

論文内容の要旨

報告番号		氏名	中島 由翔
<p>The C-terminal acidic region in the A1 domain of factor VIII facilitates thrombin-catalyzed activation and cleavage at Arg³⁷²</p> <p>第 VIII 因子 A1 ドメイン C 末端酸性領域は、トロンビン惹起活性化と Arg³⁷² 開裂を制御する</p>			

論文内容の要旨

【背景・目的】第 VIII 因子(FVIII)は、トロンビンにより Arg³⁷², Arg⁷⁴⁰, Arg¹⁶⁸⁹ が開裂され活性化される。我々は、FVIII A2 残基に Arg³⁷² 開裂を制御するトロンビン結合部位を同定した(BJH 2007)。また、FVIII A1 残基が、Arg³⁷² 開裂反応に関連するトロンビンの exosite 1 領域に結合する事を報告した(JBC 2005)。一方、hirudin のカルボキシル末端アミノ酸残基 54-65 に相当する hirugen はトロンビンと高い親和性を有し、hirugen のアミノ酸配列は FVIII A1 残基酸性領域と類似している。そこで、我々は FVIII A1 残基酸性領域 337-372 に Arg³⁷² 開裂を制御するトロンビン結合部位が存在するのではないかと仮定し、検証した。

【方法・結果】FVIII A1 残基の硫酸化 337-353 合成ペプチドと 354-372 合成ペプチドを用意し、トロンビンによる FVIII の活性化及び開裂反応を比較したところ、硫酸化 337-353 合成ペプチドは FVIII 活性化及び開裂反応を優位に抑制したが、354-372 ペプチドは抑制しなかった。トロンビンと、FVIII A1 残基の硫酸化 340-350 合成ペプチドの架橋産物をエドマン分解による N 末端アミノ酸配列分析で解析すると、FVIII A1 残基 344-349 がトロンビン結合部位であることが示唆された。そこで、FVIII A1 残基 344-349 を Ala に置換した FVIII 変異体(E344A/E345A, Y346A, D347A/D348A/D349A)を BHK 細胞で発現・精製し、トロンビンによる FVIII の活性化及び開裂反応を FVIII 野生株(WT)と比較した。E344A/D345A の活性化のピーク値は WT と差はなかったが、Y346A 及び D347A/D348A/D349A における活性化のピーク値は WT と比較して 0.5-0.6 倍低下した。Arg³⁷² 開裂を Western blotting を用いて経時的に比較したところ、Y346A 及び D347A/D348A/D349A は WT より 0.8-0.9 倍開裂速度定数が低下した。次に、FVIII A1 残基 337-346 に hirugen のアミノ酸配列を組み込んだ FVIII 変異体(A1 hirugen)を作製し、トロンビンによる Arg³⁷² 開裂反応に起因する FVIII 活性化反応に影響を及ぼすのかどうかを検討した。A1 hirugen における活性化のピーク値は WT と比較して 1.5 倍上昇し、また Arg³⁷² 開裂反応は WT より 2.5 倍開裂速度定数が増加した。最後に、表面プラズモン共鳴法を用いて Y346A, D347A/D348A/D349A, A1 hirugen 及び WT とトロンビンの結合能を比較した。Y346A 及び D347A/D348A/D349A における解離定数(K_D)は WT より 3-6 倍高値であった。一方、A1 hirugen と WT の K_D に差はなかったが、A1 hirugen の結合速度定数(k_{ass})は WT より 1.8 倍高値であった。

【結論】FVIII A1 残基 346-349 は Arg³⁷² 開裂を制御するトロンビン結合部位であり、A1 hirugen は、WT に比して効率的にトロンビンによる Arg³⁷² 開裂に起因する活性化反応を引き起こす。