

# 血液凝固 VIII 因子の構造と機能について

## Coagulation factor VIII: its molecular structure and functional mechanism

奥田美香\*, 橋本康平, 荒木辰也, 中富 靖, 濱本高義  
Mika OKUDA, Kohei HASHIMOTO, Tatsuya ARAKI, Yasushi NAKATOMI, Takayoshi HAMAMOTO

**Key words:** coagulation factor VIII, crystal structure, von Willebrand factor

### Points

- ① FVIII は, FIXa による FX 活性化の補因子であり, 正常な止血機構を維持するために重要な因子である.
- ② 結晶構造解析は, 2008 年以降, B ドメイン欠失型分子を中心に進められている.
- ③ A ドメインは, FVIII の活性発現に寄与し, 特に A2 ドメインはその役割の中心を担う.
- ④ B ドメインは, FVIII の細胞内プロセッシングや細胞内輸送に関与する. この機能には B ドメイン内の N 型糖鎖が関与している.
- ⑤ C ドメインは, リン脂質や FIXa と相互作用し, 特に C2 ドメインがその役割の中心を担う.

### はじめに

血液凝固 VIII 因子(FVIII)は正常な止血機構を維持するための重要な補因子のひとつであり, 循環血液中ではキャリアタンパク質である von Willebrand factor (VWF) と複合体を形成している. FVIII の血中濃度は 100~250 ng/mL (約 1 nM), その半減期は約 12 時間である. 先天的に FVIII が欠損または活性低下をきたすと, 血友病 A と呼ばれる伴性劣性遺伝形式の血液凝固障害を生じる.

1936 年, 米国の Patek らが FVIII の存在を示唆し<sup>1)</sup>, 1973 年, 血中での FVIII/VWF 複合体が実証された<sup>2)</sup>. その後, 遺伝子工学技術の進歩により FVIII の cDNA が単離され, 1984 年, その全アミノ酸配列が明らかにされた<sup>3,4)</sup>. これを契機に, 血友病 A 患者の遺伝子変異解析や FVIII のタンパク質機能解析

が精力的に進められるとともに, 遺伝子組換え型 FVIII (rFVIII) 製剤が臨床応用されるに至っている.

本稿では, これまでの報告をもとに, 主に FVIII の分子構造と機能に焦点を絞って解説する. なお, FVIII に関しては, 過去, 本誌でいろいろな角度から review されているので参照されたい<sup>5-7)</sup>.

### i) FVIII の生合成

FVIII の mRNA やそのタンパク質は様々なヒト組織で確認されているが, 主要な生合成場所は肝臓, 中でも類洞内皮細胞と考えられている<sup>4,8)</sup>. FVIII はシグナルペプチドを含む全 2351 個のアミノ酸残基からなる 1 本鎖タンパク質として翻訳される. 小胞体内腔に移動する際に, 19 個のアミノ酸からなるシグナル配列が切断され, 25 個の Asn 残基が糖鎖修飾される. さらに小胞体内腔では, シャペロンタンパク質のカルネキシン, カルレティキュリンおよび免疫グロブリン結合タンパク質 (BiP) と相互作用

一般財団法人 化学及血清療法研究所 蛋白製剤研究部

\* 責任者連絡先: okuda-mika@kaketsuken.or.jp

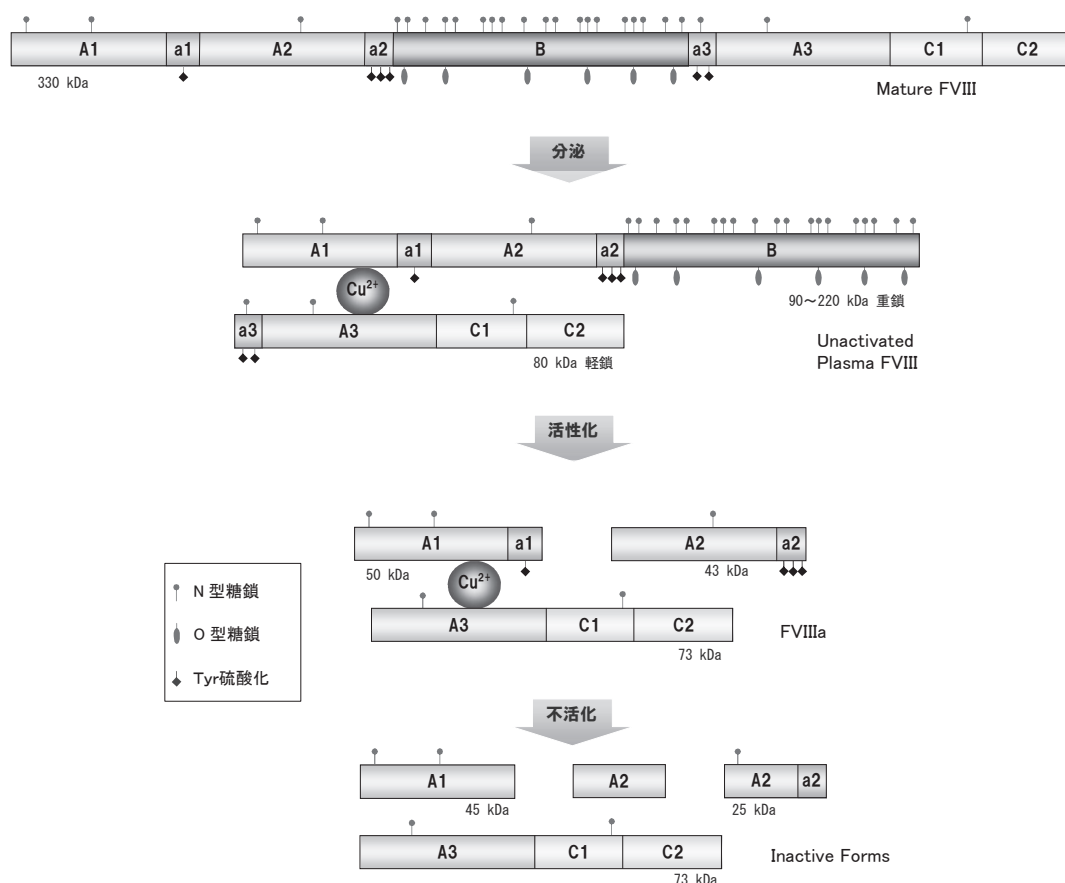


図1 FVIIIのドメイン構造とプロセッシング(文献10, 11を参考に作成)

Mature FVIII: 2332 残基のアミノ酸から成る。小胞体やゴルジ体で糖鎖や Tyr 硫酸化修飾を受ける。Unactivated Plasma FVIII: ゴルジ体にて Arg1313 や Arg1648 が切断され、重鎖と軽鎖の2本鎖となる。イオン結合を介してヘテロダイマーを形成し、循環血液中に分泌される。循環中では、B鎖のC末側が切断を受け、重鎖の分子量は90,000~220,000となる(モデルは分子量220,000)。FVIIIa:  $\alpha$ -トロンビン等により Arg740, Arg1689, Arg372 が切断され、活性型FVIIIに変換される。Inactive Forms: APCにより Arg336 と Arg562 が切断され、FVIIIaは不活化される。

し、高次構造の形成が促進される。FVIIIはER Golgi intermediate compartment protein 53/multiple combined factor deficiency protein 2(ERGIC-53/MCFD2)と結合することで小胞体からゴルジ体へ運搬される。この際の結合と解離の制御には $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が影響し<sup>9)</sup>、ERGIC-53はFVIIIのN型糖鎖を認識して、結合する。ゴルジ体に移行したFVIIIは、SerおよびThr残基へのO型糖鎖修飾、Asn残基へのマンノース修飾、さらにTyr残基の硫酸化を受け、分子としての形態を整えていく。ゴルジ体ではさらに、1本鎖FVIIIのBドメイン内Arg1313やArg1648が切断され、重鎖と軽鎖の2本鎖となり、イオン結合を介してのヘテロダイマーを形成する。その後、FVIIIは

細胞外に分泌され、循環血液中では直ちにVWFと結合し安定化される。

## ii) FVIIIの構造

### 一次構造

FVIIIは計2332個のアミノ酸残基からなる分子量約300,000の糖タンパク質である。図1に示すように、FVIIIは3つのAドメイン(A1, A2, A3)、2つのCドメイン(C1, C2)、Bドメイン、さらには、酸性アミノ酸が豊富な3つのペプチド領域(a1, a2, a3)から構成される。FVIIIはアミノ末端側からA1(アミノ酸1~336)、a1(337~372)、A2(373~710)、

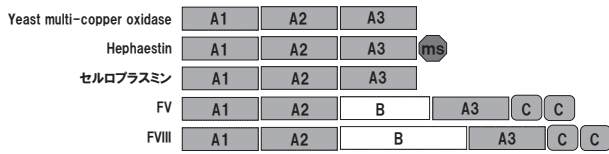


図2 Yeast multi-copper oxidase, hephaestin, セルロプラスミン, FV ならびに FVIII のドメイン構造の比較。(文献12より引用, 一部改変)

ms: membrane spanner

a2 (711~740), B (741~1648), a3 (1649~1689), A3 (1690~2019), C1 (2020~2172), C2 (2173~2332)と並ぶ(図1)。

FVIII と V 因子(FV)は同じドメイン構造(A1-A2-B-A3-C1-C2)を持ち, それらは3つのAドメインからなるトリプレット構造を示す点で, 銅結合タンパク質のセルロプラスミンと類似しており, アミノ酸配列上も FVIII のAドメインとの相同性は約40%と高い。また, セルロプラスミンは腸上皮細胞膜タンパク質の hephaestin<sup>\*1</sup>とも相同性が高く(50%以上), これら4つのタンパク質は, multi-copper oxidase family に属する酵母の fet3 と同族(homologous)である(図2)。セルロプラスミンと hephaestin は ferroxidase 活性( $\text{Fe}^{2+}$  を  $\text{Fe}^{3+}$  に変換)を示すものの, FV と FVIII は分子構造内に銅原子を有するが酸化活性は示さず, こうした祖先タンパク質とは明らかに異なる機能を持つように進化してきた点で非常に興味深い<sup>12)</sup>。

### 立体構造

2008年以降, 複数のグループよりBドメイン欠失型のFVIIIの立体構造が報告されている<sup>13-15)</sup>。いずれの報告もトライアングル状に位置したAドメインと2つのCドメインが連結した形状モデルが提唱されているが(図3),  $\text{Cu}^{2+}$  や  $\text{Ca}^{2+}$  の配位に関しては相互に一致してない。

$\text{Cu}^{2+}$  は重鎖と軽鎖によるヘテロダイマー形成に参与しており, 重鎖と軽鎖を用いた再構成実験で,  $\text{Cu}^{2+}$  の添加により重鎖と軽鎖の親和性が約100倍増大する<sup>16)</sup>。Shenら<sup>13)</sup>とNgoら<sup>14)</sup>は, A1ドメインのCys310, His315, His267とA3ドメインのHis1954, Cys2000, His2005に囲まれて $\text{Cu}^{2+}$ が配位しているとしたが, Venkateswarluはこの2箇所に加えて,

His99, His161, His1957に囲まれた位置にもう1つの $\text{Cu}^{2+}$ 配位があるという<sup>15)</sup>。一般的にも, His/Cys/MetまたはHis/His/His残基に囲まれた位置に $\text{Cu}^{2+}$ は配位するといわれており, このことは上記の報告と矛盾しない。

一方,  $\text{Ca}^{2+}$ はFVIIIの活性発現に重要であり, 複数の報告でその配位位置はGlu110, Asp116, Glu122, Asp125, Asp126で囲まれた領域にあるとされており, 事実, これらの残基の点変異により $\text{Ca}^{2+}$ との親和性が低下する<sup>17)</sup>。これに加え, Shenら<sup>13)</sup>はAsp538とAsp542, Venkateswarlu<sup>15)</sup>はGlu604とGlu1908の近傍を $\text{Ca}^{2+}$ の配位位置としている。

また, Venkateswarluは, 分子動力学法(MD法)<sup>\*2</sup>によるシミュレーションでFVIIIとFVIIIaの構造の違いを解明した(図3)。FVIIIのA1とA2ドメイン間に位置するa1酸性領域は柔軟性に富み, 活性化IX因子(FIXa)と結合すると推定されるA2ドメインのTyr555-Asp569ループ領域をマスクしている。一方, FVIIIaでは, Arg372切断によりa1がA1ドメイン側に移行することにより, このTyr555-Asp569ループ領域と周辺領域の露出を招くという<sup>15)</sup>。こうした不活性状態の安定化機構はFVにも備わっているようで, FVのA2ドメイン内の活性化X因子(FXa)結合部位は, FVのBドメインがマスクしている。トロンビンによるBドメイン切断の結果, FXa結合部位が露出し, 活性型のコファクター(FVa)となる<sup>18,19)</sup>。

### iii) 各ドメインの構造と機能

#### Aドメイン

FVIIIには3つのAドメインが存在するが, 中でもA2ドメインはFVIIIの機能発現に非常に重要である。A2ドメイン内の484-509や558-565の合成ペプチド添加により, FIXaによるFXa生成が抑制されることから, A2ドメインはFIXaとの結合サイトを含む<sup>20,21)</sup>。また, FVIIIaのA2ドメインは生理的条件下で他のドメイン(A1とA3-C1-C2)から解離し, 凝固活性を失う<sup>22)</sup>。事実, 軽症血友病患者で同定されたArg531→His変異のFVIIIはA2ドメインの解離速度が高まっており, トロンビンで活性化されると30秒以内には完全に失活するという<sup>23)</sup>。

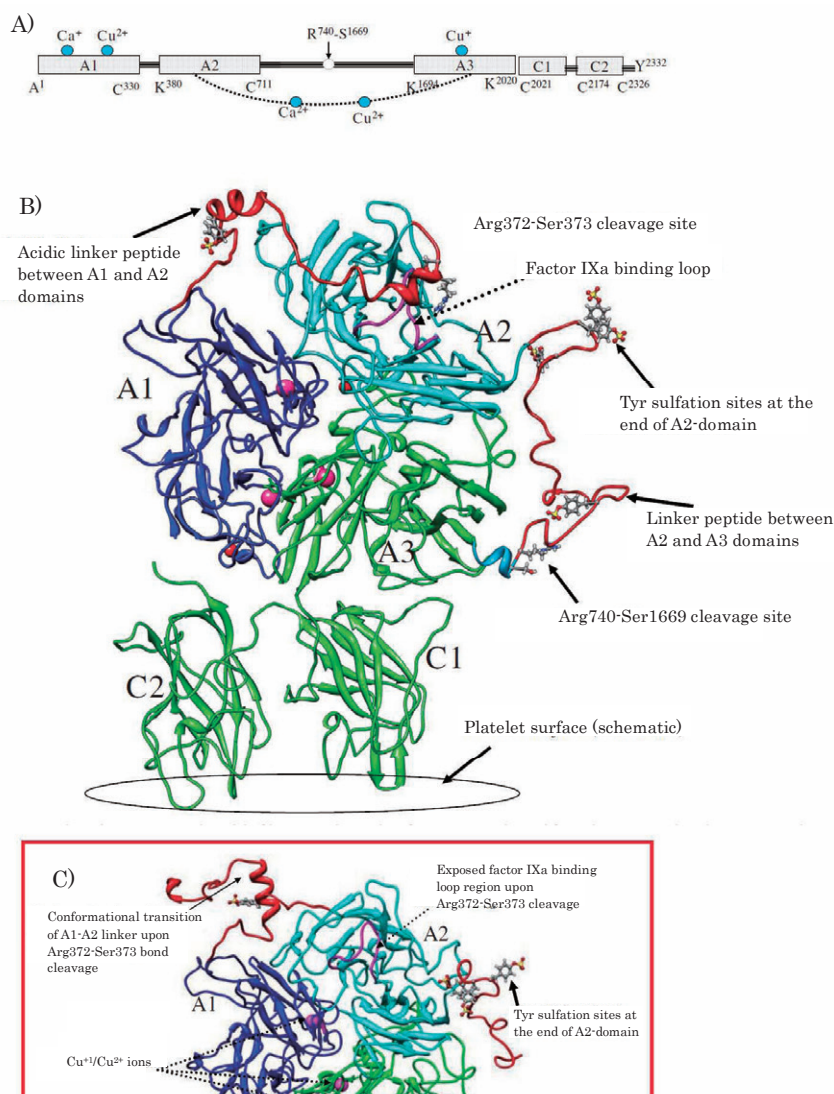


図3 分子動力学スナップショットによる B ドメイン欠失型 FVIII の溶液中の構造モデル(文献 15 より引用し、一部改変)  
 A) B ドメイン欠失型 FVIII のドメインの配列. B) B ドメイン欠失型 FVIII の 3 次元構造. カルシウムイオンを red spheres, 銅イオンを pink spheres, Tyr 硫酸化サイトを ball-and-stick で示す. A1-A2 ドメイン間の酸性領域は, FIXa と結合すると推定される A2 ドメイン内の Y555-D569 ループ(マゼンダ色)をブロックしている. 図中に示す血小板表面は略図. C) FVIIIa の溶液中の構造. A1-A2 ドメイン間の酸性領域(朱色)切断により FIXa が結合する Y555-D569 ループ(マゼンダ色)が露呈する.

逆に, A2 と A1 または A3 をジスルフィド架橋させると, FVIIIa の活性低下を抑制できる<sup>24, 25)</sup>.

また, A2 ドメインは, FVIII のクリアランスに関与する low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) family やヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合サイトを含み, FVIII の代謝にも関わっている<sup>26, 27)</sup>. 活性化プロテイン C (APC) や FXa<sup>28)</sup> による切断部位の Arg<sup>562</sup> のような FVIII 活性制御に重要なサイトも, このドメイン内に含まれる.

## B ドメイン

FVIII の B ドメインは, 循環血液中での FVIII コファクター活性には寄与せず, FVIII の細胞内プロセッシングや細胞内輸送に関与する. B ドメインは FV を含めた他のどのタンパク質とも相同なアミノ酸配列を示さないが, B ドメイン内に多くの N 型糖鎖を含むことは FV と共通しており, FVIII 分子内には 25 個の N 型糖鎖があり, そのうち 19 個は B ドメインに存在する. 全長型 FVIII と B ドメイン

欠失型 FVIII (BDD-FVIII) の発現実験では, mRNA の発現量は全長型 FVIII より BDD-FVIII で 20 倍増加するものの, 分泌される FVIII 量は 2 倍の増加にすぎない. このことは, 大量発現による生産性向上を期待していた当時の課題であった<sup>29)</sup>. その後, 研究が進み, 2004 年, Miao らは B ドメインの長さや糖鎖修飾が rFVIII の分泌量に影響し, 6 つの N 型糖鎖を備えた 226 アミノ酸からなる B ドメインを組み込んだ FVIII が最も効率的に分泌されることを明らかにした<sup>30)</sup>. B ドメインが FVIII 分泌に関与するメカニズムのひとつとして, FVIII 生合成過程で FVIII が小胞体からゴルジ体に輸送される際のシャペロンタンパク質(カルネキシンとカルレチキュリン)との相互作用が示されており, BDD-FVIII や糖鎖修飾を抑制した FVIII では, シャペロンタンパク質との相互作用が低下する. また, 小胞体からゴルジ体への移動に関与する ERGIC-53/MCFD2 との相互作用も示されており, これら ERGIC-53 あるいは MCFD2 に異常があると, FV と FVIII の複合欠損を来すことから, B ドメイン内の N 型糖鎖の重要性が示唆される.

B ドメインがタンパク質の分解抑制に寄与するというデータが報告されている. 完全長の FVIII と BDD-FVIII を用いて, 活性化後の A1 および A2 ドメインの APC や FXa による分解を Western blot で比較したところ, 活性化 BDD-FVIII の分解は活性化された血漿由来 FVIII や完全長 FVIII より 11~13 倍速いという. また, BDD-FVIII は APC による不活化が 2~3 倍, また FXa による不活化が 5~6 倍速くなることも確認されている. しかし, FVIII の活性化に伴い遊離される B ドメインがどのようなメカニズムでタンパク質分解制御に寄与するのかは明らかではない<sup>31)</sup>.

詳細はクリアランスの項で述べるが, FVIII のクリアランスに関与するアジアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) との結合サイトも, B ドメインに存在するとされており, B ドメインは, 発現からクリアランスまでの FVIII のライフサイクルに重要な役割を果たしている.

### C ドメイン

C ドメインの構造は, discoidin family<sup>\*3)</sup> に属する lactadherin (乳脂肪小球膜に由来する糖タンパク質)

およびガラクトース酸化酵素に類似している. C2 ドメインは, FV の C2 ドメインと同様に  $\beta$  サンドイッチ構造が中心骨格を形成している. その中心からは 3 つの  $\beta$  ヘアピン構造とループが伸びている<sup>32)</sup>. C2 ドメインの両末端に相当する Cys2174 と Cys2326 はジスルフィド結合を形成しており, 構造の保持に重要な役割を果たしている.  $\beta$  サンドイッチ構造の上部と底部には疎水性領域が存在し, 前者は FVIIIa の C1 ドメインや FIXa など他の因子との結合に関与する. 後者は 2 つの  $\beta$  ヘアピン構造によって形成されており, 先端で 2 対の疎水性アミノ酸 Met2199/Phe2200, Leu2251/Leu2252 が外側に突出し, 細胞膜との結合に重要な役割を果たすという<sup>33)</sup>. また, 電子顕微鏡による観察からは, 別の 2 つのループ (Trp2313-His2315, Gln2222-Lys2227) も膜結合への関与が示唆されている<sup>34)</sup>. Trp2313-His2315 については, 結晶構造解析より, FVIII-リン脂質の相互作用を阻害する低分子化合物がこの部位に結合していることが観察されており, このループの重要性が示唆される<sup>35)</sup>.

出血を引き起こすいくつかの抗 FVIII 抗体は C2 ドメインを認識し, リン脂質との結合を阻害する<sup>36,37)</sup>. これらの抗体は FVIIIa 活性も強力に阻害することから<sup>38)</sup>, FVIIIa の機能に膜結合は極めて重要である. FVIII の膜結合に関しては, C1 ドメインの関与も示唆されており, 事実, FVIII と血小板との結合に C1 ドメインが関与する<sup>39)</sup>. FVIII の X 線結晶構造解析からは, C2 ドメインだけでなく, C1 ドメインもリン脂質膜表面への結合に関与し得る位置に存在する<sup>14)</sup>. C1 ドメインの Arg2090/Gln2091, Lys2092/Phe2093, Gln2042/Tyr2043, Arg2159 を Ala に置換した変異体は膜結合の親和性が低下し, かつ FVIII 活性も低下していた<sup>40)</sup>. また, C1 ドメインの Cys2021 と Cys2169 はジスルフィド結合を形成しているが, この内側の領域 (2022-2168) を C2 ドメインの相当領域 (2175-2325) に置換した変異体は, リン脂質膜および FIXa との結合能が低下した<sup>41)</sup>. さらに, FVIII の C2 ドメインを欠失させると, リン脂質との親和性は 1/14 に減少するものの, 結合能は残存しており, コファクター活性も有していた<sup>42)</sup>. こうした知見からも, FVIII の膜結合や tenase 複合体の活性には, C2 ドメインだけでなく, C1 ドメイ

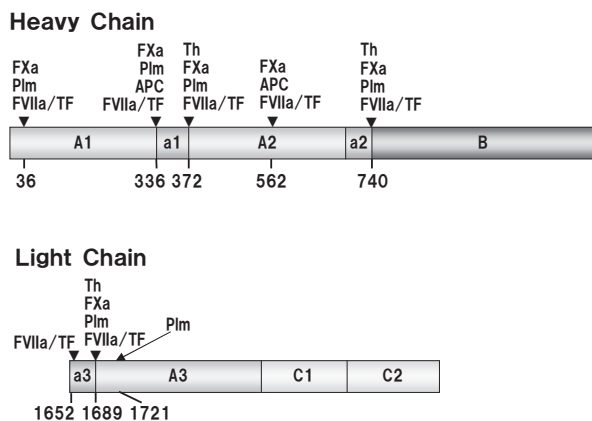


図4 各種プロテアーゼによるFVIIIの切断部位  
FVIIIは各種プロテアーゼによって切断され、活性化・不活化される。  
Plm：プラスミン，APC：活性化プロテインC，Th： $\alpha$ -トロンビン，TF：組織因子

ンも寄与することが示唆される。

#### iv) FVIIIの活性化と不活化

FVIIIは、 $\alpha$ -トロンビン(Th)に加えて、FXa、プラスミン、活性化VII因子(FVIIa)/組織因子(TF)、APCにより限定分解を受け(図4)、活性化または不活化される。Thは活性化のみに作用し、FVIIIのArg372(a1-A2境界)、Arg740(a2-B境界)、およびArg1689(a3-A3境界)を切断する。Arg740が切断されると、Bドメインが遊離するが、この部位の切断は、Arg372およびArg1689の切断の律速となる。Arg1689が切断されると、VWFからの解離が促され、FVIIIはリン脂質と結合可能となる。一方、Arg372が切断されると、FIXa結合部位が露出する<sup>15)</sup>。これらの切断を経て、A1、A2およびA3-C1-C2サブユニットのヘテロトリマーからなるFVIIIaが形成される。

FXaはFVIIIの活性化と不活化に関与する。FVIIIの活性化において、FXaによる切断部位はThと同じである。両プロテアーゼともにC2ドメインに結合するが、これらの結合には機能的な違いがみられる。合成ペプチドTyr2253-Gln2270はFXaによるFVIII活性化を阻害するが、Thによる活性化に影響しない<sup>43)</sup>。また、a1酸性領域(図1)の361-363の

Asp残基をAlaに置換すると、FXaによる活性化は影響を受けるが、Thによる活性化には影響しない<sup>44)</sup>。このように、ThとFXaによるFVIII活性化機構で、明らかな違いがある。さらに、FXaは、Lys36、Arg336、Arg562を切断することでFVIIIaを不活化し、活性化と不活化の両方に関与する。

FXaと同様にプラスミンもFVIIIの活性化と不活化に寄与し、Lys36、Arg336、Arg372、Arg740、Arg1689、Arg1721でFVIIIを切断する。プラスミン添加後3分以内にFVIIIの活性は約2倍上昇し、45分以内に検出不可なレベルまで失活する。プラスミンによるFVIIIの活性化レベルはFXaの約50%で、不活化速度はFXaの12倍、プロテインS存在下APCの3.7倍であった。Arg372よりArg336の水解速度が著しく速いことが、プラスミンによるFVIII不活化の特徴である<sup>45)</sup>。in vivoで、実際にこうしたFVIIIの活性化が起こっているか興味深い。

FVIIa/TFによってもFVIIIが活性化されることが示された<sup>46)</sup>。FVIIaとFVIIIの相互作用部位はFVIIIの3ドメイン(A2/A3/C2)と考えられ、その親和性はA2>A3>C2の順に高い<sup>47)</sup>。これらの部位での相互作用は、FIXaとFVIIIの相互作用に類似しているが、FIXaはA2ドメインよりA3ドメインとの親和性が高い点で異なる。

APCは、その補因子であるプロテインS存在下で、FVaおよびFVIIIaの分解・不活性化を担っているため、APC前駆体であるプロテインC欠乏症患者は血栓傾向を示す。APCはFVIIIaのFIXa相互作用部位内のArg562を切断し、FVIIIaを不活性化する。また、APCによってFVIIIのA1ドメイン内のArg336が切断されることにより、A2ドメインの解離を招き、不活化される。FXaもFVIIIのArg562を切断するが、A2ドメイン単独だとArg562の切断は認められないため、この反応にはA2ドメイン以外の部位との相互作用が必要という。また、この反応はVWFやFIXaの存在下で阻害される。Aドメインの項でも述べたとおり、A2ドメインはFVIIIaのその他のドメインとの親和性が低いため(Kd $\sim$ 300 nM)、生理的条件下で容易に解離し、活性を失う<sup>22)</sup>。

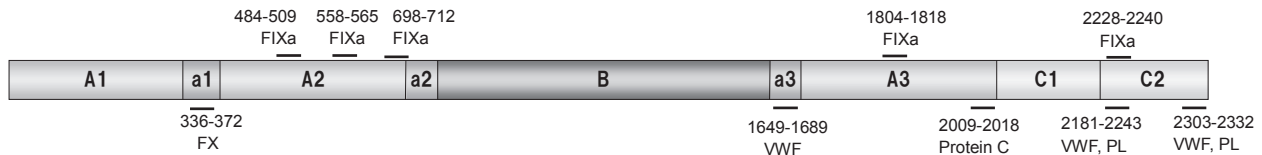


図5 FVIII中の各種タンパク質との相互作用領域(文献71を参考に作成)  
PL:リン脂質(Phosphatidylserine, Phosphatidylethanolamine等)

## v) Xaseの形成とFXの活性化

Tenase複合体(Xase)によるX因子(FX)の活性化機構については、本誌に掲載された「血液凝固IX因子—その分子構造と機能発現メカニズムについて—」でまとめられている<sup>48)</sup>。重複する内容もあるが、今回はFVIIIに焦点を当てて説明したい。

FXを活性化するXaseは、セリンプロテアーゼFIXa, 補因子FVIIIa, リン脂質膜およびカルシウムイオンから構成される。FIXaは単独でもFXを活性化するが、その効率は極めて低く、リン脂質上でFVIIIaに結合することで、FX活性化の効率を著しく上昇する。すなわち、酵素と基質の親和性を高め(Kmを200倍低下させ)、触媒効率の目安となるkcatを24000倍高めるが、FVIIIは主にこのkcatの上昇に寄与する<sup>49)</sup>。

Xaseの形成にはタンパク質とリン脂質間およびタンパク質とタンパク質間の相互作用が関与する。FVIIIは、C2ドメインを介して疎水的および静電的相互作用によって陰イオン性のリン脂質膜に結合する<sup>32)</sup>。疎水的相互作用は、Met2199/Phe2200およびLeu2151/Leu2152で構成された2つの疎水性スパイク様構造が脂質二重層に浸透し、リン脂質の脂肪酸アシル炭化水素鎖と結合することによって生じる。静電的相互作用は、疎水性残基上に局在化したArg2215, Arg2220, Lys2227およびLys2249を含む塩基性アミノ酸残基のリング様構造によって調節され、それは、フォスファチジルセリンの陰イオン極性頭部基との間にイオン結合を形成する。循環血液中ではほとんどのFVIIIはVWFと結合しているが、Thにより活性化されたFVIIIaは、VWFから解離してリン脂質膜に結合可能となり、FIXaとXaseを形成する。

FVIIIaとFIXa間のタンパク質間相互作用は広範囲のインターフェースで生じており(図5)、様々な領域について報告がなされている。FVIIIaのA2ドメインはその機能発現に非常に重要であり、FIXaとの結合領域として558–565, 712周辺領域, 484–509の3領域が知られている。FVIIIaの558–565はFIXaの重鎖330–339ヘリックスと相互作用し、このインターフェース形成には、静電的・疎水的相互作用と水素結合が寄与するという<sup>50)</sup>。712周辺領域はFIXaの重鎖301–303領域と相互作用し、712周辺領域の変異実験により、この領域がFIXaとの結合やFXa生成、Xaseの形成に重要であることが確認されている<sup>51)</sup>。配列484–509がFIXaと結合することは、484–509を認識する抗体を用いて確認されたが<sup>20)</sup>、FIXa側の結合サイトは明らかではない。FVIIIaのArg489, Arg490, Lys493の点変異は触媒速度に影響しないものの、3残基全てをAlaに置換すると明らかな触媒速度の低下が認められることから<sup>52)</sup>、この領域での静電的ポテンシャルが触媒作用に寄与しているという。このようにA2ドメインはFIXaと複数の領域で結合するが、A2ドメインとFIXaの親和性はKd~300nMとあまり高くない。一方、FVIIIaの軽鎖とFIXaとの親和性はKd~15nMと高い。従来から、FVIII軽鎖側の結合サイトとしてはA3ドメインの1804–1818が知られていたが<sup>53, 54)</sup>、2009年に添田らにより、C2ドメインの2228–2240領域がFIXaのGlaドメインと結合することが報告された<sup>55)</sup>。また、合成ペプチドによる阻害実験では、1804–1818よりも2228–2240ペプチドの方でFXa生成の阻害効率が高く<sup>56)</sup>、2228–2240とFIXaのGlaドメインの結合はFXaの生成において重要な役割を果たすという。

## vi) クリアランス

FVIIIのクリアランスには、Low-density lipoprotein receptor (LDLR) familyに属するLDLR related protein (LRP)が関与する<sup>57, 58)</sup>。LRPは、FVIIIのC2ドメイン<sup>57)</sup>、A2ドメインの484-509<sup>58)</sup>、およびA3ドメインの1804-1834<sup>59)</sup>に結合して細胞内への取り込みを担っており、VWFはC2ドメインに結合することでこれを阻害する。A2ドメインの484-509はFVIIIが活性化されると露出し、A3ドメインの1804-1834はVWFと結合してないときのみ露出するという。なお、LRPとFVIIIの結合では、C1ドメインの関与も示唆されている<sup>60)</sup>。

肝臓のLRPを欠損させたマウスでは、血中FVIIIが上昇するとともにFVIIIの半減期が延長する<sup>61)</sup>。また、LRPに加え、同じLDLR familyに属するLDLRも欠損させた二重欠損マウスの解析から、LDLRのFVIIIのクリアランスへの関与が*in vivo*で示されている<sup>62)</sup>。興味深いことに、*in vitro*の実験ではVWFはこれら受容体との相互作用はみられないものの<sup>57, 58, 62)</sup>、この二重欠損マウスでは血中のFVIIIだけでなくVWFも増加していた。その後の研究により、シェアストレス下ではLRPがVWFと相互作用し、VWFのクリアランスにも寄与することが明らかになった<sup>63, 64)</sup>。なお、LDLRはComplement-type Repeat<sup>※4</sup>(CR)2-5でFVIIIと結合することが示されている<sup>65)</sup>。

また、細胞表面へパラン硫酸プロテオグリカンは、FVIII-VWF複合体からのFVIIIクリアランスを促進する働きをもつ<sup>27)</sup>。

アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)は肝臓に多く発現しており、C-typeレクチンfamilyに属する。この受容体は循環中の糖タンパク質をエンドサイトーシスで取りこむ。FVIIIのBドメインはASGPRに高いアフィニティー(Kd $\sim$ 2 nM)で結合する<sup>66)</sup>。酵素処理によりFVIIIのN型糖鎖を欠失させると、ASGPRへの結合が抑制され、また、BDD-FVIIIはASGPRと結合しないことから、BドメインのN型糖鎖はFVIIIのクリアランスに関与すると考えられる。さらに、ASGPRはVWFのクリアランスに関与するとの報告に加えて、肝臓および腎臓内でマクロファージがFVIIIやFVIII-VWF複合体を貪食

するとの報告もあり<sup>67)</sup>、これらのメカニズムもFVIIIのクリアランス機構の候補となる。

## vii) VWF との相互作用

血中を循環するFVIIIのほとんどはVWFと非共有結合している。VWFは、分子量約220,000のサブユニットが多重結合した巨大マルチマータンパク質であり、結合のモル比は約1:100(FVIII:VWFサブユニット)である。VWFとの結合により、FVIIIはタンパク質分解やクリアランスから保護される。そのため、VWFの完全欠損症であるvon Willebrand disease (VWD) type 3の患者は、血中VWFの欠損に伴い、FVIIIも著減している。対照的に、VWFの量的減少症であるVWD type 1患者はFVIIIレベルがわずかに低下するだけである。また、FVIIIとの結合能に異常のあるVWD type 2N患者はFVIIIレベルが低下する。

FVIII-VWF複合体はFVIIIの軽鎖とVWFのD'-D3領域で相互作用しており、そのKdが約0.4 nMと親和性は非常に強い<sup>68)</sup>。FVIIIのa3酸性アミノ酸ペプチド領域(図5)を介した結合には、Tyr1680の硫酸化が重要であり、Tyr1680残基をPheへ置換した場合や硫酸化が不完全な場合、VWFとの結合能が低下する。一方、C2ドメインのVWF結合サイトはArg2307とTrp2229であり、また、Thr2154、Gln2100およびArg2150はVWFとの結合のためのC1-C2構造互換性を引き起こすのに重要という。さらに、C1ドメインの一群のアミノ酸(Ser2119、Arg2116、Tyr2105)は、FVIIIとVWFの間の相互作用に役割を果たすと考えられている<sup>69)</sup>。

また、VWFは血管損傷部位のコラーゲンに止血の初期段階で粘着する因子であり、VWFと結合したFVIIIは、VWFにより損傷部位に運搬されるとともに、そこでの濃度が高まる。

## おわりに

FVIIIの分子構造と機能について今日までに数多くの研究がなされている。立体構造の項で詳述したように、現在では2つのCドメインが3つのAドメインとリン脂質膜の間に並んで配置されることが提



唱されている。しかし、クライオ電子顕微鏡を用いた解析では、リン脂質上の FVIII の立体構造は、X 線結晶解析モデルにフィットし難いという<sup>70)</sup>。FVIII は大きい分子であるため、高次構造解析自体難しく、ましてやリン脂質膜上での構造を解析することは現状でも困難である。今後、最新の技術を用いた解析等により、FVIII のより詳細な分子構造と機能発現のメカニズムが解明されることが期待される。

**謝辞**：稿を終えるにあたり、執筆の機会を与えていただいた武谷浩之先生(崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科 教授)、校閲していただいた化血研顧問の岩永貞昭先生、化血研の中垣智弘博士、友清和彦博士に深謝いたします。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

## 文献

- Patek AJ, Stetson RP: Hemophilia. I. The abnormal coagulation of the blood and its relation to the blood platelets. *J Clin Invest* **15**: 531–542, 1936.
- Weiss HJ, Hoyer IW: Von Willebrand factor: dissociation from antihemophilic factor procoagulant activity. *Science* **182**: 1149–1151, 1973.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312**: 326–330, 1984.
- Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EG, Vehar GA, Lawn RM: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* **312**: 330–337, 1984.
- 嶋 緑倫：第 V 因子および第 VIII 因子 C2 ドメインの結晶構造。日本血栓止血学会誌 **11**: 283–288, 2000.
- 野上恵嗣：血友病 A の分子病態—第 VIII 因子の分子構造および機能の最近の知見—。日本血栓止血学会誌 **19**: 779–787, 2008.
- 添田哲弘, 野上恵嗣：FXase 複合体における第 VIII 因子と活性化第 IX 因子間の相互作用に関する新たな知見。日本血栓止血学会誌 **20**: 453–455, 2009.
- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, et al.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312**: 342–347, 1984.
- Zheng C, Page RC, Das V, Nix JC, Wigren E, Misra S, Zhang B: Structural characterization of carbohydrate binding by LMAN1 protein provides new insight into the endoplasmic reticulum export of factors V (FV) and VIII (FVIII). *J Biol Chem* **288**: 20499–20509, 2013.
- Pipe SW: Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia* **15**: 1187–1196, 2009.
- Callaghan MU, Kaufman RJ: Synthesis and secretion of coagulation factor VIII, in Tanaka K, Davie EW, Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008. Germany, Springer, 2008, 45–67.
- Doolittle RF: The Evolution of Vertebrate Blood Clotting, United Kingdom, University Science Books, 2012.
- Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL: The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* **111**: 1240–1247, 2008.
- Ngo JC, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B: Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* **16**: 597–606, 2008.
- Venkateswarlu D: Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. *BMC Structural Biology* **10**:7, 2010.
- Wakabayashi H, Koszelak ME, Mastri M, Fay PJ: Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. *Biochemistry* **40**: 10293–10300, 2001.
- Zeibdawi AR, Pryzdial EL: Mechanism of factor Va inactivation by plasmin. Loss of A2 and A3 domains from a Ca<sup>2+</sup>-dependent complex of fragments bound to phospholipid. *J Biol Chem* **276**: 19929–19936, 2001.
- Zhu H, Toso R, Camire RM: Inhibitory sequences within the B-domain stabilize circulating factor V in an inactive state. *J Biol Chem* **282**: 15033–15039, 2007.
- Bos MH, Camire RM: A bipartite autoinhibitory region within the B-domain suppresses function in factor V. *J Biol Chem* **287**: 26342–26351, 2012.
- Fay PJ, Scandella D: Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem* **274**: 29826–29830, 1999.
- Fay PJ, Beattie T, Huggins CF, Regan LM: Factor VIIIa A2 subunit residues 558–565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem* **269**: 20522–20527, 1994.
- Fay PJ, Smudzin TM: Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIIIa. *J Biol Chem* **267**: 13246–13250, 1992.
- Pipe SW, Eickhorst AN, McKinley SH, Saenko EL, Kaufman RJ: Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation: evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIa *in vivo*. *Blood* **93**: 176–183, 1999.
- Gale AJ, Pellequer JL: An engineered interdomain disulfide bond stabilizes human blood coagulation factor VIIIa. *J Thromb Haemost* **1**: 1966–1971, 2003.
- Gale AJ, Radtke KP, Cunningham MA, Chamberlain D, Pellequer JL, Griffin JH: Intrinsic stability and functional properties of disulfide bond-stabilized coagulation factor VIIa variants. *J Thromb Haemost* **4**: 1315–1322, 2006.

- 26) Bovenschen N, van Stempvoort G, Voorberg J, Mertens K, Meijer AB: Proteolytic cleavage of factor VIII heavy chain is required to expose the binding-site for low-density lipoprotein receptor-related protein within the A2 domain. *J Thromb Haemost* **4**: 1487–1493, 2006.
- 27) Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL: Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **276**: 11970–11979, 2001.
- 28) Plantier JL, Rolli V, Ducasse C, Dargaud Y, Enjolras N, Boukerche H, Négrier C: Activated factor X cleaves factor VIII at arginine 562, limiting its cofactor efficiency. *J Thromb Haemost* **8**: 286–293, 2010.
- 29) Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ: Biochemical, immunological, and *in vivo* functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* **81**: 2925–2935, 1993.
- 30) Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L, Kucab P, Cunningham MA, Kaufman RJ, Pipe SW: Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood* **103**: 3412–3419, 2004.
- 31) Khrenov AV, Ananyeva NM, Saenko EL: Role of the B domain in proteolytic inactivation of activated coagulation factor VIII by activated protein C and activated factor X. *Blood Coagul Fibrinolysis* **17**: 379–388, 2006.
- 32) Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL: Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **402**: 439–442, 1999.
- 33) Gilbert GE, Kaufman RJ, Arena AA, Miao H, Pipe SW: Four hydrophobic amino acids of the factor VIII C2 domain are constituents of both the membrane-binding and von Willebrand factor-binding motifs. *J Biol Chem* **277**: 6374–6381, 2002.
- 34) Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kembell-Cook G, Holzenburg A: 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood* **99**: 1215–1223, 2002.
- 35) Liu Z, Lin L, Yuan C, Nicolaes GA, Chen L, Meehan EJ, Furie B, Furie B, Huang M: Trp2313-His2315 of factor VIII C2 domain is involved in membrane binding: structure of a complex between the C2 domain and an inhibitor of membrane binding. *J Biol Chem* **285**: 8824–8829, 2010.
- 36) Shima M, Scandella D, Yoshioka A, Nakai H, Tanaka I, Kamisue S, Terada S, Fukui H: A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb Haemost* **69**: 240–246, 1993.
- 37) Arai M, Scandella D, Hoyer LW: Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J Clin Invest* **83**: 1978–1984, 1989.
- 38) Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P: Anti-human factor VIII C2 domain antibodies in hemophilia A mice recognize a functionally complex continuous spectrum of epitopes dominated by inhibitors of factor VIII activation. *Blood* **110**: 4234–4242, 2007.
- 39) Hsu TC, Pratt KP, Thompson AR: The factor VIII C1 domain contributes to platelet binding. *Blood* **111**: 200–208, 2008.
- 40) Lü J, Pipe SW, Miao H, Jacquemin M, Gilbert GE: A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood* **117**: 3181–3189, 2011.
- 41) Wakabayashi H, Fay PJ: Replacing the factor VIII C1 domain with a second C2 domain reduces factor VIII stability and affinity for factor IXa. *J Biol Chem* **288**: 31289–31297, 2013.
- 42) Wakabayashi H, Griffiths AE, Fay PJ: Factor VIII lacking the C2 domain retains cofactor activity *in vitro*. *J Biol Chem* **285**: 25176–25184, 2010.
- 43) Nogami K, Shima M, Nishiya K, Hosokawa K, Saenko EL, Giddings JC, Tanaka I, Yoshioka A: Anticoagulant effects of a synthetic peptide containing residues Thr-2253-Gln-2270 within factor VIII C2 domain that selectively inhibits factor Xa-catalysed factor VIII activation. *Br J Haematol* **116**: 868–874, 2002.
- 44) Nogami K, Freas J, Manithody C, Wakabayashi H, Rezaie AR, Fay PJ: Mechanisms of interactions of factor X and factor Xa with the acidic region in the factor VIII A1 domain. *J Biol Chem* **279**: 33104–33113, 2004.
- 45) Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Yoshioka A: Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: a crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *J Biol Chem* **282**: 5287–5295, 2007.
- 46) Warren DL, Morrissey JH, Neuenchwander PF: Proteolysis of blood coagulation factor VIII by the factor VIIa-tissue factor complex: generation of an inactive factor VIII cofactor. *Biochemistry* **38**: 6529–6536, 1999.
- 47) Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M: Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *J Thromb Haemost* **8**: 2494–2503, 2010.
- 48) 中村徹, 寺澤秀俊, 中富靖, 濱本高義: 血液凝固 IX 因子—その分子構造と機能発現メカニズムについて—。 *日本血栓止血学会誌* **24**: 445–453, 2013.
- 49) Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Ashby B, Walsh PN: Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry* **29**: 2606–2611, 1990.
- 50) Bajaj SP, Schmidt AE, Mathur A, Padmanabhan K, Zhong D, Matri M, Fay PJ: Factor IXa:factor VIIa interaction. helix 330–338 of factor IXa interacts with residues 558–565 and spatially adjacent regions of the  $\alpha 2$  subunit of factor VIIa. *J Biol Chem* **276**: 16302–16309, 2001.
- 51) Griffiths AE, Rydtkin I, Fay PJ: Factor VIIa A2 subunit shows a high affinity interaction with factor IXa: contribution of A2 subunit residues 707–714 to the interaction with factor IXa. *J Biol Chem* **288**: 15057–15064, 2013.
- 52) Jenkins PV, Dill JL, Zhou Q, Fay PJ: Clustered basic residues within segment 484–510 of the factor VIIa A2 subunit contribute to the catalytic efficiency for factor Xa generation. *J Thromb Haemost* **2**: 452–458, 2004.
- 53) Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K: Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem* **269**: 7150–

- 7155, 1994.
- 54) Lenting PJ, van de Loo JW, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K: The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* **271**: 1935–1940, 1996.
- 55) Soeda T, Nogami K, Nishiyama K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M: The factor VIIIa C2 domain (residues 2228–2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. *J Biol Chem* **284**: 3379–3388, 2009.
- 56) Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M: Interactions between residues 2228–2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation. *Thromb Haemost* **106**: 893–900, 2011.
- 57) Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, Clijsters PP, Meijerman DW, Pannekoek H, van Mourik JA, Mertens K, van Zonneveld AJ: The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **274**: 23734–23739, 1999.
- 58) Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG: Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* **274**: 37685–37692, 1999.
- 59) Bovenschen N, Boertjes RC, van Stempvoort G, Voorberg J, Lenting PJ, Meijer AB, Mertens K: Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* **278**: 9370–9377, 2003.
- 60) Bloem E, van den Biggelaar M, Wroblewska A, Voorberg J, Faber JH, Kjalke M, Stennicke HR, Mertens K, Meijer AB: Factor VIII C1 domain spikes 2092–2093 and 2158–2159 comprise regions that modulate cofactor function and cellular uptake. *J Biol Chem* **288**: 29670–29679, 2013.
- 61) Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, van Vlijmen BJ: Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood* **101**: 3933–3939, 2003.
- 62) Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJ: LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII *in vivo*. *Blood* **106**: 906–912, 2005.
- 63) Castro-Núñez L, Dienava-Verdoold I, Herczenik E, Mertens K, Meijer AB: Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages. *J Thromb Haemost* **10**: 1929–1937, 2012.
- 64) Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C, Odouard S, Navarrete AM, Saint-Lu N, van Vlijmen BJ, Legendre P, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ: Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood* **119**: 2126–2134, 2012.
- 65) Kurasawa JH, Shestopal SA, Karnaukhova E, Struble EB, Lee TK, Sarafanov AG: Mapping the binding region on the low density lipoprotein receptor for blood coagulation factor VIII. *J Biol Chem* **288**: 22033–22041, 2013.
- 66) Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K: The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost* **3**: 1257–1265, 2005.
- 67) van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, Oortwijn BD, van den Berg HM, Denis CV, Lenting PJ: Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII *in vivo*. *Blood* **112**: 1704–1712, 2008.
- 68) Saenko EL, Scandella D: A mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J Biol Chem* **270**: 13826–13833, 1995.
- 69) Liu ML, Shen BW, Nakaya S, Pratt KP, Fujikawa K, Davie EW, Stoddard BL, Thompson AR: Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood* **96**: 979–987, 2000.
- 70) Stoilova-McPhie S, Lynch GC, Ludtke S, Pettitt BM: Domain organization of membrane-bound factor VIII. *Biopolymers* **99**: 448–459, 2013.
- 71) Saenko EL, Ananyeva NM, Kouivaskaia DV, Khrenov AV, Anderson JA, Shima M, Qian J, Scott D: Haemophilia A: effects of inhibitory antibodies on factor VIII functional interactions and approaches to prevent their action. *Haemophilia* **8**: 1–11, 2002.

\*<sup>1</sup> Hephaestin は腸上皮の基底膜側に発現する含銅タンパク質で、鉄の輸送に関与する。腸管上皮細胞に取り込まれた Fe<sup>2+</sup> は hephaestin によって Fe<sup>3+</sup> に変換された後、鉄輸送タンパク質 transferrin に結合して末梢組織に輸送される。

\*<sup>2</sup> MD 法 (Molecular Dynamics) : ニュートン運動方程式に従って、原子の動きをシミュレーションする方法で、溶液中のタンパク質の動きを原子レベルで知ることができる。

\*<sup>3</sup> discoidin family : 細胞性粘菌の一種である *Dictyostelium discoideum* で最初に見出された。discoidin ドメインは β シートが折り重なった構造をとっており、これを有するタンパク質は真核生物・原核生物に広く存在する。また、これらのタンパク質は細胞間の接着やリン脂質との結合にも関与する。FVIII のほか、FV も discoidin ドメインを含む。

\*<sup>4</sup> Complement-type Repeat (CR) : LDLR の細胞外ドメインである ligand 結合部位。6 残基の Cys を含む 40 程度のアミノ酸残基から構成され、ドメイン内にジスルフィド結合を 3 個有する。ドメイン内の Trp や酸性残基を介して ligand タンパク質の Lys と相互作用する。