

◆トピックス◆

プロテイン S : 最近の話題とその欠損マウス

羽室 強*



羽室 強

Protein S : Recent topics and deficient mice

Tutomu HAMURO*

1992年3月 熊本大学大学院薬学研究科
博士前期課程修了

同年4月 化学及血清療法研究所 入所

2008年1月 博士(薬学)取得 熊本大学
現在に至る

Key words: protein S deficient mice, protein C, C4b binding protein, tissue factor pathway inhibitor

1. はじめに

プロテイン S (以下 PS と略) は γ -カルボシキグルタミン酸 (Gla) を含むビタミン K 依存性のタンパク質であり, 1977 年に DiScipio らによって報告されて以来¹⁾, 血液凝固の制御因子として今日広く知られている (「S」の文字は発見者らが住む米国 Seattle のイニシャルから付けられている). 本誌でも血栓症との関連性から, PS の欠乏症や分子異常についてこれまで幾度か取り上げられてきた²⁾⁻⁶⁾. ヒト PS の生化学的性質およびタンパク質構造について概略すると, ①分子量約 8 万の 1 本鎖糖タンパク質であり, 肝臓のほか, 血管内皮細胞, 骨髄巨核球などで産生される (図 1). ②成熟 PS は 635 残基のアミノ酸から成る. NH₂ 末端から順に, Gla ドメイン (1-46 残基), トロンビン感受性ドメイン⁷⁾ (TSR, 47-75 残基), 4 つの上皮成長因子 (EGF) 様ドメイン (76-242 残基) およびラミニン球状様ドメイン繰り返し構造 (LGR) を 2 つ持つ性ホルモン結合グロブリン (SHBG) 様ドメイン (243-635 残基) 構造を含む. ③血漿中の濃度は約 25 μ g/mL (350nM) であり, その 60% は C4b 結合タンパク質 (C4BP) と複合体を形成し, 残り 40% が遊離型で存在する. ④ PS は活性化プロテイン C (APC) の活性

化 V 因子 (FVa) および活性化 VIII 因子 (FVIIIa) の分解/不活化を促進する. ⑤ PS は単独でも FVa および活性化 X 因子 (FXa) を抑制する^{8) 9)}. ⑥ PS は Gla ドメインと Ca²⁺ を介して酸性リン脂質のホスファチジルセリンに強く結合する.

PS とアミノ酸配列上 44% の相同性を持つ分子として, growth-arrest specific gene 6 (Gas 6) がある. Gas 6 は PS と類似したドメイン構造を持つが, TSR は存在しない (図 1). ホモ接合体の Gas 6 欠損マウスは正常に出生し, 自発的な血栓傾向や出血傾向はなく, むしろ血栓症モデルにおいては血栓形成に対する耐性を示す^{10) 11)}. Gas 6 は受容体型チロシンキナーゼ Axl, Sky, Mer のリガンドとして機能していると考えられている¹²⁾. 紙面の都合上, Gas 6 の機能に関する詳細は割愛するが, PS と Gas 6 の生理機能上の類似性については未だ不明な点が多い.

ヒトにおいて, 先天性 PS 欠損症は常染色体優性遺伝であり, 患者の多くはヘテロ接合体で, 大人になってから深部静脈血栓症, 肺塞栓, 脳塞栓などを発症する. ホモ接合体は極めて稀であり, 新生児期に電撃性紫斑病といわれる激しい出血症状を呈することが多い. 日本では, PS Tokushima と呼ばれる 155 番目 (Met から数えると 196 番目) の Lys が Glu に変異した変異

*一般財団法人化学及血清療法研究所 [〒 860-8568 熊本市大窪 1-6-1]

The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, KAKETSUKEN

[1-6-1 Okubo Kumamoto 860-8568, Japan]

Tel: 096-344-2183 Fax: 096-344-9234 e-mail: hamuro@kaketsuken.or.jp

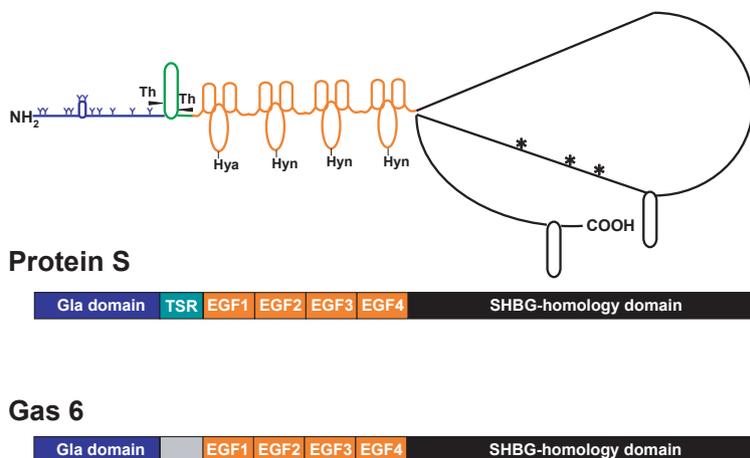


図1 PSおよびGas 6のドメイン構造

PSはNH₂末端より順に、11個のGla残基(図中にYで表示)を持つGlaドメイン、トロンビン感受性ドメイン(TSR, 矢印はトロンビンによる切断部位)、erythro-β-ヒドロキシアスパラギン酸(Hya)あるいはerythro-β-ヒドロキシアスパラギン(Hyn)を含む4つの上皮成長因子(EGF)様ドメイン、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)様ドメインからなる。FVII, FIX, FX, Protein C, およびProtein ZのEGF1ドメインにも1つのHyaが存在するが、Hynを持つ凝固関連のビタミンK依存性タンパク質はPSのみである³⁸⁾。PSのHya/Hynは抗凝固活性やC4BPへの結合に関係ないという報告があるものの³⁹⁾、EGF1内にあるβ-ヒドロキシル化を受ける95番目のAspをAlaに変異させるとAPC補酵素活性が著しく低下するという報告もあり¹⁷⁾、Hya/Hynの役割については今後の研究が待たれる。Gas 6はPSと同じドメイン構造を持つが、トロンビンによる切断部位はない。Gas 6もHya/Hynを持つかどうかは不明であるが、βヒドロキシル化のコンセンサス配列(Cys-X-Asp/Asn-X-X-X-Tyr/Phe-X-Cys)はGas 6の4つのEGFドメインにも存在することから、Gas 6もβヒドロキシル化を受ける可能性が考えられる。3つのN型糖鎖結合ポテンシャル部位(Asn-X-Ser/Thr/Cys)を*で記す。血液凝固関連因子の翻訳後修飾はHanssonらの総説³⁸⁾によくまとめられており、読者にお勧めしたい。

型PSが独立した2つのグループから報告されている^{13) 14)}。Hayashiらの報告によると、PS TokushimaはAPCおよびFXaへの結合能が消失しており、APC補酵素活性およびprothrombinase阻害活性を持たない¹⁵⁾。PS Tokushimaの遺伝子を持つ頻度は一般的に1.8%程度と比較的高いが、深部静脈血栓症の患者ではPS Tokushimaの遺伝子を持つ頻度は9.3%まで高まり、深部静脈血栓症発症のリスクファクターである¹⁶⁾。PS Tokushimaのホモ接合体は極めて稀であるものの、深部静脈血栓症患者161名中に2名のホモ接合体が含まれることから、血栓症との関連性の深さが窺える¹⁶⁾。一方、ごく最近、Anderssonらは、PS Tokushimaの変異部位と同じ155番目のLysをAlaに置換した変異体を作製し、この変異体はAPC補酵素活性がわずかに低下するのみであることを報告している¹⁷⁾。LysからGluあるいはAlaへの変異の違いでAPC補酵素活性が大きく変わることは非常に興味深い。なお、PS Tokushimaは欧米人には存在せず、plasminogen

Tochigi¹⁸⁾と同じくアジア人特有の遺伝子変異である。

2. PS欠損マウスからの情報

2009年、SallerらはPS遺伝子(*Pros*)のエクソン3から7までを欠損させ、ヘテロ接合体のPS欠損(*Pros*^{+/-})マウスを作成した¹⁹⁾。*Pros*^{+/-}は正常に出生し、解剖学的な異常は確認されなかった。野生型(WT)に比べて、*Pros*^{+/-}の血漿中のPSのタンパク質量は40%、APCコファクター活性は50%程度まで低下していたものの、PT, APTTなどの凝血的パラメータはWTと同じであった。生後12ヶ月経過しても*Pros*^{+/-}の異常死や血栓症の自然発症は見られず、血漿中のトロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT)のレベルもWTと同程度であった。しかしながら、少量の組織因子(TF)を*Pros*^{+/-}の下大静脈より注入した場合、WTと比べて生存率が著しく低下した(図2A)。*Pros*^{+/-}の肺に多数の血栓がみられることか

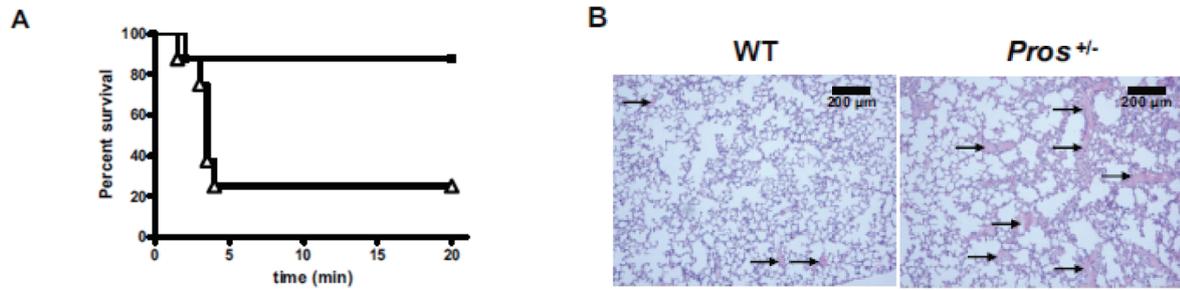


図2 組織因子誘発静脈血栓モデル

(A) 麻酔下にてマウス下大静脈より希釈した組織因子を注入し、経時的に生存率を観察した。20 分後の生存率は、野生型マウス (■: n=8) で 87.5% であるのに対し、PS ヘテロ欠損マウス (△: n=8) では 25% であった。
 (B) 組織因子注入後の野生型マウス (WT) ならびに PS ヘテロ欠損マウス (*Pros*^{+/-}) の肺組織のヘマトキシリン-エオシン染色像。WT では血栓がわずかに認められるのに対し、*Pros*^{+/-} では多数の血栓の沈着が観察される。
 文献 19) より引用。The research was originally published in *Blood*. ©American Society of Hematology.

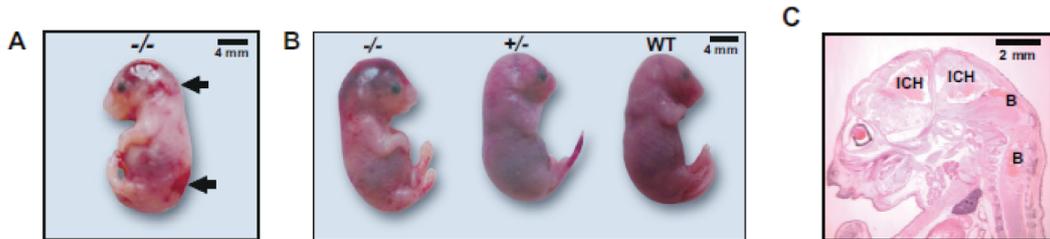


図3 *Pros*^{-/-}, *Pros*^{+/-}, WT の胎齢 17.5 日における胚とその顕微鏡写真

(A) 胎齢 17.5 日の *Pros*^{-/-} の写真。頭部に激しいアザがあり、全身、特に背部に局所的な出血あるいは血栓が見られる。
 (B) 胎齢 17.5 日の *Pros*^{-/-} は *Pros*^{+/-} や WT と同じ大きさである。
 (C) 胎齢 17.5 日の *Pros*^{-/-} の組織のヘマトキシリン-エオシン染色像。広範囲な頭蓋内出血 (ICH) 及び全身に亘る二次的出血 (B) が生じている。
 文献 19) より引用。The research was originally published in *Blood*. ©American Society of Hematology.

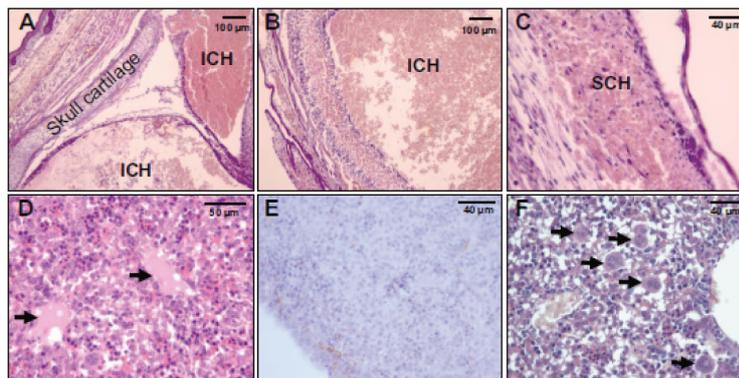


図4 *Pros*^{-/-} 胎齢 17.5 日の血栓性症状

脳では広範囲な頭蓋内出血 (ICH) が生じ (A, B), 皮下出血も見られる (C)。肝臓では血栓 (D) やフィブリン (E, 茶色) の沈着が確認される。巨核球の数の増加も見られ (F, 矢印) 末梢性の血小板減少が生じていると考えられる。A, B, C, D, F はヘマトキシリン-エオシン染色。E はフィブリンの免疫染色。
 文献 19) より引用。The research was originally published in *Blood*. ©American Society of Hematology.

ら、 $Pros^{+/-}$ はTFに対する感受性が高まり、肺血栓を生じた結果死亡したと推定された(図2B)。

一方、ホモ接合体のPS欠損($Pros^{-/-}$)マウスは全て胎仔期に死亡し、出生してこなかった。胎齢17.5日の胎仔27例のgenotypeを調べたところ、7例が $Pros^{-/-}$ (26%)、12例が $Pros^{+/-}$ (44%)、8例がWT(30%)とメンデルの法則に従って生存しており、胎仔の大きさにも違いはみられないことから(図3B)、致命的な変化は胎齢17.5日から誕生までの間に起きると考えられた。しかし、胎齢17.5日の $Pros^{-/-}$ の胎仔は、生存しているものの全身に亘って局所的な出血あるいは血栓の跡が見られ、特に背部で顕著であった(図3A)。顕微鏡観察でも脳や背部に重度の出血が確認された(図3C)。組織学的観察の結果、顕著な頭蓋内出血(図4A, B)に加えて、皮下出血(図4C)、肝臓での血栓並びにフィブリン沈着(図4D, E)が確認された。さらに肝臓で巨核球の数が増えており、末梢性血小板減少を引き起こしているものと考えられた。これらの結果より、 $Pros^{-/-}$ は凝固亢進による激しい血栓形成と消費性の凝固障害による二次的な出血で、胎齢後期に死亡してしまうことが明らかとなった。 $Pros^{-/-}$ マウスの症状はヒトでのホモ接合体PS欠損症の症状と似ており²⁰⁾、PSの血液凝固制御機能の重要性が窺える。 $Pros^{-/-}$ の胎齢17.5日の症状はまた、プロテインCのホモ欠損マウスのそれと類似しているが^{21) 22)}、 $Pros^{-/-}$ は全く出生しないのに対し、プロテインCのホモ欠損マウスはわずかながら出生するものの、激しい消費性凝固障害で生後24時間以内に死亡する点で異なる。

3. PSの最近の話題

1) APC非依存的なPSの抗凝固活性

*In vitro*において、PSは単独でもFVaおよびFXaを阻害することが以前より報告されている^{8) 9)}。PSはまた、リン脂質への結合を介しても抗凝固活性を発揮する²³⁾。最近Heebらは、PSに Zn^{2+} が結合していること、 Zn^{2+} がないとPSのFXaへの結合能が弱まり、PS単独によるprothrombinase(FXa/FVa)に対する阻害活性が低下することを報告した²⁴⁾。精製条件如何では

PSから Zn^{2+} が遊離することもあり、PSの機能評価には Zn^{2+} の関与を十分考慮する必要がある。

2006年、HackengらはPS非存在下の血漿ではtissue factor pathway inhibitor(TFPI)のFXa阻害活性が低下することを報告した²⁵⁾。その後、活性化VII因子(FVIIa)/TF複合体に対するTFPIの阻害活性にはPSは影響を及ぼさないこと²⁶⁾、先天性あるいは後天性PS欠損患者35名において、血漿中のPS量の低下に加えてTFPI量も低下していること²⁷⁾、*in vitro*の試験において、精製したPSとTFPIが結合($K_d=21\sim 28nM$)することが報告された^{24) 27)}。今年に入ってMaurissenらは、遊離型およびC4BP結合型の両方のPSが減少しているType Iヘテロ接合体PS欠損患者の血漿を用いた検討から、PSあるいはTFPIに対する中和抗体の処理前後のトロンビン生成量の変化量を指標にすることで、患者血漿中のPSやTFPIの機能低下の程度を知ることが可能となり、PS欠損患者の血栓症発症のリスクを予測する手段につながる可能性を提案している²⁸⁾。

2) PSの抗凝固活性以外の機能

1995年、StittらはPSがチロシンキナーゼ受容体ファミリーであるTyro 3/Axlのリガンドとして機能し、細胞増殖活性を示すことを報告した²⁹⁾。また、Luiらはマウス虚血脳梗塞モデルを用いて、PSに神経細胞の保護作用があることを見出した³⁰⁾。Tyro 3/Axlは神経細胞に顕著に発現していることから、PSの神経保護効果は抗凝固作用のみならず、PS-Tyro 3/Axl経路を介したものである可能性を示唆している。TakagiらはマウスへのLPS投与による急性肺傷害モデルにおいて、PSの投与によりサイトカイン産生が抑制され、肺傷害を軽減することを報告し、このPSの作用にTyro 3/Axl経路の関与を示唆している³¹⁾。Tyro 3/AxlリガンドとしてのPSのこうした機能については、Hafiziらの総説を参照されたい³²⁾。

2003年、Andersonらはマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食作用を促進する因子が血漿中に存在することを見出し、その本体がPSであることを報告した³³⁾。アポトーシスを生じた細

胞の表面では酸性リン脂質であるホスファチジルセリンが豊富に含まれることが知られているが、PSはCa²⁺依存的にホスファチジルセリンに結合し、何らかの機序でマクロファージの貪食作用を促進しているものと考えられる（これらの作用におけるZn²⁺の関与は不明である）。なお、PS-C4BP複合体は逆にこの貪食作用を抑制する³⁴⁾。これらの結果は、PSの本質的な機能に関連するものと考えられ、今後一層注目されよう。

3) PS-C4BP 複合体の抗凝固機能について

PSの60%はC4BPに結合しているといわれ、C4BPの濃度(200nM)から考えると血漿中のC4BPのほとんどはPSに結合している計算になる。これまでC4BPはPSに結合することにより、PSのAPC補酵素活性を阻害すると考えられてきた。2008年、MaurissenらはAPCによるFVa中の2箇所(R³⁰⁶, R⁵⁰⁶)の切断部位それぞれについて、PSおよびPS-C4BPのAPC補酵素活性を詳細に評価した³⁵⁾。その結果、遊離型PS存在下ではAPCによるR³⁰⁶切断活性が約18倍促進するがR⁵⁰⁶切断活性は変化しないこと、PS-C4BP存在下でもR³⁰⁶切断活性は約11倍促進するが、R⁵⁰⁶切断活性は逆に1/3~1/4に低下することを報告している。FVaを基質とした場合、PS-C4BP複合体はAPCのR⁵⁰⁶の切断活性を低下させるため、APCのFVa不活化能はPS単独の時に比べて低下すると考えられよう。しかし、R⁵⁰⁶が変異してAPCに切断されなくなったfactor V_{Leiden}を基質とした場合、PS-C4BP複合体によってAPCのR³⁰⁶切断活性は約13倍に促進されるという。従って、factor V_{Leiden}保因者においてはPS-C4BP複合体もAPCを介した抗凝固に重要な役割を持っていることが示唆される。なお、マウスPSはC4BPと複合体を形成しないため³⁶⁾、PS-C4BP複合体の機能をマウスで評価するのは困難であろう。PS-C4BP複合体に関する知見はRezendeらの総説を参考にされたい³⁷⁾。

4. おわりに

PS欠損マウスの内容を要約すると、① *Pros*^{+/-}マウスは正常に出生し成長するものの、*Pros*^{-/-}マウスは胎齢17.5日から出生までの間に致死的な

血栓症と二次的な出血を引き起こし、出生してこない。② *Pros*^{+/-}マウスはTFに対する感受性が高まり、肺塞栓を起こしやすくなっている。③顕微鏡観察による検討から、胎齢17.5日の*Pros*^{-/-}では頭蓋内出血、皮下出血、および肝臓での血栓形成が確認された。④胎齢17.5日までの胎仔のサイズはWTと*Pros*^{-/-}で同等であることから、PSは胚形成には無関係であり、胎齢後期の血液凝固の制御に重要な役割を果たしているものと推定される。*Pros*^{-/-}の胎仔の症状はPCホモ欠損マウスのそれと類似していることから、*Pros*^{-/-}の胎仔はAPC補酵素活性の消失によって血栓を引き起こした可能性が考えられる。しかし、PSのAPC非依存的な抗凝固活性、Tyro 3/Axlのリガンドとしての機能、あるいはアポトーシス細胞の貪食作用促進活性など様々な機能も分かってきており、PS欠損マウスの症状についてはこれらの機能の消失による影響も考慮する必要がある。今後、PSの機能を限定的に欠失させた遺伝子改変マウスの作出が行なわれ、PSの生理的役割がより明らかになることを期待したい。

謝 辞

御校閲をいただきました岩永貞昭先生（一般財団法人 化学及血清療法研究所 顧問）、中垣智弘博士（一般財団法人 化学及血清療法研究所）に御礼申し上げます。

Disclosure of Conflict of Interests

The author is an employee of Kaketsuken.

文 献

- 1) DiScipio RG, Hermondson MA, Yates SG, Davie EW: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* **16**: 698-706, 1977.
- 2) 中山草之, 小嶋哲人: プロテイン S 欠乏症. *血栓止血誌* **12**: 235-239, 2001.
- 3) 井上須美子, 藤井智美, 浦田美秩代, 和田結, 小野美由紀, 栗原正子, ウォラワン チュンピア, 飯田廣子, 木下幸子, 津田博子, 康東天, 濱崎直孝: プロテイン S 活性低下を示した血栓症患者に見出された変異型プロテイン S 分子の機能解析. *血栓止血誌* **16**: 641-649, 2005.
- 4) 岡田浩美: 先天性プロテイン S 欠乏症の分子生物学. *血栓止血誌* **17**: 128-135, 2006.

- 5) 濱崎直孝：日本人特有の血栓性素因-プロテイン S, プロテイン C 分子異常-。血栓止血誌 **17** : 136-143, 2006.
- 6) 小嶋哲人：先天性凝固阻止因子欠乏症 (antithrombin, protein C, protein S 欠乏症)。血栓止血誌 **20** : 484-486, 2009.
- 7) Morita T, Mizuguchi J, Kawabata S, Iwanaga S : Proteolytic Cleavage of Vitamin K-Dependent Bovine Plasma Protein S by α -Thrombin and Plasma Serine Protease. *J Biochem* **99** : 561-568, 1986.
- 8) Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH : Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* **268** : 2872-2877, 1993.
- 9) Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH : Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 2728-2732, 1994.
- 10) Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlbäck B, Carmeliet P : Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med* **2** : 215-221, 2001.
- 11) 下田純一, 濱本高義 : Gas6 の欠損マウス。血栓止血誌 **12** : 514-521, 2001.
- 12) 大橋一正, 水野健作 : Gas6 とそのレセプター。血栓止血誌 **9** : 462-466, 1998.
- 13) Yamazaki T, Sugiura I, Mastushita T, Kojima T, Kagami K, Takamatsu J, Saito H : A phenotypically neutral dimorphism of protein S : The substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res* **70** : 395-403, 1993.
- 14) Shigekiyo U, Kawaguchi S, Saito S, Hondo H, Nishioka J, Hayashi T, Suzuki K : Protein S Tokushima : an abnormal protein S found in a Japanese family with thrombosis. *Thromb Haemost* **270** : 244-246, 1993.
- 15) Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K : Molecular mechanism of the dysfunction of protein S (Tokushima) (Lys155-->Glu) for the regulation of the blood coagulation system. *Biochim Biophys Acta* **1272** : 159-167, 1995.
- 16) Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T. Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* **107** : 1737-1738, 2006.
- 17) Andersson HM, Arantes MJ, Crawley JT, Luken BM, Tran S, Dahlbäck B, Lane DA, Rezende SM : Activated protein C cofactor function of protein S : a critical role for Asp95 in the EGF1-like domain. *Blood* : Epub, 2010.
- 18) Miyata T, Iwanaga S, Sakata Y, Aoki N : Plasminogen Tochigi : inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci USA* **79** : 6132-6135, 1982.
- 19) Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN, Azevedo M, Chrast R, Fernandez J, Schapira M, Hackeng TM, Griffin JH, Angelillo-Scherrer A : Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood* **114** : 2307-2314, 2009.
- 20) Mahasandana C, Veerakul G, Tanphaichitr VS, Suvatve V, Opartkiattikul N, Hathaway WE : Homozygous protein S deficiency : 7-year follow-up. *Thromb Haemost* **76** : 1122, 1996.
- 21) Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JCY, Carmeliet P, Collen D, Castellino FJ : Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **102** : 1481-1488, 1998.
- 22) 下瀬克郎, 濱本高義, 水口純 : プロテイン C の欠損マウス。血栓止血誌 **10** : 219-222, 1999.
- 23) van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM, Bouma BN : The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb Haemost* **76** : 397-403, 1996.
- 24) Heeb MJ, Prashun D, Griffin JH, Bouma BN : Plasma protein S contains zinc essential for efficient activated protein C-independent anticoagulant activity and binding to factor Xa, but not for efficient binding to tissue factor pathway inhibitor. *FASEB J* **23** : 2244-2253, 2009.
- 25) Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J : Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** : 3106-3111, 2006.
- 26) Ndonwi M, Broze GJ : Protein S enhances the tissue factor pathway inhibitor inhibition of factor Xa but not its inhibition of factor VIIa-tissue factor. *J Thromb Haemost* **6** : 1044-1046, 2008.
- 27) Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Rosing J, Hackeng TM : Hereditary and acquired protein S deficiencies are associated with low TFPI levels in plasma. *J Thromb Haemost* **8** : 294-300, 2009.
- 28) Maurissen LF, Castoldi E, Simioni P, Rosing J, Hackeng TM : Thrombin generation-based assays to measure the activity of the TFPI-protein S pathway in plasma from normal and protein S-deficient individuals. *J Thromb Haemost* : Epub, 2010.
- 29) Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, Masiakowski P, Ryan TE, Tobkes NJ, Chen DH, DiStefano PS, Long GL, Basilico C, Goldfarb MP, Lemke G, Glass DJ, Yancopoulos GD : The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* **80** : 661-670, 1995.
- 30) Liu D, Guo H, Griffin JH, Fernández JA, Zlokovic BV : Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice. *Circulation* **107** : 1791-1796, 2003.
- 31) Takagi T, Taguchi O, Aoki S, Toda M, Yamaguchi A, Fujimoto H, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Ramirez AY, Naito M, Yano Y, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujiwara A, Takei Y, Morser J, Gabazza EC : Direct effects of protein S in ameliorating acute lung injury. *J Thromb Haemost* **7** : 2053-2063, 2009.
- 32) Hafizi S, Dahlbäck B : Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J* **273** : 5231-5244, 2006.
- 33) Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E : Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* **4** : 87-91, 2003.
- 34) Kask L, Trouw LA, Dahlbäck B, Blom AM : The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* **279** : 23869-23873, 2004.
- 35) Maurissen LF, Thomassen MC, Nicolaes GA, Dahlbäck B, Tans G, Rosing J, Hackeng TM : Re-evaluation of the role of the protein S-C4b binding protein complex in activated protein C-catalyzed factor Va-inactivation. *Blood* **111** : 3034-3041, 2008.
- 36) Rodriguez de Córdoba S, Pérez-Blas M, Ramos-Ruiz R, Sánchez-Corral P, Pardo-Manuel de Villena F, Rey-Campos J : The gene coding for the beta-chain of C4b-binding protein (C4BPB) has become a pseudogene in the mouse. *Genomics* **21** : 501-509, 1994.
- 37) Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA : Coagulation, inflammation, and apoptosis : different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood* **103** : 1192-1201, 2004.
- 38) Hansson K, Stenflo J : Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *J Thromb Haemost* **3** : 2633-2648, 2005.
- 39) Nelson RM, VanDusen WJ, Friendman PA, Long GL : β -Hydroxyaspartic acid and β -hydroxyasparagine residues in recombinant human protein S are not required for anticoagulant cofactor activity or for binding to C4b-binding protein. *J Biol Chem* **266** : 20586-20589, 1991.