



## 第 V 因子および第 VIII 因子 C2 ドメインの結晶構造

嶋 緑 倫\*

Crystal Structures of Human Factor V and Factor VIII C2 Domains

Midori SHIMA\*

**Key words** : factor V, factor VIII, C2 domain, crystal structure, phospholipid membrane

### はじめに

第 V 因子 (FV) および第 VIII 因子 (FVIII) は血液凝固系の 2 大酵素複合体, prothrombinase (活性型第 X 因子,  $\text{Ca}^{2+}$ , リン脂質) および tenase (活性型第 IX 因子,  $\text{Ca}^{2+}$ , リン脂質) における必須の補因子として機能する。両因子の構造はきわめて似ており, いずれもアミノ酸組成の相同性により ABC の 3 ドメインに分けられる (図 1)。C2 ドメインは両因子の凝固活性発現上きわめて重要なドメインである。これまでに, リン脂質膜結合部位<sup>1)2)</sup>, モノクローナル抗体やインヒビター (抗第 V 因子あるいは第 VIII 因子同種抗体, 自己抗体) のエピトープ<sup>3)~5)</sup> が本ドメイン内に同定されている。さらに FVIII C2 ドメインには FVIII 凝固活性の安定化因子でもあるフォン・ヴィレブランド因子 (vWF)<sup>6)</sup> や FVIII 活性化に必須である活性型第 X 因子の結合部位も同定されている<sup>7)</sup>。従来, FV および FVIII の分子構造は A ドメインについてはセルロプラスミン<sup>8)</sup>, C ドメインについてはガラクトースオキシダーゼ結合ドメイン (GOBD) の構造<sup>9)</sup> を鋳型にしたモデリングにより予測されてきた。最近, 相次いで両因子の C2

ドメインが結晶化されその結晶構造が明らかになった<sup>10)11)</sup>。

### 1. 第 V 因子の C2 構造

Macedo-Riberio らは FVC2 ドメインを結晶化させ, 1.9 Å の分解能で構造を明らかにした<sup>8)</sup>。得られた結晶は単量体と二重体の 2 種類である。結晶解析によると C2 は樽型になっており, 5 本と 3 本の  $\beta$  構造によるシートが重なった  $\beta$  サンドイッチ構造を中心に, さらに上部に 3 本, 下部に 2 本の  $\beta$  構造を有する。特に上面は平坦になっており, N 末端残基である Cys 1 と C 末端領域の残基 Cys 156 は S-S 結合でつながっている (図 2a)。GOBD を鋳型にした FVC1-C2 のモデルでは, C1 ドメインと C2 ドメインが  $\beta$  サンドイッチの上面どうしが head to head の関係でつながっている<sup>9)</sup>。下部には Arg や Lys などの塩基性残基が多く存在している。C2 ドメインの特記すべき構造は底面からちょうど「熊の足」のようにのびる 3 つのスパイク様突起である。第 1 スパイクと第 3 スパイクはヘアピン構造で連結したそれぞれ 2 つの  $\beta$  シートから成り立っている。第 3 スパイ

\*奈良県立医科大学小児科 [〒 634-8522 橿原市四条町 840]

Department of Pediatrics, Nara Medical University [840 Shijo-cho, Kashihara city, Nara 634-8522, Japan.]  
Tel. 0744-22-3051, Fax. 0744-24-9222, e-mail : mshima@naramed-u.ac.jp

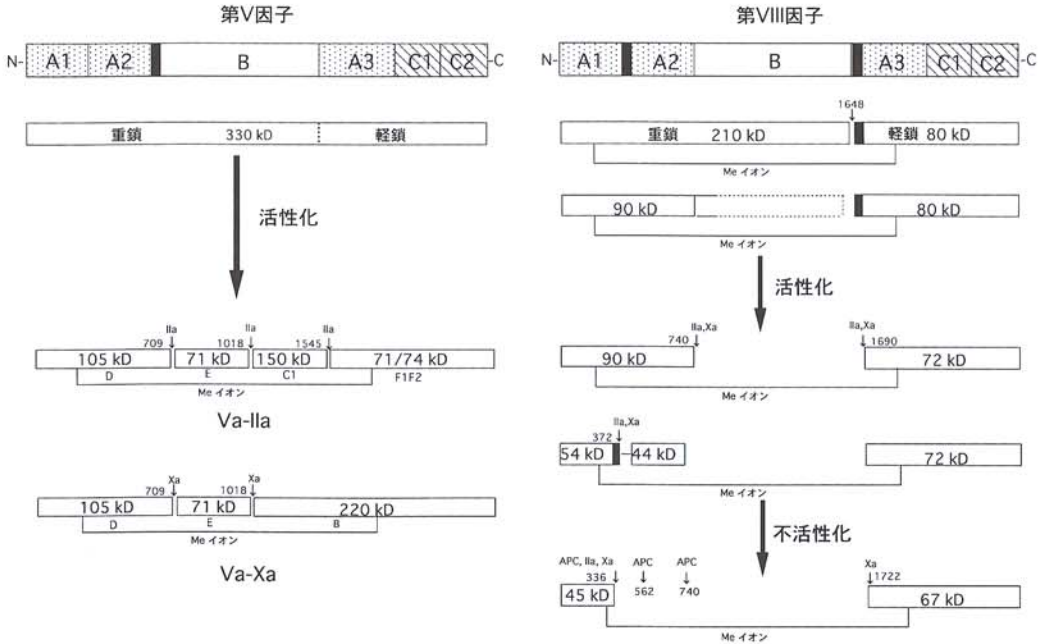


図 1 FV および FVIII のドメイン構造

FV および FVIII はアミノ酸組成の相同性により 3 ドメインに分けられ、A1-A2-B-A3-C1-C2 の順に並んでいる。トロンビン (IIa) により FV は順に Arg 709, Arg 1,018, Arg 1,545 が開裂されて活性型 FV (Va-IIa) に変換される。活性型 X 因子 (Xa) は Arg 1,018 および Arg 709 を開裂して活性型 FV (Va-Xa) に変換する。循環血漿中の FVIII は B ドメインが種々の程度に蛋白分解されて N 末側の 90-210 kD のサイズからなる重鎖と C 末側の 80 kD からなる軽鎖とのメタル結合でつながったヘテロダイマーである。IIa や Xa により Arg 740, Arg 372, Arg 1,689 が開裂され活性型 FVIII に変換される。

クはより広い不規則なループ状である (図 2b)。第 1 スパイクの先端はインドール基を有する 2 つの疎水性残基 Trp 26 および Trp 27 で両残基は溶媒相に露出している。第 3 スパイクの先端も疎水性の Leu 79 が位置している。一方、第 2 スパイクは Arg 43 の側鎖でキャップされている。単量体では 3 つのスパイクが深いポケットを形成しているが、二重体では第 1 スパイクと第 3 スパイクが内側に 3 つのスパイクの先端はお互いに近接している。ちょうど底面から見ると前者では Trp 26, Trp 27 および Leu 79 が離れていて、スパイクが開いているように見え open form とみなすことができる。一方、後者ではこれらの 3 残基が互いに近接しており、閉じたように見え closed form とみなすことができる (図 3)。このようにスパイク領域

は構造変化をきたしやすいことから、後述するリン脂質膜との結合メカニズムが提唱された。

## 2. 第 VIII 因子の C2 ドメイン 構造

FVIII の C2 ドメインも、FV と同様に 5 本と 3 本の  $\beta$  シートが重なった  $\beta$  サンドイッチ構造を中心骨格としている。さらに、3 つのヘアピン構造といくつかのループが中心からさらにのびている (図 4)。上部では Cys 1 (2174)\* と Cys 152 (2326) が S-S 結合でつながっている。本結合は C2 ドメインの両末端の 3 次元的な近接関係を示すのみならず、C2 構造の保持に重要と考えられる。実際、抗 C2 モノクローナル抗体 NMC-VIII/5 の C2 ドメインへの結合能は本ドメインの N 末端を除去しても C 末端を除

去しても消失する<sup>4)</sup>。樽構造本体の上面は疎水性の表面構造を有し、C1 ドメインや活性型第 IX 因子などのほかの因子との結合に関与しているものと考えられる。GOBD を鋳型にした FVIII C2 のモデルでは FV と同様に両ドメインが上面どうしが head to head につながっている<sup>12)</sup>。底面からは FVIII でも 2 つのヘアピン構造がスパイク状にのび下面の疎水性表面構造を形成している。第 1 のスパイクの先端部は非極性残基の 2 つの残基、Met 2199 (25) および Phe 2200 (26) が露出している。この両残基は FV の第 1 スパイクの Trp 26, Trp 27 に相当する。第 2 のヘアピン構造の先端には同じく非極性の残基である Leu 77 (2251), Leu 78 (2252) があり溶媒相に露出して接している。さらに、Val 49 (2223) も疎水性表面構造に関与している。

### 3. FVC2 ドメインにおけるリン脂質膜結合メカニズム

第一スパイクを認識する抗 FV モノクローナル抗体は FV/リン脂質結合、および、凝固活性を抑制する。また、第 1 スパイク先端部の 2 非極性残基 Trp 26, Trp 27 を Ala で置換した変異 FV ではフォスファチジルセリン (PS) との結合や凝固活性が障害される<sup>13)</sup>。さらに、FVC2 ドメインと共通の構造を有するガラクトースオキシダーゼではスパイク間のポケットにガラクトース結合部位を形成している<sup>14)</sup>。したがって、FV のリン脂質膜結合には C2 底面からのびる疎水性残基を特徴とするスパイク構造が関与していることが強く示唆される。

さて、この疎水性のスパイク構造がどのようにリン脂質膜と結合するのか、以下のようなメカニズムが考えられる。1) 循環血漿中に存在している closed form の FVC2 が酸性電荷のリン脂質膜表面に近づく。2) まず、1~2 個の PS 分子が closed form の下面スパイク領域の陽性電荷を有する残基 (たとえば Arg 150, Glu 48)

に結合後、ポケット部が開いて open form に変化する。3) PS 分子がポケット内に塩基性残基 (Lys 23, Gln 48, Ser 78) との水素結合によりすっぽりとうまる。4) 疎水性のスパイク部分が極性膜表面を貫通して、Trp 26, Trp 27, Leu 79 の側鎖が非極性の中心部へと進む。5) C2 樽構造の底面がスパイク部分の塩基性残基と近傍ループを介してリン脂質膜の陰性荷電部と結合する。FVC2 がリン脂質膜に結合後、構造変化をきたし、さらに  $\beta$  樽構造上面付近の Trp 残基とも結合する。

### 4. FVIII C2 ドメインとリン脂質膜結合様式

FV C2 ドメインのリン脂質膜進入部分を形成する 2 つの Trp 残基 (Trp 26, Trp 27) に相当するのが Met 26 (2199), Phe 27 (2200) である。FVC2 と同様なメカニズムでこの 2 疎水性残基がリン脂質膜表面に進入するものと考えられる。ただし、FVC2 と比較して FVIII C2 のスパイク部分はより非極性残基が多く PS ポケットのサイズは約 1/4 である。したがって、FVIII C2 はリン脂質膜結合のために FV より多くの PS 濃度が必要であることになる。FVIII のリン脂質への結合は vWF の存在により抑制され、C2 両末端を認識する抗 C2 モノクローナル抗体 NMC-VIII/5 は FVIII のリン脂質および vWF の両結合を抑制することから<sup>4)</sup>、FV と同様にスパイク領域を介してリン脂質膜に結合後、2 次的に樽構造上面領域もリン脂質膜結合に関与するものと考えられる。

### 5. 血友病 A 変異部位からの考察

データベースによると、FVIII C2 ドメイン内には 22 の血友病 A 点変異が明らかにされている<sup>15)</sup>。これらの血友病 A の変異部位の構造と臨床的フェノタイプとの関係は C2 構造・機能解析上重要である。変異部位は次の 4 タイプに分

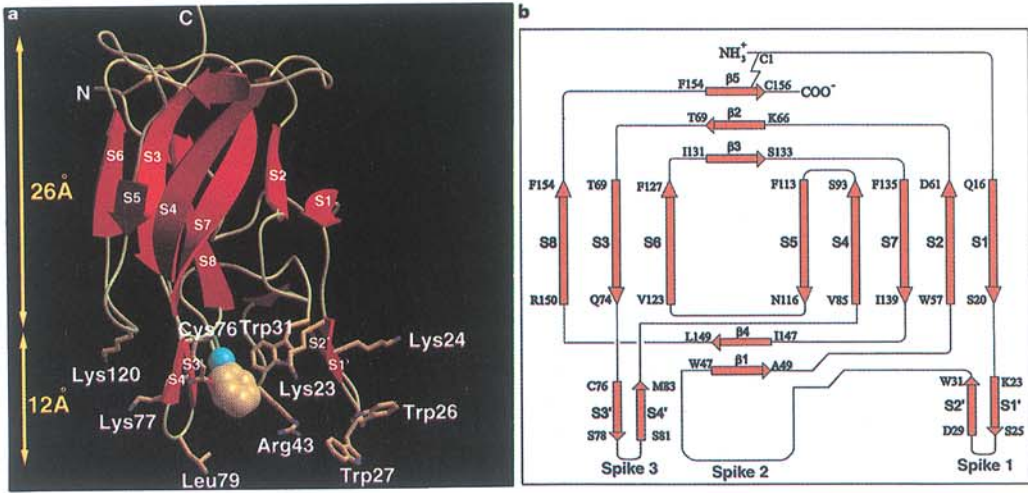


図 2

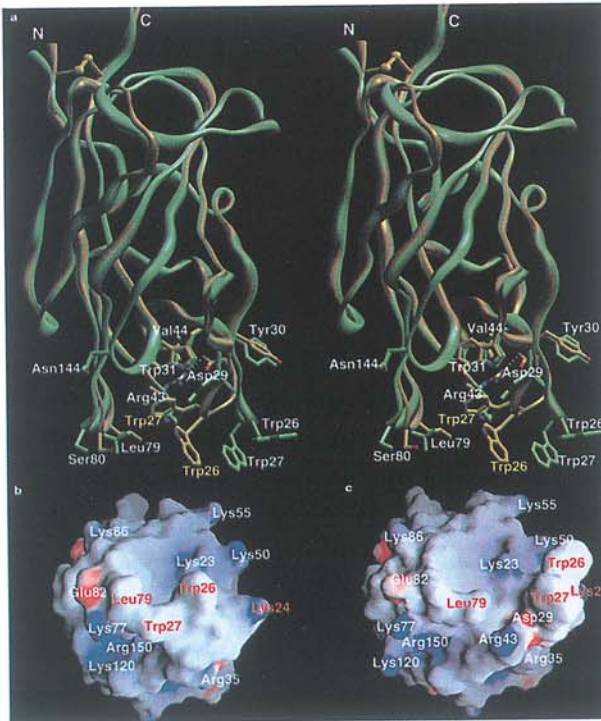


図 3

けられる(図 5)。第1はC2ドメイン中心核部の変異でIle 2185, Ile 2190, Val 2232, Thr 2245, Phe 2260, Ile 2262である。この部位の異常はC2樽構造の中心であるβサンドイッチ部位の重大な構造変化をきたすために、血中からのクリアランスが高くなる可能性がある。

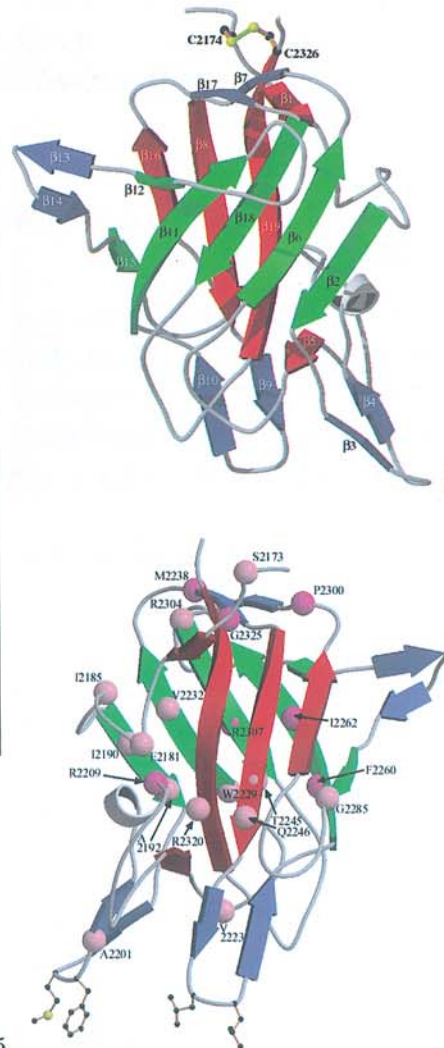


図 4

図 5

Ile 2185 および Thr 2245 は軽症型であるが、その他は中等もしくは重症型である。第 2 は上面の疎水構造部位の変異で Pro 2300, Met 2238 がある。Pro 2300 の異常症は P 2300 L, P 2300 S の 2 変異あり、いずれも軽症である。この上面の領域は C1 ドメインとの結合領域とも考えられており、これらの変異が C1-C2 結合に影響を与える可能性がある<sup>12)</sup>。Met 2238 は 5 症例登録され、いずれも M 2238 V であるが、1 例のみ重症型でほかの 4 例は中等症である。この領域の異常は C1 ドメインなどの FVIII のほかの領域や vWF などとの相互関係にも影響を与える可能性がある。第 3 はほかの表面構造部位における変異で Ser 2173, Glu 2181, Ala 2192, Ala 2201, Val 2223, Trp 2229, Gly 2285, Arg 2304, Arg 2307 などがあげられる。Arg 2307 におけるミスセンス例で R 2307 E は軽症、R 26307 L は重症型である。第 4 はその他の構造上重要と思われる部位における変異で Arg 2209, Gln 2246, Arg 2320, Gly 2325 があげられる。これらの変異は蛋白構造を保持するのに必要な水素結合に影響を与えるものと考えられ、重症型が多い。

## おわりに

結晶解析により、両因子 C2 ドメインの構造に関する理解が飛躍的に深まった。今後は、リ

ン脂質膜との結合のみならず vWF やインヒビターなどの各種抗体との結合様式に関する知見が期待される。

**謝 辞:** FV および FVIII の C2 結晶構造掲載を快く承諾頂いた Bode 博士 (Max-Planck-Institut, Germany), および Pratt 博士 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA) に深謝致します。

## 文 献

- 1) Ortel TL, Devore-Carter D, Quinn-Allen MA, Kane WH: Deletion analysis of recombinant human factor V. Evidence for a phosphatidylserine binding site in the second C-type domain. *J Biol Chem* **267**: 4189-4198, 1992.
- 2) Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS: Synthetic factor VIII peptides with amino acids sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* **75**: 1999-2004, 1990.
- 3) Ortel TL, Moore KD, Quinn AMA, Okamura T, Sinclair AJ, Lazarchick J, Govindan R, Carmagnol F, Kane WH: Inhibitory anti-factor V antibodies bind to the factor V C2 domain and are associated with hemorrhagic manifestations. *Blood* **91**: 4188-4196, 1998.
- 4) Shima M, Scandella D, Yoshioka A, Nakai H,

### 図 2 FVC2 ドメイン構造

- a. FVC2 ドメインの open form の結晶構造を示す。Cys 76 に結合しているのは構造決定のために用いられるフェニル水銀分子を示す。赤は FVC2 ドメイン構造の中心骨格である  $\beta$  構造を示す。
- b. FVC2 ドメインの 2 次構造の模式図を示す。方向は図 1a と一致しており、上部は平坦な上面表面構造、中央部は  $\beta$  シートが束になった中心核部、下方は  $\beta$  骨格底面と下方に突起するスパイク構造を示す。赤い矢印は  $\beta$  構造を示す。

### 図 3 FVC2 スパイク領域の構造変化

- a. 図上部は図 2a と同じ方向の FVC2 の立体構造を示す。Open form は緑、closed form は黄色で、側鎖も色表示している (C, 黄; O, 赤; N, 青)。
- b. Closed form の FVC2 底面の電荷: Trp 26 および Trp 27 と Leu 79 が近接している。
- c. Open form の FVC2 底面の電荷: Trp 26 および Trp 27 と Leu 79 が離れている。

### 図 4 FVIII C2 の構造

計 19 の  $\beta$  構造から成り立ち、8 本の  $\beta$  中心構造と上・下面の構造を有する。

### 図 5 FVIII C2 ドメイン内の血友病 A 点変異

数字は変異残基番号を示す。紫は重症型、桃は中等～軽症型を示す。

- 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.
- 5) Scandella D, DeG-Mahoney S, Mattingly M, Roeder D, Timmons L, Fulcher CA: Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of factor VIII fragments expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6152-6156, 1988.
- 6) Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D: A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem* **269**: 11601-11605, 1994.
- 7) Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Suzuki T, Koide T, Saenko EL, Scandella D, Shibata M, Kamisue S, Tanaka I, Yoshioka A: Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J Biol Chem* **274**: 31000-31007, 1999.
- 8) Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EGD, Kemball-Cook G: A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89**: 2413-2421, 1997.
- 9) Pellequer JL, Gale AJ, Griffin JH, Getzoff ED: Homology models of the C domains of blood coagulation factors V and VIII: A proposed membrane binding model for FV and FVIII C2 domains. *Blood Cells Mol Dis* **24**: 448-461, 1998.
- 10) Macedo RS, Bode W, Huber R, Quinn AMA, Kim SW, Ortel TL, Bourenkov GP, Bartunik HD, Stubbs MT, Kane WH, Fuentes PP: Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature* **402**: 434-439, 1999.
- 11) Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL: Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5Å resolution. *Nature* **402**: 439-442, 1999.
- 12) Gale AJ, Pellequer JL, Getzoff ED, Griffin JH: Structural basis for hemophilia A caused by mutations in the C domains of blood coagulation factor VIII. *Thromb Haemost* **83**: 78-85, 2000.
- 13) Kim SW et al.: Identification of functionally important amino acid residues within the C2 domain of human factor V using alanin scanning mutagenesis. *Biochemistry* (in press).
- 14) Ito N, Phillips SEV, Yadav KDS, Knowles PF: Crystal structure of a free radical enzyme, galactose oxidase. *J Mol Biol* **238**: 794-814, 1994.
- 15) Haemostasis Research Group at the MRC Clinical Science Centre, Imperial College School. Haemophilia A mutation database. [Http://europium.mrc.rpms.ac.uk/](http://europium.mrc.rpms.ac.uk/)
- \*アミノ酸残基 FVIII C2ドメインの残基番号(FVIIIの残基番号)