

von Willebrand factor の構造と機能： C-terminal cystine knot ドメインおよび von Willebrand factor C ドメインの役割

Structure and function of von Willebrand factor: The role of
C-terminal cystine knot and von Willebrand factor C domains



辛 英哲

辛 英哲*
Yongchol SHIN

1996年
岡山大学大学院自然科学研究
科博士課程 修了
1996年～2000年
明治薬科大学薬学部 助手
2000年～2005年
カリフォルニア大アーバイン
校 Postdoctoral Researcher
2005年～2008年
国立循環器病センター研究所
博士研究員
2008年～
工学院大学先進工学部生命化
学科 准教授

Key words: von Willebrand factor, C-terminal cystine knot domain, von Willebrand factor C domain, electronic microscope, x-ray crystallography

Points

- ①血管損傷部位の初期血小板粘着および血小板凝集に重要なマルチドメイン構造を有するタンパク質である von Willebrand factor について、電子顕微鏡による解析や A ドメインおよび C-terminal cystine knot ドメインの X 線結晶構造解析に関する報告がなされている。
- ②本報告では、電子顕微鏡像の解析から得られた von Willebrand factor のコンフォメーションの変化と、その変化に関与する C-terminal cystine knot ドメインおよび von Willebrand factor C ドメインの役割について、X 線結晶構造解析および立体構造モデリングから得られた知見に基づいて概説する。

1. はじめに

von Willebrand factor (VWF) は、血小板凝集において重要な役割を担う、マルチドメイン構造を有するタンパク質である^{1,2)}。近年 VWF の A ドメインの電子顕微鏡像や X 線結晶構造解析に関する報告が行われており、構造と機能相関に関する知見が蓄積

されている。とくに VWF の A ドメイン (A1, A2 および A3) の構造と機能について、その重要性から多くの報告がある。一方、A ドメイン以外のドメインは、ドメイン内のアミノ酸置換や欠失によって von Willebrand disease (VWD) を発症することから、重要であることが推察されるが、構造や機能についての報告は多くない。本稿では、最近明らかになった VWF の C 末側領域のドメイン構造とその役割との関連について概説する。

*責任者連絡先：
工学院大学先進工学部生命化学科生体機能化学研究室
〒192-0015 東京都八王子市中野町 2665-1
Tel: 042-673-1491
E-mail: shin@cc.kogakuin.ac.jp

2. VWFの機能とドメイン構造

VWFの主な役割は血小板凝集の起点となることである。VWFの欠損や欠失は、出血症状を呈するよく知られた遺伝病であるVWDを引き起こす。VWFは、血管損傷部位に露出するコラーゲンに結合することで、血小板膜タンパク質Glycoprotein Ib (GPIb)に結合可能となり、血小板の損傷部位への粘着に寄与する³⁻⁵⁾。VWFのA1およびA3ドメインがそれぞれGPIb⁶⁾およびコラーゲン^{7,8)}に結合する。

VWFの機能発現には、ドメイン内およびドメイン間のジスルフィド結合による構造の安定性が重要な因子となる。小胞体内でVWF分子はC末端の鎖間ジスルフィド結合によってダイマー(二量体)を形成する³⁾。ダイマーはゴルジ体内でD'D3ドメイン間のジスルフィド結合によってマルチマー(多量体)を形成する^{3,9,10)}。分泌後、血液中ですり応力を受けたVWFマルチマーは伸長した構造となる¹¹⁻¹⁴⁾(**図1a**)。各ドメインは、ドメイン内で形成されるジスルフィド結合によって、血流中でもその構造が安定に保持できるようになっている。VWFマルチマーの血小板凝集能はその長さに比例し、血液中のVWF切断酵素ADAMTS13による切断によって凝集能は抑制される¹⁵⁻¹⁷⁾。ADAMTS13は血流ですり応力によって伸展・変性したA2ドメインを切断する¹⁸⁻²¹⁾。A2ドメインには、ずり応力によってドメイン構造が伸展・変性することを抑制するジスルフィド結合がないことに起因すると考えられる。

3. VWFマルチマー形成におけるC末側ドメインの役割

3.1 C-terminal cystine knot(CK)ドメイン

VWFのC末端に存在するC-terminal cystine knot(CK)ドメインは、VWFがマルチマーを形成維持するのに必須のドメインである。Zhouらは、様々なドメインを有する組換え体の電子顕微鏡像から、pH 6.2ではVWFダイマーがファスナー様の構造をしていることを示した^{14,22)}(**図1b**)。血管内皮細胞のWeibel-Palade body内で、VWFマルチマーはこのようなコンフォメーションをとると考えられている。VWFは、CKドメイン間のジスルフィド結合により

ホモダイマーを形成する^{23,24)}。pH 6.2では、CKドメインはファスナー様構造の下止めの役割をしていると考えられる。

CKドメインのX線結晶構造解析の結果から、CKドメインは鎖間ジスルフィド結合などにより強固なダイマーを形成することが示された²⁵⁾(**図2**)。CKドメインは76個のアミノ酸からなり、7個のβ鎖(N末端から順にβ1~β7)からなる。CKドメインのダイマー形成には、1)鎖間ジスルフィド結合、2)鎖間βシート、3)鎖間疎水結合の形成が寄与している。ダイマー間には3つのジスルフィド結合があり、ダイマー形成において重要な役割を担っていると考えられる(**図2**, 球モデル)。CKドメインには4つの鎖内ジスルフィド結合があり、ずり応力中でのドメイン構造の安定に寄与していると考えられる。また、β4, β5およびβ6鎖により形成されるβシートは、相対するCKドメインのβシートと協同して一つのβシート構造を形成している。β4鎖の一部が相対するCKドメインのβ4鎖と水素結合を形成し、鎖間βシートの形成に寄与していることが示された(**図2**, 赤色)。さらに、CKモノマーの接触面には、モノマー間相互作用に寄与する疎水結合に関与するチロシン、イソロイシンなどのアミノ酸残基が存在する(**図2**, スティックモデル)。

VWDに関するデータベース、VWFdb²⁶⁾(<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/vwd.html>)には、VWDを呈するアミノ酸残基の変異が示されている(**表1**)。興味深いことに、CKドメインの鎖間ジスルフィド結合などのモノマー間相互作用に関与するアミノ酸残基の変異は、高分子量VWFマルチマーの減少を呈するVWD type 2Aを引き起こす。強固なモノマー間の結合が多量体の構造維持に重要であることが示唆された。

3.2 VWF Cドメイン

VWF Cドメイン(C1, C2, C3, C4, C5およびC6)はWeibel-Palade body内で、ファスナー様構造のエレメント部分を形成すると考えられる(**図1b**)。エレメント部分では、相対するVWF分子の各Cドメイン間で相互作用しているが、細胞から分泌され中性のpHになると、ドメイン間での相互作用が失われ、開いたコンフォメーションをとると考えられる^{22,27)}(**図1a**)。VWFは、血小板上のインテグリン

表1 VWD患者に同定されたCドメインおよびCKドメイン内のミスセンス変異

ドメイン	VWD type				
	1		2A	3	
C1	C2257S R2287W C2304Y	R2311H R2313H	C2373W		
C2	C2340R G2343V	R2379C R2384W			C2362F C2394W
C3	G2441C R2464C S2469P	C2477Y C2477S			C2491R
C4	S2497P G2518S	Q2520P			N2546Y
C5	C2619Y				N2636Y
C6	T2647M C2671Y	C2676F C2693Y			C2671Y
CK	P2722A P2776L		C2771S* C2771Y* C2773R*	C2773S* C2773Y* A2801D	C2739Y C2754W C2804Y

*C2771 および *C2773 は鎖間ジスルフィド結合を形成する。

$\alpha_{1b}\beta_3$ と、RGD 配列を介して結合すると考えられる²⁸⁾。RGD 配列は VWF 分子内では C4 ドメインにのみ存在する。電子顕微鏡による観察結果から、インテグリン $\alpha_{1b}\beta_3$ の RGD 結合領域を含む組換え体は C4 ドメインを介して、VWF の組換え体と結合していることが確認された²⁾。また、最近 VWF が、C3 ドメインと C5 ドメインを介して、フィブリンモノレイヤーと結合している可能性が報告されている²⁹⁾。

VWF C ドメインに相同性を有する配列領域が、II 型コラーゲンの N 末非らせん領域^{2, 30)} や骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP) の調節タンパク質である Crossveinless の N 末端領域³¹⁾ に見出されている。そこで筆者は、コラーゲン非らせん領域の立体構造³⁰⁾ を基に、立体構造予測サイト LOMETS³²⁾ (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS/>) を用いて、VWF C ドメインの構造モデリングを行った。図 3 に、C3 ドメインおよび C4 ドメインの構造モデリングを行った結果を示した。C3 ドメインおよび C4 ドメインは構造の中心に β シート構造を有し、両端にループ構造をもつ。C1, C3 お

よび C5 ドメインは 5 つのジスルフィド結合 (緑色)、C2, C4 および C6 ドメインは 4 つのジスルフィド結合 (緑色) を形成し、構造を安定化していると考えられる。インテグリンとの結合に関与すると考えられる RGD 配列 (図 3, 点線球モデル, 赤) は、C4 ドメインのループ領域に存在する。C3 ドメインのループ領域には、フィブリンの E ドメインとの結合に関与している可能性が報告されている YET 配列 (図 3, 点線球モデル, 赤) が存在する。また、同様に行ったモデリングでは、C5 ドメイン内のフィブリン E ドメイン結合配列と考えられる YKE 配列も同様にループ領域に存在した。VWFdb から、VWD で検出した、VWF C ドメイン (C1~C6) 内の変異についてまとめた結果を表 1 に示した。変異の多くは、VWF 量が減少する VWD type 1 に見られ、VWF 量が著減する type 3 で検出されたものもあった。VWF C ドメインが VWF の構造の形成に重要な領域であると考えられる。

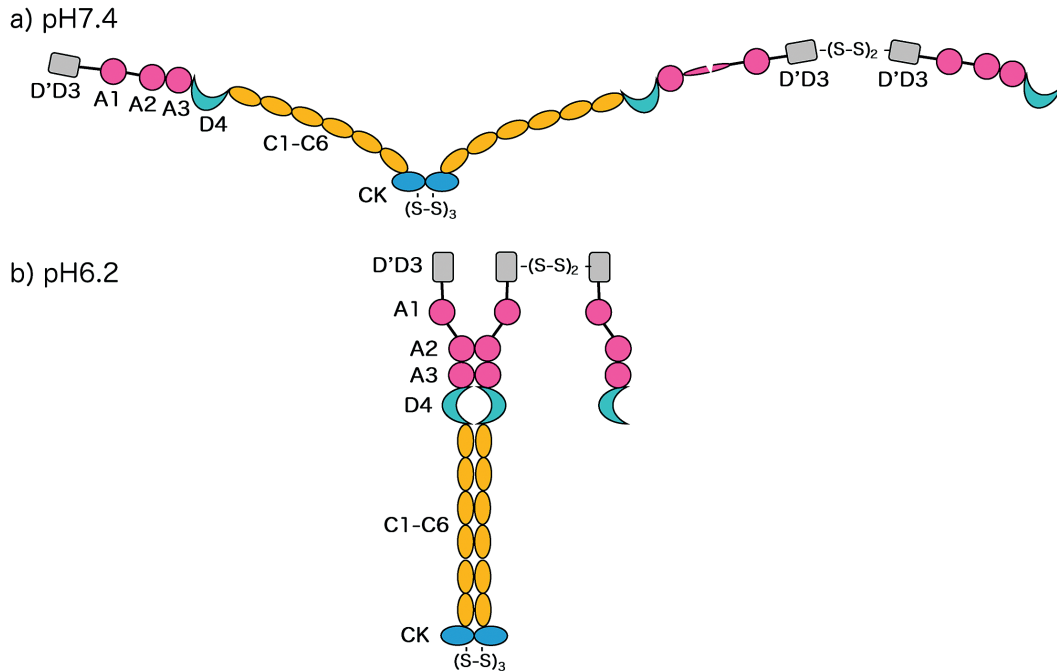


図1 電子顕微鏡観像から推定されたVWFマルチマーの構造模式図(文献13から改変)

- a) pH 7.4(細胞外)ではVWFマルチマーはファスナー様構造が開いた伸長した構造をとる。VWF分子はCKドメインによってダイマーとなり、D'D3ドメインでさらにマルチマー化する。D'D3ドメイン間のジスルフィド結合は少なくとも2個あると考えられている¹⁰⁾。血流でのずり応力下では、伸長した構造をしていると考えられる。超高分子量VWFマルチマーは、ずり応力によって伸展・変性したA2ドメインにて、ADAMTS13によって切断される。
- b) pH 6.2(Weibel-Palade body内)では、ファスナーが閉じた構造をとる。CKドメインの結合と、VWF Cドメイン(C1~C6)間の相互作用によるものと考えられる。

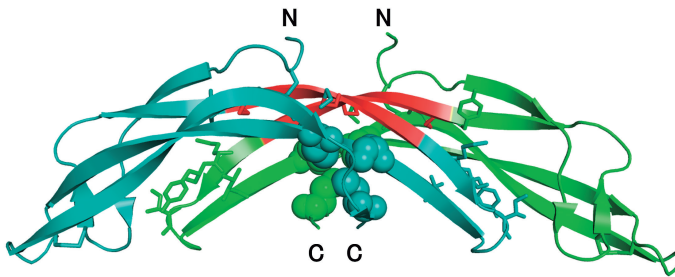


図2 C-terminal CKダイマーの立体構造図(PDB ID: 4NT5を基に作製)

CKドメインは7つのβ鎖(N末側から順にβ1~β7)からなる。NはN末端を、CはC末端を表す。ダイマーでは、ジスルフィド結合(球モデル)、β鎖間でのβシート形成(赤色)、接触面での疎水性結合(スティックモデル)によって、非常に強固に結合している。

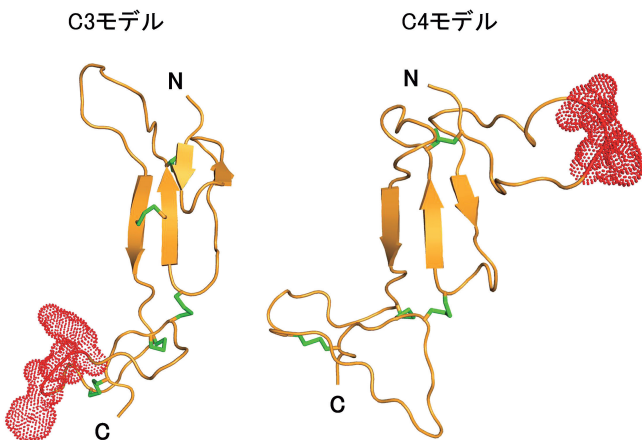


図3 VWF Cドメインの立体構造モデル

II型コラーゲンの非らせん領域の立体構造(PDB ID: 1U5M)を基にC3ドメインおよびC4ドメインの立体構造モデル図を作製した。スティックモデル(緑色)はジスルフィド結合を表す。NはN末端を、CはC末端を表す。C3ドメインおよびC4ドメインはそれぞれ5個あるいは4個のジスルフィド結合を有する。C3ドメインのループ領域にはフィブリンEドメインに結合すると考えられるYET配列(点線球モデル, 赤色)、C4ドメインのループ領域にはインテグリンに結合すると考えられるRGD配列(点線球モデル, 赤色)が存在する。

4. おわりに

X線結晶構造解析によって、VWFのAドメインとCKドメインの構造と機能について多くの知見が得られてきた。また、電子顕微鏡による様々な条件下でのVWFの解析は、生体内でのVWFのコンフォメーションについて、重要な示唆を与えている。今後、VWFのDドメインおよびCドメインの立体構造解析が行われることによって、各ドメインがVWFの機能発現にどのように関与しているか、明らかになることが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、御校閲いただいた宮田敏行先生(国立循環器病研究センター)に深謝いたします

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- Sadler JE: New concepts in von Willebrand disease. *Annu Rev Med* **56**: 173–191, 2005.
- Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA: Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* **120**: 449–458, 2012.
- Wagner DD: Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 217–246, 1990.
- De Luca M, Facey DA, Favalaro EJ, Hertzberg MS, Whisstock JC, McNally T, Andrews RK, Berndt MC: Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain: analysis with monoclonal antibodies reveals distinct binding sites involved in recognition of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and ristocetin-dependent activation. *Blood* **95**: 164–172, 2000.
- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM: Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* **94**: 657–666, 1998.
- Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P: Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* **297**: 1176–1179, 2002.
- Nishida N, Sumikawa H, Sakakura M, Shimba N, Takahashi H, Terasawa H, Suzuki E, Shimada I: Collagen-binding mode of vWF-A3 domain determined by a transferred cross-saturation experiment. *Nat Struct Biol* **10**: 53–58, 2003.
- Brondijk TH, Bihan D, Farndale RW, Huizinga EG: Implications for collagen I chain registry from the structure of the collagen von Willebrand factor A3 domain complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 5253–5258, 2012.
- Huang RH, Wang Y, Roth R, Yu X, Purvis AR, Heuser JE, Egelman EH, Sadler JE: Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 482–487, 2008.
- Purvis AR, Gross J, Dang LT, Huang RH, Kapadia M, Townsend RR, Sadler JE: Two Cys residues essential for von Willebrand factor multimer assembly in the Golgi. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 15647–15652, 2007.
- Michaux G, Abbitt KB, Collinson LM, Haberichter SL, Norman KE, Cutler DF: The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies. *Dev Cell* **10**: 223–232, 2006.
- Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA: Substructure of human von Willebrand factor. *J Clin Invest* **76**: 1491–1500, 1985.
- Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE: Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* **88**: 2939–2950, 1996.
- Springer TA: von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* **124**: 1412–1425, 2014.
- Sadler JE: Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* **112**: 11–18, 2008.
- Loirat C, Girma JP, Desconclois C, Coppo P, Veyradier A: Thrombotic thrombocytopenic purpura related to severe ADAMTS13 deficiency in children. *Pediatr Nephrol* **24**: 19–29, 2009.
- Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, López JA: Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood* **99**: 3971–3977, 2002.
- Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, López JA: ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **100**: 4033–4039, 2002.
- Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA: Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science* **324**: 1330–1334, 2009.
- Ying J, Ling Y, Westfield LA, Sadler JE, Shao JY: Unfolding the A2 domain of von Willebrand factor with the optical trap. *Biophys J* **98**: 1685–1693, 2010.
- Xu AJ, Springer TA: Calcium stabilizes the von Willebrand factor A2 domain by promoting refolding. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 3742–3747, 2012.
- Zhou YF, Eng ET, Nishida N, Lu C, Walz T, Springer TA: A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J* **30**: 4098–4111, 2011.
- Marti T, Rösselet SJ, Titani K, Walsh KA: Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* **26**: 8099–8109, 1987.
- Katsumi A, Tuley EA, Bodó I, Sadler JE: Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* **275**: 25585–25594, 2000.

-
- 25) Zhou YF, Springer TA: Highly reinforced structure of a C-terminal dimerization domain in von Willebrand factor. *Blood* **123**: 1785–1793, 2014.
 - 26) Hampshire DJ, Goodeve AC: The international society on thrombosis and haemostasis von Willebrand disease database: an update. *Semin Thromb Hemost* **37**: 470–479, 2011.
 - 27) Lankhof H, Wu YP, Vink T, Schiphorst ME, Zerwes HG, de Groot PG, Sixma JJ: Role of the glycoprotein Ib-binding A1 repeat and the RGD sequence in platelet adhesion to human recombinant von Willebrand factor. *Blood* **86**: 1035–1042, 1995.
 - 28) Beacham DA, Wise RJ, Turci SM, Handin RI: Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) binding site in von Willebrand factor by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **267**: 3409–3415, 1992.
 - 29) Miszta A, Pelkmans L, Lindhout T, Krishnamoorthy G, de Groot PG, Hemker CH, Heemskerk JW, Kelchtermans H, de Laat B: Thrombin-dependent Incorporation of von Willebrand Factor into a Fibrin Network. *J Biol Chem* **289**: 35979–35986, 2014.
 - 30) O’Leary JM, Hamilton JM, Deane CM, Valeyev NV, Sandell LJ, Downing AK: Solution structure and dynamics of a prototypical chordin-like cysteine-rich repeat (von Willebrand Factor type C module) from collagen IIA. *J Biol Chem* **279**: 53857–53866, 2004.
 - 31) Zhang JL, Qiu LY, Kotzsch A, Weidauer S, Patterson L, Hammerschmidt M, Sebald W, Mueller TD: Crystal structure analysis reveals how the Chordin family member crossveinless 2 blocks BMP-2 receptor binding. *Dev Cell* **14**: 739–750, 2008.
 - 32) Wu S, Zhang Y: LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res* **35**: 3375–3382, 2007.