



## プロテイン Z (PZ) の欠損マウスおよび 新しい PZ 依存性セルピンの特性

下田 純一\*, 水口 純\*, 濱本 高義\*

Protein Z Deficient Mice and Protein Z-dependent Protease Inhibitor

Junichi SHIMODA\*, Jun MIZUGUCHI\* and Takayoshi HAMAMOTO

**Key words** : protein Z, protein Z deficiency, factor V Leiden, protein Z-dependent protease inhibitor, factor Xa

### はじめに

プロテイン Z (PZ) は, 1977 年, Prowse と Esnouf<sup>1)</sup> によりウシ血漿中に見い出されたビタミン K 依存性タンパク質で, 「Z」の由来は, 当時, こうした血漿タンパク質の分別に汎用されていた DEAE-セファロースカラムクロマトグラフィーの最後に, このタンパク質が溶出されるという意味からきている. 1984 年には, Broze らによりヒト血漿からも精製されたが<sup>2)</sup>, 以来, 最近まで, その生理的意義は不明であった<sup>脚注)</sup>. しかし, ごく最近, Han らのグループが, Ca<sup>2+</sup> とリン脂質存在下で, 活性型 X 因子 (Xa) を PZ 依存的に阻害するセリンプロテアーゼインヒビター (ZPI) を発見したことによって, にわかに PZ の生理的意義についての興味が高まりつつある<sup>3)~5)</sup>.

ヒト PZ のタンパク質および遺伝子構造などに関するこれまでの知見を要約すると<sup>6)~10)</sup>, ① PZ は N 末端側領域に 12 残基の  $\gamma$ -カルボキシ

グルタミン酸 (Gla) を含む一本鎖糖タンパク質で, 分子量は約 62,000 (360 アミノ酸残基), 循環血液中の濃度は約 2~3  $\mu\text{g/ml}$  である. ヒトとウシ PZ のアミノ酸配列には, 約 59% の相同性があり, そのドメイン構成も, ほかのビタミン K 依存性凝固因子 (X 因子, IX 因子, VII 因子, プロテイン C) と酷似する. すなわち, アミノ末端側から特徴的な Gla ドメインおよび 2 つの上皮性細胞成長因子 (EGF-1 と EGF-2) 様ドメイン, シュードセリンプロテアーゼドメインからなる. このシュードセリンプロテアーゼドメイン全体の 1 次構造は, トリプシンなど通常のセリンプロテアーゼのそれらと高い相同性を示す. ヒト PZ では, その触媒部位を形成する 3 つのアミノ酸の Ser-195 と, His-57, Asp-102 (キモトリプシン番号) のうち, Asp は保存されているが, Ser-195 と His-57 は, それぞれ Asp と Lys に置換されている. したがって, PZ はプロテアーゼ活性をまったく示さない. ウシ PZ も触媒基はほかのアミノ酸に置換されてい

\* (財) 化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 [〒 860-8568 熊本市大窪 1-6-1]

Blood Products Research Department, KAKETSUKEN [1-6-1, Okubo, Kumamoto, 860-8568, Japan.]  
Tel. 096-344-2183, Fax. 096-344-9234

脚注: 1991 年, Hogg と Stenflo はウシ由来の PZ とトロンビンの相互作用を見出し<sup>11)12)</sup>, PZ がトロンビンの運搬タンパク質である可能性を示唆したが, ヒトの PZ にはそうした作用は認められてない. しかし, ヒトの PZ は, Ca<sup>2+</sup> およびリン脂質の存在下, Xa と相互作用することが報告されている<sup>3)</sup>.

るが、ヒト PZ の cDNA からの推定アミノ酸配列と異なり、タンパク質レベルで 1 次構造が決定されたので、Asp-64 が  $\beta$ -ヒドロキシル化されていることや、Asn-59, Ser-53, Thr-338 にそれぞれ糖鎖付加のあることなどが確認されている。② ヒト PZ 遺伝子は全長 14 kb で、第 13 染色体 q 34 に位置し、1 つの extra エキソンを含む 9 つのエキソンと 7 つのイントロンから構成される。この第 13 染色体 q 34 には、PZ に加えて、X 因子、VII 因子および growth-arrest specific gene 6 (Gas 6) の遺伝子も存在し、それらのうち VII 因子と X 因子は互いに隣接した位置にある。③ これまで、PZ の臨床的意義については、出血傾向を示す患者において、血漿中の PZ 濃度が低下しているという報告はあるものの<sup>13)~15)</sup>、PZ の凝固系あるいは凝固制御系の役割は不明確であった。ワーファリン服用患者やビタミン K 代謝異常患者、重症肝障害患者では、明らかに PZ は低値を示す。血栓症や DIC、癌患者、膠原病などでは、健常人と同様、かなりの変動幅があり、疾患との相関は認められない<sup>16)</sup>。しかし、腎障害の血液透析患者の PZ の血中濃度は、健常人の約 2 倍高く<sup>17)</sup>、また、急性白血病患者や非 Hodgkin 病患者では、血漿 PZ 濃度は IL-6 濃度と逆相関にあるという<sup>18)</sup>。最近では、動脈硬化巣プラーク周辺の血管内あるいは血管外組織に、PZ の沈着が観察されており、動脈硬化の進展に及ぼす影響が示唆されている<sup>19)</sup>。

本稿では、PZ 依存性セルピン (ZPI) および、最近、作出された PZ の欠損マウスについて紹介したい。

### PZ 依存性セルピン (ZPI) の 生化学的性質

ZPI は、1998 年、Han らによってヒト血漿から精製され、その 1 次構造は、cDNA より決定された。ヒト ZPI の生化学的性質については、これまでに以下のことが明らかにされてい

る<sup>3)~5)</sup>。

① ZPI の分子量は、約 72,000 (423 アミノ酸残基) であり、1 次構造的にはセリンプロテアーゼインヒビター (セルピン) に属する。アミノ酸配列上は、 $\alpha_1$ -antitrypsin, antithrombin, heparin cofactor II や protease nexin-1 などのセルピンと 25~35% の相同性を示す。特に C 末側領域の相同性は高いが、N 末側領域は酸性アミノ酸 (グルタミン酸) 残基を多く含んでおり (26~43 アミノ酸残基領域)、その相同性は低い。しかし、ラットの regeneration-associated serpin protein-1 (rasp-1) とは、78% もの高い相同性がある。ほかのセルピンとの比較から推定すると、ZPI のインヒビター反応部位の P1 および P1' は、それぞれ Tyr 残基と Ser 残基である。この P1 に位置する Tyr 残基の重要性は、それを Ala 残基に変換した改変体で、ZPI の Xa 阻害活性が消失することからも明かである。ZPI の生合成部位は、ノーザン解析の結果から、主に肝臓であり、また、Han らは、その血中濃度を約  $4 \mu\text{g/ml}$  と推定している。肝臓からクローニングされた ZPI の cDNA は、2.44 kb で 5' 側領域は比較的長く (466 bp)、6 つの ATG 翻訳開始コドンが存在する。そのうち、6 番目の ATG が ZPI の発現に要求されることが、組換え体の発現実験から示されている。

② ZPI は、 $\text{Ca}^{2+}$  とリン脂質存在下、PZ 依存的に Xa を阻害するが、ヘパリンによる阻害促進は認められず、プロトロンビナーゼ複合体を形成した Xa は阻害しない。一方、ZPI は PZ 非依存的に活性型 XI 因子 (XIa) を阻害し、ヘパリンにより阻害速度は増強される。トロンビンやメイゾトロンビン、活性型 VII 因子、活性型 IX 因子、活性型プロテイン C, tissue-type plasminogen activator (t-PA), urokinase-type plasminogen activator (u-PA), プラスミン、トリプシン、白血球由来エラスターゼ、キモトリプシン、カテプシン G に対する阻害能は低く、活性型 XII 因子 (XIIa) やカリクレンは阻害されない。ZPI の Xa 阻害反応において、PZ

の Gla ドメインを欠失した PZ では、ZPI の阻害作用が失われるので、ZPI の PZ 依存的な Xa 阻害には、PZ の Gla ドメインが必須である。ZPI の Xa 阻害反応後の alkaline-PAGE では、PZ 存在下で ZPI と Xa の複合体バンドが認められ、ZPI と Xa の複合体形成は示されたが、SDS-PAGE の解析では、ZPI と Xa の複合体バンドが認められないことから、ZPI と Xa の阻害反応では、他のセルピンのようにアシル型酵素複合体を形成しないと推定される。また、ZPI は Xa あるいは XIa と反応後、それら活性型因子により反応部位の P1 (Tyr 387) - P1' (Ser 388) 間が切断されることが示されている。さらに、ZPI の阻害活性は、SDS (1%) や尿素 (8 M)、2-メルカプトエタノール (5%, vol/vol) で処理すると失活するが、Tween 20 (2%) や Triton X-100 (2%)、2-メチルアミン処理には抵抗する。

以上の如く、ZPI の研究は、未だ緒についたばかりであるが、ZPI の発見により、PZ の生理的意義についての興味が深まり、PZ 欠損マウスの作出が望まれた。

#### プロテイン Z 欠損マウスからの情報

Yin らは、凝固系あるいは凝固制御系での PZ の役割を明らかにするため、neo 遺伝子の挿入により破壊した PZ 遺伝子を、129/SV 由来の ES 細胞に導入し、PZ ヘテロ欠損 (PZ<sup>+/-</sup>) マウ

スを作成した<sup>20)</sup>。次いで PZ<sup>+/-</sup> マウス同士を交配させ、PZ ホモ欠損 (PZ<sup>-/-</sup>) マウスの作出を行った。誕生した各遺伝子型マウス、すなわち、正常 PZ (PZ<sup>+/+</sup>) マウス、PZ<sup>+/-</sup> マウス、PZ<sup>-/-</sup> マウスの出生比率は、それぞれ 23%、54%、23% でメンデルの法則にしたがっていた。

Yin らの報告では、PZ<sup>-/-</sup> マウスは PZ<sup>+/+</sup> マウスや PZ<sup>+/-</sup> マウスと比較しても、外観は何ら差はなく、胎仔の発育段階でも異常を認めなかったという。また、血小板数やフィブリノーゲンの血中濃度も、各遺伝子型間で差はなく、組織学的にも血管内血栓や肝臓でのフィブリン沈着も検出されてない。このように、正常マウスと比較しても、PZ 欠損マウスには何ら異常は認められなかった。

そこで、Yin らは PZ 欠損マウスに凝固系の負荷をかける意味で、V 因子 (FV) の変異体である FV<sub>Leiden</sub> 分子の遺伝子を導入したホモ FV<sub>Leiden</sub> (FV<sup>M+</sup>) マウスを作成して、それと PZ<sup>-/-</sup> マウスを交配させ、まず、ヘテロ FV<sub>Leiden</sub>/PZ ヘテロ欠損 (FV<sup>M+</sup> PZ<sup>+/-</sup>) を作成した。そして、FV<sup>M+</sup> PZ<sup>+/-</sup> マウス同士の交配により、各遺伝子型マウスを作成した。Yin らの報告からは、FV<sup>M+</sup> PZ<sup>+/-</sup> マウス同士の交配により得られたマウスの遺伝子型、胎児期の生存数、出生数、出生後の生存数などの詳細は不明であるが、大変興味深いことに、FV<sup>M+</sup> PZ<sup>+/-</sup> マウス同士の交配で得られたホモ FV<sub>Leiden</sub>/PZ ホモ

表 1 各 FV<sub>Leiden</sub>/PZ 遺伝子型マウスの交配により得られた生後 6 週目のマウスと胎齢 17.5~18.5 日の胎仔の生存 (文献 19 より引用・改変)

交配マウスの遺伝型	得られる遺伝子型	観察期日	生存数 (%)	期待値 (%)
FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup> × FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup>	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/+</sup>	生後 6 週	40 ( 52)	25
	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup>	生後 6 週	37 ( 48)	50
	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>-/-</sup>	生後 6 週	0 ( 0)	25
FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup> × FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup>	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/+</sup>	胎 17.5~18.5	7 ( 21)	25
	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup>	胎 17.5~18.5	18 ( 53)	50
	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>-/-</sup>	胎 17.5~18.5	9 ( 26)	25
FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup> × FV <sup>+/+</sup> PZ <sup>-/-</sup>	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup>	生後 6 週	28 ( 74)	50
	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>-/-</sup>	生後 6 週	10 ( 26)	50
FV <sup>M+</sup> PZ <sup>-/-</sup> × FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup>	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>+/-</sup>	生後 6 週	16 (100)	50
	FV <sup>M+</sup> PZ <sup>-/-</sup>	生後 6 週	0 ( 0)	50

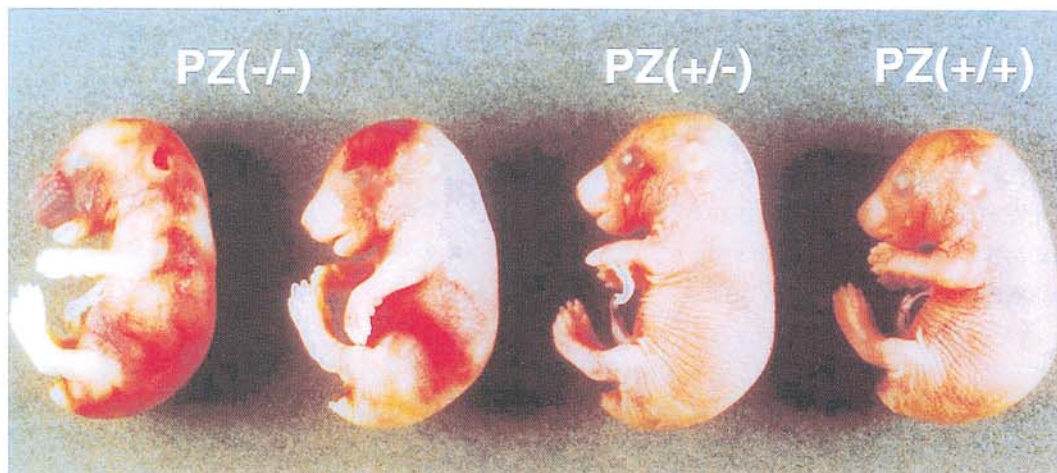


図 1 胎齢 17.5 日の  $FV^{Ala} PZ^{-/-}$ ,  $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  および  $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウス胎仔の写真 (転載許可取得)

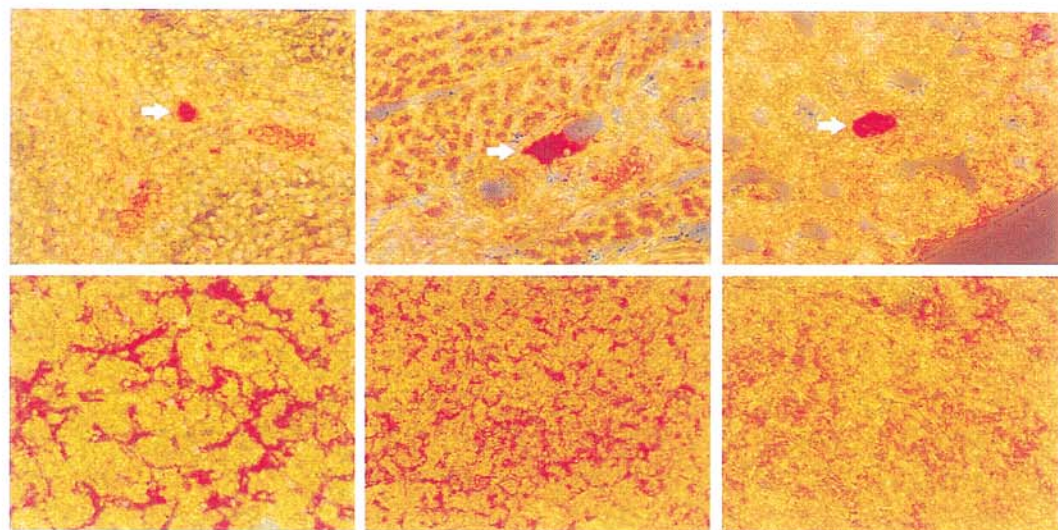


図 2 胎齢 17.5 日の抗フィブリン/フィブリノーゲン抗体による組織免疫染色の写真。上段写真は  $FV^{Ala} PZ^{-/-}$  胎仔の各組織での血栓形成を示す (矢印)。

上段左: 脊髄, 上段中央: 胸壁, 上段右: 肺血管, 下段写真は  $FV^{Ala} PZ^{-/-}$ ,  $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  および  $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウスのそれぞれの胎仔の肝臓でのフィブリン沈着を示す。

下段左:  $FV^{Ala} PZ^{-/-}$ , 下段中央:  $FV^{Ala} PZ^{+/-}$ , 下段右:  $FV^{Ala} PZ^{+/+}$ . (転載許可取得)

欠損 ( $FV^{Ala} PZ^{-/-}$ ) マウスで, 誕生後, 成熟マウスまで成長し生存したのは, たった 1 匹の雄マウスだけであったという。

次に, 各遺伝子型マウスの交配により得られるマウスの出生後 6 週目での生存数, また, 胎齢 17.5 日目での生存数や血管内および肝臓組織内での血栓形成について調べた。表 1 から明

かなように,  $PZ^{-/-}$  遺伝子型は,  $FV^{Ala}$  遺伝子型マウスの胎齢 17.5~18.5 日以降の死亡率を著しく増加させた。すなわち, ホモ  $FV_{Leiden}/PZ$  ヘテロ欠損 ( $FV^{Ala} PZ^{+/-}$ ) マウス同士を交配した場合,  $FV^{Ala} PZ^{-/-}$  マウスは, 胎齢 17.5~18.5 日では, メンデル則にしたがった数の胎仔が生存していたにもかかわらず, 生後 6 週目では 1

匹も生存しなかった。また、 $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウスと  $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  マウスの生後6週目のメンデル期待値は、1:2 (25%:50%) であるにもかかわらず、実際は約 1:1 (52%:48%) であったことから、 $PZ^{+/-}$  遺伝子型も  $FV^{Ala}$  遺伝子型マウスの死亡率を増加させると推定される(表 1)。しかし、 $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウスと  $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  マウスの両者間に、血小板数および血中フィブリノーゲン濃度の差は認められなかった。

さらに、ヘテロ  $FV_{Leiden}/PZ$  ホモ欠損 ( $FV^{+/+} PZ^{-/-}$ ) マウスと  $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  マウスの生後6週目での生存比率を調べると、その比率は 26%:74% を示し、これは期待値の 50%:50% に比較して、 $FV^{Ala} PZ^{-/-}$  が有意に低く、ヘテロ  $FV_{Leiden}$  マウスの生存率も  $PZ$  の発現量に依存していた(表 1)。

次に、 $PZ$  の発現量が、 $FV^{Ala}$  胎児の発育にどのように影響するかを調べる目的で、組織学的解析を行った。表 1 に示すように、 $FV^{Ala} PZ^{-/-}$ 、 $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  および  $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウスの、胎齢 17.5~18.5 日での発育数は、メンデル則にしたがっていたが、その中で、 $FV^{Ala} PZ^{-/-}$  マウスでは、全身に出血が認められた(図 1)。また、 $FV^{Ala}$  マウスの各  $PZ$  遺伝子型における胎児の免疫組織染色による解析では(図 2)、血管内血栓形成および肝臓組織内のフィブリン沈着は、 $PZ$  の発現量に依存し、その症状の重篤度は、 $FV^{Ala} PZ^{-/-}$  マウス  $>$   $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  マウス  $>$   $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウスの順であり、その程度も  $PZ$  の発現量に逆相関していた。

これらの結果から、Yin らは、凝固制御に  $PZ$  が重要な役割を果たしており、その制御機序に  $ZPI$  の  $PZ$  依存的な  $Xa$  阻害が関わっていると報告した。しかし、現在のところ、 $PZ$  単独での生理的役割については明らかでない。

## おわりに

以上を要約すると、①  $ZPI$  は、セルピンに属し、 $Ca^{2+}$  とリン脂質(セファリン)存在下、 $PZ$

依存的に  $Xa$  を阻害するが、ヘパリンによって阻害速度は促進されない。その反応部位の Tyr 残基(P1)は、 $ZPI$  の  $Xa$  阻害に重要であるが、 $ZPI$  と  $Xa$  の阻害反応では、ほかのセルピンのようなアシル型酵素複合体は形成されないという。 $ZPI$  は、 $Ca^{2+}$  とリン脂質存在下、 $PZ$  依存的に  $Xa$  を強く阻害するが、 $PZ$  非依的に  $XIa$  も阻害する。しかし、トロンビンやメイゾトロンビン、活性化 VII 因子、活性化 PC、t-PA、u-PA、プラスミン、トリプシン、白血球由来エラスターゼに対する阻害能は低く、 $XIIa$  やカリクレイン、キモトリプシン、カテプシン G は阻害されない。 $ZPI$  の  $PZ$  依存的な  $Xa$  阻害には、 $PZ$  の Gla ドメインが必須である。②  $PZ$  欠損マウスは、胎児期に子宮内で死亡することもなく、正常マウスと同様に誕生し、生育した。一方、 $PZ$  欠損マウスに血栓性素因の1つである  $FV_{Leiden}$  を導入すると、 $FV^{Ala}$  遺伝子型マウスおよび  $FV^{+/+}$  遺伝子型マウスともに、 $PZ$  の発現量の低下に依存して、胎齢 17.5~18.5 日以降の生存率が低下した。また、 $FV^{Ala} PZ^{-/-}$  マウス、 $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  マウスおよび  $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウスの胎仔において、凝固異常を伴う出血や血管内血栓および肝臓組織でのフィブリン沈着が認められ、その程度も、 $FV^{Ala} PZ^{-/-}$  マウス  $>$   $FV^{Ala} PZ^{+/-}$  マウス  $>$   $FV^{Ala} PZ^{+/+}$  マウスの順で、 $PZ$  の発現量に逆相関していた。これらの結果から、 $PZ$  が生体内において血液凝固制御系に重要な役割を果たしていることが示唆された。

今後、 $ZPI$  については、さらに詳細な  $Xa$  阻害機序や、阻害反応の速度論的解析、タンパク質間の相互作用、X線結晶構造解析などの研究が望まれる。また、 $PZ$  の生理的意義の解明のために、 $ZPI$  欠損マウスや  $ZPI$  と  $PZ$  の二重欠損マウスの作出、あるいは、血栓性素因として  $FV_{Leiden}$  だけでなく、ほかの血栓性素因、例えば、プロテイン C や tissue factor pathway inhibitor などとの  $PZ$  二重欠損マウスの作出が期待される。

謝辞: 御校閲を戴きました岩永貞昭先生(藤田保健衛生大学客員教授)に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Prowse CV, Esnouf MP: The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. *Biochem Soc Trans* **5**: 255-256, 1977.
- 2) Broze GJ Jr, Miletich JP: Human protein Z. *J Clin Invest* **73**: 933-938, 1984.
- 3) Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr: Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9250-9255, 1998.
- 4) Han X, Huang Z-F, Fiehler R, Broze GJ Jr: The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. *Biochemistry* **38**: 11073-11078, 1999.
- 5) Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr: Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* **96**: 3049-3055, 2000.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 西村 仁, 岩永貞昭: プロテイン Z-機能不明の  $\gamma$ -Glu 含有蛋白質. *医学のあゆみ* **169**: 583-587, 1992.
- 9) 鈴木宏治: プロテイン Z. *日本臨床* **750**(増刊号): 645-647, 1999.
- 10) 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.
- 11) Hogg PJ, Stenflo J: Interaction of vitamin K-dependent protein Z with thrombin. Consequences for the amidolytic activity of thrombin and the interaction of thrombin with phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **266**: 10953-10958, 1991.
- 12) Hogg PJ, Stenflo J: Interaction of human protein Z with thrombin: evaluation of the species difference in the interaction between bovine and human protein Z and thrombin. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 801-807, 1991.
- 13) Kemles-Matthes B, Matthes KJ: Protein Z deficiency: a new cause of bleeding tendency. *Thromb Res* **79**: 49-55, 1995.
- 14) Kemles-Matthes B, Matthes KJ: Protein Z, a new haemostatic factor, in liver diseases. *Haemostasis* **25**: 312-316, 1995.
- 15) Ravi S, Mauron T, Lammle B, Willemin WA: Protein Z in healthy human individual and in patients with a bleeding tendency. *Br J Haematol* **102**: 1219-1223, 1998.
- 16) Miletich JP, Broze GJ Jr: Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarin therapy. *Blood* **69**: 1580-1586, 1987.
- 17) Usalan C, Erdem Y, Altun B, Arici M, Haznedaroglu IC, Turgan C, Caglar S: Protein Z levels in haemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* **31**: 541-545, 1999.
- 18) Undar L, Karadogan I, Ozturk F: Plasma protein Z levels inversely correlate with plasma interleukin-6 levels in patients with acute leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Thromb Res* **94**: 131-134, 1999.
- 19) Greten J, Kreis I, Liliensiek B, Allenberg J, Ziegler R, Nawroth PP: Localization of protein Z in vascular lesions of patients with atherosclerosis. *Vasa* **27**: 144-148, 1998.
- 20) Yin Z-F, Huang Z-F, Cui J, Fiehler R, Lasky N, Ginsburg D, Broze GJ Jr: Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6734-6738, 2000.