

血液凝固 IX 因子 —その分子構造と機能発現メカニズムについて—

中村 徹*, 寺澤秀俊*, 中冨 靖*, 濱本高義*



中村 徹

Coagulation factor IX ; its molecular structure and functional mechanism

Toru NAKAMURA*, Hidetoshi TERASAWA*, Yasushi NAKATOMI*, Takayoshi HAMAMOTO*

1998年 宮崎大学農学部卒業
2000年 九州大学大学院
生物資源環境科学研究科
修士課程修了
同年 化学及血清療法研究所 入所

Key words: coagulation factor IX, activated factor IX, post-translational modification

1. はじめに

血液凝固 IX 因子 (以下, FIX) はアミノ酸 415 残基からなる分子量約 57,000 の 1 本鎖糖タンパク質である. FIX 遺伝子は 8 つのエキソンと 7 つのイントロンからなる 34kb の塩基長であり, X 染色体の Xq27.1 に位置する¹⁾. FIX は肝臓で生合成され, 血中濃度は 3~5 μ g/mL であり, 加齢に応じてこの血中濃度は高くなる²⁾. ヒト血漿由来 FIX の血漿中の半減期は約 24 時間である³⁾.

生体内において, FIX は内因系凝固因子の活性型 XI 因子 (以下, FXIa) または外因系凝固開始因子の組織因子/活性型 VII 因子複合体 (以下, TF/FVIIa) により, Arg145-Ala146 および Arg180-Val181 間のペプチド結合が順に切断され, 活性型 IX 因子 (以下, FIXa) に変換される. FIXa はコファクターである活性型 VIII 因子 (以下, FVIIIa) とリン脂質, Ca²⁺ 共存下で, Xase と呼ばれる複合体を形成し, X 因子 (以下, FX) を活性型 X 因子 (以下, FXa) に活性化する. 最終的には α -トロンビンがフィブリノゲンをフィブリンに変換し, 活性型 XIII 因子 (以下,

FXIIIa) 共存下, フィブリン網を形成しつつ止血の役割を果たす (図 1)⁴⁾.

FIX は血液凝固経路において, 内因系経路と外因系経路の交差点に位置する因子として重要な役割を果たし, その遺伝的欠乏症は血友病 B として知られている. その主な原因は点変異であり, 全体の約 9 割を占める.

本稿では, これまで報告されている知見を基に FIX の各ドメインの分子構造と機能について概説する⁵⁾.

i) FIX の一次構造

FIX はシグナル配列およびプロ配列を含め 461 アミノ酸残基からなる前駆体蛋白質として肝臓で生合成される. FIX 前駆体は 28 残基のシグナル配列が切断された後, 18 残基のプロ配列がプロセッシング酵素により切断され, 成熟した FIX として血中へ分泌される. 成熟 FIX はアミノ末端側から γ カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインおよび 2 つの上皮細胞成長因子様 (EGF 様) ドメイン, 活性化ペプチド領域, セリンプロテアーゼドメイン領域で構成される. セリンプロテアーゼドメイン領域はトリプシンやキモトリ

*一般財団法人化学及血清療法研究所蛋白製剤研究部 [〒 860-8568 熊本市北区大窪 1-6-1]

Therapeutic Protein Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, KAKETSUKEN [1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto 860-8568, Japan]

Tel: 096-344-2189 Fax: 096-344-9234 e-mail: nakamura-t@kaketsuken.or.jp

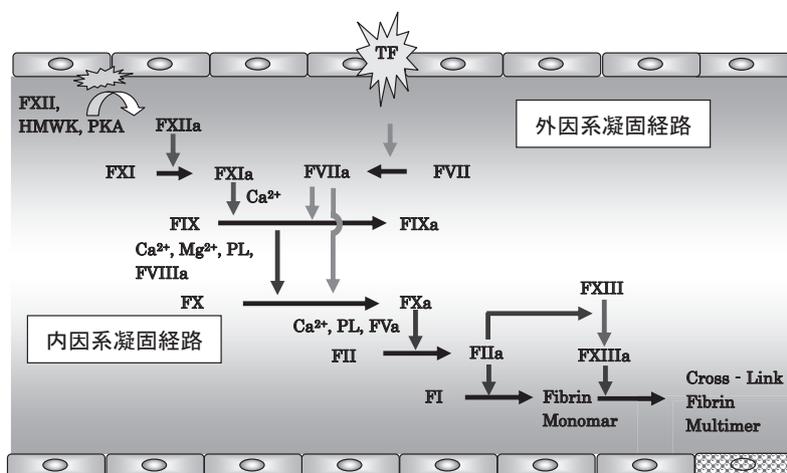


図1 血液凝固カスケード

TF: Tissue Factor, HMWK: High molecular weight kinogen, PKA: Prekallikrein, PL: Phospholipids, FVa: 活性化型血液凝固 V 因子, FII: プロトロンビン, FIIa: トロンビン, FI: フィブリノーゲン, FXII: 血液凝固 XII 因子, FXIIa: 活性化血液凝固 XIII 因子, FXIII: 血液凝固 XIII 因子

プシンと相同性が高い。成熟過程において、FIX は小胞体で翻訳後修飾を受けるが、遺伝子組換えの FIX は宿主細胞の翻訳後修飾を受けるため、ヒトの FIX の修飾と異なる (表 1, 図 2)。以下、各ドメインの構造について詳しく述べる。

ii) 各ドメインの構造と機能

Gla ドメイン

Gla ドメインはビタミン K 依存性凝固蛋白質に含まれる共通のドメインであり、因子間で高い相同性を有する。FIX では肝臓で γ カルボキシラーゼによってアミノ末端側の 12 個のグルタミン酸が γ カルボキシル化される。ビタミン K は、この反応の補助因子であり、還元型ビタミン K は γ カルボキシラーゼとともにグルタミン酸残基を γ カルボキシル化し、酸化されたビタミン K は、ビタミン K エポキシドレダクターゼ (VKOR) によって還元される。この γ カルボキシラーゼは、FIX プロペプチド内の Ala-10 に変異があると親和性が低下する。また、Arg-4 (プロペプチド) を Gln に変異させると、Gla 化が不十分な組換え体が得られることが分かっており、Gla 化にはプロペプチド領域が関与する^{6) - 8)}。

FIX の Gla ドメインには 8 つの陽イオン結合部位が存在する。この部分に Ca^{2+} が結合すると、

FIX の立体構造が安定化し、Gla ドメイン内の疎水性アミノ酸残基の側鎖とリン脂質膜とが相互作用できるようになる。また、 Ca^{2+} に加え、 Mg^{2+} 存在下で、FIX 活性が上昇することが森田らによって報告されている⁹⁾。Bajaj ら¹⁰⁾ によると、 Mg^{2+} は FIXa とリン脂質膜との相互作用を促進させるという。 Mg^{2+} は 8 つの陽イオン結合部位のうち 1, 7, 8 番目に配位すると考えられている。逆に、 Mg^{2+} だけでは FIX の Gla ドメインはリン脂質膜と結合できず、Gla 残基の 2 番目から 5 番目の 4 つの Ca^{2+} が Ω (オメガ) ループ^{*1} (Gly4-Gln11) の安定化に必要と考えられている¹¹⁾。Gla ドメイン内の Ω ループは EGF 様ドメイン-2 (以下、EGF-2, Cys88-Cys124 に相当) と共に、活性化血小板やリン脂質膜上で FX を活性化するための Xase 形成に重要である¹²⁾。

FIX の Ω ループ内の Lys5 は脊椎動物の FIX 間でよく保存されているが、その他のビタミン K 依存性凝固蛋白質では保存されていないユニークな塩基性アミノ酸である¹³⁾。Cheung らによって Lys5 を Ala に置換した FIX 変異体は IV 型コラーゲンとの結合能を消失することが報告され、FIX の Ω ループ内の Lys5 は血管内皮細胞や、基底膜の IV 型コラーゲンに結合する際に重要な役割を果たすことが示された¹⁴⁾。

表 1 血漿由来 IX 因子と遺伝子組換え IX 因子の翻訳後修飾の比較

	ヒト血漿由来	遺伝子組換え由来 ^{24) 38)}
Gla 化の数		
12/12 残基	100%	60%
11/12 残基	0%	35%
10/12 残基	0%	5%
EGF-1		
Asp64 β -ヒドロキシル化	37%	46%
Ser53 O型糖鎖	(Xyl) ₁ -Glc, (Xyl) ₂ -Glc	(Xyl) ₂ -Glc
Ser61 O型糖鎖	Sia- α 2,6-Gal- β 1,4-GlcNAc-Fuc	Sia- α 2,6-Gal- β 1,4-GlcNAc-Fuc
AP (活性化ペプチド)		
Tyr155 硫酸化, Ser158 リン酸化		
完全に修飾されているもの	70%	4%
どちらか一方が修飾されているもの	30%	21%*
全く修飾されていないもの	0%	75%
Asn157 N型糖鎖	α 2-3, α 2-6 で シアル化	α 2-3 のみ シアル化
Asn167 N型糖鎖		
Thr159 O型糖鎖	部分的に糖鎖が付加	部分的に糖鎖が付加
Thr169 O型糖鎖		
Thr172 O型糖鎖		

*文献では数値の記載がないため、全てを100%と仮定した場合の割合を示した。

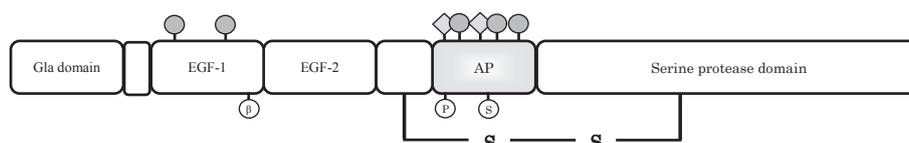


図 2 FIX のドメイン構成

●: O型糖鎖 ◆: N型糖鎖 ⊖: β ヒドロキシル化 ⊕: リン酸化 ⊙: 硫酸化

EGF 様ドメイン

EGF 様ドメインは Ca^{2+} 高親和性結合部位を有する EGF 様ドメイン-1 (以下, EGF-1) と FVIIIa との結合に寄与する EGF-2 からなる。

EGF-1 内の Ser53 と Ser61 は翻訳後修飾により O-グリコシル化され, Asp64 は β ヒドロキシル化されている。EGF-1 の Ser53 に結合する O 型糖鎖はキシロース (Xyl) とグルコース (Glc) からなり, (Xyl)₁-Glc と (Xyl)₂-Glc の 2 種類が存在する¹⁵⁾。遺伝子組換え FIX では (Xyl)₁-Glc は観察されないため, 血漿由来 FIX の特徴のひとつとなっている (表 1)。EGF-1 の Ca^{2+} 結合部位は Asp64-Ser68 ヘアピループとその近

くの β -ストランド間に位置する。EGF-1 への Ca^{2+} の結合は EGF-2 とセリンプロテアーゼドメインの位置を調節し, FVIIIa との相互作用を最適化することで酵素活性を促進している。しかし, EGF-1 と Thr39-Val46 の疎水配列は内皮細胞への結合には関与しておらず, また直接 Xase の形成にも関与していない^{16) - 19)}。

なお, EGF-1 は TF/FVIIa による FIX の活性化には必須であるが, FXIa による FIX の活性化には必須ではないという²⁰⁾。EGF-2 には 3 つのループが存在し, ファーストループ (Asn89-Gly93) はコファクターである FVIIIa との結合に関与し, サードループ (Ser102-Val108) は基質

であるFXとの結合に関与している²¹⁾。EGF-1とEGF-2を繋ぐ領域のアミノ酸配列とその長さ(Leu84-Thr87)は、FVIIIaのA2ドメインとの相互作用に重要であり、この部位を改変したFIXではFXの活性化能が低下する²²⁾。

活性化ペプチド

活性化ペプチド(以下、AP)内には翻訳後修飾を受ける箇所が数多く存在し、FIXのクリアランスに関与している²³⁾。FIXの糖鎖修飾では、Asn157とAsn167はN-グリコシル化され、Thr159、Thr169とThr172はO-グリコシル化されている。また、Tyr155は硫酸化されており、Ser158はリン酸化されている。表1に示すように、ヒト血漿由来FIXのAPの質量分析の結果から、Tyr155が硫酸化され、かつSer158がリン酸化されているものは70%であり、どちらか一方のみ修飾されているものは30%である。一方、遺伝子組換えFIXでは硫酸化され、かつリン酸化されたものは約4%しかなく、両アミノ酸共に修飾されていないものは75%にも及ぶ²⁴⁾。血漿由来のFIXのリン酸化を脱リン酸化すると血中回収率が著しく低下する。リン酸化が血中回収率に影響を与えるという仮説に基づき、APをポリリン酸化したFIX改変体を用いて血中回収率を調べたところ、予想に反して血中回収率は遺伝子組換えFIXよりも低下した。したがって、翻訳後修飾による血中回収率の差はリン酸化ではなく糖鎖ではないかと考察されている²⁵⁾。糖鎖に関する報告によれば、ヒト血漿由来FIXのAPのN型糖鎖は α 2-3、 α 2-6で結合したシアル酸を含んでいるが、CHO細胞で産生される遺伝子組換えFIXでは α 2-3で結合したシアル酸のみである。こうしたAPの糖鎖の翻訳後修飾の差がヒト血漿由来と遺伝子組換えのFIXのクリアランスの差に影響していると考えられている²⁴⁾。

セリンプロテアーゼドメイン

一般に、セリンプロテアーゼは求核攻撃をもつセリン残基および触媒残基としてヒスチジン残基とアスパラギン酸残基をもつ。これら3つのアミノ酸は空間的にSer-His-Aspの順で並んでおり、セリンの水酸基の水素原子とヒスチジンの窒

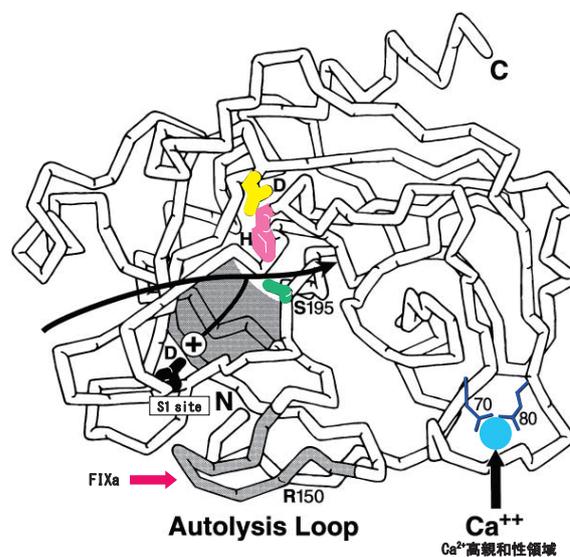


図3 プロテアーゼドメインのカルシウムイオン結合部位、Autolysis Loop、触媒部位とS1部位の位置関係
N: NH₂末端, C: COOH末端, D: アスパラギン酸の側鎖 黄, H: ヒスチジンの側鎖 マゼンダ, S: セリンの側鎖 緑, S1site D: S1部位のアスパラギン酸 黒
矢印は基質の結合部位に結合したP1側鎖の位置を示している。FIXaはAutolysis LoopのC150のR(アルギニン)とC151のセリンの結合を切断する。Ca²⁺はC70, C80のグルタミン酸の側鎖と結合することで構造を安定化し、FIXaによるAutolysis Loopの切断に対し保護的に働く。(文献26より引用、一部改変)

素原子が、またヒスチジンの窒素原子とアスパラギン酸の酸素原子が水素結合している。セリンプロテアーゼは基質とミカエリス型複合体を形成すると、セリンの水酸基のプロトンがヒスチジンに移る。プロトン化ヒスチジンはアスパラギン酸との水素結合によって安定化されている。プロトンを失ったセリンの水酸基の酸素原子は基質のペプチド主鎖にあるカルボニル基の炭素原子に求核攻撃を行う。それによってセリンの水酸基と基質ペプチドのカルボニル基が共有結合した四面体型の中間複合体が形成される。次いで四面体型の中間複合体が分解し、基質のペプチド結合が切断され、アシル酵素中間体が形成する。その後、水がアシル酵素中間体のアシル基を攻撃し、最終的に基質を切り離して水解する。

FIXaではSer365(C195)、His221(C57)、Asp269(C102)がCatalytic triadを形成する(カッコ内のCの数字はキモトリプシンナンバー)。この触媒部

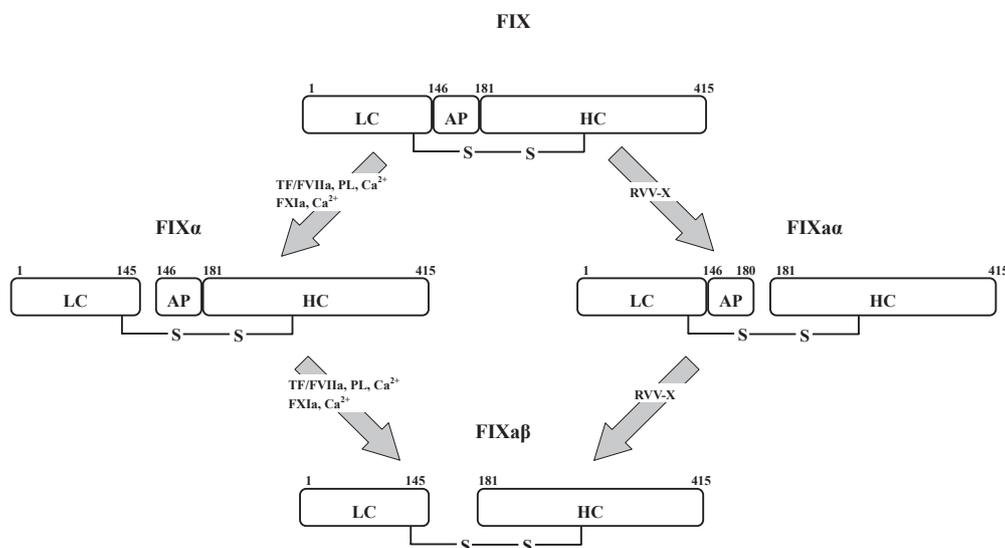


図4 FIXの活性化機構

LC : Light Chain, AP : Activation Peptide, HC : Heavy Chain, RVV-X : Russell's Viper Venom factor X activator

位に加えてセリンプロテアーゼドメイン内には, Autolysis ループと呼ばれる領域と Ca^{2+} 高親和性領域が存在する. これら2つの領域は2箇所の水素結合で繋がっている. Autolysis ループはFIXαがチモゲンのFIXを切断する領域 (Ser318-Arg319) を含むため, このように呼ばれている. Autolysis ループで切断されたFIXは, Catalytic triadを形成できなくなるため酵素活性を示さない. Ca^{2+} 結合ループには1つの Ca^{2+} が Glu235 (C70), Asn237 (C72), Glu240 (C75), Glu245 (C80) で配位しており, Ca^{2+} はFIXαの立体構造を維持するのに重要な働きを担っている (図3). これにより, セリンプロテアーゼドメインでの Ca^{2+} の結合は Autolysis ループの切断 (Ser318-Arg319) を抑制している²⁶⁾.

iii) FIX 活性化機構

FIXの活性化には切断順序の違いにより2つの経路が存在する. 1つはFXIa, あるいはTF/FVIIaによる活性化経路である (図4). この経路では, まずArg145-Ala146間のペプチド結合が切断されてFIXαとなり, 次いでArg180-Val181のペプチド結合が切断され, 35残基のAPが遊離し, Cys132-Cys289がジスルフィド結合した2本鎖のFIXαβ (FIXa) へと変換される.

もう1つの経路は蛇毒のRussell's viper venomのX因子活性化酵素 (RVV-X) により活性化される経路である. 前述の活性化経路とは異なりArg180-Val181のペプチド結合が先に切断され, FIXααを産生する. その後, Arg145-Ala146間のペプチド結合が切断されて2本鎖のFIXαβ (FIXa) へと変換される. 中間体であるFIXααとFIXαは合成基質と天然基質であるFXの活性化能が異なる. FIXαは合成基質の水解活性を有するが, その効率はFIXαβの4分の1以下である. なお, 基質をFXにすると, FIXαはFXaを産生することができない. 一方, FIXααの合成基質の水解活性はFIXαβの活性にほぼ等しい. しかし, 基質をFXにするとFXaの産生効率はFIXαβに比べて低くなる²⁷⁾. このようにFIXの中間体やFIXαβの活性は低分子の基質と高分子の基質の間で反応性が大きく異なる.

TF/FVIIaによるFIX活性化は, TF/FVIIaのTFとFIXのGlaドメイン及びEGF-1ドメインとが相互作用することによって上記のペプチド結合が切断される. この反応では, Arg145-Ala146間のペプチド結合のみが切断されているためFIXαが観察できる. このことから, TF/FVIIaによる活性化は, 産生されたFIXαがTF/FVIIa複合体から一度解離し, 解離した

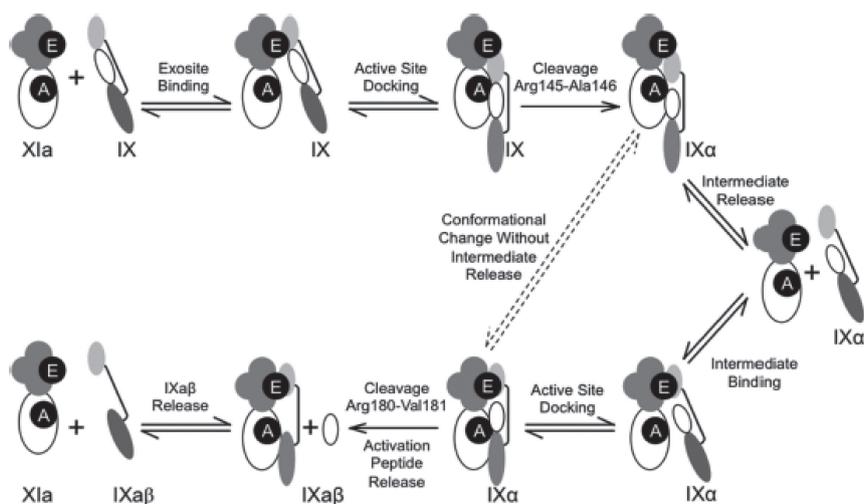


図5 FXIaによるFIX活性化機構のモデル(文献33より引用)

E : Exosite, A : Active site

FIX α は再びTF/FVIIaと結合し、Arg180-Val181のペプチド結合を切断することでFIX $\alpha\beta$ へと2段階で変換していることが分かる³²。すなわち、TF/FVIIaはFIX α よりもFIXに対する親和性が高い。したがって、TF/FVIIaによるFIXの活性化はArg180-Val181のペプチド結合切断が律速である^{28) 29)}。

一方、ホモダイマーであるFXIaによるFIXの活性化では、ホモダイマー中のFXIaのアクティブサイトが2箇所あり活性化の中間体が観察されないことから、FXIaがFIXの2箇所のペプチド結合を切断すると考えられていた³⁰⁾。しかし、FXIの結晶構造が明らかにされるとアクティブサイトが互いに近接せず反対方向を向いていることから、この考えは否定された。その後、Gailaniらは、2箇所あるFXIaのアクティブサイトのうち1箇所のみを不活化したFXIaを用いてFIXを活性化すると、FIX α が蓄積されることを見出した。この結果により、TF/FVIIaによるFIX活性化と同様にFXIaによるFIXの活性化においても、産生されたFIX α はFXIaから一度解離し、解離したFIX α は再び別のFXIaと結合し、Arg180-Val181のペプチド結合を切断することでFIX $\alpha\beta$ へと変換していることが判明した。すなわち、FXIaはFIXよりもFIX α に対する親和性が高いために、中間体が観察され

ないという^{31) 32)}。FXIaによるFIXの活性化は、TF/FVIIaの活性化と異なりArg145-Ala146間のペプチド結合の切断が律速である。最近、同グループは、一部のFXIaでは1箇所のアクティブサイトだけで一度も乖離することなくFIXをFIX α に活性化する可能性についても報告している(図5)³³⁾。

iv) XaseによるFX活性化

FIXaは単独でも基質であるFXを活性化するが、その活性化速度は遅い。FIXaはコファクターであるFVIIIa、Ca²⁺、リン脂質共存下で複合体(Xase)を形成すると、酵素活性は劇的に増強し、FXの活性化速度は10⁹倍まで高められる。また、XaseによるFXの活性化は、TF/FVIIaによるFXの活性化の~50倍効率が良い³⁴⁾。

FIXaはXaseを形成するときFVIIIaとリン脂質上で結合する。この結合にはFVIIIaのA2ドメインとA3ドメインが関与している。前者のFIXaとの親和性は低くKd~300nM程度であるが、後者のFIXaとの親和性は高くKd~15nMである。これまでの報告から、FIXaとFVIIIaとの結合部位は3箇所同定されている。①FIXaの330-339ヘリックスとFVIIIaの558-565の領域、②FIXaの301-303の領域とFVIIIaの712周辺領域、③FIXaのPhe25, Tyr69, Asn92と

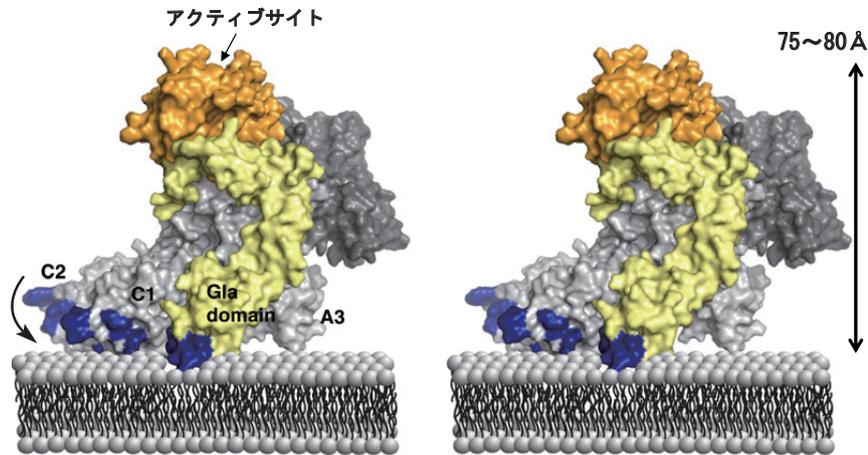


図6 脂質二重膜と相互作用するXaseのステレオビュー (文献35より一部改変)
 FVIIIaの重鎖: ダークグレー, FVIIIaの軽鎖: ライトグレー
 リン脂質と相互作用するFVIIIaのC1, C2ドメインとFIXaのGlaドメイン: 青
 FIXaの重鎖: 橙, FIXaの軽鎖: 黄

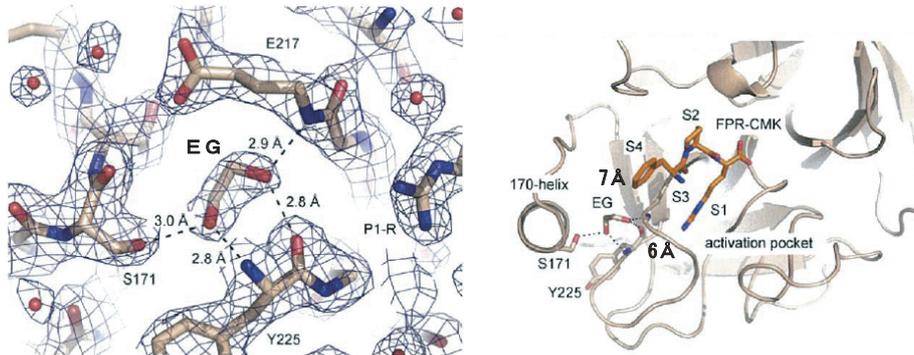


図7 エチレングリコール (EG) の結合部位 (文献37より引用, 一部改変)
 左図 エチレングリコールの結合部位と各アミノ酸側鎖との距離
 P1-R: P1の側鎖
 右図 エチレングリコールと各基質結合部位との距離
 FPR-CMK: Phe-Pro-Arg-Chloromethyl ketone

FVIIIaの1811-1818の領域, である. この複合体をリン脂質上でモデリングすると, FIXaの活性触媒基は液相に接する上部に位置し, 膜表面から約75~80Åの距離に位置している (図6)³⁵.

また, 活性化されたFIXaはアルコールにより合成基質に対する触媒活性が上昇することが知られている. 1価のアルコールよりも2価のアルコールのほうが顕著に合成基質の水解活性を増強させる. 特にエチレングリコール (EG) 存在下では, その酵素活性は20倍も増強される. その理

由としてはEGがFIXaのアクティブサイトに構造変化を起こさせ, P3位の疎水性の残基とトリペプチドの合成基質がアクセスしやすくなるためだと考えられている (図7)³⁶. このEGの結合部位はFVIIa同様に60ループと99ループの間であると考えられたが, ZoggらによってEGはFIXaの170ヘリックスのSer171のO γ およびTyr225のカルボニル基の酸素とアミド基の窒素, Glu217のアミド基の窒素と水素結合していることが示された. EGはS3位であるGlu217と直

接相互作用して、それぞれ6.0 Åと7.0 Åの距離にあるS1位とS4位に影響を与える。この結果、FIXの触媒活性が上昇すると考えられている³⁷⁾。

2. おわりに

以上のように、FIXはその構造と機能について数多くの研究がなされている。血漿由来の血液凝固IX因子製剤と遺伝子組換え由来の血液凝固IX因子製剤との血中回収率の差は、宿主の違いによる翻訳後修飾の差がその原因とされているが、決定的な結論に至っていない。今後、最新の技術を用いた解析等により、FIXのより詳細な分子構造と機能発現のメカニズムが解明されることが期待される。

謝辞：稿を終えるにあたり、校閲していただいた岩永貞昭先生と執筆の機会を与えていただいた武谷浩之先生（崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科 教授）に深謝します。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K : Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* **24** : 3736-3750, 1985.
- 2) Zhang K, Kurachi S, Kurachi K : Genetic mechanisms of age regulation of protein C and blood coagulation. *J Biol Chem* **277** : 4532-4540, 2002.
- 3) 齋藤英彦, 高松純樹, 神谷忠, 藤巻道男, 稲垣稔, 三間屋純一 : モノクローナル抗体精製加熱第IX因子製剤 (MC-9) の臨床試験成績。基礎と臨床 **24** : 8044-8064, 1990.
- 4) 竹尾和寛, 中垣智弘, 岩永貞昭 : フィブリノゲンの多様性—その構造と機能, および分子進化について—。日本血栓止血学会誌 **24** (3) : 300-317, 2013.
- 5) 濱本高義, 副島見事, 岩永貞昭 : 活性化IX因子の結晶構造。日本血栓止血学会誌 **10** (4) : 290-298, 1999.
- 6) Kristensen SR : Warfarin treatment of a patient with coagulation factor IX propeptide mutation causing warfarin hypersensitivity. *Blood* **100** : 2676-2677, 2002.
- 7) Chu K, Wu SM, Stanley T, Stafford DW, High KA : A mutation in the propeptide of factor IX leads to warfarin sensitivity by a novel mechanism. *J Clin Invest* **98** : 1619-1625, 1996.
- 8) Galeffi P, Brownlee GG : The propeptide region of clotting factor IX is a signal for a vitamin K dependent carboxylase : evidence from protein engineering of amino acid -4. *Nucleic Acids Res* **15** : 9505-9513, 1987.
- 9) Sekiya F, Yamashita T, Atoda H, Komiyama Y, Morita T : Regulation of the tertiary structure and function of coagulation factor IX by magnesium (II) ions. *J Biol Chem* **270** : 14325-14331, 1995.
- 10) Messer AS, Velander WH, Bajaj SP : Contribution of magnesium in binding of factor IXa to the phospholipid surface : implications for vitamin K-dependent coagulation proteins. *J Thromb Haemost* **7** : 2151-2153, 2009.
- 11) Shikamoto Y, Morita T, Fujimoto Z, Mizuno H : Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein. *J Biol Chem* **278** : 24090-24094, 2003.
- 12) Yang X, Walsh PN : An ordered sequential mechanism for Factor IX and Factor IXa binding to platelet receptors in the assembly of the Factor X-activating complex. *Biochem J* **390** : 157-167, 2005.
- 13) Cheung WF, Hamaguchi N, Smith KJ, Stafford DW : The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3-11. *J Biol Chem* **267** : 20529-20531, 1992.
- 14) Cheung WF, van den Born J, Kühn K, Kjellén L, Hudson BG, Stafford DW : Identification of the endothelial cell binding site for factor IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** : 11068-11073, 1996.
- 15) Nishimura H, Kawabata S, Kisiel W, Hase S, Ikenaka T, Takao T, Shimonishi Y, Iwanaga S : Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl₂-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z. *J Biol Chem* **264** : 20320-20325, 1989.
- 16) Schmidt AE, Bajaj SP : Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends Cardiovasc Med* **13** : 39-45, 2003.
- 17) Lenting PJ, Christophe OD, Maat H, Rees DJ, Mertens K : Ca²⁺ binding to the first epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX promotes enzyme activity and factor VIII light chain binding. *J Biol Chem* **271** : 25332-25337, 1996.
- 18) Mathur A, Bajaj SP : Protease and EGF1 domains of factor IXa play distinct roles in binding to factor VIIIa. *J Biol Chem* **274** : 18477-18486, 1999.
- 19) Cheung WF, Straight DL, Smith KJ, Lin SW, Roberts HR, Stafford DW : The role of the epidermal growth factor-1 and hydrophobic stack domains of human factor IX in binding to endothelial cells. *J Biol Chem* **266** : 8797-8800, 1991.
- 20) Zhong D, Smith KJ, Birktoft JJ, Bajaj SP : First epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX is required for its activation by factor VIIa/tissue factor but not by factor XIa. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 3574-3578, 1994.
- 21) Chang YJ, Wu HL, Hamaguchi N, Hsu YC, Lin SW : Identification of functionally important residues of the epidermal growth factor-2 domain of factor IX by alanine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **277** : 25393-25399, 2002.
- 22) Celie PH, Van Stempvoort G, Fribourg C, Schurgers LJ, Lenting PJ, Mertens K : The connecting segment between both epidermal growth factor-like domains in blood coagulation factor IX contributes to stimulation by factor VIIIa and its isolated A2 domain. *J Biol Chem* **277** : 20214-20220, 2002.
- 23) Begbie ME, Mamdani A, Gataiance S, Eltringham-Smith LJ, Bhakta V, Hortelano G, Sheffield WP : An important role for the activation peptide domain in controlling factor IX levels in the blood of haemophilia B mice. *Thromb Haemost* **94** : 1138-1147, 2005.
- 24) Chevreux G, Faid V, Andre MH, Tellier Z, Bihoreau N : Differential investigations from plasma-derived and recombinant factor IX revealed major differences in post-translational modifications of activation peptides. *Vox Sang* **104** : 171-174, 2013.
- 25) Böhm E, Dockal M, Graninger M, Hasslacher M, Kaliwoda M, Konetschny C, Mitterer A, Muchitsch EM, Reiter M, Scheiflinger F : Expression of recombinant human coagulation factors VII (rFVII) and IX (rFIX) in various cell types, glycosylation analysis, and pharmacokinetic comparison. *BMC proceedings* **5** : 23-25, 2011.

- 26) Mathur A, Zhong D, Sabharwal AK, Smith KJ, Bajaj SP : Interaction of factor IXa with factor VIIIa. *J Biol Chem* **272** : 23418-23426, 1997.
- 27) Lenting PJ, ter Maat H, Clijsters PP, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K : Cleavage at arginine **145** in human blood coagulation factor IX converts the zymogen into a factor VIII binding enzyme. *J Biol Chem* **270** : 14884-14890, 1995.
- 28) Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W : The coagulation cascade : initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30** : 10363-10370, 1991.
- 29) Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR : Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood* **86** : 1794-1801, 1995.
- 30) Wolberg AS, Morris DP, Stafford DW : Factor IX activation by factor XIa proceeds without release of a free intermediate. *Biochemistry* **36** : 4074-4079, 1997.
- 31) Smith SB, Gailani D : Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa, *Expert Rev Hematol* **1** : 87-98, 2008.
- 32) Smith SB, Verhamme IM, Sun MF, Bock PE, Gailani D : Characterization of novel forms of coagulation factor XIa : independence of factor XIa subunits in factor IX activation. *J Biol Chem* **283** : 6696-6705, 2008.
- 33) Geng Y, Verhamme IM, Messer A, Sun MF, Smith SB, Bajaj SP, Gailani D : A sequential mechanism for exosite-mediated factor IX activation by factor XIa. *J Biol Chem* **287** : 38200-38209, 2012.
- 34) Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH : Surface-dependent hemostasis. *Semin Hematol* **29** : 213-226, 1992.
- 35) Ngo JC, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B : Crystal structure of human factor VIII : Implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* **16** : 597-606, 2008.
- 36) Stürzebecher J, Kopetzki E, Bode W, Hopfner KP : Dramatic enhancement of the catalytic activity of coagulation factor IXa by alcohols. *FEBS Letters* **412** : 295-300, 1997.
- 37) Zögg T, Brandstetter H : Structural basis of the cofactor- and substrate-assisted activation of human coagulation factor IXa. *Structure* **17** : 1669-1678, 2009.
- 38) White GC 2nd, Beebe A, Nielsen B : Recombinant factor IX. *Thromb Haemost* **78** : 261-265, 1997.

*¹ Ω (オメガ) ループは Gla ドメインへのカルシウムの結合により現れるループ構造であり, リン脂質膜との相互作用に関与する.

*² 一般に Arg, Lys 残基に特異性を示すセリンプロテアーゼは, 次の残基が疎水性残基であるより, 親水性残基の方をより早く水解する.