

プロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビターの構造と機能

Structure and function of protein Z-dependent protease inhibitor

一瀬白帝*
Akitada ICHINOSE

Key words: serpin, anti-FXa inhibitor, anti-FXIa inhibitor, phospholipid, heparin-like substance



一瀬白帝

学 歴
昭和53年3月 鹿児島大学医学部卒業, 医学士号取得
昭和53年5月 医籍登録
昭和63年7月 九州大学理学部にて学位取得 (理学博士号)
平成元年12月 鹿児島大学医学部にて学位取得 (医学博士号)
平成15年5月 ハンガリー・デブレッセン大学医学部 (名誉医学博士号)

職 歴
昭和53年6月 鹿児島大学医学部第三内科研修医
昭和55年4月 自治医科大学研究生, 内科非常勤医
昭和58年4月 鹿児島大学医学部第三内科医員
昭和58年9月 ワシントン大学医学部生化学部門上級研究員
昭和62年7月 ワシントン大学医学部生化学部門研究助教授
平成元年7月 ワシントン大学医学部生化学部門研究準教授
平成4年6月 山形大学医学部分子病態学講座教授
(平成18年1月 山形大学医学部副学部長)
(平成26年4月 山形大学医学部副学部長)
現在に至る

1. はじめに

プロテイン Z (PZ) 依存性プロテアーゼインヒビター (ZPI) は, 前世紀末に登場してから 10 数年以上の年月が経過したが¹⁾, 未だに謎に満ちたタンパク質である. GW 最終日の前日に本誌編集長に問い合わせたところ「大々至急」との回答が届いたので, 他の総説執筆を中断して本稿を書き始めたが, 何しろ本テーマについては研究費が取れないため原著論文

も連続的には出せないし, 総説を書くのも 2005 年以来で 10 年振りである^{2,3)}. 因みに, GW 最終日に「医学中央雑誌」で「プロテイン Z」を検索したところ, 僅か 34 件しかヒットせず, その内 3 件は別物であった. 「プロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビター」に至っては 1 件のみで, われわれの本学会の抄録であった. これほどまでに国内で人気のないテーマであるのは, 偏にヒトにおける「病的意義」が不明であるからであろう. ついでに PubMed を「Protein Z」で検索すると 385 件がヒットしたが, 無論, 植物タンパク質やウイルスタンパク質が混在している. 「Protein Z dependent protease inhibitor」では 83 件に減る. 以上のような悲惨な状況であるので, 本稿では主に ZPI の生理的であると「思われる」機能構造関連について述べる. なお, 後述するように ZPI の機能の半分には PZ が関与しているので, 関連する PZ について

*責任者連絡先:
山形大学医学部分子病態学講座
〒 990-9585 Department of Molecular Patho-Biochemistry
and Patho-Biology, Yamagata University School of Medicine,
Yamagata, Japan
Tel: 023-628-5276, Fax: 023-628-5280
E-mail: aichinos@med.id.yamagata-u.ac.jp

の知見の一部についても言及するが、基本的な事項については以前の総説^{2,3)}を参照して頂きたい。

なお、本稿の執筆依頼の段階では、「総説かトピックで」ということであったが、現時点ではトピックとなる部分の原著論文が未採択なので詳述できず、総説にせざるを得なかったことを、予め担当編集委員の皆さんにお詫びしておきたい。

2. 構造と機能

1) ZPIの構造と生合成：ZPI(遺伝子記号 *SERPINA10*)は、72 kDaの一本鎖タンパク質で serine protease inhibitor (serpin)の一つである^{1,4)}。423個のアミノ酸からなり、他の serpin の Arg 残基とは異なる Y387 が反応中心である。したがって、ZPIが阻害する標的プロテアーゼは特異的で少数に限定されている。主に肝臓で合成され⁴⁾、分泌されてPZの2倍量が血中に存在するが、半分はPZと非共有結合で複合体を形成しており⁵⁾、残りの半分は遊離型として存在している(図1上)。したがって、両タンパク質は相互依存性に血中濃度が制御されていると思われる。例えば、ワーファリン投与症例ではビタミンK依存性タンパク質であるPZが著減するが、同時にZPI濃度もほぼ半減する⁵⁾。白人健常者の血中ZPI濃度は、約50 nM(約3.8 µg/mL)で⁶⁾、少なくとも生殖年齢の女性では白人と日本人の間で有意差はない⁷⁾。後述するように、血中ZPI濃度は遺伝的に規定されているが、後天的にも各種の病態で変動する。

2) (血小板)リン脂質上での抗FXa作用と補因子PZ(図1左下)：ZPIは、活性化第X因子(FXa)に予めPZとリン脂質、カルシウムを添加すると、時間依存的に抗FXa作用が現れることから、1998年に発見された¹⁾。ZPIの抗FXa活性は、PZの添加によって1,000倍も促進されるので⁴⁾、PZは強力な補因子である。こうして、1990年にPZのアミノ酸配列が決定され、セリンプロテアーゼドメインの活性部位アミノ酸が置換されていること(すなわち偽セリンプロテアーゼドメイン)が発見されて以来^{8,9)}、長らく探索されてきた機能が確定した訳である。なお、プロトロンビナーゼ複合体に活性化型第V因子(FVa)を用いるとトロンビン生成が抑制されないので、プロトロンビナーゼ複合体形成前に凝固反応を鎮静化

することが⁸⁾、ZPI-PZ複合体の主な作用であると考えられている⁶⁾。

ZPIの抗FXa反応は2段階に分けられ¹⁰⁾、まずリン脂質膜に結合したZPI-PZ複合体とFXaが一時的に集合し、次に安定なZPI-FXa複合体に変わり、PZが遊離する。ここで重要なのは、ZPI-FXa複合体1分子の形成過程でFXaによって2分子のZPIのC末端領域(4.2 kDa)が切断されて68 kDaに変化し、抗FXa作用を失うことである(ZPIの消費)⁶⁾。すなわち、ZPIも自殺基質/インヒビターである。一方、PZは切断されたZPI-FXa複合体から解離するので、次の未反応ZPIに結合して抗FXa反応を促進することができる¹⁰⁾。ただし、そのPZも次の段階でトロンビンによってN末側のトロンビン感受性部位R43-R44が切断されてそのGlaドメインを失い、ZPIの抗FXa作用を補助する機能を失う(PZの消費)¹⁾。このように、ZPI/PZシステムの抗FXa作用自体も制御され、生体にとって都合の良いように凝固・抗凝固のバランスが取られているのであろう。

3) 内皮細胞上での抗XIa作用とヘパリン(図1右下)：多くの凝固・線溶酵素との反応性が試験され、リン脂質、カルシウムの存在下で活性型第XI因子(FXIa)をZPIが抑制することが判明し、これをヘパリンが促進することが示されている⁶⁾。遊離ZPIの抗FXIa作用はPZの存在下で著明に抑制される。また、この抗FXIa作用には抗FXa作用に要するZPI量の2倍が必要である¹⁰⁾(FXIは2量体)。至適な濃度、至適な長さのヘパリンは、ZPI上のPZ結合部とは異なる反対側の部位に結合して抗FXIa作用を20倍、抗FXa作用を100倍促進する¹¹⁾。この場合は、PZの影響はほとんどない。このように、FXaとFXIaに対する異なるZPI反応性が、異なる状況/場面での凝固反応におけるFXaとFXIaの制御を巧妙にバランスさせているものと考えられている。恐らく、生体内では、内皮細胞上のヘパリン硫酸などのヘパリン様物質がZPIの抗FXIa作用を促進するものと推測されるが、内皮細胞自身は少量のPZを合成するものの、ZPIは産生しないという¹²⁾。

なお、ZPIが活性化第IX因子(FIXa)を抑制するという報告があるが¹³⁾、否定的な結果も出されている^{6,10)}。

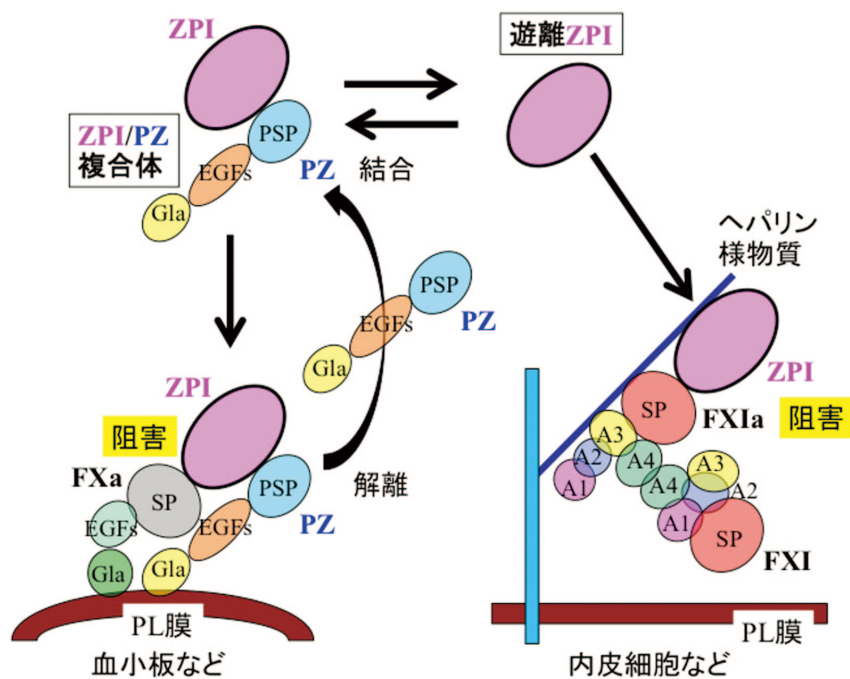


図1 ZPI/PZシステムの作用機序(模式図)
 (上) 血中にはPZの2倍量のZPIが存在し、半分はPZとの複合体として、残り半分は遊離型ZPI単独で存在する。
 (左下) ZPI-PZ複合体は、PZのGlaドメインで血小板などのリン脂質膜に結合し、同じくGlaドメインで膜に結合したFXaに接近して結合し(templateメカニズム)、FXa-ZPI-PZ複合体を形成するので、FXaはZPIによって不活性化される。PZは、安定化されたFXa/ZPI複合体から解離し、新たなZPIと結合して、次のFXa分子の不活性化に働く。
 (右下) 遊離型ZPIは、内皮細胞などの細胞膜上のへパリン様物質に結合してFXIaを効果的に不活性化する。FXIの立体構造は解かれているが、FXIaの各ドメインの相対的位置は未定。FXIaのA3とSPドメインがへパリン様物質に結合する。
 略語：PSP：偽セリンプロテアーゼドメイン、SP：セリンプロテアーゼドメイン、EGF：上皮成長因子ドメイン、Gla：Glaドメイン、PL：リン脂質、A1-4：アップルドメイン1-4

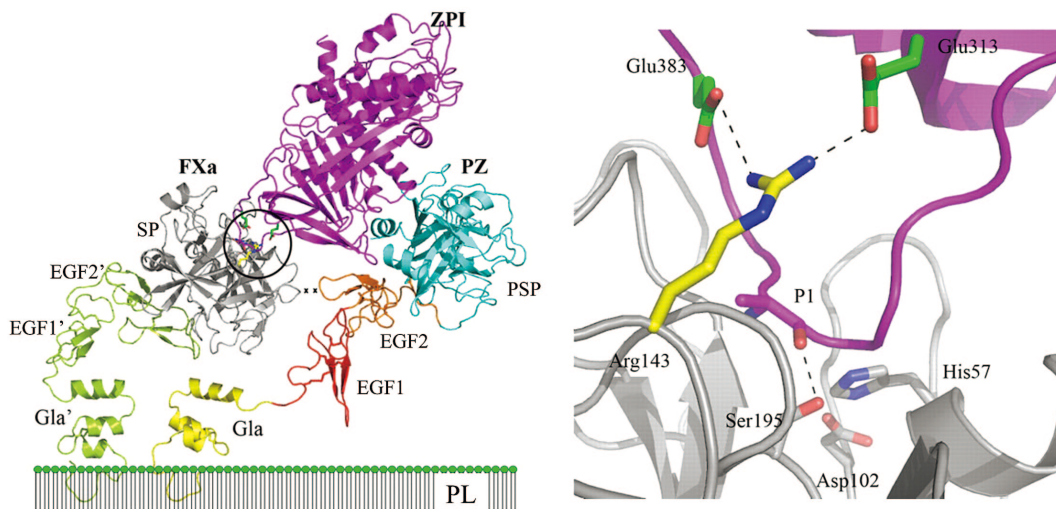


図2 PZ結合ZPIとFXaの3者複合体の分子構造モデル

(左) ZPI-PZ_{AGD2}複合体(Glaドメインを除く)にFXa構造を係留させて作成した3者複合体である。FXaの構造からGlaドメインを借りて模式化して、それらの一部をリン脂質膜に埋め、相互作用できるように近接させた。FXaの活性部位とZPIの接触領域を円で囲んだ。PZのEGF2ドメインとFXaの36(37)ループの間の予想される相互作用を星印で示した。

(右) 左図の円で囲んだ領域の拡大図。FXaとZPIの根本的な接触部位を含む。FXaのR-143は、ZPI分子本体のE-313と反応中心ループのE-383と強固なイオン結合を形成する。この反応中心ループは、ZPIのP1バックボーンがFXaのS-195、H-57、D-102の触媒3残基と相互作用することができ、かつP1側鎖がFXaのS1ポケットに突き出ることができるよう配置されている。

略語：PSP：偽セリンプロテアーゼドメイン、SP：セリンプロテアーゼドメイン、EGF：上皮成長因子ドメイン、Gla：Glaドメイン、PL：リン脂質

(文献16の責任著者と出版社の許可を得て転載した。)

3. 構造機能関連

1) **ZPI と FXa (図 2 左)** ; ZPI の抗 FXa 作用については良く研究されており, PZ の Gla ドメインがリン脂質上の FXa との相互作用に必須で, PZ の C 末の偽セリンプロテアーゼドメインに ZPI が付着することが示唆されていた¹⁴⁾. ZPI の機能構造関連の理解は, 2009 年にその X 線結晶 3 次元構造が解明されてから大いに進んだ^{15, 16)}. 2.3 Å の解像度で明らかにされた ZPI-PZ 複合体は 2400 Å² にわたる広い接触表面を持ち, イオン結合的, 疎水結合的相互作用で付着していた¹⁵⁾. すなわち, ZPI の反応中心ループ側に陰性(E313, E213, D233), 陽性荷電(K253, K260, H265, K308, R310) アミノ酸が集まった表面があり, 後者と FXa の 36(37) ループが相互作用する可能性が示された(図 2 右). したがって, PZ と FXa がそれぞれの Gla ドメインを介して同じ血小板のリン脂質表面に結合して, ZPI を FXa 抑制に至適な位置に導くという「template メカニズム」を支持するものと考えられる¹⁵⁾. 前述した ZPI の E313 がとくに FXa との相互作用に重要であること, 反応中心 P1-Y387 がプロテアーゼと低反応性なので PZ が ZPI と FXa をリン脂質膜上に共局在させることが阻害作用の補助に不可欠であること, PZ は ZPI の反応中心ループから離れたヘリックス G とヘリックス A の C 末と固い結合をすること, PZ の EGF2 ドメインが FXa の 36(37) ループと相互作用する可能性があることなども示唆された¹⁶⁾. その後, 反応中心ループが切断された ZPI と PZ の X 線構造解析により, ZPI のヘリックス G の D293 とシート C の Y240 が, それぞれ PZ の偽セリンプロテアーゼドメインと EGF2 ドメインの結合に重要で, ヘリックス A の M71 と D74 は二次的に結合すること¹⁷⁾, Gla ドメイン欠失 FIXa の X 線構造解析により, FIXa は FXa の 36(37) ループにある 3 つの Glu 残基の内 E37 を欠如し, K36 と D39 で置換されているため, ZPI による阻害に抵抗性を持つ可能性が高いこと¹⁸⁾, ZPI-PZ 複合体形成に参加している荷電アミノ酸群と疎水性アミノ酸群があること¹⁹⁾, ZPI の K239 は複合体からの PZ の解離を促進すること²⁰⁾, などが報告された. なお, PZ の解離が ZPI の抗 FXa 作用を補助する機能を発揮するために必要であることは前

述した通りである.

2) **ZPI と FXIa とヘパリン** ; ZPI の抗 FXIa 作用の構造機能関連については報告がほとんどないが, 各種の ZPI 変異体を用いてその高分子ヘパリンとの相互作用を解析した論文では, ZPI の helix C と helix D の塩基性アミノ酸(K-104, R-105; K-113, -116, -125) がヘパリンとの結合に重要であると結論されている²¹⁾.

4. 生理的, 病理的意義

1) **先天性欠乏症と血栓症 ; ノックアウト (KO) マウスの所見** ; PZ の機能は, 1977 年に発見されて以来ずっと不明であった. 上述したように試験管内での機能は ZPI の発見と共に確定したが, それは必ずしも生体内での機能であることを意味しない. そこで, 先ず PZ KO マウスが作製されたが, 単独では症状(表現型)が認められず, Factor V Leiden マウスの血栓傾向を増強することが判明した²²⁾. 次に ZPI の KO マウスが作製され, PZ KO マウスと並行して動脈損傷やコラーゲン+アドレナリン投与による実験が行われ, 血栓あるいは血栓塞栓の形成, 死亡率が上昇することが判明した²³⁾. ところが, ZPI KO マウスは, PZ KO マウスよりも Factor V Leiden マウスの血栓傾向を強く増強する. 更に, PZ KO マウスは周産期に死亡するが, ZPI KO マウスは妊娠中にも胎仔が死亡する. そこで, PZ 欠乏では抗 FXa 作用が失われるのみであるが, ZPI 欠乏では同時に抗 FXIa 作用も失われるので, ZPI の抗 FXIa 作用が少なくともマウスではより重要であると結論された.

ヒトでの報告 ; ヒトにおいては, PZ KO マウスと同様に PZ 欠乏症が Factor V Leiden 変異を持つ症例の血栓傾向を増悪させると報告されており²⁴⁾, 静脈血栓症と流産を繰り返した症例で, PZ 遺伝子の E30Q 変異を持つ異常タンパク質の分泌障害が世界初の先天性 PZ 欠乏症の原因であることが同定された²⁵⁾. 一方, 先天性 ZPI 欠乏症については, W303X ナンセンス変異がニュージーランドの静脈血栓症の患者 250 名の 4.4% に同定されたという報告があり²⁶⁾, 世界の耳目を集めた. ところが, その後, スペインの血栓症 218 名では変異が同定されず²⁷⁾, イタリアの血栓症 365 名でも, W303X と R67X のナン

センス変異の検出率は健常対照 416 名と有意差が認められなかった²⁸⁾。一方、1018 名もの静脈血栓症患者と同数の健常対照者の比較では、R67X のナンセンス変異は独立した危険因子であると報告された²⁹⁾。そこで、2008 年、遂に 5000 名の症例を含むメタアナリシスが実施されたが、これらの ZPI 変異は静脈血栓塞栓症を増加させないと結論された³⁰⁾。こうして、この領域の研究は下火になってしまった。2012 年には、ナンセンス変異ではなく F145L、Q384R のミスセンス変異が血栓症例で同定され、試験管内では前者は 2、3 倍、後者は 68 倍 ZPI の抗 FXa 作用を減少させることが報告された³¹⁾。ただし、550 名の血栓症患者と 600 名の健常対照との間に有意差は認められていない。なお、PZ、ZPI 共に血中濃度の遺伝性自体は、それぞれ 274 名、287 名のプロテイン C 欠乏症の家系調査で確認されている³²⁾。

2) 後天性欠乏症と血栓症：PZ の研究では、当初は多くの研究者が PZ 欠乏症と血栓症が関連していると報告したが、異論も多かった³³⁾。血栓症 4218 名、健常対照 4778 名を含むメタアナリシスでは、PZ 欠乏症は血栓症の危険因子であり、動脈血栓症、妊娠合併症、静脈血栓塞栓症と有意な相関があると結論されている³⁴⁾。

ZPI については、まず、血栓症を合併することの多い抗リン脂質抗体症候群で PZ 血中濃度が低下しているが、ZPI 濃度は不変であることが報告されており³⁵⁾、426 名の静脈血栓症の患者と 471 名の健常対照との比較でも PZ と ZPI レベルと静脈血栓症との関係はないと報告されている³⁶⁾。また、382 名の心血管障害症例と 375 名の健常対照との比較でも、110 名の脳血管障害症例と 399 名の健常対照との比較でも、PZ と ZPI レベルとの相関は認められていない³⁷⁾。ところが、95 名の末梢動脈疾患の症例と 190 名の健常対照との比較では、PZ と ZPI レベルの低下との相関が認められており³⁸⁾、決着はついていない。したがって、抗凝固反応の冗長性が存在するために、ZPI/PZ システムと血栓症の相関には、相反する結果が出ている可能性が指摘されている³⁹⁾。

因みに、ZPI と PZ は、肝疾患では産生低下、DIC では消費亢進により減少する。最近、静脈血栓症を合併しやすいことが知られている本態性血小板血症の症例では、PZ の減少は有意でないのに拘らず ZPI

は有意に減少しているという報告が出された⁴⁰⁾。この ZPI 減少は、実際に静脈血栓症を合併した症例では更に顕著であり、恐らく ZPI が何らかの理由で約 1/2 に低下して二次的に PZ を軽度減少させているものと推定される。

3) 妊娠合併症：PZ 遺伝子の解析により⁴¹⁾、その 5'-発現調節領域にエストロゲン反応エレメントの存在が予想された⁴²⁾。また、妊娠中は血中 PZ 濃度が上昇することや^{43, 44)}、PZ 低下と妊娠合併症が相関することが多数の研究者により報告されていた。逆に、卵巣摘除したマウスではエストロゲン投与により、各種の凝固因子の発現レベルが低下し、ZPI と PZ も含まれているという報告もあった⁴⁵⁾。

著者らは ZPI/PZ システムが妊娠時の胎盤血流を担保しているという仮説を立てて、正常妊娠の女性と習慣性流産の症例で両者の血中濃度を測定した。予想通り、両者は妊娠期間と共に増加したが、習慣性流産の症例では変化が認められなかった⁷⁾。著者は、妊娠中は多くの凝固因子が増加、プロテイン C を含む抗凝固因子が減少するので凝固亢進状態にあり、ミラーイメージ的な ZPI/PZ システムの増加はそれをバランスするものと考えている。なお、前述した W303X と R67X のナンセンス変異が特発性習慣性流産と相関するというデータも、症例 288 名と 304 名の健常対照との比較によって報告されている⁴⁶⁾。

以上の錯綜した報告を総合すると、血栓症や胎盤/子宮の血流異常に ZPI/PZ システムが関与している可能性は否定できず、後述するように、生体内では他の抗凝固システムも共存するためにそれぞれのシステムの単独の異常は、正常に機能している他のシステムで代償されていると考えるのが妥当であろう。

4) 炎症：さて、少なくとも筆者のような浅はかな凡人は単純明快な解答を予測したが、しばしばその仮説は裏切られる。上述したように、ZPI が PZ と共に妊娠時に増加するのは当然エストロゲンかプロゲステロンの影響であろうと考えて、卵巣摘出の有無で症例を 2 つのグループに分けて ZPI と PZ を測定したところ、何と卵巣摘出とは無関係に両者は増加した(吉田ら、2013 年本学会で発表)。以前、経口避妊薬の投与により両者の血中濃度が上昇するという報告もあったのである³⁶⁾。しかし、逆に ZPI

濃度は男性で女性の2倍高いという報告もあり⁴⁷⁾、筆者らも前述した論文に「閉経後のホルモン補充療法開始後4週間でZPIとPZは不変」と明記しており、薄々は仮説の破綻の可能性に気付いていたのである。結局、約3年の時間と労力と資金を投じてその有難くない可能性を証明した訳である。共同研究者の皆さんには大変申し訳ないが、医学には「ネガティブデータも不可欠」であろう。

なお、ヒトでは、移植臓器に対する免疫学的傷害が炎症を惹起するために生じる同種移植腎の早期急性拒絶反応において、ZPI濃度が1.23倍に増加することが報告されており⁴⁸⁾、血友病Aの50症例では健常対照90名に比較してZPIが有意に増加し、しかも出血の重症度や関節出血とも正相関していたという⁴⁹⁾。筆者は、出血が炎症反応を惹起して急性相タンパク質であるZPIを増加させ、その抗凝固作用の増強が遺伝性第VIII(8)因子欠乏症である血友病Aの凝固異常を更に増悪させている可能性があると考えている。

マウスでは、リポポリサッカライド投与で惹起した全身性シュワルツマン反応において、ZPIは抗血栓形成に、PZは抗炎症反応に働いている可能性が示唆されている⁵⁰⁾。実は、前述した卵巣摘出後のZPIとPZ増加についての学会発表の数カ月後、論文執筆の際に気付いたのであるが、何とターペントインを皮下注射したマウスでは、血清アミロイドAとフィブリノゲンが著増、アルブミンは著減、ZPIは増加するがPZは不変であるという論文が出ていた⁵¹⁾。マウスの肝臓では、ZPIとフィブリノゲンのmRNAは増加するがPZのmRNAは不変であった。もはや、「勝負あり!」と観念した。オリジナルな研究であったのに拘らず、ヒトでの焼き直し/2番手と化したためか、われわれの原著論文は未だに採択されていない。若手研究者の皆さんには、「学会発表したら即論文投稿」という原則を肝に銘じるよう、繰り返してお伝えしたい。

5) **がん**:がんは欧米では死因の第2位であり、がん組織への血流確保にZPI/ZPシステムが関与していると考えるのは自然であろう。まず、乳癌組織にZPIが免疫組織学的に検出され、そのmRNAの存在も確認された⁵²⁾。PZも同様である⁵³⁾。次に、非小細胞肺癌組織でZPIが中等度、PZは弱く発現し

ていること⁵⁴⁾、大腸癌組織でもZPIとPZが発現していること⁵⁵⁾、胃癌組織でも同様であること⁵⁶⁾、などが報告されている。少なくとも、一部の癌組織では、ZPI/PZシステムのターゲットであるFX、FXIも共局在し、フィブリノゲンやフィブリンの存在も確認されている。したがって、ZPI/PZシステムは癌組織の局所で抗凝固反応に働いている可能性がある。

なお、48名の大腸直腸癌や膀胱癌の症例では、ZPIとPZの血中濃度は不変であるので⁵⁷⁾、ZPI/PZの発現自体は主に癌組織の局所に影響すると報告されている。ただし、血中ZPI濃度はCRPとは強く、フィブリノゲンとは弱く相関しており、癌組織における炎症反応の影響であると考えられる。

5. おわりに

少なくとも、試験管内では、ZPIはFXaを阻害するので、アンチトロンビン(AT)、組織因子経路インヒビター(TFPI)と並ぶ第3のFXa抑制タンパク質であることは間違いない。とくに、リン脂質、カルシウム、PZを添加するとATによる抗FXa作用が阻害されるので¹⁾、生体内の活性化血小板など各種の細胞膜表面のリン脂質上ではZPI/PZシステムが抗FXa反応で働いていると思われる(図1左)。また、ATとTFPIはいずれもヘパリン様物質によって抗FXa作用が促進されるので、主に内皮細胞表面において抗FXa反応で働いていると思われる(図1右)。更に、内皮細胞表面では遊離ZPIが単独でヘパリン様物質と結合して抗FXIa作用を担っているであろう。私見ではあるが、これらは協働して内皮細胞の抗血栓作用を支えているに違いない。

また、先天性AT欠乏症患者は血栓症を惹起し、ATの天然の変異体である α_1 -antitrypsin Pittsburgh症例はその発現が著増する急性相に出血することを考慮すると、ATは生体内で強い抗凝固作用を持っている可能性があり、TFPIも先天性欠乏症患者が存在しないこと自体、生体に不可欠な抗凝固タンパク質であることを示唆しているであろう。一方、ZPI/PZシステムは先天性欠乏症でも血栓傾向が不明瞭なので、生体内での抗凝固作用はそれほど強くないのかも知れない。

結論としては、ようやくZPI/PZシステムの立体構

造は確定したが、残念ながらその病的意義は謎のままである。筆者の勉強不足のせいでもあるが、ヒトの欠乏症症例が明らかな臨床症状を示さないことが主な原因である。最後に、所詮 PubMed を検索した程度では、この謎は当分解明できないことが判明したことを明記して Macintosh を終了する(筆を置く)。

謝辞；

惣宇利博士、吉田博士をはじめ山形大学医学部の共同研究者の皆さんに深謝したい。また、本稿の準備に貢献した尾崎博士と渋江女史に感謝する。

著者の利益相反(COI)の開示：

このテーマについては企業との COI はない。研究費(厚生労働科学研究委託費(平成 26 年度)、日本医療研究開発機構研究費(平成 27 年度)、厚生労働科学研究費補助金(平成 27 年度))

文献

- Han X, Fiehler R, Broze GJ: Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9250–9255, 1998.
- 一瀬白帝：プロテイン Z と血栓症について教えて下さい。血栓と循環 **13**: 147–151, 2005.
- 岩田宏紀, 一瀬白帝：プロテイン Z と ZPI の分子病態学。一瀬白帝 編, 図説 血栓・止血・血管学—血栓症制圧のために—。東京, 中外医学社, 2005, 510–516.
- Han X, Huang ZF, Fiehler R, Broze GJ: The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. *Biochemistry* **38**: 11073–11078, 1999.
- Tabatabai A, Fiehler R, Broze GJ: Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost* **85**: 655–660, 2001.
- Han X, Fiehler R, Broze GJ: Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* **96**: 3049–3055, 2000.
- Souri M, Sugiura-Ogasawara M, Saito S, Kemkes-Matthes B, Meijers JC, Ichinose A: Increase in the plasma levels of protein Z-dependent protease inhibitor in normal pregnancies but not in non-pregnant patients with unexplained recurrent miscarriage. *Thromb Haemost* **107**: 507–512, 2012.
- Sejima H, Hayashi T, Deyashiki Y, Nishioka J, Suzuki K: Primary structure of vitamin K-dependent human protein Z. *Biochem Biophys Res Commun* **171**: 661–668, 1990.
- Ichinose A, Takeya H, Espling E, Iwanaga S, Kisiel W, Davie EW: Amino acid sequence of human protein Z, a vitamin K-dependent plasma glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 1139–1144, 1990.
- Huang X, Swanson R, Broze GJ, Olson ST: Kinetic characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor reaction with blood coagulation factor Xa. *J Biol Chem* **283**: 29770–29783, 2008.
- Huang X, Rezaie AR, Broze GJ, Olson ST: Heparin is a major activator of the anticoagulant serpin, protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem* **286**: 8740–8751, 2011.
- Vasse M, Denoyelle C, Corbière C, Litzler PY, Legrand E, Vannier JP: Human endothelial cells synthesize protein Z, but not the protein Z dependent inhibitor. *Thromb Haemost* **95**: 519–523, 2006.
- Heeb MJ, Cabral KM, Ruan L: Down-regulation of factor IXa in the factor Xase complex by protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem* **280**: 33819–33825, 2005.
- Rezaie AR, Bae JS, Manithody C, Qureshi SH, Yang L: Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of protein Z. *J Biol Chem* **283**: 19922–19926, 2008.
- Wei Z, Yan Y, Carrell RW, Zhou A: Crystal structure of protein Z-dependent inhibitor complex shows how protein Z functions as a cofactor in the membrane inhibition of factor X. *Blood* **114**: 3662–3667, 2009.
- Huang X, Dementiev A, Olson ST, Gettins PG: Basis for the specificity and activation of the serpin protein Z-dependent proteinase inhibitor (ZPI) as an inhibitor of membrane-associated factor Xa. *J Biol Chem* **285**: 20399–20409, 2010.
- Huang X, Yan Y, Tu Y, Gatti J, Broze GJ Jr, Zhou A, Olson ST: Structural basis for catalytic activation of protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) by protein Z. *Blood* **120**: 1726–1733, 2012.
- Yang L, Rezaie AR: Residues of the 39-loop restrict the plasma inhibitor specificity of factor IXa. *J Biol Chem* **288**: 12692–12698, 2013.
- Qureshi SH, Lu Q, Manithody C, Yang L, Rezaie AR: Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor interactive-sites of protein Z. *Biochim Biophys Acta* **1844**: 1631–1637, 2014.
- Huang X, Zhou J, Zhou A, Olson ST: Thermodynamic and Kinetic Characterization of the Protein Z-dependent Protease Inhibitor (ZPI)-Protein Z Interaction Reveals an Unexpected Role for ZPI Lys-239. *J Biol Chem* **290**: 9906–9918, 2015.
- Yang L, Ding Q, Huang X, Olson ST, Rezaie AR: Characterization of the heparin-binding site of the protein z-dependent protease inhibitor. *Biochemistry* **51**: 4078–4085, 2012.
- Yin ZF, Huang ZF, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsburg D, Broze GJ: Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6734–6738, 2000.
- Zhang J, Tu Y, Lu L, Lasky N, Broze GJ: Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. *Blood* **111**: 4973–4978, 2008.
- Kemkes-Matthes B, Nees M, Kühnel G, Matzdorff A, Matthes KJ: Protein Z influences the prothrombotic phenotype in Factor V Leiden patients. *Thromb Res* **106**: 183–185, 2002.
- Souri M, Koseki-Kuno S, Iwata H, Kemkes-Matthes B, Ichinose A: A naturally occurring E30Q mutation in the Gla domain of protein Z causes its impaired secretion and subsequent deficiency. *Blood* **105**: 3149–3154, 2005.
- Van de Water N, Tan T, Ashton F, O’Grady A, Day T, Browett P, Ockelford P, Harper P: Mutations within the protein Z-

- dependent protease inhibitor gene are associated with venous thromboembolic disease: a new form of thrombophilia. *Br J Haematol* **127**: 190–194, 2004.
- 27) Gonzalez-Conejero R, Perez-Ceballos E, Vicente V, Corral J: Protein Z-dependent protease inhibitor W303X mutation in venous thrombosis. *Br J Haematol* **129**: 561–562; author reply 562, 2005.
 - 28) Razzari C, Martinelli I, Bucciarelli P, Viscardi Y, Biguzzi E: Polymorphisms of the protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) gene and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost* **95**: 909–910, 2006.
 - 29) Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, Roldán V, Souto JC, Miñano A, Hernández-Espinosa D, Alberca I, Fontcuberta J, Vicente V: A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood* **108**: 177–183, 2006.
 - 30) Dentali F, Gianni M, Lussana F, Squizzato A, Cattaneo M, Ageno W: Polymorphisms of the Z protein protease inhibitor and risk of venous thromboembolism: a meta-analysis. *Br J Haematol* **143**: 284–287, 2008.
 - 31) Young LK, Birch NP, Browett PJ, Coughlin PB, Horvath AJ, Van de Water NS, Ockelford PA, Harper PL: Two missense mutations identified in venous thrombosis patients impair the inhibitory function of the protein Z dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost* **107**: 854–863, 2012.
 - 32) Vossen CY, Hasstedt SJ, Rosendaal FR, Callas PW, Bauer KA, Broze GJ, Hoogendoorn H, Long GL, Scott BT, Bovill EG: Heritability of plasma concentrations of clotting factors and measures of a prethrombotic state in a protein C-deficient family. *J Thromb Haemost* **2**: 242–247, 2004.
 - 33) Bafunno V, Santacroce R, Margaglione M: The risk of occurrence of venous thrombosis: focus on protein Z. *Thromb Res* **128**: 508–515, 2011.
 - 34) Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Broze G, Fedi S: A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb Haemost* **103**: 749–756, 2010.
 - 35) Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze GJ: Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor. *J Thromb Haemost* **1**: 1764–1770, 2003.
 - 36) Al-Shanqeeti A, van Hylckama Vlieg A, Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJ: Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* **93**: 411–413, 2005.
 - 37) Refaai MA, Ahn C, Lu L, Wu K, Broze GJ: Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events. *J Thromb Haemost* **4**: 1628–1629, 2006.
 - 38) Sofi F, Cesari F, Tu Y, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, Gensini GF, Abbate R, Fedi S, Broze GJ Jr: Protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease patients. *J Thromb Haemost* **7**: 731–735, 2009. Erratum in: *J Thromb Haemost* **7**: 1436, 2009. Fedi, S [added].
 - 39) Corral J, González-Conejero R, Hernández-Espinosa D, Vicente V: Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. *Br J Haematol* **137**: 99–108, 2007.
 - 40) Szumowska A, Galar M, Bolkun L, Kloczko J: Plasma Concentrations of Protein Z and Protein Z-Dependent Protease Inhibitor in Patients With Essential Thrombocythemia. *Clin Appl Thromb Hemost In press*, 2015.
 - 41) Fujimaki K, Yamazaki T, Taniwaki M, Ichinose A: The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. *Biochemistry* **37**: 6838–6846, 1998.
 - 42) Sugawara H, Iwata H, Souri M, Ichinose A: Regulation of human protein Z gene expression by liver-enriched transcription factor HNF-4alpha and ubiquitous factor Sp1. *J Thromb Haemost* **5**: 2250–2258, 2007.
 - 43) Quack Loetscher KC, Stiller R, Roos M, Zimmermann R: Protein Z in normal pregnancy. *Thromb Haemost* **93**: 706–709, 2005.
 - 44) Ramsay JE, Stewart F, Friel H, Walker ID, Greer IA, McColl MD; West of Scotland PZ Study Group: Protein Z in pregnancy: exaggerated rise in obese women. *J Thromb Haemost* **3**: 2584–2586, 2005.
 - 45) Cleuren AC, Van der Linden IK, De Visser YP, Wagenaar GT, Reitsma PH, Van Vlijmen BJ: 17alpha-Ethinylestradiol rapidly alters transcript levels of murine coagulation genes via estrogen receptor alpha. *J Thromb Haemost* **8**: 1838–1846, 2010.
 - 46) AlShaikh FS, Finan RR, Almawi AW, Mustafa FE, Almawi WY: Association of the R67X and W303X non-sense polymorphisms in the protein Z-dependent protease inhibitor gene with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* **18**: 156–160, 2012.
 - 47) Silliman CC, Dzieciatkowska M, Moore EE, Kelher MR, Banerjee A, Liang X, Land KJ, Hansen KC: Proteomic analyses of human plasma: Venus versus Mars. *Transfusion* **52**: 417–424, 2012.
 - 48) Freue GV, Sasaki M, Meredith A, Günther OP, Bergman A, Takhar M, Mui A, Balshaw RF, Ng RT, Opushneva N, Hollander Z, Li G, Borchers CH, Wilson-McManus J, McManus BM, Keown PA, McMaster WR; Genome Canada Biomarkers in Transplantation Group: Proteomic signatures in plasma during early acute renal allograft rejection. *Mol Cell Proteomics* **9**: 1954–1967, 2010.
 - 49) Bolkun L, Galar M, Piszcz J, Lemancewicz D, Kloczko J: Plasma concentration of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in patients with haemophilia A. *Thromb Res* **131**: e110–113, 2013.
 - 50) Butschkau A, Nagel P, Grambow E, Zechner D, Broze GJ, Vollmar B: Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Shwartzman reaction. *Crit Care Med* **41**: e447–456, 2013.
 - 51) Girard TJ, Lasky NM, Tuley EA, Broze GJ: Protein Z, protein Z-dependent protease inhibitor (serpinA10), and the acute-phase response. *J Thromb Haemost* **11**: 375–378, 2013.
 - 52) Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Ostrowska-Cichocka K, Zimnoch L: Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) is present in loco in human breast cancer tissue. *Thromb Haemost* **104**: 183–185, 2010.
 - 53) Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Tokajuk P, Kisiel W: Protein Z is present in human breast cancer tissue. *Int J He-*

- matol **93**: 681–683, 2011.
- 54) Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Ostrowska-Cichocka K, Tokajuk P, Ramlau R, Kisiel W: Protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor system in human non-small-cell lung cancer tissue. *Thromb Res* **129**: e92–96, 2012.
- 55) Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Tokajuk P, Ostrowska-Cichocka K, Kisiel W: Co-localization of Protein Z, Protein Z-Dependent protease inhibitor and coagulation factor X in human colon cancer tissue: implications for coagulation regulation on tumor cells. *Thromb Res* **129**: e112–118, 2012.
- 56) Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zimnoch L, Tokajuk P, Ostrowska-Cichocka K, Kisiel W: Protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor system in loco in human gastric cancer. *Ann Hematol* **93**: 779–784, 2014.
- 57) Doat S, Borgel D, François JH, Bianchini E, Botton J, François D, Mitry E, Vasse M: Unbalance between plasma levels of Protein Z and protein Z-dependent inhibitor in patients with colorectal and pancreatic cancer: a pilot study. *Thromb Res* **133**: 299–300, 2014.