

リン脂質膜上における血液凝固因子の複合体形成過程の動的解析

森下英理子

金沢大学医薬保健研究域 保健学系

【研究の背景】

本学は、液中環境にある試料をナノメートルの空間分解能 1 フレーム約 0.1 秒でイメージングすることができる、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) 技術を有しており^{1,2)}、この技術を持っているのは今のところ世界中で金沢大学と Stanford 大学のみである。血液凝固反応は、リン脂質膜上で効率的に進む。われわれはプロトロンビン (PT) のリン脂質 (PL) 膜への結合過程を、HS-AFM 技術を用いて“1 分子レベル”かつ“ナノメートルスケール”で可視化することに世界で初めて成功した。

【目 的】

PT は、10 個の γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基を含む Gla ドメインを介して PL に結合する。この反応において、PL に結合することが PT の効率的な活性化に重要である。これまでに、PT の Gla ドメインの変異体として、PT Nijmegen (p.Glu50Lys) と PT Shanghai (p.Glu72Gly) の報告があり、重篤な出血傾向を呈する。両変異とも Gla 残基の置換による変異体のため PL への結合に障害があると予想されるが、詳細な解析は行われていない。そこで、今回 HS-AFM を用いて PT Nijmegen³⁾および PT Shanghai⁴⁾の PL 結合能を解析し、出血傾向を呈する病態を解明することを目的とした。

【方 法】

(1) 変異蛋白の作成

C 末端に 10 個のヒスチジン (His) を付加した PT 野生型 (WT) と 2 種類の PT 変異型発現ベクターを作製し、HEK293 に遺伝子導入後、リコンビナント PT (Rpt) を安定発現する細胞株を樹立した。この安定発現株をビタミン K (VK) 含有 D-MEM 培地で 24 時間培養し、その上清を回収した。PIVKA-II (PIVKA) は、WT の安定発現細胞株を、VK を含まない D-MEM 培地で培養し、その上清を回収した。培養上清を Ni イオン配位樹脂による His タグ精製、バリウム吸着を行い、目的濃度に濃縮して rPT 溶液を取得した。HS-AFM に使用するサンプルは、さらにゲル濾過クロマトグラフィーを行い、高純度 rPT 溶液とした。

(2) PT 活性測定

凝固一段法では、精製 rPT と PT 欠乏血漿の混合液を作製し、全自動血液凝固測定装置にてプロトロンビン時間 (PT) を測定した。再構成系プロトロンビナーゼ活性試験では、精製 rPT に FXa、FVa、PL、CaCl₂ を添加してトロンビンへ活性化させ、生成したトロンビンによる基質切断の蛍光強度の変化を測定した。反応初期の傾きが $R^2=1$ に近い区間にて、WT の傾きを 100% とし活性値 (%) を算出した。

(3) HS-AFM を用いた PT と PL の結合反応の観察

HS-AFM による観察では始めに、希釈した rPT 溶液をマイカ基板上に添加・静置後、Ca²⁺ 含有 Buffer で満たした観察プールにて、rPT を 1 分子レベルで観察した。次に、希釈した混合 PL 液 (DOPC:DOPS:DOPE-biotin=7:2:1、1mg/mL、pH7.2、150mM NaCl₂、2mM CaCl₂、20mM HEPES-NaOH) をマイカ基板上に添加・静置して固相化し、Ca²⁺ 含有 Buffer で希釈した rPT 溶液で満たした観察プールにて、rPT と PL の反応を観察した。観察は、rPT とマイカ基板の相互作用を考慮して、観察開始から 30 分間とした。撮影した画像解析において、PL 辺縁部と rPT 中心部の距離、PL 辺縁部の長さを UMEX Viewer

により算出した。単位長さあたりの PT 結合数は、それぞれ 200 個の PL について PL 辺縁の長さの平均値と結合している rPT 数より算出した。PT1 分子の結合時間は、それぞれ 200 個の rPT について結合しているフレーム数と 1 フレームあたりの撮影時間より算出した。また、結合時間のヒストグラムを作成し、Prism を用いて単一指数関数フィッティングを行い、時定数を算出した。結果は 3 回以上の独立した実験によって得られたデータを平均値±標準誤差 (SEM) として示した。統計解析は Mann-Whitney U test にて行い、有意水準 $p < 0.05$ として解析した。また、画像解析は 1 つのデータに対して 2 人以上で行い、再現性を確認した。

【結 果】

(1) PT 活性測定

rPT の活性値として凝固一段法と再構成系プロトロンビナーゼ活性試験を実施した。結果は、WT を 100% として凝固一段法では、PT Nijmegen $38.9 \pm 2.1\%$ 、PT Shanghai $26.5 \pm 3.1\%$ 、再構成系プロトロンビナーゼ活性試験では、PT Nijmegen $14.9 \pm 0.3\%$ 、PT Shanghai $1.7 \pm 0.2\%$ と有意に低下していた。両方の結果より、変異型では野生型と比較して凝固促進能が著しい低下が示唆された。

(2) HS-AFM を用いた PT と PL の結合反応の観察

WT と変異型、PIVKA のそれぞれでランダムに 40 個の分子を選び、PL 辺縁部と rPT 中心部の距離を算出した。その分子について目視で結合の有無を判断し、Youden's index を用いてカットオフ値を算出し、距離が 5.46 nm 以下であれば結合ありとした (図 1)。この条件で、WT と変異型、PIVKA のそれぞれ 200 個の PL について PL 辺縁の長さの平均値と結合している rPT 数より単位長さあたりの PT 結合数を算出した結果、PT WT

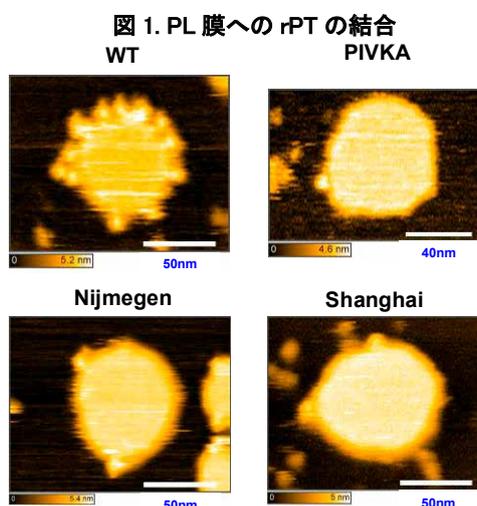
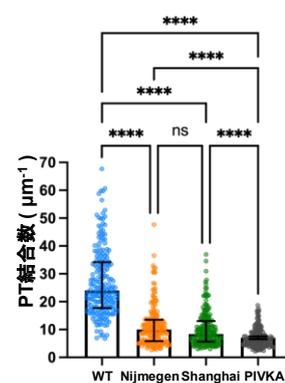


図 1. PL 膜への rPT の結合

図 2. PL 膜単位長さあたりの PT 結合数の測定

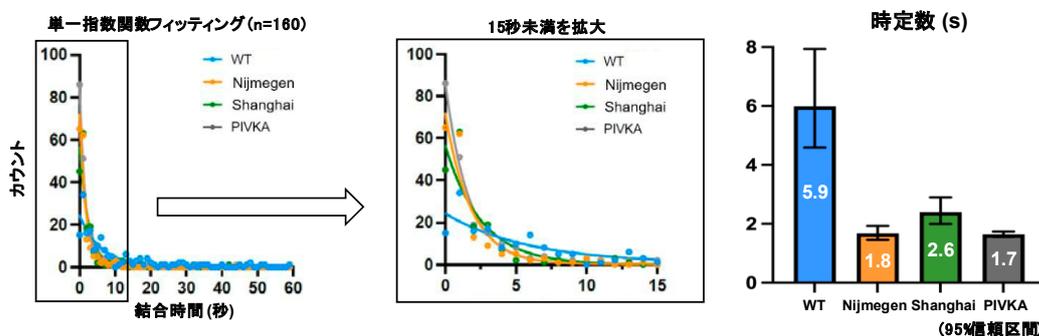


Median (IQR) (n=200), **** $p < 0.001$

27.0 ± 0.86 molecule/μm に対し、PT Nijmegen 11.3 ± 0.51 molecule/μm、PT Shanghai 10.1 ± 0.44 molecule/μm、PIVKA 7.0 ± 0.24 molecule/μm であった。これより、WT 型と比較して変異型で PL 結合能の低下が考えられた (図 2)。

また、WT と変異型、PIVKA のそれぞれ 200 個の PT1 分子の PL 結合時間を測定した結果、PT WT 6.3 秒 (17.7–34.0) に対して、PT Nijmegen 0.9 秒 (5.80–13.5)、PT Shanghai 1.3 秒 (5.66–8.37)、PIVKA 0.8 秒 (4.57–8.16) であった。これより、変異型は PIVKA と同程度に結合時間が短いことがわかった。

図 3. PL 辺縁への結合時間解



また、ヒストグラムで分布を比較したところ、変異型、PIVKA では 15 秒以内に分布が集中していた。この分布が解離しやすさを反映している可能性を考え、15 秒未満のヒストグラムに対して単一指数関数フィッティングを行い、時定数 (95% 信頼区間) を算出した。結果、PT WT 5.9 秒 (5.92–7.77) に対し、PT Nijmegen 1.8 秒 (1.58–2.14)、PT Shanghai 2.6 秒 (2.10–3.11)、PIVKA 1.6 秒 (1.56–1.76) であった。これより、WT 型より変異型では解離しやすい傾向があるとわかった。

【考 察】

HS-AFM で観察された結合数は平均的な結合能を反映しており、結合時間は結合後の解離しやすさより構造の不安定さを反映しているとする、今回得られた結果から WT 型と比較して変異型では変異による構造変化によって平均的な結合を維持できずに解離しやすくなっている可能性が考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

Gla の変異を有する異常 PT 分子が、PL への結合後解離しやすいことにより機能障害をきたすことを、初めて 1 分子レベルで動的に可視化し明らかにした。

【参考・引用文献】

1. Ando N, Kodera D, Maruyama E, Takai K, Saito A, Toda A. High-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12468-12472, 2001.
2. Kodera D, Yamamoto R, Ishikawa T, Ando N. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468: 72-76, 2010.
3. Strijks E, Poort SR, Renier WO, Gabreëls FJM, Bertina RM. Hereditary Prothrombin Deficiency Presenting as Intracranial Haematoma in Infancy. *Neuropediatrics* 30: 320-324, 1999.
4. Wang W, Fu Q, Zhou R, Wu W, Ding Q, Hu Y, Wang X, Wang H, Wang Z. Prothrombin Shanghai: hypoprothrombinaemia caused by substitution of Gla29 by Gly. *Haemophilia* 10: 94-97, 2004.