

血液凝固第 VII 因子の構造と機能および臨床応用

Blood coagulation factor VII; structure, function and clinical application

高見英輔^{*1}, 中島輝久²

Eisuke TAKAMI, Teruhisa NAKASHIMA

Key words: coagulation factor VII, crystal structure, factor VIIa agent, hemostatic management

Points

- ① VIIa は, X および IX を基質とするセリンプロテアーゼであり, 外因系凝固経路の開始因子として重要な役割を果たす.
- ② Gla ドメインは, 7 つの 2 価金属イオン (Ca^{2+} , Mg^{2+}) 結合部位を有し, リン脂質および EPCR との相互作用に関与する.
- ③ EGF1 ドメインは, TF との相互作用に関与し, EGF2 ドメインは, VIIa/TF/X 複合体の形成に関与する.
- ④ セリンプロテアーゼドメインは, 酵素活性の中心であり, TF および EGF2 ドメインとの相互作用に関与する.
- ⑤ VII または VIIa を含有する製剤として, 本邦では, 1984 年より aPCC 製剤, 2000 年より rVIIa 製剤, 2014 年より VIIa/X 混合製剤が VIII または IX インヒビター患者の止血管理に臨床応用されている.

1. はじめに

VII 因子 (VII) は外因系凝固経路の開始因子として重要な役割を果たすビタミン K 依存性タンパク質である. VII の血中濃度は約 500 ng/mL (10 nM), その半減期は 3~4 時間¹⁻³⁾である.

生体内での凝固反応^{4,5)}は血管壁の障害などによって内皮細胞上に出現した組織因子 (TF), 血管内皮下組織中 (繊維芽細胞等) に存在する TF, または活性化

された単球上の TF に VII または活性化 VII (VIIa) がリン脂質, Ca^{2+} 共存下で複合体 (extrinsic Xase complex) を形成することによって開始される (図 1A). 血中の VII の約 1% (5 ng/mL, 0.1 nM) は VIIa として循環しており, TF と複合体を形成すると, 細胞膜上で基質である X 因子 (X) を活性化する. なお, もう一つの基質である IX 因子 (IX) の方が X よりも効率的に活性化される⁶⁻⁸⁾. 凝固の初期段階で VIIa による X 活性化を介して形成されたトロンビン量ではフィブリノゲンを活性化させるには不十分であるものの, VIII 因子 (VIII), V 因子 (V) および血小板を活性化させることができる. その結果, 活性化血小板膜上ではさらに凝固因子の活性化反応が増幅する.

上記の TF 発現細胞上で VIIa により活性化された IX (IXa) は活性化血小板膜上で活性化 VIII (VIIIa) と

¹ 一般財団法人化学及血清療法研究所分画事業部門営業部
血友病学術課

² 一般財団法人化学及血清療法研究所分画事業部門開発部

* 責任者連絡先:

〒 860-8568 熊本市北区大窪 1-6-1

Tel: 096-345-6500, Fax: 096-344-9269

E-mail: takami-ei@kaketsuken.or.jp

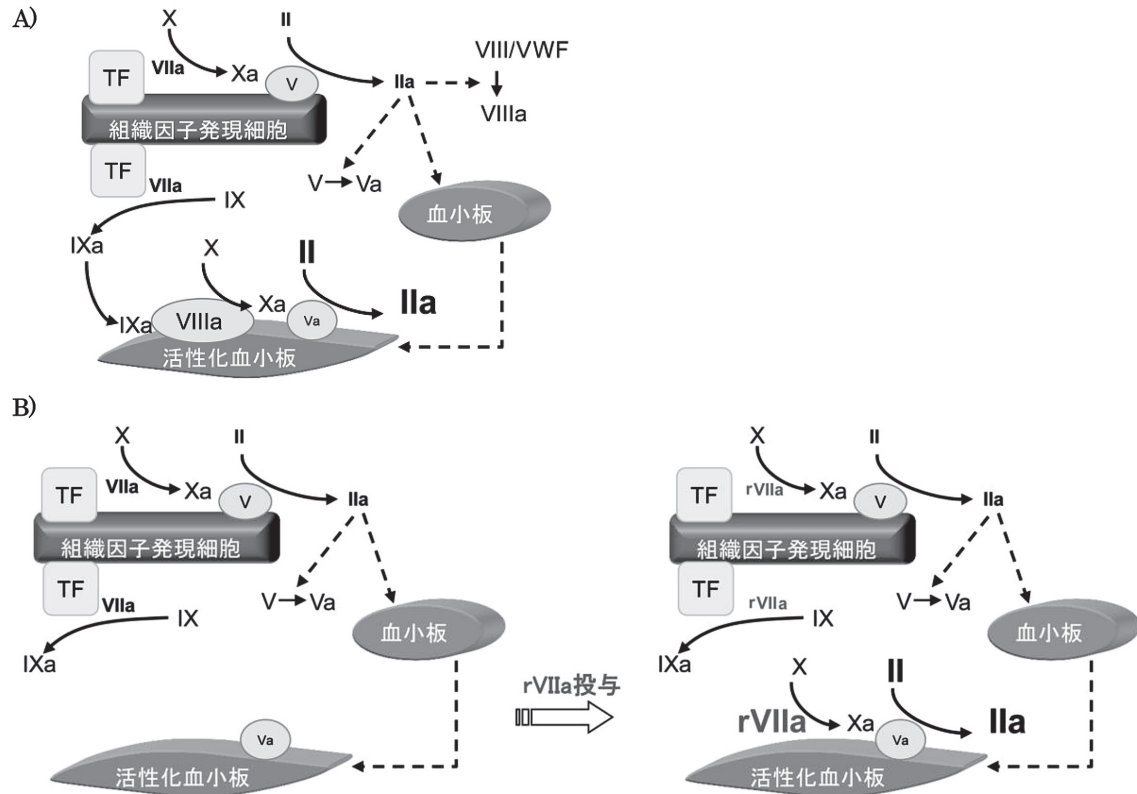


図1 凝固モデル(文献4より引用し、一部改変)

A) 健常者の生理的凝固モデル

B) インヒビター保有血友病A患者の凝固モデル(rVIIa製剤投与の場合)

VWF:フォン・ヴィレブランド因子, II:プロトロンビン, IIa:トロンビン

複合体(intrinsic Xase complex)を形成し、Xを活性化する。活性化されたX(Xa)は活性化V(Va)およびプロトロンビンと複合体(prothrombinase complex)を形成し、大量のトロンビンを生成する(トロンビンバースト)。最終的には、この局所におけるトロンビンバーストによってトロンビンがフィブリノゲンをフィブリンに変換し、活性化XIII因子共存下で、フィブリン網を形成して止血の役割を果たす。

1964年、DavieおよびMacfarlaneらが提唱した凝固カスケードでVIIの位置が示されると^{9,10)}、1986年にはHagenらによってその遺伝子がクローニングされた³⁾。1996年、Bannerらによって結晶構造解析がなされ、世界で初めてVIIaとsoluble(s)TF^{*1)}の複合体(VIIa/sTF複合体)の3次構造が報告され

た¹¹⁾(図2)。また、HigashiらによってVIIは限定分解後にVIIaとなっても前駆体様構造をとること¹²⁾、さらにDickinsonらによりalanine scanningの実験からVIIaとTFの親和性、VIIa/TF複合体によるXの活性化に参与するアミノ酸残基が報告された¹³⁾。その後、VIIまたはVIIaを含有する製剤として、乾燥人血液凝固因子抗体迂回活性複合体(aPCC)製剤と遺伝子組換えVIIa(rVIIa)製剤が開発され、VIIIまたはIXに対するインヒビターを保有する患者に臨床応用されている。前者は複数の凝固因子(プロトロンビン、VII、IX、Xと各々の活性型)を含んでおり、とくにプロトロンビンおよびXaがその止血作用において重要な役割を果たすと考えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。後者の作用機序(図1B)については、治療量のrVIIa(90 μg/kg)が投与されると、血中のrVIIaは約25 nM(生理的濃度の約250倍)に上昇し、TFに依存せずに活性化血小板膜上でXを直接活性化する^{4,5)}。

*1) sTF: soluble tissue factor の略語。細胞外ドメインのみからなる可溶性TF。

セリンプロテアーゼドメイン

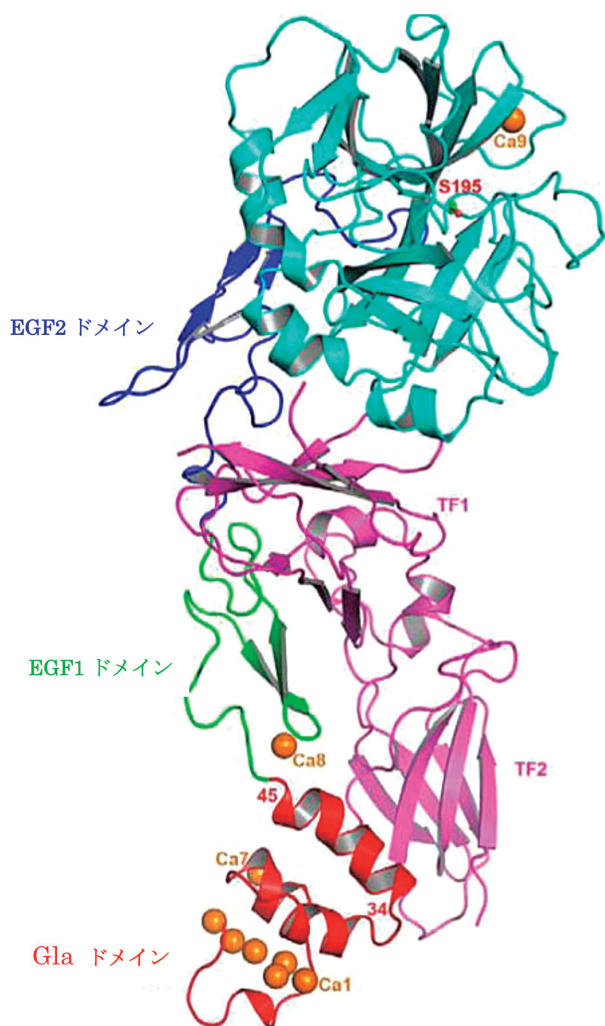


図2 VIIa/sTF複合体の三次構造(文献11より引用し、一部改変)

1996年、最初に結晶化されたVIIa/sTF複合体(PDB id: 1DAN)。VIIaのactive siteはインヒビターであるFFRck (Phe-Phe-Arg-chloromethyl ketone)によって修飾されている。合計9つのCa²⁺が結合している(セリンプロテアーゼドメイン:1つ, EGF1ドメイン:1つ, Glaドメイン:7つ)。

また、2014年11月11日より国産初の国内献血血漿由来のバイパス止血製剤として、VIIa/X混合製剤(販売名: バイクロット® 配合静注用, 化学及血清療法研究所)が発売されている。

本稿では、VIIの分子構造と機能および臨床応用について解説する。なお、VIIに関しては、過去、本誌でもreviewされているので参照されたい¹⁷⁻¹⁹⁾。

2. VIIの一次構造

VIIはプレプロ配列を含め444個のアミノ酸残基からなる前駆体タンパク質として肝臓で生合成される。VII前駆体は20残基からなるプレ配列が小胞体に存在するシグナルペプチダーゼにより切断後、18残基のプロ配列がプロセシング酵素の作用によって切断され、最終的に406残基からなる分子量約50,000の一本鎖糖タンパク質として血中に分泌される。

成熟したVIIは多くのビタミンK依存性凝固因子と同様に、アミノ末端(N末端)側からγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメイン、上皮細胞成長因子(EGF)様のEGF1ドメインとEGF2ドメイン、セリンプロテアーゼドメインの4つのドメイン構造からなる¹²⁾。VIIは*in vitro*において、XaなどによりArg152-Ile153(R152-I153; 以下アミノ酸残基は一文字表記)間のペプチド結合が切断され、Gla-EGF1-EGF2の各ドメインからなる軽鎖(Light chain; L鎖)と、セリンプロテアーゼドメインからなる重鎖(Heavy chain; H鎖)がジスルフィド結合(S-S結合)した二本鎖のVIIaへと変換される^{20,21)}(図3)。

なお、VIIにはS52とS60にO-結合型²²⁾、N145とN322にN-結合型の糖鎖が確認されているが、これらはVIIの機能と血中半減期に重要である²³⁾。

3. 各ドメインの構造と機能

3.1. Glaドメイン

Glaドメイン(GD)はビタミンK依存性凝固因子に含まれる共通のドメインであり、因子間で高い相同性を示す²⁴⁾。VIIでは肝臓でγ-カルボキシラーゼによってN末端側の10個のグルタミン酸がγ-カルボキシ化される。ビタミンKは、この反応の補助因子であり、還元型ビタミンKはγ-カルボキシラーゼとともにグルタミン酸残基をγ-カルボキシ化し、酸化されたビタミンKは、ビタミンKエポキシドレダクターゼによって還元される。

VIIのGDには7つの2価金属イオン結合部位が確認されている¹¹⁾(図2)。この部分にCa²⁺が結合すると、GDの立体構造が安定化し、GD内の疎水性アミノ酸残基の側鎖とリン脂質が相互作用できるよう

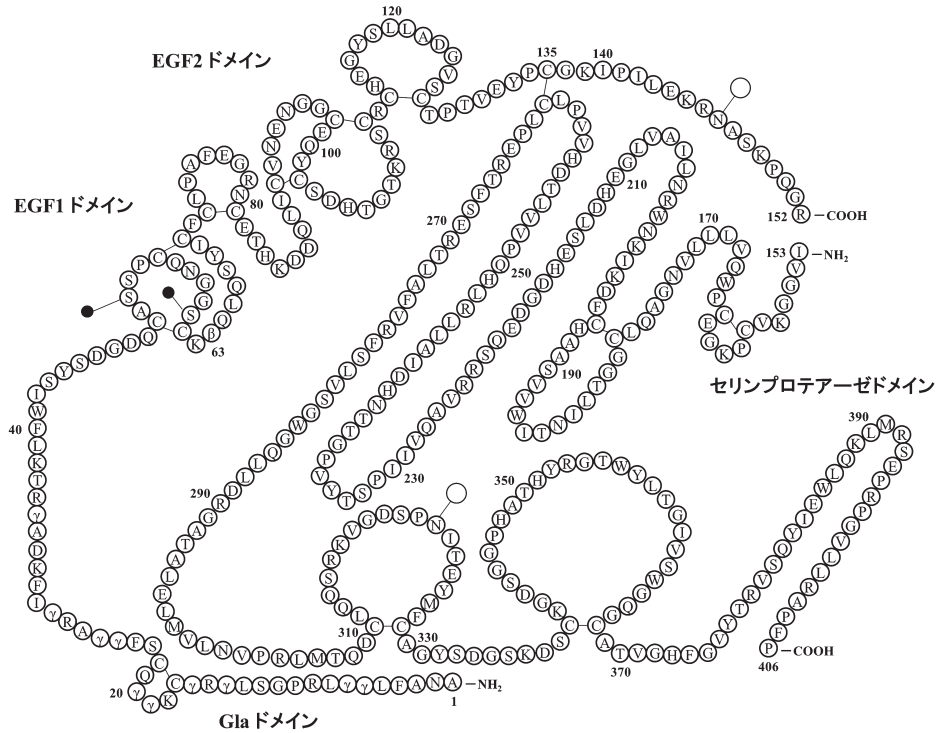


図3 VIIaの一次構造(文献21を参考に作成)

γ : γ -カルボキシグルタミン酸, \circ : N-結合型糖鎖²²⁾, \bullet : O-結合型糖鎖²²⁾

軽鎖(L鎖)はGla-EGF1-EGF2ドメイン(残基1-152)から, 重鎖(H鎖)はセリンプロテアーゼドメイン(残基153-406)から構成される. 数字はVIIa固有のアミノ酸残基番号を示す.

になる. また, Mg^{2+} が結合するとVII^{25, 26)}, IX²⁶⁻²⁹⁾, X³⁰⁾およびプロトロンビン³¹⁾が関与するリン脂質依存的な凝固反応が促進される. Vadivelらによると, ビタミンK依存性の凝固タンパク質および抗凝固タンパク質はGDに4つの Ca^{2+} (ポジション2, 3, 5, 6)と3つの Mg^{2+} (ポジション1, 4, 7)が結合した状態で血中を循環するという³²⁾(図4A). さらに, これらタンパク質がリン脂質と結合するとGD内の ω -loopおよび2つの α ヘリックスのコンホメーションが変化し, それに伴いポジション4の Mg^{2+} が Ca^{2+} へ置換されるという(図4B). これらの知見から, Mg^{2+} はポジション1, 7との結合を介してリン脂質依存的な凝固反応および抗凝固反応を促進する可能性が示唆される.

VIIのGDは, プロテインCのレセプターとして同定されたEPCR(endothelial protein C receptor)のリガンドとしても機能し, プロテインCと同様の親和性を持って結合するが³³⁾, このVIIaとEPCRとの相互作用の*in vivo*での意義に関してPavaniら³⁴⁾は血友

病マウスを用いて以下のように明らかにした. まず, ヒトVIIaはヒトEPCRに結合するが, マウスVIIa(mVIIa)はマウスEPCRに結合しないため, EPCRに結合できるようにmVIIaのGDの3残基をヒト型に置換した変異体mVIIa(L4F/L8M/W9R; mVIIa-FMR)を作製した. 次に, EPCRに富む大血管(頸動脈)の傷害モデルを用いて, EPCRとの結合能がないmVIIaと結合能を有するmVIIa-FMRの止血効果を比較し, mVIIa-FMRはmVIIaに比べて高い止血能を有する(出血時間を1/3に短縮)ことを示した. これは, VIIaが傷害部位周囲の内皮細胞上でEPCRと相互作用することで, その部位に留まり易くし, 凝固反応を高めるとともに, プロテインCの活性化能を低下させるからであり, 高用量のrVIIa製剤の作用機序にはEPCRとの相互作用が関与しているという.

3.2. EGF様ドメイン

GDと同様にEGF様ドメインはビタミンK依存性凝固因子に含まれる共通のドメインであり, 約45

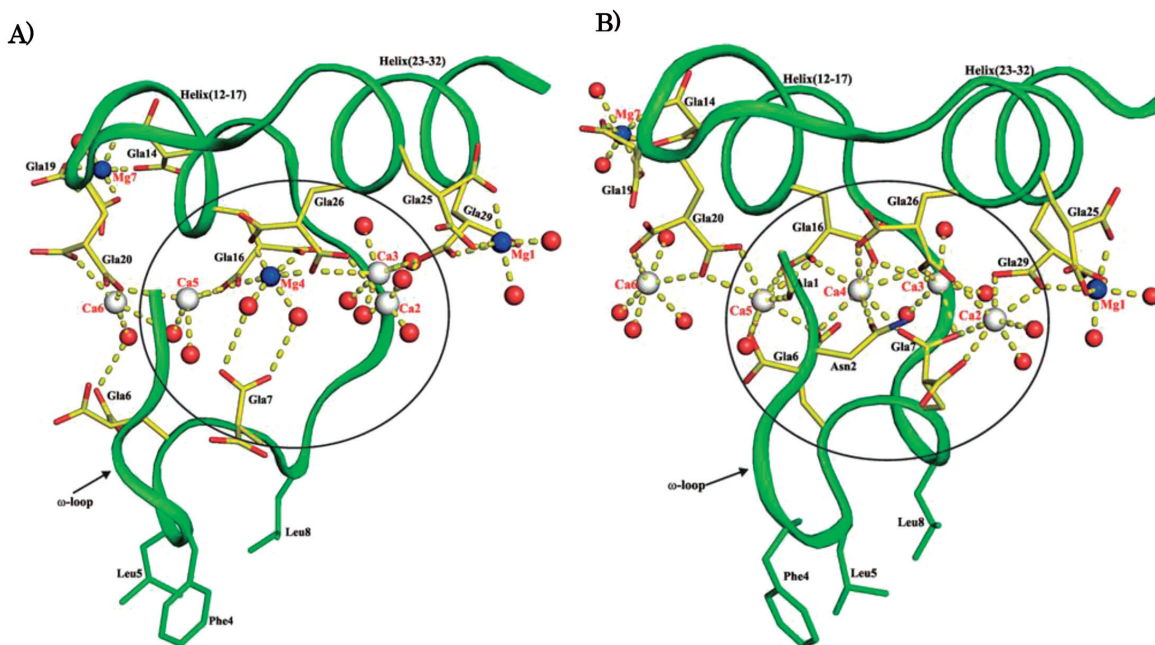


図4 VIIaのGlaドメイン構造(文献32より引用)

Gla 残基：黄色， ω -loop上の疎水性残基：緑色， Ca^{2+} ：white spheres， Mg^{2+} ：blue spheres，水分子：red spheres，配位結合および水素結合：黄色の破線。

A) 5 mM Ca^{2+} /2.5 mM Mg^{2+} 存在下の VIIa/sTF 複合体構造(PDB id : 3TH2)。 Ca^{2+} および Mg^{2+} は ω -loop と 2つの α ヘリックスの境界面上で結合している。図中の円内では Ca2, Ca3, Mg4, Ca5 は Gla 残基および 10 個の水分子と配位している。

B) 45 mM Ca^{2+} /5 mM Mg^{2+} 存在下の VIIa/sTF 複合体構造(PDB id : 3TH4)。A)と同様に Ca^{2+} および Mg^{2+} は ω -loop と 2つの α ヘリックスの境界面上で結合しており，ポジション 4 には Ca^{2+} (Ca4)が結合している。A)と比べて， ω -loop は 2つのヘリックスに接近している。図の円内では Ca2, Ca3, Ca4, Ca5 は Gla 残基および 6 個の水分子と配位している。

アミノ酸残基より構成され，2つの逆平行 β -シートを有している。また，その立体構造は3つの分子内 S-S 結合によって安定化されている。EGF 様ドメインは主としてタンパク質同士の相互作用に参与する³⁵⁾。

VII の EGF1 ドメインは N 末端側に高親和性の Ca^{2+} 結合部位を有しており，GD の動きを制限する。また，この部位は TF との相互作用および VIIa の酵素活性に重要である^{36, 37)}。部位特異的な蛍光標識実験より，VIIa と sTF の複合体形成は Ca^{2+} が EGF1 ドメインと結合することで開始される³⁸⁾。なお，TF との相互作用には EGF1 ドメインだけでなく，GD やセリンプロテアーゼドメインも関与する。

EGF2 ドメインについては R100C, D123Y という変異を有する患者が報告されており，いずれも VII の分泌異常を示している³⁹⁾。また，EGF2 ドメイン由来のあるペプチド配列は TF 依存的な X の活性化反応を阻害することから，EGF2 ドメインは VIIa/TF/X 複合体の形成およびその機能に参与する可能

性が示唆される⁴⁰⁾。

3.3. セリンプロテアーゼドメイン

一般に，セリンプロテアーゼは求核性をもつセリン残基(c195)を有し，触媒残基であるヒスチジン残基(c57)とアスパラギン酸残基(c102)と共に活性中心(catalytic triad)を構成する(括弧内の c の数字はキモトリプシンナンバー)。セリンプロテアーゼは基質とミカエリス型複合体を形成すると，セリン残基の水酸基のプロトンがヒスチジン残基に移る。プロトン化したヒスチジン残基はアスパラギン酸残基との水素結合によって安定化される。プロトンを失ったセリン残基の水酸基の酸素原子は基質のペプチド主鎖にあるカルボニル基の正に分極した炭素原子に求核攻撃を行う。それによってセリン残基の水酸基と基質ペプチドのカルボニル基が共有結合した四面体型の中間複合体が形成される。次いで四面体型の中間複合体が分解し，基質のペプチド結合が切断され，アシル酵素中間体が形成される。その後，

水がアシル酵素中間体のアシル基を攻撃し、最終的に基質を切り離して水解反応が完了する。

セリンプロテアーゼドメインは3つの α -ヘリックスを有しており、それらはTFのN末端ドメインと水素結合を形成し、同様にEGF2ドメインとも相互作用する。X線結晶構造解析で決定された構造(図2)に基づいて、セリンプロテアーゼドメイン、EGF2ドメインおよびsTFの相互作用境界面を図5に示す⁴¹⁾。図5によると、セリンプロテアーゼドメインとsTFの相互作用には関与するアミノ酸残基は、VIIa側ではF275(c129F), R277(c134), T307(c165), Q308(c166), D309(c167), R379(c230)であり、sTF側ではS39, D44, W45, E91, Y94, N96である³²⁾。また、上述の相互作用境界面ではVIIaの活性を増加させる重要な残基としてM306(c164)が同定されている。M306はVIIのアロステリックな活性化に関与しており、その側鎖はsTFのF76, P92, Y94で構成される疎水ポケットにはまり込む^{11,25)}。

セリンプロテアーゼドメインは水素結合および疎水性相互作用を介してEGF2ドメインとも相互作用する。このうち水素結合形成に関与するアミノ酸残基を図5に示す。図5によると、セリンプロテアーゼドメイン側ではP260(c120), L263(c123), E265(c125), R271(c129B), T272(c129C), EGF2ドメイン側ではN95, Y101, C102, D104, R113, H115, G136が水素結合に関与していることがわかる。また、セリンプロテアーゼドメインはその疎水性部分をEGF2ドメインの疎水性残基によって保護され、安定化する。この疎水性相互作用がないと、セリンプロテアーゼドメインの疎水的表面は溶媒にさらされ、不安定化すると考えられている。

3.3.1. Na⁺ および Zn²⁺ 結合部位

【Na⁺ 結合部位】

VIIaにおいて、Na⁺結合部位はセリンプロテアーゼドメインのY332(c184)-C340(c191)およびC368(c220)-F374(c225)ループを含む領域に存在する。これと相同な領域はIXa, Xa, 活性化プロテインC(APC)においても存在する(トロンピンには類似の領域はないようである)²⁵⁾。

Na⁺はY332(c184), S333(c185), H373(c224), T370(c221)主鎖のカルボニル酸素と2つの水分子によって配位されている(図6A)。これら水分子の

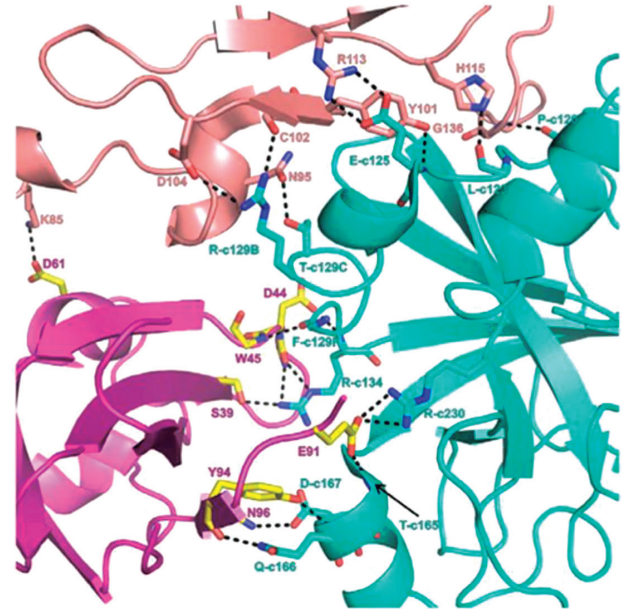


図5 VIIaのセリンプロテアーゼドメインおよびEGF2ドメイン、sTFの相互作用境界面(文献41より引用)
セリンプロテアーゼドメイン: cyan, EGF2ドメイン: salmon, sTF: magenta, 水素結合: 黒の破線, 窒素原子: blue, 酸素原子: red, アミノ酸残基-cの横の数字: キモトリプシンナンバ.

1つはD338(c189)^{**2)}と水素結合している。

VIIaはNa⁺と結合することで、sTFに対する親和性がわずかに増加する²⁵⁾。このことは、XaおよびIXaのNa⁺結合部位がそれぞれの補因子であるVaおよびVIIIaへの親和性を増加させるという報告と一致する^{42,43)}。さらに、XaとVaの結合⁴²⁾およびIXaとVIIIaの結合⁴³⁾と同様に、VIIaがsTFと結合するとNa⁺による活性への影響は減じる^{44,45)}。酵素前駆体であるプロトロンビン, VII, IX, XはそれぞれNa⁺結合部位が形成されておらず、活性型へ変換される際の構造変化に伴って、Na⁺結合部位が形成され、Na⁺と結合することで自身の構造を安定化すると考えられている。

【Zn²⁺ 結合部位】

VIIaのセリンプロテアーゼドメインにはZn²⁺結合部位が2つ(1st Zn²⁺結合部位, 2nd Zn²⁺結合部位)同定されている^{25,46)}。Zn²⁺はVIIaと膀胱がんJ82細胞上に発現したTFとの結合性を増加させるとの報

^{**2)} D338(c189): S1 site(基質認識部位)の底。

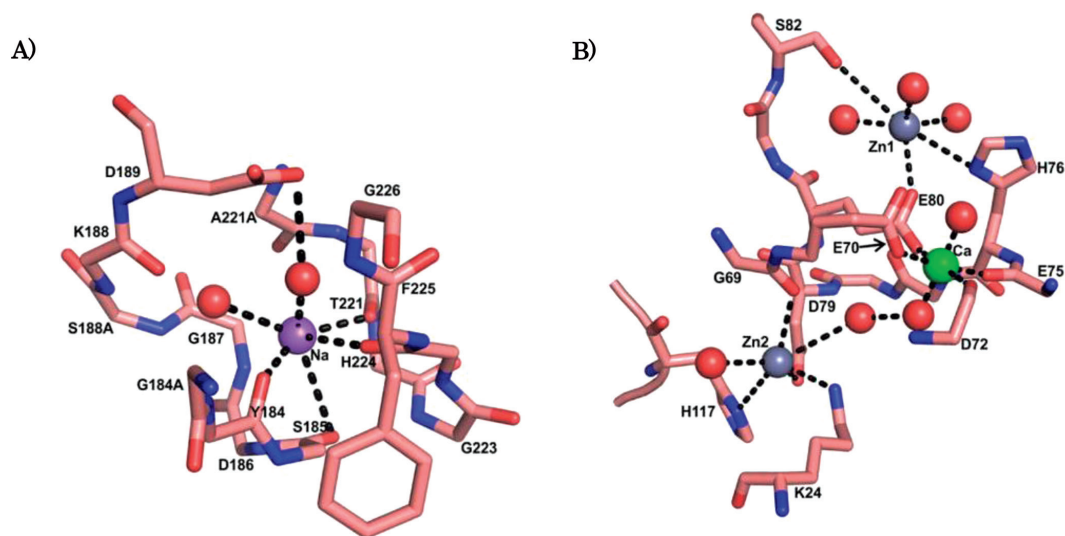


図6 VIIaのセリンプロテアーゼドメイン内の Ca^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} 結合部位(文献41より引用)

Na^+ : purple spheres, 水分子: red spheres, Zn^{2+} : light gray spheres, Ca^{2+} : green spheres, 配位結合および水素結合: 黒の破線, 窒素原子: blue, 酸素原子: red, アミノ酸残基の横の数字: キモトリブシンナンバー.

A) セリンプロテアーゼドメイン内の Na^+ 結合部位

B) セリンプロテアーゼドメイン内の Ca^{2+} および Zn^{2+} 結合部位

告がある⁴⁷⁾. しかし, その後の研究で, Zn^{2+} はsTFに対するVIIaの親和性を減少させることが確認されている⁴⁶⁾. Zn^{2+} はVIIa/sTF複合体よりもVIIa単独のプロテアーゼ活性に対して強い阻害効果を示すという^{46, 47)}.

アミノ酸変異実験とモデリング研究から, セリンプロテアーゼドメインのH216(c76)とH257(c117)が Zn^{2+} との結合に関与する⁴⁶⁾. 1st Zn^{2+} 結合部位の配位に関与するのはH216(c76), E220(c80), S222(c82)および3つの水分子であり, 2nd Zn^{2+} 結合部位ではH257(c117), K161(c24), D219(c79), G209(c69)および2つの水分子である²⁵⁾. これらの相互作用はVIIaに特有である.

図6Bによると, 2つの Zn^{2+} 結合部位はセリンプロテアーゼドメイン Ca^{2+} 結合部位の両側に位置する. E220(c80)の側鎖は1st Zn^{2+} および Ca^{2+} の配位に関与し, 一方で, 2nd Zn^{2+} および Ca^{2+} は2つの水分子が関与する水素結合ネットワークを介して相互に連結している. 即ち, Ca^{2+} および Zn^{2+} 結合部位は部分的に重複していることから, Zn^{2+} の活性阻害効果は Ca^{2+} 濃度の影響を受けやすい⁴⁶⁾. さらに, セリンプロテアーゼドメインのM306(c164)からD309(c167)の領域とTFとの結合, およびE210(c70)か

らE220(c80)の領域と Ca^{2+} との結合によって, VIIaの活性化と安定化が惹起され⁴⁶⁾, Zn^{2+} の阻害効果は一部相殺される.

4. VII 活性化機構

酵素前駆体であるVIIはほとんど活性を示さず, VIIaに活性化された後に主に外因系凝固反応に関与する⁴⁸⁻⁵¹⁾.

Xa, IXaおよびVIIaを含む凝固因子はVIIを活性化することができる⁵²⁻⁵⁵⁾, 中でもXaがVIIの最も強力なアクチベーターと考えられている⁵⁶⁾. VIIはXaなどの各種酵素により, R152(c15)-I153(c16)結合が切断され, S-S結合した約20 kDaのL鎖と約30 kDaのH鎖となる. その後, 新たに生じたN末端のI153(c16)の α -アミノ基とD343(c194)の β -カルボキシル基との間でイオンペアを形成することによってH193(c57), D242(c102)およびS344(c195)によるcatalytic triad, S1特異ポケット, oxyanion hole^{*3}が形成され, VIIはVIIaとなる⁵⁷⁾. なお, oxyanion holeの成熟はTFではなく基質またはインヒビターとの結合によって誘導される^{25, 58, 59)}.

VIIaは3つのアロステリック部位を有する⁵⁷⁾.

VIIa 単独では基質である IX および X をほとんど活性化しないが、Ca²⁺ とリン脂質存在下ではそれらの活性化はわずかに増加する。しかし、sTF を添加すると触媒効果の指標である k_{cat}/K_m 値は、VIIa に Ca²⁺ のみを添加した場合と比べて約 10⁷ 倍上昇する⁶⁰。また、ペプチド合成基質の加水分解活性は sTF の存在下で約 50 倍に増加するという⁶¹。これらの上昇は k_{cat} 値の増加が主であり、基質に対する親和性 (K_m 値) は大きくは変わらない。このことは sTF は VIIa の触媒基形成に関与することを示唆する。

TF と相互作用する VII の H 鎖の α -ヘリックスは 170 loop 領域 (C310(c168)-C329(c182)) 近傍に位置し、他のビタミン K 依存性凝固因子に比して 5 残基長く、上述の I153(c16)-D343(c194) のイオンペアの形成に影響すると考えられている。活性化後も VIIa はこのイオンペア形成が不安定で、前駆体様構造と活性型構造との間で平衡状態にあるとされるが、TF と結合することで S1 部位およびイオンペアの形成が安定化し、平衡が活性型へシフトする^{12, 17-19, 62-64}。このような構造変化は、トリプシノーゲンからトリプシンへの活性化や他のセリンプロテアーゼの活性化の際にも生じるが、通常は TF のような補助因子がなくても完結する⁶⁵。VIIa/sTF 複合体のセリンプロテアーゼドメインでは、4 つの activation domain^{*4} を除き、大きな構造変化は見られないものの、activation domain loop 2 (G285(c142)-A294(c152)) で繋がる 2 つの β ストランドの結合状態が変わり、アミノ酸 3 残基がシフトしている^{17, 18, 60}。TF との結合に伴うこうした構造変化は VIIa の時のみ起こり¹²、VII では起きない⁶⁰。VIIa/sTF 複合体の形成には VIIa の L 鎖のアミノ酸 18 残基 (F31, E35, R36, L39, F40, S43, Q34, I69, C70, F71, E77,

G78, R79, Q88, L79, I90, V92, N93) と H 鎖の 6 残基 (F275(c129F), R277(c134), R304(c162), M306(c164), Q308(c166), D309(c167)) が関与する¹¹。これら H 鎖の 6 残基のうち、「3.3. セリンプロテアーゼドメイン」の項で述べた TF との相互作用に関与するアミノ酸残基と一致するものは、F275(c129F), R277(c134), Q308(c166), D309(c167) の 4 つである。

以上、VIIa と TF の相互作用についてこれまでの知見を述べてきたが、両者の結合が前駆体様構造から活性型構造への変換をどのように促進するのかについては現在も研究が行われており結論は出ていない⁶⁶⁻⁷¹。

5. Extrinsic Xase complex による X 活性化

Extrinsic Xase complex である VIIa/TF 複合体は、Ca²⁺/Mg²⁺ およびリン脂質依存的に IX および X を活性化することで、最終的にプロトロンビンがトロンビンへと活性化されるのを誘導する。生成した Xa または IXa はポジティブフィードバックによってさらに VII/TF 複合体を活性化する。Xa および IXa のアミノ酸配列の相同性は高いが、IXa は Xa と比べて VIIa/TF 複合体との相互作用は弱く^{72, 73}、VII/TF 複合体の活性化は遅い^{74, 75}。さらに、VIIa/TF 複合体に対する親和性は IX GD および EGF1 ドメインよりも X GD および EGF1 ドメインの方が強い⁷⁶。

X (または Xa) GD および EGF1 ドメインが VIIa/TF 複合体とどのように相互作用するかを考察するために、三者複合体 (VIIa/sTF-Xa, VIIa/sTF-IXa, VIIa/sTF-IX_{alpha}^{*5}) のコンピュータモデルが利用されている^{75, 77-80}。このモデルでは、Xa, IXa または IX_{alpha} の GD は sTF および VIIa GD と相互作用する (図 7)。sTF および VIIa GD との相互作用境界面のアミノ酸配列はそれぞれ異なっており、Xa GD のアミノ酸残基 9-12 (KKGH) は塩基性であるのに対し、IXa GD のアミノ酸残基 10-13 (VQGN) は疎水性および中性である。Xa の K10 と H12 は VIIa の D33 とイオン結合を形成しているのに対して (図 7A), IXa の Q11

*³ oxyanion hole : セリンプロテアーゼドメインに特有のオキシアニオン結合部位であり、グリシン残基(c193)とセリン残基(c195)の主鎖のアミノ基によって形成される。基質の主鎖のカルボキシル基はこれら残基との水素結合によって安定化される。

*⁴ activation domain : VII セリンプロテアーゼドメインに存在する 4 つの loop 領域 (activation domain loop 1 : I153(c16)-K157(c20), Activation domain loop 2 : G285(c142)-A294(c152), Activation domain loop 3 : G331(c184)-D343(c194), Activation domain loop 4 : G365(c216)-V371(c222))。活性化に伴い構造が変化し、S1 site 形成、イオンペア形成などが生じる。

*⁵ IX_{alpha} : IX の活性化において、活性化 XI 因子あるいは VIIa/TF 複合体により R145-A146 間のペプチド結合を切断されて生じる中間体。合成基質の加水分解活性を有するが、X の活性化能は有さない。

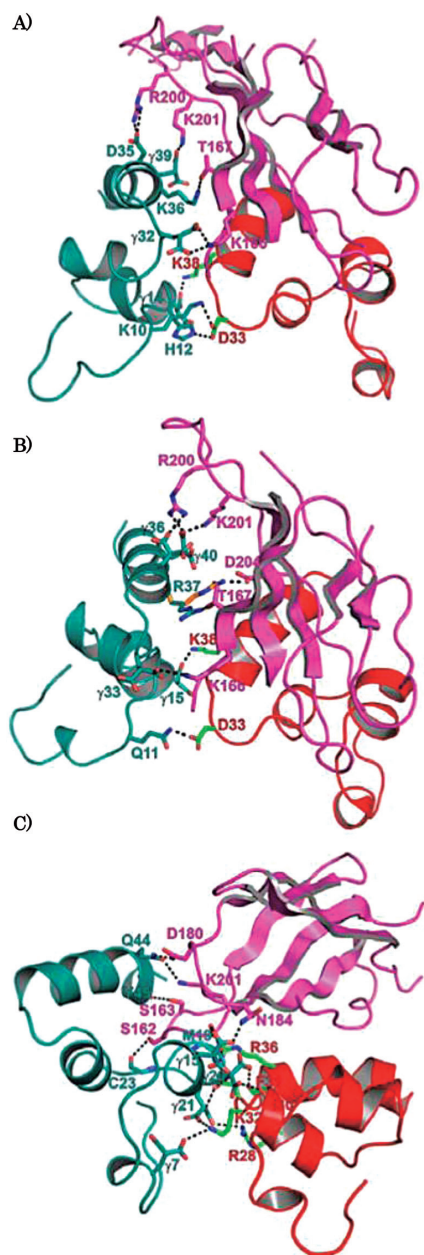


図7 VIIa/TF複合体とXa, IXaまたはIX_αGlaドメインの相互作用(モデリング)(文献41より引用)

VIIa Gla: red, sTF: magenta, Xa Gla/IXa Gla/IX_αGla: deep teal, 炭素原子: green(VIIa Gla)/magenta(sTF)/窒素原子: blue, 酸素原子: red, 水素結合: 黒の破線.

A) Xa Gla, sTF および VIIa Gla の相互作用, B) IXa Gla, sTF および VIIa Gla の相互作用, C) IX_αGla, sTF および VIIa Gla の相互作用

はVIIaのD33と水素結合を形成している(図7B)。これらの配列の相違によって、VIIa/TF複合体に対するIXaの相互作用はXaと比べて弱くなっている

と考えられる。また、その他にVIIa GDのR36はX認識に重要な残基の1つであると報告されている⁸¹⁾。図7AのモデルにおいてR36とX GDの相互作用は見出されていないが、別のモデルではR36はX GDのGla14とイオン結合を形成しており⁸²⁾、R36はTFとの水素結合ネットワークに参与するという⁸³⁾。また、X(またはXa)とIX(またはIXa)はGDを介してsTFのC末端領域(R200, K201, T167, K165が関与)と相互作用し^{73, 74, 77, 82, 84-87)}、GD以外にもEGF1ドメインのN末端領域を介してsTFと相互作用する。一方、EGF1ドメインとVIIaは相互作用しない。他にはVIIaセリンプロテアーゼドメインのR290(c147)⁸⁸⁾はXの活性化に重要とする報告がある⁸⁹⁾。IX_αGlaはIXaと比べて、VIIa/sTF複合体と相互作用するアミノ酸残基はかなり異なっており(図7B, C)。VIIa/sTF複合体と強く相互作用する。同様に、sTFと相互作用するIXaおよびIX_α EGF1ドメインのアミノ酸残基、VIIaセリンプロテアーゼドメインと相互作用するIXaおよびIX_αセリンプロテアーゼドメインのアミノ酸残基にも差異が見られる⁴¹⁾。

本項ではコンピュータモデルに基づいて extrinsic Xase complex とその基質の相互作用について述べたが、構築したモデルによって両者の相互作用領域で一部差異が見られることから、モデル構造の正確さと信頼性には限界がある。今後、正確な相互作用領域を特定し、Xの活性化プロセスを詳細に理解するためには、実験的に決定された三者複合体の構造が必要である。

6. インヒビターとの相互作用

VIIaの生理的インヒビターはアンチトロンビンと組織因子経路インヒビター(TFPI)が知られている。ここではTFPIとの相互作用について述べる。

TFPIのタンパク構造は負電荷を帯びたN末端、3つのKunitzドメイン、正電荷を帯びたC末端から構成される⁹⁰⁾。その阻害活性はKunitzドメイン2を介したXaとの結合とKunitzドメイン1を介したVIIa/TF複合体との結合が関与している^{91, 92)}。Kunitzドメイン3には阻害活性がないものの、この領域を介してプロテインSと結合することで、TFPIのXa

阻害活性が上昇する⁹³⁾。

Kunitz ドメイン 1 と相互作用する VIIa の残基および Kunitz ドメイン 2 と相互作用する Xa の残基は既に報告されている^{94, 95)}。とくに、VIIa との相互作用に重要な Kunitz ドメイン 1 の残基は D11, R20, E46 と考えられている。D11 は VIIa の R147 および K192 と、R20 は VIIa の D60 と、E46 は VIIa の K60A/K60C とそれぞれ相互作用する。また、Xa との相互作用に重要な Kunitz ドメイン 2 の残基は Y17, R32, E46 と考えられている。Y17 は疎水性ポケットに入り込み、Xa の R143 および Q151 と相互作用する。また、R32 は Xa の E39 と、E46 は Xa の K62 とそれぞれ相互作用する。

VIIa/sTF-Xa 三者複合体で Xa と相互作用する TF の残基は VIIa/sTF-Xa-TFPI 四者複合体と考えられている⁹⁶⁾。

Kunitz ドメイン 1 と VIIa セリンプロテアーゼドメインの相互作用および Kunitz ドメイン 2 と Xa セリンプロテアーゼドメインの相互作用の詳細はまだ解明されておらず、実験的に決定された立体構造の報告が待たれる。

7. 臨床応用

7.1 rVIIa 製剤の作用機序

本邦では 1984 年より aPCC 製剤、2000 年より rVIIa 製剤が VIII または IX インヒビター患者の止血管理に臨床応用されている。rVIIa 製剤の投与量は 90~120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であったが、止血に頻回投与を必要とすることもあり、2013 年に 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の単回投与が新たに認められた。大量投与が必要な理由は、① TF 結合に関して VII と VIIa が拮抗するから (rVIIa 製剤の作用機序は TF 依存性)、② 反応の場となる活性化血小板への VIIa 結合能が低いから (TF 非依存性) との説があり長く議論されてきたが、最近 Novo Nordisk 社の Augustsson らは、変異体を用いた *in vitro* の実験から、rVIIa は TF 非依存性に作用すると報告した⁹⁷⁾。すなわち、変異体 VII (R152A) は VIIa に拮抗するが、auto activation により TF に結合した VII は VIIa に活性化されるため、6 nM 以上の VIIa が存在すれば有意に拮抗しないことを示し、止血に高濃度の VIIa を必要とするのは TF 非依存性

に作用するからとした。また、Feng らは TF 結合能のないキメラ分子 (マウス IX の GD および EGF-1 ドメインと VIIa の EGF-2 およびセリンプロテアーゼドメインからなる) を作成し、血友病マウスを用いてその止血効果を試験した⁹⁸⁾。この TF 結合能のないキメラ分子はマウス VIIa と同等の止血効果を示したことから、rVIIa の作用機序は TF 非依存性であると報告している。

7.2 新規バイパス止血製剤 (VIIa/X 混合製剤)

rVIIa 製剤に次ぐ世界で 3 番目のバイパス止血製剤として新たに発売された VIIa/X 混合製剤の概要について紹介する。

2003 年、Tomokiyo らは血友病様血漿を用いた実験から、VIIa 単独の場合と比べて VIIa に X を加えた場合でトロンビン産生能が亢進することを示した⁹⁹⁾。これは、元来 X の生理的な血中濃度 (約 140 nM) は VIIa の X に対する K_m 値より低値であるが、X 濃度を K_m 値の倍以上に高めることで VIIa による X の活性化が進行し易くなったためとしている¹⁰⁰⁾。VIIa/X 混合製剤はこの知見に基づいて開発されたバイパス止血製剤であり、VIII または IX に対するインヒビターを保有する患者の出血抑制を適応に持ち、その作用機序は上述の rVIIa 製剤と同様と考えられている。なお、VIIa/X 混合製剤は 2007 年から 2013 年にかけてインヒビターを保有する先天性血友病患者を対象とした臨床試験 (Phase I~III) が行われ¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾、2014 年より国内で発売された。

8. おわりに

以上述べてきたように、これまで VII はその分子構造と機能について数多くの研究がなされてきた。しかし、VIIa が TF と結合するに伴いどのように活性型へ移行するのか、X や IX に対する VIIa/TF 複合体の親和性の違い、TFPI による制御機構などの詳細については分子レベルで明確な結論は出ていない。

今後、最新の技術を用いた解析等により、VII 単独の 3 次構造および補因子・基質・インヒビターとの複合体構造とその機能発現のメカニズムが解明されることが期待される。

また、VIIa 製剤の臨床応用も開発が進み、rVIIa 製剤に続くバイパス止血製剤として VIIa/X 混合製

剤が新たに上市された。臨床試験では症例数に限りがあり、併用薬・合併症等の情報に乏しかったが、市販後は様々な局面で使われていくことによって、当該製剤の安全性と有効性が明確になるものと期待したい。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご校閲戴いた岩永貞昭先生(九州大学名誉教授)、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)に深謝します。

著者の利益相反(COI)の開示：

高見英輔・中島輝久：役員・顧問職・社員など(一般財団法人 化学及血清療法研究所 所員)

文献

- 1) Tuddenham EG, Pemberton S, Cooper DN: Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology. *Thromb Haemost* **74**: 313–321, 1995.
- 2) Bajaj SP, Rapaport SI, Brown SF: Isolation and characterization of human factor VII. Activation of factor VII by factor Xa. *J Biol Chem* **256**: 253–259, 1981.
- 3) Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, Grant FJ, Saari GC, Woodbury RG, Hart CE, Insley M, Kisiel W, Kurachi K: Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2412–2416, 1986.
- 4) 桑原光弘：Factor VIIa 製剤の過去・現在・未来. *血栓止血誌* **25**: 475–481, 2014.
- 5) Hoffman M, Monroe DM 3rd, Roberts HR: Activated factor VII activates factors IX and X on the surface of activated platelets: thoughts on the mechanism of action of high-dose activated factor VII. *Blood Coagul Fibrinolysis* **9**: S61–S65, 1998.
- 6) Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W: The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**: 10363–10370, 1991.
- 7) Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR: Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* **86**: 1794–1801, 1995.
- 8) Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W: Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa. *Biochemistry* **29**: 9418, 1990.
- 9) Davie EW, Ratnoff OD: Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **145**: 1310–1312, 1964.
- 10) Macfarlane RG: An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* **202**: 498–499, 1964.
- 11) Banner DW, D'Arcy A, Chène C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* **380**: 41–46, 1996.
- 12) Higashi S, Matsumoto N, Iwanaga S: Molecular mechanism of tissue factor-mediated acceleration of factor VIIa activity. *J Biol Chem* **271**: 26569–26574, 1996.
- 13) Dickinson CD, Kelly CR, Ruf W: Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14379–14384, 1996.
- 14) Turecek PL, Varadi K, Gritsch H, Auer W, Pichler L, Eder G, Schwarz HP: Factor Xa and prothrombin: mechanism of action of FEIBA. *Vox Sang* **77**: 72–79, 1999.
- 15) Negrier C, Gomperts ED, Oldenburg J: The history of FEIBA: a lifetime of success in the treatment of haemophilia complicated by an inhibitor. *Haemophilia* **12**: 4–13, 2006.
- 16) Turecek PL, Váradi K, Gritsch H, Schwarz HP: FEIBA: mode of action. *Haemophilia* **10**: 3–9, 2004.
- 17) 東昌市：血液凝固 VII 因子と組織因子の分子相互作用—特に VIIa 因子触媒活性の増強機構について—。 *血栓止血誌* **10**: 12–21, 1999.
- 18) 水口純, 副島見事, 岩永貞昭：血液凝固 VII 因子の活性化発現メカニズム—そのとき凝固カスケードは動き始める—。～前編～。 *血栓止血誌* **15**: 94–106, 2004.
- 19) 水口純, 副島見事, 岩永貞昭：血液凝固 VII 因子の活性化発現メカニズム—そのとき凝固カスケードは動き始める—。～後編～。 *血栓止血誌* **15**: 223–237, 2004.
- 20) Greenberg DL, Davie EW: The blood coagulation factors—their complementary DNAs, genes, and expression, In Rovert W, Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ (eds): *Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice*, 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2006, 21–57.
- 21) Petersen LC, Hedner U, Wildgoose P: Factor VII, In High KA, Roberts HR (eds): *Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis*. New York, Marcel Dekker, 1995, 147–165.
- 22) 岩永貞昭：血液凝固に含まれる新しい O 結合型糖鎖, d-Xyl α 1-3-d-Xly α 1-3-d-Glc p β -O-Ser(53) および Neu 5Ac α 2-6 Gal β 1-4Glc NAc β 1-3 Fuc-O-Ser-61, の発見。「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」 *News Letter No.8*: 6–12, 2006.
- 23) Perry DJ: Factor VII Deficiency. *Br J Haematol* **118**: 689–700, 2002.
- 24) 森田隆司, 水野洋：Gla ドメインの立体構造と機能. *血栓止血誌* **11**: 391–392, 2000.
- 25) Bajaj SP, Schmidt AE, Agah S, Bajaj MS, Padmanabhan K: High resolution structures of p-aminobenzamidine- and benzamidine-VIIa/soluble tissue factor: unpredicted conformation of the 192–193 peptide bond and mapping of Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, and Zn²⁺ sites in factor VIIa. *J Biol Chem* **281**: 24873–24888, 2006.
- 26) Sekiya F, Yoshida M, Yamashita T, Morita T: Magnesium(II) is a crucial constituent of the blood coagulation cascade. Potentiation of coagulant activities of factor IX by Mg²⁺ ions. *J Biol Chem* **271**: 8541–8544, 1996.
- 27) Sekiya F, Yamashita T, Atoda H, Komiyama Y, Morita T: Regulation of the tertiary structure and function of coagula-

- tion factor IX by magnesium (II) ions. *J Biol Chem* **270**: 14325–14331, 1995.
- 28) Sekiya F, Yoshida M, Yamashita T, Morita T: Localization of the specific binding site for magnesium(II) ions in factor IX. *FEBS Lett* **392**: 205–208, 1996.
 - 29) Agah S, Bajaj SP: Role of magnesium in factor XIa catalyzed activation of factor IX: calcium binding to factor IX under physiologic magnesium. *J Thromb Haemost* **7**: 1426–1428, 2009.
 - 30) Persson E, Ostergaard A: Mg²⁺ binding to the Gla domain of factor X influences the interaction with tissue factor. *J Thromb Haemost* **5**: 1977–1978, 2007.
 - 31) Prendergast FG, Mann KG: Differentiation of metal ion-induced transitions of prothrombin fragment 1. *J Biol Chem* **252**: 840–850, 1977.
 - 32) Vadivel K, Agah S, Messer AS, Cascio D, Bajaj MS, Krishnaswamy S, Esmon CT, Padmanabhan K, Bajaj SP: Structural and functional studies of γ -carboxyglutamic acid domains of factor VIIa and activated Protein C: role of magnesium at physiological calcium. *J Mol Biol* **425**: 1961–1981, 2013.
 - 33) Ghosh S, Pendurthi UR, Steinoe A, Esmon CT, Rao LV: Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem* **282**: 11849–11857, 2007.
 - 34) Pavani G, Ivanciu L, Faella A, Marcos-Contreras OA, Margaritis P: The endothelial protein C receptor enhances hemostasis of FVIIa administration in hemophilic mice in vivo. *Blood* **124**: 1157–1165, 2014.
 - 35) Stenflo J, Stenberg Y, Muranyi A: Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 51–63, 2000.
 - 36) Persson E, Nielsen LS: Ca²⁺ in the first epidermal growth factor-like domain of activated factor VII. *Blood Coagul Fibrinolysis* **9**: S79–S81, 1998.
 - 37) Muranyi A, Finn BE, Gippert GP, Forsén S, Stenflo J, Drakenberg T: Solution structure of the N-terminal EGF-like domain from human factor VII. *Biochemistry* **37**: 10605–10615, 1998.
 - 38) Carlsson K, Osterlund M, Persson E, Freskqård PO, Carlsson U, Svensson M: Site-directed fluorescence probing to dissect the calcium-dependent association between soluble tissue factor and factor VIIa domains. *Biochim Biophys Acta* **1648**: 12–16, 2003.
 - 39) D'Andrea G, Bossone A, Lupone MR, Peyvandi F, Maisto G, Perricone F, Grandone E, Margaglione M: Molecular characterization of a factor VII deficient patient supports the importance of the second epidermal growth factor-like domain. *Haematologica* **89**: 979–984, 2004.
 - 40) Orning L, Stephens RW, Petersen LB, Hamers MJ, Stormorken H, Sakariassen KS: A peptide sequence from the EGF-2 like domain of FVII inhibits TF-dependent FX activation. *Thromb Res* **86**: 57–67, 1997.
 - 41) Vadivel K, Bajaj SP: Structural biology of factor VIIa/tissue factor initiated coagulation. *Front Biosci* **17**: 2476–2494, 2012.
 - 42) Camire RM: Prothrombinase assembly and S1 site occupation restore the catalytic activity of FXa impaired by mutation at the sodium-binding site. *J Biol Chem* **277**: 37863–37870, 2002.
 - 43) Schmidt AE, Stewart JE, Mathur A, Krishnaswamy S, Bajaj SP: Na⁺ site in blood coagulation factor IXa: effect on catalysis and factor VIIIa binding. *J Mol Biol* **350**: 78–91, 2005.
 - 44) Schmidt AE: *Allostery in Serine proteases*, Saint Louis, Saint Louis University, 2005.
 - 45) Gopalakrishna K, Rezaie AR: The influence of sodium ion binding on factor IXa activity. *Thromb Haemost* **95**: 936–941, 2006.
 - 46) Petersen LC, Olsen OH, Nielsen LS, Freskqård PO, Persson E: Binding of Zn²⁺ to a Ca²⁺ loop allosterically attenuates the activity of factor VIIa and reduces its affinity for tissue factor. *Protein Sci* **9**: 859–866, 2000.
 - 47) Pedersen AH, Lund-Hansen T, Komiyama Y, Petersen LC, Oestergård PB, Kisiel W: Inhibition of recombinant human blood coagulation factor VIIa amidolytic and proteolytic activity by zinc ions. *Thromb Haemost* **65**: 528–534, 1991.
 - 48) Nemerson Y, Repke D: Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb Res* **40**: 351–358, 1985.
 - 49) Rao LV, Rapaport SI: Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6687–6691, 1988.
 - 50) Williams EB, Krishnaswamy S, Mann KG: Zymogen/enzyme discrimination using peptide chloromethyl ketones. *J Biol Chem* **264**: 7536–7545, 1989.
 - 51) Wildgoose P, Berkner KL, Kisiel W: Synthesis, purification, and characterization of an Arg152—Glu site-directed mutant of recombinant human blood clotting factor VII. *Biochemistry* **29**: 3413–3420, 1990.
 - 52) Radcliffe R, Nemerson Y: Activation and control of factor VII by activated factor X and thrombin. Isolation and characterization of a single chain form of factor VII. *J Biol Chem* **250**: 388–395, 1975.
 - 53) Rao LV, Bajaj SP, Rapaport SI: Activation of human factor VII during clotting in vitro. *Blood* **65**: 218–226, 1985.
 - 54) Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kisiel W: Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. *Biochemistry* **30**: 10819–10824, 1991.
 - 55) Neuenschwander PF, Fiore MM, Morrissey JH: Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. Implications of a two-dimensional enzyme kinetic mechanism. *J Biol Chem* **268**: 21489–21492, 1993.
 - 56) Rand KD, Jørgensen TJ, Olsen OH, Persson E, Jensen ON, Stennicke HR, Andersen MD: Allosteric activation of coagulation factor VIIa visualized by hydrogen exchange. *J Biol Chem* **281**: 23018–23024, 2006.
 - 57) Butenas S, Lawson JH, Kalafatis M, Mann KG: Cooperative interaction of divalent metal ions, substrate, and tissue factor with factor VIIa. *Biochemistry* **33**: 3449–3456, 1994.
 - 58) Zhang E, St Charles R, Tulinsky A: Structure of extracellular

- tissue factor complexed with factor VIIa inhibited with a BPTI mutant. *J Mol Biol* **285**: 2089–2104, 1999.
- 59) Sichler K, Banner DW, D'Arcy A, Hopfner KP, Huber R, Bode W, Kresse GB, Kopetzki E, Brandstetter H: Crystal structures of uninhibited factor VIIa link its cofactor and substrate-assisted activation to specific interactions. *J Mol Biol* **322**: 591–603, 2002.
- 60) Eigenbrot C: Structure, function, and activation of coagulation factor VII. *Curr Protein Pept Sci* **3**: 287–299, 2002.
- 61) Neuenschwander PF, Branam DE, Morrissey JH: Importance of substrate composition, pH and other variables on tissue factor enhancement of factor VIIa activity. *Thromb Haemost* **70**: 970–977, 1993.
- 62) Higashi S, Matsumoto N, Iwanaga S: Conformation of factor VIIa stabilized by a labile disulfide bond (Cys-310-Cys-329) in the protease domain is essential for interaction with tissue factor. *J Biol Chem* **272**: 25724–25730, 1997.
- 63) Soejima K, Yuguchi M, Mizuguchi J, Tomokiyo K, Nakashima T, Nakagaki T, Iwanaga S: The 99 and 170 loop-modified factor VIIa mutants show enhanced catalytic activity without tissue factor. *J Biol Chem* **277**: 49027–49035, 2002.
- 64) Soejima K, Mizuguchi J, Yuguchi M, Nakagaki T, Higashi S, Iwanaga S: Factor VIIa modified in the 170 loop shows enhanced catalytic activity but does not change the zymogen-like property. *J Biol Chem* **276**: 17229–17235, 2001.
- 65) Huber R, Bode RW: Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc Chem Res* **11**: 114–122, 1978.
- 66) Ruf W, Dickinson CD: Allosteric regulation of the cofactor-dependent serine protease coagulation factor VIIa. *Trends Cardiovasc Med* **8**: 350–356, 1998.
- 67) Pike AC, Brzozowski AM, Roberts SM, Olsen OH, Persson E: Structure of human factor VIIa and its implications for the triggering of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8925–8930, 1999.
- 68) Kemball-Cook G, Johnson DJ, Tuddenham EG, Harlos K: Crystal structure of active site-inhibited human coagulation factor VIIa (des-Gla). *J Struct Biol* **127**: 213–223, 1999.
- 69) Petrovan RJ, Ruf W: Residue Met(156) contributes to the labile enzyme conformation of coagulation factor VIIa. *J Biol Chem* **276**: 6616–6620, 2001.
- 70) Persson E, Bak H, Østergaard A, Olsen OH: Augmented intrinsic activity of Factor VIIa by replacement of residues 305, 314, 337 and 374: evidence of two unique mutational mechanisms of activity enhancement. *Biochem J* **379**: 497–503, 2004.
- 71) Persson E, Olsen OH: Allosteric activation of coagulation factor VIIa. *Front Biosci* **17**: 3156–3163, 2011.
- 72) Lu G, Broze GJ, Krishnaswamy S: Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *J Biol Chem* **279**: 17241–17249, 2004.
- 73) Ndonwi M, Broze GJ, Agah S, Schmidt AE, Bajaj SP: Substitution of the Gla domain in factor X with that of protein C impairs its interaction with factor VIIa/tissue factor: lack of comparable effect by similar substitution in factor IX. *J Biol Chem* **282**: 15632–15644, 2007.
- 74) Butenas S, Mann KG: Kinetics of human factor VII activation. *Biochemistry* **35**: 1904–1910, 1996.
- 75) Ndonwi M, Broze GJ, Bajaj SP: The first epidermal growth factor-like domains of factor Xa and IXa are important for the activation of the factor VII-tissue factor complex. *J Thromb Haemost* **1**: 112–118, 2005.
- 76) Thiec F, Chereil G, Christophe OD: Role of the Gla and first epidermal growth factor-like domains of factor X in the prothrombinase and tissue factor-factor VIIa complexes. *J Biol Chem* **278**: 10393–10399, 2003.
- 77) Chen SW, Pellequer JL, Schved JF, Giansily-Blaziot M: Model of a ternary complex between activated factor VII, tissue factor and factor IX. *Thromb Haemost* **88**: 74–82, 2002.
- 78) Norledge BV, Petrovan RJ, Ruf W, Olson AJ: The tissue factor/factor VIIa/factor Xa complex: a model built by docking and site-directed mutagenesis. *Proteins* **53**: 640–648, 2003.
- 79) Kirchhofer D, Eigenbrot C, Lipari MT, Moran P, Peek M, Kelley RF: The tissue factor region that interacts with factor Xa in the activation of factor VII. *Biochemistry* **40**: 675–682, 2001.
- 80) Lee CJ, Chandrasekaran V, Wu S, Duke RE, Pedersen LG: Recent estimates of the structure of the factor VIIa (FVIIa)/tissue factor (TF) and factor Xa (FXa) ternary complex. *Thromb Res* **125** Suppl 1: S7-S10, 2010.
- 81) Manithody C, Yang L, Rezaie AR: Identification of a basic region on tissue factor that interacts with the first epidermal growth factor-like domain of factor X. *Biochemistry* **46**: 3193–3199, 2007.
- 82) Venkateswarlu D, Duke RE, Perera L, Darden TA, Pedersen LG: An all-atom solution-equilibrated model for human extrinsic blood coagulation complex (sTF-VIIa-Xa): a protein-protein docking and molecular dynamics refinement study. *J Thromb Haemost* **1**: 2577–2588, 2003.
- 83) Kirchhofer D, Lipari MT, Moran P, Eigenbrot C, Kelley RF: The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X. *Biochemistry* **39**: 7380–7387, 2000.
- 84) Sabharwal AK, Padmanabhan K, Tulinsky A, Mathur A, Gorka J, Bajaj SP: Interaction of calcium with native and decarboxylated human factor X. Effect of proteolysis in the autolysis loop on catalytic efficiency and factor Va binding. *J Biol Chem* **272**: 22037–22045, 1997.
- 85) Huang Q, Neuenschwander PF, Rezaie AR, Morrissey JH: Substrate recognition by tissue factor-factor VIIa. Evidence for interaction of residues Lys165 and Lys166 of tissue factor with the 4-carboxyglutamate-rich domain of factor X. *J Biol Chem* **271**: 21752–21757, 1996.
- 86) Ruf W, Shobe J, Rao SM, Dickinson CD, Olson A, Edgington TS: Importance of factor VIIa Gla-domain residue Arg-36 for recognition of the macromolecular substrate factor X Gla-domain. *Biochemistry* **38**: 1957–1966, 1999.
- 87) Vadivel K, Agah S, Messer AS, Cascio D, Bajaj MS, Krishnaswamy S, Esmon CT, Padmanabhan K, Bajaj SP: Mg²⁺ is required for optimal folding of the γ -carboxyglutamic acid (Gla) domains of vitamin K-dependent clotting factors at physiological Ca²⁺ ASH Meeting: Abstract number 1172, 2011.

- 88) Wilkinson FH, London FS, Walsh PN: Residues 88-109 of factor IXa are important for assembly of the factor X activating complex. *J Biol Chem* **277**: 5725–5733, 2002.
- 89) Ruf W: Factor VIIa residue Arg290 is required for efficient activation of the macromolecular substrate factor X. *Biochemistry* **33**: 11631–11636, 1994.
- 90) Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ: Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* **263**: 6001–6004, 1988.
- 91) Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze GJ: Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* **338**: 518–520, 1989.
- 92) Baugh RJ, Broze GJ, Krishnaswamy S: Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* **273**: 4378–4386, 1998.
- 93) Ahnström J, Andersson HM, Hockey V, Meng Y, McKinnon TA, Hamuro T, Crawley JT, Lane DA: Identification of functionally important residues in TFPI Kunitz domain 3 required for the enhancement of its activity by protein S. *Blood* **120**: 5059–5062, 2012.
- 94) Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP: Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* **86**: 959–972, 2001.
- 95) Burgering MJ, Orbons LP, van der Doelen A, Mulders J, Theunissen HJ, Grootenhuys PD, Bode W, Huber R, Stubbs MT: The second Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor: cloning, structure determination and interaction with factor Xa. *J Mol Biol* **269**: 395–407, 1997.
- 96) Carlsson K, Freskgård PO, Persson E, Carlsson U, Svensson M: Probing the interface between factor Xa and tissue factor in the quaternary complex tissue factor-factor VIIa-factor Xa-tissue factor pathway inhibitor. *Eur J Biochem* **270**: 2576–2582, 2003.
- 97) Augustsson C, Persson E: In vitro evidence of a tissue factor-independent mode of action of recombinant factor VIIa in hemophilia. *Blood* **124**: 3172–3174, 2014.
- 98) Feng D, Whinna H, Monroe D, Stafford DW: FVIIa as used pharmacologically is not TF dependent in hemophilia B mice. *Blood* **123**: 1764–1766, 2014.
- 99) Tomokiyo K, Nakatomi Y, Araki T, Teshima K, Nakano H, Nakagaki T, Miyamoto S, Funatsu A, Iwanaga S: A novel therapeutic approach combining human plasma-derived Factors VIIa and X for haemophiliacs with inhibitors: evidence of a higher thrombin generation rate in vitro and more sustained haemostatic activity in vivo than obtained with Factor VIIa alone. *Vox Sang* **85**: 290–299, 2003.
- 100) Nakatomi Y, Nakashima T, Gokudan S, Miyazaki H, Tsuji M, Hanada-Dateki T, Araki T, Tomokiyo K, Hamamoto T, Ogata Y: Combining FVIIa and FX into a mixture which imparts a unique thrombin generation potential to hemophilic plasma: an in vitro assessment of FVIIa/FX mixture as an alternative bypassing agent. *Thromb Res* **125**: 457–463, 2010.
- 101) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H: Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors—Phase I trial—. *Haemophilia* **18**: 94–101, 2012.
- 102) Shirahata A, Fukutake K, Mimaya J, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Takedani H, Takashima Y, Matsushita T, Tawa A, Higasa S, Takata N, Sakai M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H: Results of clot waveform analysis and thrombin generation test for a plasma-derived factor VIIa and X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors—phase I trial: 2nd report. *Haemophilia* **19**: 330–337, 2013.
- 103) Shirahata A, Fukutake K, Takamatsu J, Shima M, Hanabusa H, Mugishima H, Amano K, Takedani H, Tamashima S, Matsushita T, Tawa A, Tanaka I, Higasa S, Kosaka Y, Fujii T, Sakai M, Migita M, Kawakami K, Ohashi Y, Saito H: A Phase II clinical trial of a mixture of plasma-derived factor VIIa and factor X (MC710) in haemophilia patients with inhibitors: haemostatic efficacy, safety and pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Haemophilia* **19**: 853–860, 2013.
- 104) Shima M, Hermans C, De Moerloose P: Novel products for haemostasis. *Haemophilia* **20** (Suppl.4): 29–35, 2014.