

論文内容の要旨

報告番号		氏名	添田 哲弘
<p>The Factor VIIIa C2 Domain (Residues 2228-2240) Interacts with the Factor IXa Gla Domain in the Factor Xase Complex</p> <p>(活性化第VIII因子のC2ドメイン(残基2228-2240)はFactor Xase複合体における活性化第IX因子のGlaドメインと相互作用する)</p>			

論文内容の要旨

活性化血液凝固第 VIII 因子(FVIIIa)は、リン脂質膜上で活性化第 IX 因子(FIXa)と Factor Xase 複合体を形成し、第 X 因子(FX)活性化を約 10^6 倍促進する。FVIII 又は FIX の先天的欠乏症として知られる血友病 A 又は B では、Factor Xase 複合体の活性が低下し、安定したフィブリン形成が障害されるために重大な出血症状をきたす。したがって、Factor Xase 複合体における FVIIIa 及び FIXa の機能を解析することは、その複合体の凝固反応における機能ならびに血友病の病態解明において極めて重要である。

FVIII はアミノ酸組成の相同性により A、B、C の3ドメインに分類され、A1-A2-B-A3-C1-C2 の順に配列している。中でも C 末端の C2 ドメインはリン脂質への結合に関与し、FX 活性化に必須なドメインである。さらに、FIXa の Gla ドメインもリン脂質との結合に関与している。Blosteinら(JBC, 2003)は、FIXa Glaドメインが FVIIIa と結合することを報告していたが、FVIIIa の結合領域は不明であった。そこで我々は、C2 ドメインが FIXa Gla ドメインと同様リン脂質結合ドメインであること、また立体構造的に近い位置にあることに着目し、両者の相互作用について検討した

ELISA にて、固相化したリコンビナント C2 ドメイン(rC2)に対し FIXa は直接結合した。また表面プラズモン共鳴法により、sensor chip に固相化した FIXa に対する rC2 との Kd は 107 nM であった。この結合反応は、キモトリプシンにより Gla ドメインを除去した FIXa では認められず、抗 FIXa Glaドメイン抗体により抑制されたことから、FIXa Glaドメインに対する FVIIIa の結合領域は C2 ドメインであることがわかった。さらに V8 プロテアーゼ処理後精製した rC2 フラグメントや合成 C2 ペプチドを用いた結合競合実験により、C2 ドメイン上の FIXa 結合部位は残基 2228-2240 であることも明らかになった。本領域は、C2 ドメイン内のリン脂質膜との結合に重要な残基と近接していたが、overlap していなかった。残基 2228-2240 の合成 C2 ペプチドはリン脂質存在下での FIXa/FVIIIa による FX 活性化を濃度依存的に 95%まで抑制したことから、本領域が Factor Xase 複合体活性発現に重要な役割を果たしていることが示された。