

## ◆トピックス◆

## 活性化 IX 因子の結晶構造

濱本高義\*<sup>1</sup>, 副島見事\*<sup>1</sup>, 岩永貞昭\*<sup>1\*2</sup>

## Crystal Structure of Factor IXa

Takayoshi HAMAMOTO\*<sup>1</sup>, Kenji SOEJIMA\*<sup>1</sup> and Sadaaki IWANAGA\*<sup>1\*2</sup>**Key words:** factor IX, crystal structure, factor VIIIa, blood coagulation factor

## 1. はじめに

血液凝固 IX 因子 (FIX) は、アミノ酸 415 残基から成る分子量約 55,000 の一本鎖糖タンパク質であり、アミノ末端領域に 12 個の  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基を有するビタミン K 依存性因子である。FIX は、ほかの凝固因子の VII 因子 (FVII) や X 因子 (FX), 抗凝固因子のプロテイン C などと同様に、4 つのドメイン構造から構築される。分子のアミノ末端から Gla ドメイン, EGF 様第 1 ドメイン (EGF-1) および EGF 様第 2 ドメイン (EGF-2) と連なり、さらに、そのカルボキシ末端側にトリプシンやキモトリプシンと相同性の高いプロテアーゼドメインを含む。生理的には、FIX は外因系凝固開始因子の活性化 FVII (FVIIa) / 組織因子 (TF) 複合体, あるいは内因系凝固因子の活性化 XI 因子により, Arg<sub>145</sub>-Ala<sub>146</sub> および Arg<sub>180</sub>-Val<sub>181</sub> 切断され、軽鎖と重鎖が Cys<sub>132</sub>-Cys<sub>289</sub> の間でジスルフィド結合した 2 本鎖の活性化 FIX (FIXa) に変換される。

FIXa 単独では極めて弱い酵素活性しか示さ

ないが<sup>3</sup>, 補助因子の VIII 因子 (FVIII) と Ca<sup>2+</sup>, リン脂質 (PL) 共存下, 複合体 (FIXa/活性化 FVIII (FVIIIa)/Ca<sup>2+</sup>/PL : Xase) を形成すると、触媒活性は劇的に増強し、天然基質である FX の活性化速度は約 10<sup>9</sup> 倍高められる。この点で FVIIa と共通する面があるが、FVIIa と異なり補助因子存在下での合成基質に対する水解放活性は増強されない。FIX は、血液凝固反応系において、内因系および外因系経路の交差点に位置する因子として生理的に重要な働きを持つ。すなわち、FIX 欠乏・欠損症は、25,000~30,000 人に 1 人の確率で発生する伴性劣性遺伝形式の血友病 B として知られ、重症な患者の場合は、関節、筋肉および臓器の反復性深部出血が認められる。最近では、FIX のノックアウトマウスも作出され、血友病 B モデルとしての有用性が報告された<sup>1)2)</sup>。FIX のタンパク質構造・遺伝子・生合成などに関する生化学的データを、表 1 にまとめた。

さて、1995 年に、ブタ血漿由来の FIXa の X 線結晶構造解析が Brandstetter らにより報告された<sup>3)4)</sup>。最近では、ホモロジーモデリング法

\*<sup>1</sup> (財) 化学及血清療法研究所 [〒 860-8568 熊本市大窪一丁目 6 番地 1 号] KAKETSUKEN [1-6-1 Okubo, Kumamoto-Shi, Kumamoto 860-8568, Japan.]

\*<sup>2</sup> 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 [〒 470-11 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98] Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University [1-98 Dengakugakubo, kutsukake-cho, Toyoake-Shi, Aichi 470-1101, Japan]

表 1 FIX・メモ

別称	CHRISTMAS 因子
生理機能	IX 因子は血液凝固カスケードの中間に位置し, 内因系凝固反応により生じた XIa 因子あるいは外因系凝固反応によって生じた FVIIa-TF 複合体によって活性化される。FIXa は FX を活性化するが, $Ca^{2+}$ , リン脂質, FVIIIa の存在下で, その活性化反応は約 $10^9$ 倍も増幅する。
分子量	55,000
総アミノ酸残基数	全 461 残基のプレプロ体として合成され, 28 残基のシグナルペプチドが切断され, プロ FIX となり, プロセッシング酵素により 18 残基のプロ領域が切断を受け, 415 残基の成熟型 FIX に変換され, 分泌される。
ドメイン構造	アミノ末端側に 12 個の $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を有する Gla ドメイン, 次に 2 つの EGF 様ドメイン (EGF-1, EGF-2), 活性化時に遊離する活性化ペプチド, そしてカルボキシ末端領域に FXa やトリプシンと相同性の高いセリンプロテアーゼドメインを含む。
糖鎖などの修飾アミノ酸	Gla ドメインの 12 残基の $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸残基。EGF-1 内の Asp <sub>64</sub> の $\beta$ 位に水酸基をもつ $\beta$ -ヒドロキシアスパラギン酸残基。また, EGF-1 内の Ser <sub>53</sub> にはオリゴ糖鎖としてはめずらしい Xyl-Glc あるいは Xyl-Xyl-Glc がグルコースを介して結合しており, Ser <sub>61</sub> には NeuAc-Gal-GalNAc-Fuc がリンクしている。活性化ペプチド内の Asn <sub>157</sub> と Asn <sub>167</sub> には N 結合型糖鎖があり, Thr <sub>159</sub> と Thr <sub>169</sub> には O 結合型糖鎖が結合している。
ヒト染色体部位	X 染色体長腕上の末端側 Xq26-27
遺伝子構造	34 kb 8 個のエクソンが 7 個のイントロンで分断
血漿濃度	3~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (約 60 nM)
欠乏症	出血症状 (FIX 欠損症は血友病 B として分類)
血中半減期	$\alpha$ 相: 50 分 $\beta$ 相: 24~30 時間 ( <sup>125</sup> I ラベルした FIX を血友病 B 患者に投与して測定)
主な生合成の場所	肝細胞
主な局在場所	血液
レセプターおよび結合蛋白質	IV 型コラーゲン, Calreticulin (FIX 以外の Gla 含有凝固因子も結合する)

などを用いた立体構造モデルの構築により, ヒトの正常 FIX はもとより, FIX 異常症に由来する異常分子の高次構造と機能相関についても, これまで以上に理解されるようになった<sup>5)</sup>。本稿では, X 線回折法による結晶解析で得られた FIXa の立体構造をもとに, その構造と機能について解説する。

## 2. FIXa の高次構造と機能相関

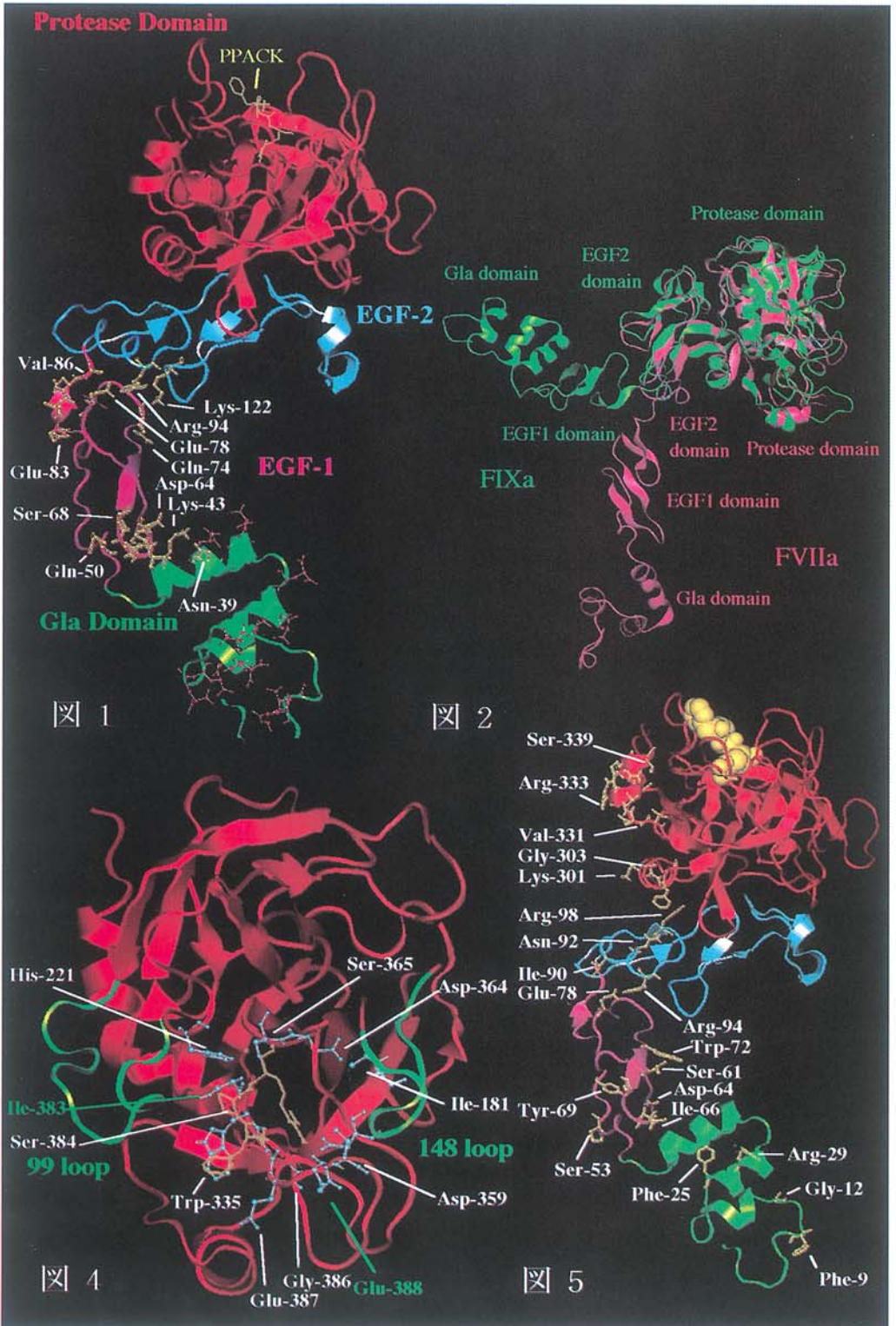
### 2-1. FIXa の立体構造

1995 年, Brandstetter らにより報告されたブタ FIXa の 3Å 分解能での結晶構造を, 図 1 に示した。

FIXa は, FVIIa (FVIIa-TF 複合体の結晶構

造からの推定)と同様<sup>6)</sup>, チューリップ様構造をしていて, 花の部分に相当するプロテアーゼドメイン, 折れ曲がった茎の部に相当する 2 つ連結した EGF 様ドメイン, 球根の部分に相当する Gla ドメインから成る。FIXa の全長は, 折れ曲がりの距離を含めると 130 Å であるが, Gla ドメインや EGF-1, EGF-2, プロテアーゼドメインが連結した, 空間的な広がりの中では最大 105 Å である。FIXa と FVIIa のプロテアーゼドメインを構成する 221 アミノ酸残基の  $C\alpha$  座標を重ね合わせると, 両者のずれの偏差は 1.1 Å であり, また EGF-2 も同様によく重なり合う (図 2)。プロテアーゼドメインと EGF-2 はほとんど一体化しており, その高次構造は FVIIa と FIXa との間で差はない。しかし,





図の説明は次の頁

EGF-1 と EGF-2 のつなぎ目部分を見ると, FVIIa では EGF ドメインの主軸はプロテアーゼドメインの主軸とほぼ直線的に位置しているが, FIXa の場合はそれらの主軸は 110 度の角度で折れ曲がっている (図 2)<sup>7)</sup>. この違いがどのような理由によるものなのか, あるいは生理的にどのような意義があるのか大変興味深い.

## 2-2. 各機能ドメインの立体構造とその特徴

### ① プロテアーゼドメイン

FIXa のプロテアーゼドメインの立体構造は, 典型的なトリプシン様セリンプロテアーゼの立体構造をとり, 活性化 FX (FXa) とともに非常に似ている. アミノ末端 Ile<sub>181</sub> (C16; 以下, 括弧内はすべてキモトリプシノーゲン番号で示す.) の  $\alpha$ -アミノ基は, Asp<sub>364</sub> (C194) と塩結合を形成している (図 3 と 4 を参照). 本結晶構造では, FIXa の触媒部位を形成する 3 つのアミノ酸残基 Ser<sub>365</sub> (C195), His<sub>221</sub> (C57) と Asp<sub>269</sub> (C102) の立体的配置は, D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl-ketone (PPACK) が結合しているため多少構造が変わっている.

ここで本論に入る前に, 酵素と基質の認識部位である P1 や S1 について簡単に説明したい. FIXa は Arg 残基のカルボニル側のペプチド結

合を加水分解する酵素である. この切断される Arg を P1 位のアミノ酸残基と呼ぶ. P1 からアミノ末端側の残基を, 順に P2 位, P3 位の残基という. 加水分解されるペプチド結合のカルボキシ末端側に向かって, 順に P1' 位, P2' 位のアミノ酸残基という. FIXa には, 基質の Arg 残基の側鎖がうまく入り込めるホールがあり, これを S1 ポケットと呼ぶ. このポケットの底に Asp<sub>359</sub> (C189) の側鎖  $\beta$ -カルボキシル基が位置し, 基質の Arg (P1) 側鎖のグアニジル基と塩結合する. FIXa の Asp<sub>359</sub> (C189) は S1 位のアミノ酸残基に相当し, 基質の P2, P1, P1', P2' に対応する残基として, 酵素側にそれぞれ S2, S1, S1', S2' を考える.

実際の結晶構造では, プロテアーゼドメインの触媒部位に合成インヒビターの PPACK が His<sub>221</sub> (C57) および Ser<sub>365</sub> (C195) を介して共有結合しており, S1 ポケットの中で Arg (P1) の側鎖と Asp<sub>359</sub> (C189) の  $\beta$ -カルボキシル基とがしっかりと塩結合している (図 4). FIXa 特異的な触媒部位のポケット入り口へのフレーム, すなわち Ser<sub>384</sub>-Cys<sub>389</sub> (C214-C220) はトリプシン様セリンプロテアーゼの典型的な構造をとっている (図 4). その中でも Gly<sub>386</sub>-Glu<sub>387</sub>-Glu<sub>388</sub>-Cys<sub>389</sub> (C217-C218-C219-C220) セグメン

図 1 FIXa の結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード 「1pfx」をもとに分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した].

水平面に沿って FIXa の Gla ドメインがリン脂質に結合していると仮定した. PPACK (黄色 wire model) が活性部位に結合している. FIXa はアミノ末端側から Gla ドメイン (緑色) / Gla 残基 (ピンク ball & stick model, 白棒), EGF-1 (ピンク色), EGF-2 (スカイブルー色), プロテアーゼドメイン (赤色) で構成されている. 図中の残基番号は FIXa のアミノ酸配列番号.

図 2 FIXa と FVIIa のプロテアーゼドメインと EGF-2 の C<sub>α</sub> を重ね合わせた図 [Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード FIXa: 「1 pfx」, FVIIa: 「1 dan」をもとに分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した].

緑色: FIXa, ピンク色: FVIIa. 両者の間で, EGF-1 からアミノ末端にかけて, プロテアーゼドメインに対する角度が違っていることに注意.

図 4 FIXa のプロテアーゼドメインの結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード 「1 pfx」をもとに分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した].

緑色のループ構造が 99 loop と 148 loop (図 3 参照) に相当する. 図中の Ile<sub>383</sub> (C213) と Glu<sub>388</sub> (C219) は緑色で, また残基番号は FIXa のアミノ酸配列番号で示した.

図 5 FIXa と FVIIIa の相互作用部位 [Protein Data Bank (PDB) 中の PDB コード 「1 pfx」をもとに分子設計支援ソフト QUANTA を用いて作図した]

本文中, FIXa と FVIIIa の相互作用部位として記述したアミノ酸残基を示した (図中黄色 ball & stick). 図中の残基番号は FIXa のアミノ酸配列番号を示し, 黄色 ball は PPACK を示す.



	20	30	40	50	60	70
	185	195	204	214	* 224	234
human FIXa	VVGGEDAKPGQFPWQVVL-NGKVDAPFCGGSIVNEKWIWTAAHCVETGVKITVVAGEHNIE					
porcine FIXa	I...N.....L-...I.....I...V.....I.P.....Y.T.					
human FVIIa	I...KVCPEK.EC...L.LVNGAQL-...TLI.TI.V.S...FDKIKNWRNLIIVLGEH					
human FXa	I...QEC.D.EC...AL.I.EENEG...T.LS.FY.L...LYQAKRFK.RV.DR.T.					
human APC	LID.KMTRR.DS.....LDS.KKLA..AVLIHPS.VL.....MDESK--K-LLVRLGEY					
	80	90	100	110	120	
	247	255	267	277	287	
human FIXa	ETEHTEQKRNVIKIPHHNYAAINRYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT--					
porcine FIXa	...P...R.....-...S...TV...S.....T.....					
human FVIIa	DLSEHDGDEQSR.VAQVIIPSTIYVPGTT.....R.HQ.V..TDH.V.L.LPERTFSER					
human FXa	QE.GG.AVHE-VEVV.K.NRF-T-KET.DF...V.R.KT.ITFRMN.A.A.LPERDWAE-					
human APC	DLRRW.KWELDLDIKEVFVHP..YSKSTTDN.....H.AQ.AT.SQTIV...LP.SGLAER					
	130	140	150	160	170	180
	299	309	318	328	338	348
human FIXa	NIFLKFSGSYV-S-G--WAR-VFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCA					
porcine FIXa	.....-...-...G...NR...TI...K.....S.....					
human FVIIa	TL-AFVRFSL.SGW.QLLD.GATAIELMV.NVPR.MTQDCLQSRKVGDSFN.TEY....					
human FXa	STLMTQKT.I.-...-FG--THE...QSTR.KM.E..Y...NS.KL.SS.I.TQ.....					
human APC	ELNQAGQETL.TGW.YHSS.EKEA..RNRTF..NFIKI.V.PHNE.SEVMSNMVSE..L..					
	190	200	210	220	230	240
	360	370	380	389	400	410
human FIXa	GFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGTIISWGEICAMKGYGIYTKVSRVYVNI-KE					
porcine FIXa	.....K.....V.....					
human FVIIa	.YSD.SK...K.....A.HYR..WY...V...QG...TV.HF.V..R..Q.IE.LQ.L					
human FXa	.YDTKQE.A.....RFKD.Y.V...V...G...R.....TAFLK..DRS					
human APC	.ILGDRQ.A.E.....M.ASFH..W.V.LV...S...GLLHN..V.....LD..HGH					
	human FIXa	-KTK-LTKMDFQG-----				
	porcine FIXa	-.....-----				
	human FVIIa	MRSEPRPGVLLRAPFP-----				
	human FXa	M..RG.P.AKSHAPEVITSSPLK				
	human APC	IRD.EAPQK-SWAP-----				

図3 FIXa と他の凝固因子プロテアーゼドメインの全アミノ酸配列 (文献10より引用・改変)。点の部分は保存された部分。枠で囲んだ部分はFIXa とFXa の立体構造の比較から同定された両者に特徴的な領域であり(99 loop と148 loop), 相同組み換えを行った部分を示す。\*:Catalytic triad を形成するアミノ酸残基 [His<sub>221</sub> (C57), Asp<sub>269</sub> (C102), Ser<sub>365</sub> (C195)]. ◆:S1 サイト [基質結合部位, Asp<sub>359</sub> (C189)]. ■:Ile<sub>181</sub> (C16) アミノ末端アミノ酸と塩結合する Asp<sub>364</sub> (C194)。図中, 上はキモトリプシンノーゲン番号, 下はFIXa のアミノ酸配列番号を示す。

トは非常に可動性に富み, 特に, Glu<sub>388</sub> (C219) の主鎖カルボニル基はPPACKのArg<sub>31</sub> (PPACKのArg残基を示す)の側鎖アミノ基

の方向に向いている。このGlu<sub>388</sub> (C219)はPPACKで安定化されており, 分子動力学を用いた検討からPPACKを外すとGlu<sub>388</sub> (C219)

のカルボニル基は不安定になるようである。この 388 位 (C219 位) の Glu は, FIXa 以外の凝固セリンプロテアーゼでは Gly であり, FIX 固有のアミノ酸残基である。この Glu<sub>388</sub> (C219) のカルボニル基の不安定化により, FIXa の S1 ポケットは非常に可動的で, かつ閉じた形になっており, 基質が触媒部分のポケットに入り難いために触媒効率の低下をきたすと考えられている<sup>8)9)</sup>。これが FIXa の合成基質に対する触媒活性を低くしている原因の 1 つという。

Hopfner らは<sup>10)</sup>, FIXa の合成基質に対する触媒活性を低くしている原因を明白にするため, タンパク質工学的手法を活用しつつ, FIXa の特異的な触媒部位周辺領域と FXa の対応するループを相互に入れ換えた EGF-2 とプロテアーゼドメインで構成される改変体を大腸菌で作製し (図 3), それらの性状を調べた。その結果, FIXa の Glu<sub>388</sub> (C219) を Gly に点変異した FIXa 分子の合成基質に対する触媒活性には変化なく, さらに 148 ループ (キモトリプシノーゲン番号) 領域のみを入れ替えても変化はなかった。一方, Ile<sub>383</sub> (C213) を Val に点変異した FIXa 分子の合成基質に対する触媒活性は約 1.3 倍上昇し, 99 ループ (キモトリプシノーゲン番号) 領域を変異させた分子は約 20 倍触媒活性が上昇した。さらに, それら 4 カ所を同時に変異させた FIXa の触媒活性は 100 倍以上と劇的な上昇を示した。これらの結果から, Hopfner らは, FIXa の合成基質に対する触媒活性が低いのは, Glu<sub>388</sub> (C219) のカルボニル基の状態如何よりも, S3/S4 のサブサイトが狭いために基質の P3/P4 との相互作用が抑えられ, かつ S1 サブサイトにも歪みが生じているために, 基質を効率良く切断できないと推察している (図 4)。

さらに最近 Fay らは<sup>11)</sup>, FIXa が FX を活性化する際, FVIIIa の A2 ドメインは Km には影響しないが, *k<sub>cat</sub>* を 100 倍上昇させることを示し, また, fluorescein-Phe-Phe-Arg-FIXa 分子を用いた蛍光異方性測定から, FVIIIa の A2 ド

メインが FIXa の触媒部位の配向を一定方向に規定し, それが FX の存在下でさらに強くなると報告した。これらの結果は, FVIIIa の A2 ドメインが FIXa のプロテアーゼドメインに結合すると, FIXa の触媒部位に少なからず構造変化が起きることを示唆している。したがって, FIXa の天然基質である FX に対する加水分解速度は, FX の P1 位に結合というよりもむしろ他の領域, 例えば, FIXa の exosite との結合を介して高まると考えることもできる。

## ② EGF 様ドメイン

プロテアーゼドメインの触媒部位と反対側面の窪みの部分に, FIXa の軽鎖と重鎖を連結する Cys<sub>132</sub>-Cys<sub>289</sub> (132-C122) のジスルフィド結合が位置し, 続いてアミノ末端側に向けて 2 つの EGF ドメインが折れ曲がった格好で位置している (図 1)。EGF-2 は aromatic-rich な境界面を介して, プロテアーゼドメインと相互作用しているようである。EGF のドメイン構造は斧頭に似ており, 5 つの連続した  $\beta$ -ストランドから構成され, 4 つの  $\beta$ -ヘアピンループを形成し, 3 つのジスルフィド結合を含む。EGF-1 および EGF-2 の接合点での回転は束縛されているようで, この理由として, ① Glu<sub>83</sub> から Val<sub>85</sub> にかけてのコンフォメーション, ② Lys<sub>122</sub> の側鎖アミノ基と Gln<sub>74</sub> の主鎖カルボニル基の酸素原子との間の水素結合, ③ Glu<sub>78</sub> と Arg<sub>94</sub> との間の塩結合形成などが考えられている。これらの領域は各動物の FIX に非常に保存された配列である。

Ca<sup>2+</sup> 結合部位は EGF-1 のアミノ末端側に位置し, Asp<sub>64</sub>-Ser<sub>68</sub> ヘアピンループと, その近くの  $\beta$ -ストランドとの間に存在する。今回の FIXa の結晶構造からも, Gln<sub>50</sub>, Asp<sub>64</sub>, Asp<sub>65</sub> は Ca<sup>2+</sup> 結合のできやすい立体配置をとっているという。また, EGF-1 と Gla ドメインのカルボキシ末端ヘリックス部位との相互作用は, Ca<sup>2+</sup> が存在しない場合は非常に弱い。EGF-1 と Gla ドメインとの相互作用は, 主に EGF-1 の Asp<sub>64</sub>-Ser<sub>68</sub> ループと, Ca<sup>2+</sup> 存在下で安定化



された Gla ドメインの  $\alpha$ -helix hydrophobic stack 領域の Asn<sub>39</sub> と Lys<sub>43</sub> の側鎖を介するといわれ、Ca<sup>2+</sup> に強く依存する。

### ③ Gla ドメイン

Brandstetter らの報告では、Gla ドメインには部分的にディスオーダーが見られ、原子位置を確定することが困難であったようである。この理由は、X線回折において Ca<sup>2+</sup> が存在しなかったためと推定されている。事実 Ca<sup>2+</sup> 非存在下では、30~35 のアミノ末端領域はフォールディングしておらず、自由度の高い揺らいだ構造を示していたという。Freedman ら<sup>12)13)</sup> の NMR を用いた FIX の Gla ドメインの解析結果を見ると、Ca<sup>2+</sup> 結合した Gla ドメイン中の Gly<sub>12</sub> から Asp<sub>47</sub> のアミノ酸残基にかけての全体的な折りたたみ構造は、プロトロンピンフラグメント 1 の Gla ドメインに非常に類似おり、Brandstetter らの FIXa の結晶構造における Gla ドメインは、プロトロンピンフラグメント 1 の Ca<sup>2+</sup> 結合型の Gla ドメインのモデルをあてはめて示されている。しかし、Ser<sub>3</sub> から Leu<sub>6</sub> のアミノ酸残基に相当する部分の立体構造はかなり異なっていることは留意する必要がある。アミノ末端領域から 9 個の Gla 残基はタンパク質の内部に位置し、内部 Ca<sup>2+</sup> 結合ポケットを形成しており、カルボキシ末端側の 3 個の Gla 残基は外側に向かって位置しているという。FIXa のアミノ末端領域に存在する疎水性残基は分子表面にあって、これら 9 個の Gla 残基とともに Ca<sup>2+</sup> 依存的なリン脂質膜上への結合に関与しているらしい。

## 2-3. FIXa 因子の FVIIIa あるいは FX との相互作用

これまでの研究から、FIXa の軽鎖および重鎖は、それぞれ FVIIIa の A3 ドメイン及び A2 ドメインと相互作用することが示唆されている<sup>14)</sup>。FIXa の軽鎖と FVIIIa との相互作用部位は、血友病 B 患者の異常分子の解析や他の研究結果から、Phe<sub>9</sub>、Gly<sub>12</sub>、Phe<sub>25</sub>、Arg<sub>29</sub>、 $\beta$ -ヒド

ロキシ Asp<sub>64</sub>、Tyr<sub>69</sub>、Trp<sub>72</sub>、Glu<sub>78</sub>、Ile<sub>90</sub>、Asn<sub>92</sub> および Arg<sub>98</sub> などが推定されている。Brandstetter らの結晶解析を見ると、Gla ドメイン内の Phe<sub>9</sub> ( $\Omega$  ループ内)、Phe<sub>25</sub> と Arg<sub>29</sub> (第 2 ヘリックス内) は、FIXa のアーチ状構造によって形成された窪みに向かって露出している (図 5)。また、EGF-1 の Ile<sub>66</sub>、Tyr<sub>69</sub>、Trp<sub>72</sub> は窪みに沿って表面に位置し、特に Trp<sub>72</sub> は窪みに向かって露出している。一方、EGF-2 の Ile<sub>90</sub>、Asn<sub>92</sub> および Arg<sub>94</sub> のアミノ酸残基も、同様にアーチ状構造の窪みに向かって露出し、特に Arg<sub>94</sub> は FIX に特異的な Glu<sub>78</sub> と塩結合を形成している。これらの残基によって構成された立体構造領域が FVIIIa との結合部位として推定されている。

また、FIXa の重鎖 (プロテアーゼドメイン) は、FVIIIa の A2 ドメインと相互作用すると報告されているが、FIXa の軽鎖および重鎖のどこの残基あるいはどこの領域が FVIIIa との結合に関与しているのかは依然明らかでない。最近 Kolkman らは<sup>15)</sup>、FIXa の Lys<sub>301</sub>-Gly<sub>303</sub> (C132-C134) および Arg<sub>333</sub>-Ser<sub>339</sub> (C165-C171) の領域が、FVIIIa の重鎖と相互作用していることを示唆する報告をした。一方、ヒトやウシ FIX の EGF-1 内には、Ser<sub>53</sub> や Ser<sub>61</sub> に O 型糖鎖が付加しているが、これらは上述のアーチ状構造の窪みの反対側に位置しており、FVIIIa との結合には関与しないようである (図 5)。

FIXa と FX の相互作用に関する報告はほとんどなく、Brandstetter らの報告もこれについてはふれてない。FIXa が FX を基質として認識する際は、触媒基近傍との結合に加えて、ほかの領域 (exosite) も相互作用していると考えられる。FIXa の exosite に関する情報は非常に乏しいが、これまで Ala<sub>390</sub>→Val<sub>390</sub> の変異をもつ FIX Lake Elsinore は、凝固活性は低下しているものの、合成基質水解活性は変化してないことから、この部位が FX との結合に関与しているといわれる。また、宮田らは<sup>5)</sup>、ホモロジーモデリング法により、Val<sub>331</sub>-Arg<sub>338</sub> (C163-

C170) の領域が exosite として働いているのではないかと推定している (図 5). 今後, FIXa, FVIIIa および FX の三者複合体の結晶解析を通して, こうした点が一層明白になるであろう.

### 3. おわりに

X 線結晶構造解析により FIXa の立体構造が明らかとなり, FIXa のプロテアーゼドメインが, 全体像として FXa, FVIIa あるいは活性化 PC の構造に非常に類似していることが分かった. しかし, ① 活性触媒基およびその周辺構造には FIXa 固有の立体構造があって, それが基質水解活性を低くしている原因と推定される. ② FIXa と FVIIa では EGF ドメインの主軸とプロテアーゼドメインの主軸の折れ曲がり角度が異なっている. ③ 補助因子の FVIIIa と基質である FX が FIXa に結合して三者複合体を形成すると, FIXa の触媒活性が劇的に増強されるが, その仕組みは未だ明らかでない. それを明らかにする意味で, 今後, FIXa と FVIIIa の 2 者複合体, あるいは FIXa, FVIIIa と FX の 3 者複合体の立体構造, さらに, これらそれぞれの分子間相互作用の解析が必要である.

### 文 献

- Lin HF, Maeda N, Smithies O, Straghit DL, Stafford DW: A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood*, **90**: 3962-3966, 1997.
- Kung SH, Hagstrom JN, Cass D, Tai SJ, Lin HF, Stafford DW, High KA: Human factor IX corrects the bleeding diathesis of mice with hemophilia B: *Blood*, **91**: 784-790, 1998.
- Bode W, Lollar P, Bauer M, Huber R, Brandstetter H: Crystal structure of the antihemophilic clotting factor IXa: Explanation for its activity enhancement towards factor X upon complex formation with factor VIIIa. *日本血栓止血学会誌* **7**(3): 165-175, 1996.
- Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W: X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 9796-9800, 1995.
- 宮田敏行, 塚本洋晃, 鈴木宏治, 梅山秀明: 立体構造から眺める凝固因子欠損症 凝固第 IX 因子, プロテイン C およびアンチトロンビン III の欠損症. *日本血栓止血学会誌* **8**(2): 84-102, 1997.
- Banner DW, D'Arcy A, Chene 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.
- Zhang E, Charles SR, Tulinsky A: Structure of extracellular tissue factor complexed with factor VIIa inhibited with a BPTI mutant. *J Mol Biol*, **285**: 2089-2104, 1999.
- Bode W, Brandstetter H, Mather T, Stubbs TM: Comparative analysis of haemostatic protease: Structural aspects of thrombin, factor Xa, factor IXa and protein C. *Thromb Haemost*, **78**: 501-511, 1997.
- Kirchhofer D, Banner WD: Molecular and structural advances in tissue factor-dependent coagulation. *Trends Cardiovasc Med*, **7**: 316-324, 1997.
- Hopfner KR, Brandstetter H, Karcher A, Kopetzki E, Huber R, A.Engl R, Bode W: Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: Dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants. *EMBO J*, **16**: 6626-6635, 1997.
- Fay JP, Koshibu K: The A2 subunit of factor VIIIa modulates the active site of factor IXa. *J Biol Chem*, **273**: 19049-19054, 1998.
- Freedman SJ, Furie BC, Furie B, Baleja JD: Structure of the calcium ion-bound gamma-carboxyglutamic acid-rich domain of factor IX. *Biochemistry*, **34**: 12126-12137, 1995.
- Freedman SJ, Furie BC, Furie B, Baleja JD: Structure of the metal-free gamma-carboxyglutamic acid-rich membrane binding region of factor IX by two-dimensional NMR



- spectroscopy. *J Biol Chem*, **270**: 7980-7987, 1995.
- 14) Lenting PJ, van Mourik J, Mertens K: The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*, **92**: 3983-3996, 1998.
- 15) Kolkman JA, Lenting PJ, Mertens K: Regions 301-303 and 333-339 in the catalytic domain of blood coagulation factor IX are factor VIII-interactive sites involved in stimulation of enzyme activity. *Biochem J*, **339**: 217-221, 1999.
-