

論文要旨

学位論文題目：アネキシン A4 の血液凝固内因系経路の阻害機構

氏名：中山 萌絵香

【背景】

血液凝固反応は止血反応として失血を防ぎ、生体防御に大きな役割を果たす一方で、血中で起こると血管が閉塞する血栓症を引き起こし、心筋梗塞や脳卒中などの重篤な疾患に関与することも知られている。血液凝固反応は血中で負電荷性分子やコラーゲンに血液凝固第 XII 因子 (Factor XII, FXII) が接触して開始される内因系経路と、損傷組織と血液の接触により開始される外因系経路の二経路からなり、両経路とも血液凝固因子が連鎖的に反応することで最終的にトロンビンを生成し、線維状のフィブリンにより止血が完了するカスケード反応である。FXII は内因系の凝固反応の上流に位置するセリンプロテアーゼで、負電荷表面との相互作用により活性化することが知られている。FXII は遺伝的な欠損によっても出血傾向を示さず、また、活性化 FXII (activated FXII, FXIIa) により活性化される血液凝固第 XI 因子 (Factor XI, FXI) の遺伝的な欠損は、弱い出血傾向のみしか示さないことから、内因系経路の生理的意義は長らく不明であった。しかしながら、FXII や FXI の遺伝子をノックアウトしたマウスでは血栓傾向が低下するが、出血傾向には影響がないことが近年明らかになり、FXII と FXI は血栓形成に関与することが示された。さらに、内因系経路の活性化剤として、生体内に存在する硫酸化糖脂質 スルファチド (3-O-sulfated galactosylceramide) やポリリン酸、細胞外 RNA が見出されたため、生体内でも内因系経路が活性化されることで血栓形成が起きる可能性がある。このことから、FXII や FXI の活性化抑制は抗血栓薬の新規標的として注目されている。

アネキシン (ANX)A4 は抗凝固活性を持つ Ca^{2+} 結合タンパク質である。アネキシンファミリーは、アネキシン間で相同性の高い 4 つの C 末端側のリピート構造と、各アネキシンに固有の配列の N 末端側領域で特徴付けられる。その中でも ANXA4 はファミリー間で最も抗凝固活性が高いタンパク質の一つであることが明らかにされている。これまでに、血栓傾向の上昇する妊娠高血圧症候群を発症した妊婦の胎盤では正常な胎盤よりも ANXA4 が高発現していることが報告され、周産期には血中の ANXA4 濃度が上昇することが明らかになった。これらの背景から、ANXA4 は生体内において抗凝固活性をもち、内因系経路を阻害することで血栓形成を抑制しているという仮説を立て、これを検証するために ANXA4 の血液凝固阻害機構の解明を目的として研究を進めた。

【結果・考察】

(1) ANXA4 による血液凝固内因系経路活性化阻害

始めに血漿の凝固阻害活性を調べ、ANXA4 は外因系経路と内因系経路のどちらも阻害することを明らかにした。このうち、血栓形成に関わる内因系経路に着目し、ANXA4 の抗凝固活性を調べるこ

ととした。また、スルファチドを用いて FXII 欠乏血漿の凝固を開始させ、凝固開始までの時間が大幅に延長したことから、スルファチドの作用点は主に FXII であることが示された。次に、FXIIa と活性化 FXI (activated FXI, FXIa) に対する合成基質と、SDS-PAGE による FXII と FXI の活性化断片の検出により、ANXA4 の阻害活性を調べた。その結果、ANXA4 は FXII の自己活性化と FXI の活性化を阻害する一方で、FXIIa と FXIa の活性は阻害しないことが明らかになった。加えて、FXI の活性化にはスルファチドが補因子として働き、FXIIa の活性を強めることも見出された。ANXA4 の FXII・FXI 活性化阻害機構を明らかにするため、プルダウンアッセイ、およびスルファチドリポソームによる結合試験を行なった。これらの結果、ANXA4 は FXII, FXI, FXIIa, FXIa のいずれにも直接結合しないことが明らかになった一方で、ANXA4 を添加することによる FXII のスルファチドへの結合性の阻害が見出された。このことから、ANXA4 はスルファチドに結合することで、FXII のスルファチドへの結合を阻害し、自己活性化を抑制することが示唆された。

(2) ANXA4 の変異体を使った活性部位の探索

次に、ANXA4 の種々の変異体を作製し、活性部位の解明を目指した。(1) の結果より ANXA4 のスルファチドへの結合が阻害活性に関与すると考えられたことから、推定されるスルファチド結合部位の変異体を作製した。固相結合試験によって、作製した変異体のスルファチドへの結合性が低下していることが確認された。スルファチドを開始剤として用いた凝固試験において、作製した変異体は活性を維持していた。このことから、変異を導入したリピート 1 上のスルファチド結合部位は活性部位ではないことが示された。次に、ANXA4 のスルファチド結合性は Ca^{2+} 依存的であることから、リピート 1, 2, 4 に存在する Ca^{2+} 結合部位の変異体を作製した。凝固試験の結果、リピート 4 の Ca^{2+} 結合部位変異体で抗凝固活性が低下した。さらに、活性部位が存在するリピート構造を特定するためにリピート欠損体を作製した。作製したリピート 4 欠損体 ($\Delta R4$) において、NMR による立体構造の解析からは立体構造の不安定化が見出された。疎水性蛍光プローブ bis-ANS による疎水表面の検出からはリピート 3 欠損体 ($\Delta R3$) と $\Delta R4$ の疎水表面の露出が示唆されたが、凝固試験の結果、 $\Delta R3$ では抗凝固活性は維持していた一方で、 $\Delta R4$ は抗凝固活性を失ったことから、抗凝固活性部位はリピート 4 にあることが明らかになった。

(3) 巨核球，血小板における ANXA4 とスルファチドの発現と局在

アネキシンファミリーにおいて高い抗凝固活性を持つ ANXA4 と ANXA5 が生体内ではたらく可能性を探るため、巨核芽球系培養細胞 MEG-01 細胞，マウス骨髄由来 巨核球，iPS 細胞由来 不死化巨核球細胞株 imMKCL 細胞，およびマウス・ヒト血小板を用いてアネキシンファミリーとスルファチドの発現と局在を調べた。RT-PCR の結果、ANXA4 と ANXA5 は MEG-01, imMKCL, 血小板のいずれも他のアネキシンファミリーに比べて多く発現していた。さらに、ウェスタンブロッティングと細胞染色によって巨核球と血小板の細胞質に ANXA4 と ANXA5 が存在することが見出された。特に ANXA4 については、細胞染色による観察とフローサイトメトリーによって血小板の活性化により細胞表面に局在を変化させることが見出された。スルファチドについては、ガラクトース転移

酵素 CGT と硫酸基転移酵素 CST の発現を調べることで、巨核球における発現を調べた。RT-PCR の結果から、これらのスルファチド合成酵素の発現は見出されなかったため、巨核球や血小板はスルファチドを産生しないと考えられた。

【論文の概要】

上記の研究結果を本学位論文に以下の構成でまとめた。第 1 章の序論では、抗凝固薬の現状と血液凝固内因系経路の活性化機構、アネキシンファミリータンパク質の抗凝固活性に関する現在までの研究を本研究の背景として述べた。第 2 章では、本研究で行なった実験方法をまとめ、第 3 章および第 4 章では、ANXA4 による血液凝固阻害の分子機構の解明を目的として、FXII と FXI に着目した ANXA4 の阻害活性測定と ANXA4 との結合性の解析を行なった結果を示した。第 5 章では、生体内で ANXA4 が抗凝固タンパク質としてはたらく可能性を探るため、巨核球と血小板においてアネキシンファミリーとスルファチド合成酵素の発現と局在の結果を述べた。第 6 章では、これらの研究から見出された知見を踏まえて ANXA4 の応用可能性と発現意義、スルファチドの発現意義についての考察を示した。