

◆凝固・線溶・血小板タンパク質の機能発現機構◆

pH とずり応力に感受性を持つ血漿タンパク質である von Willebrand 因子の構造と機能

松井太衛^{*1}, 濱子二治^{*2}



松井太衛

Structure and function of von Willebrand factor, a shear- and pH-sensing plasma protein

Taei MATSUI^{*1}, Jiharu HAMAKO^{*2}

1979年 名古屋大学理学部生物学科卒業
 1985年 名古屋大学大学院理学研究科生物学専攻博士課程後期修了理学博士. 日本学術振興会特別研究員 (東京工業大学理学部・星元紀教授)
 1986年 藤田保健衛生大学総合医科学研究科医高分子学研究室門助手 (千谷晃一教授)
 同 講師, 助教授, 奈良県立医科大学非常勤講師兼任
 2003年 藤田保健衛生大学医療科学部臨床検査学科教授, 現在に至る.

Key words: von Willebrand factor, shear stress, ADAMTS13, defolding, sugar chains

◆ Points ◆

- ① von Willebrand 因子 (VWF) は, pH 変化を感受することで, マルチマー形成, Weibel-Palade 体への集積と分泌過程を制御することが明らかとなった.
- ② VWF の A2 ドメインの立体構造が解明され, ずり応力を感受してダイナミックに unfolding し, ADAMTS13 の切断部位を露出するように設計されていることが明らかとなった.
- ③ VWF の A1 ドメインと GPIb α との相互作用は, 2 段階の結合様式を持つことが明らかとなった.
- ④ VWF の A1 ドメイン隣接の O 結合糖鎖は GPIb との相互作用を調節し, A2 ドメインの N 結合糖鎖は ADAMTS13 感受性に関与することが示唆された.

1. はじめに

von Willebrand 因子 (VWF) は, 血栓形成の調節において重要な働きを担う血漿タンパク質である. VWF は, 凝固第 VIII 因子のキャリアーとなってこれを分解から保護するとともに, 血管損傷部位で露出した血管内皮下組織に血小板をつなぎ止めるもやい綱として, さらに血小板間の分子

架橋剤としての機能を持つ. VWF の量的減少あるいは機能的不全により, 出血時間が顕著に延長する von Willebrand 病が発症する. VWF の遺伝子は, 12p13.2 上にマップされており, 52 のエキソンから構成される 2813 アミノ酸をコードする. この VWF サブユニットは, D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK で表されるマルチドメインからなり, プロペプチド (D1-D2)

^{*1} 藤田保健衛生大学医療科学部臨床検査学科 [〒 470-1192 豊明市杏掛町田楽ヶ窪 1 番地 98]
 Faculty of Medical Technology, Fujita Health University School of Health Sciences
 [1-98 Dengakuga-kubo, Kutsukake, Toyoake 470-1192, Japan]
 Tel: 0562-93-2954 Fax: 0562-93-4595 e-mail: tmatsui@fujita-hu.ac.jp

^{*2} 藤田保健衛生大学医療科学部医療経営情報学科 [〒 470-1192 豊明市杏掛町田楽ヶ窪 1 番地 98]
 Faculty of Medical Management and Information Science, Fujita Health University School of Health Sciences
 [1-98 Dengakuga-kubo, Kutsukake, Toyoake 470-1192, Japan]
 Tel: 0562-93-9439 Fax: 0562-93-4595 e-mail: jhamako@fujita-hu.ac.jp

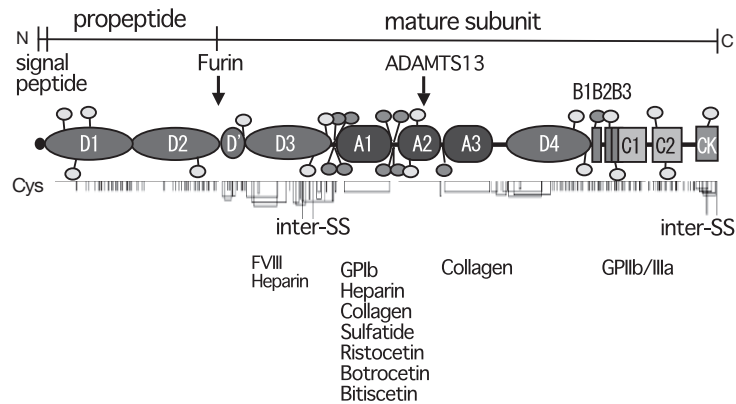


図1 VWFのドメイン構造の模式図

VWFは、シグナルペプチド(22アミノ酸)、プロペプチド(741アミノ酸)、成熟サブユニット(2050アミノ酸)からなり、A~Dで表されるドメイン構造を持つ。プロペプチドはFurinによって切断され、ADAMTS13による切断部位は、A2ドメイン内に存在する。Aドメイン以外はCys残基に富み、D3ドメインとCK(Cys knot)ドメインで分子間SS結合を形成する。VWFの主要な活性部位はA1ドメインに集中するが、FVIIIとの結合ドメインはN末端側のD', D3ドメインに存在する。予想される糖鎖結合部位として、N結合糖鎖を黄色丸、O結合糖鎖を赤丸で示す。

部分は、furinにより切断され、成熟サブユニットとなる(図1)。1990年代後半にその主要な機能ドメインであるAドメインのうち、A1とA3ドメインの立体構造が明らかにされて以来¹⁾²⁾、この15年間にマルチマー形成メカニズム(最近では、1本の連結体構造という意味でconcatamerという用語も使われている³⁾)やA2ドメインの立体構造、ADAMTS13との相互作用、糖鎖の機能などが徐々に解明されてきた。本小論ではその一部を紹介する。

2. VWFの生合成とWeibel-Palade体(WPB)

VWFの合成部位は、骨髄巨核球と血管内皮細胞に限られ、それぞれ血小板の α 顆粒と血管内皮細胞のWeibel-Palade体(WPB)に貯留され、刺激に応じて分泌されるほか、血管内皮細胞からは構成的に血中に分泌されている。VWFの生合成過程では、粗面小胞体(ER)でのシグナル配列の除去とC末端側(CKドメイン)でのSS結合の形成によるダイマー化が起こり、ゴルジ内でのfurinによるプロペプチド(D1, D2ドメインの741アミノ酸)の切断とN末端側(D3ドメイン)でのSS結合によるマルチマー形成を経て超巨大VWF(ULVWF: Ultra large VWF)となる。Purvisらは、マルチマーの両端のサブユニッ

トが、N末端側のSS結合を欠如すると仮定して、還元型のCys残基を割り出し、D3ドメインのCys1142間とCys1099間で、分子間のSS結合が形成されることを明らかにした⁴⁾。また、これらのCys残基はダイマー形成時は、プロペプチド部分と一時的にSS結合しており、ゴルジ体でのマルチマー形成時に再編成されること、プロペプチドはこのSH基の酸化還元酵素として機能することが示唆されている⁵⁾。

ULVWFは成熟VWFサブユニット(2050アミノ酸)が200個以上連結した超巨大分子であり、質量は20,000~50,000kDaに及ぶ。このような超巨大分子がどのようにして形成され、 α 顆粒やWPBに詰め込まれ、そしてどのようにして分泌されるのかは明らかではなかった。WPBは、古く1960年代にWeibelとPaladeによって初めて電顕観察で発見された直径100-200nm、長さ1-5 μ mの葉巻状の構造をした血管内皮細胞に特有の細胞内小器官であり、内部には、長軸に沿って管状構造物がいくつも並んだ特異な構造を有す⁶⁾。Zennerらは、WPBの詳細な電顕観察を行い、WPB内部の直径約20nmの管状構造がゴルジ体から形成され、成熟するにつれて管状構造が密になっていくことを明らかにしている⁷⁾。この管状構造は、ほとんどVWFで占められていると考えられてきたが⁸⁾⁹⁾、実際、Huangらは、

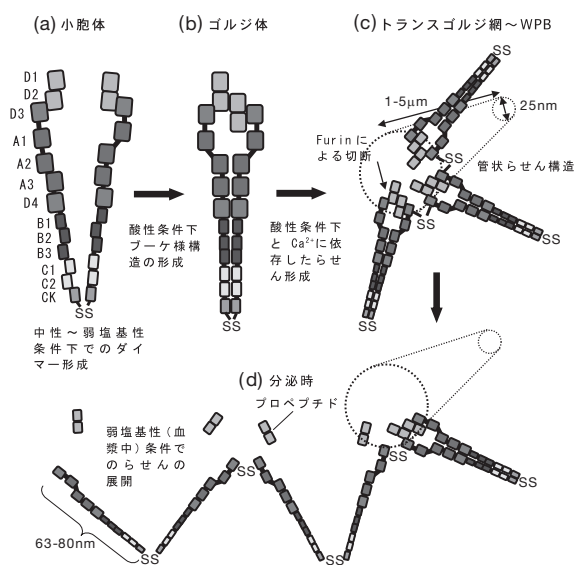


図2 VWF マルチマーの生合成と WPB への集積、分泌モデル

(a) proVWF は、ER 内で CK ドメインで分子間 SS 結合を生じてダイマーを形成する。(b) ゴルジ体に入ると酸性環境下 (\sim pH6.2) で、D1-D2 間の非共有結合、及び A2~CK ドメイン間の非共有結合を生じ、ブーケ用構造となる。(c) さらに、trans ゴルジ網に入ると酸性環境下、 Ca^{2+} 存在下でダイマー間の D3 ドメインで分子間 SS 結合を形成しながららせん状に重層化し、管状構造を形成する。これが集まって WPB 内の管状構造となる。(d) 分泌時に、血中の弱アルカリ性 (pH7.2~7.4) の環境に接すると、ダイマーの A2~CK ドメイン間の非共有結合が切れて、血流中に展開していくと考えられる。図は、Springer らの文献³⁾を参考に改変した。

VWF の D1-D2-D'-D3 ドメインを発現させて、これだけで自動的に管状構造が構築されることを示した⁹⁾。この管状構造の構築は、弱酸性条件 (pH6.2) と Ca^{2+} に依存しており、D1-D2 を必要とする。図2に示すように、2つのサブユニットが C 末端側で SS 結合した proVWF ダイマーは、中性の ER からゴルジ体内の弱酸性環境に移行すると、A2-CK ドメイン同士が密に非共有結合し、A1 ドメイン周辺が膨らんだブーケ様の構造となる³⁾。このダイマーはトランスゴルジ網に移行すると、D3 ドメイン間で SS 結合してマルチマーを形成する。この pH 変化を感知する部位として、D2 ドメインの His395 と His460 が関与する¹⁰⁾。マルチマーは、右巻きらせん状に配位し、N 末端側を内側に向けた中空 (内部径 12nm, 外部径 25nm, 長さ 1-5 μ m) の管状構造が形成され

ていく。らせん型の管状構造は、それぞれ 1 本のマルチマーからできており、pH7.4 の血中に放出されると、コンパクトに収納されたロープがスルスルと伸びるように展開していくことが示唆されている^{9) 11)}。実際に VWF の長い繊維が血管内皮細胞表面から血流中に伸びている像が観察されている¹²⁾。

3. A2 ドメインの立体構造と ADAMTS13 感受性

VWF の機能ドメインとして、分子の中ほどに約 180 アミノ酸からなる類似した 3 つの A ドメインが並んでいる (図1)。A1 は主に血小板 GPIb や VI 型コラーゲン、リストセチン、ヘビ毒由来ボトロセチンなどの結合サイトであり、A2 は ADAMTS13 の切断サイト、A3 は I 型、III 型コラーゲンとの結合サイトとして機能している。1997~1998 年に A1 と A3 ドメインの結晶構造が解明されたが^{1) 2)}、最後に残った A2 ドメインの立体構造も最近決定された^{13) 14)}。

A2 ドメインは、A1 や A3 と較べて特異な立体構造を持つ。A ドメインでは共通して、中央部に 6 個の疎水性の β シートが並び、それを囲むように外側に両親媒性の 6 本の α ヘリックスが林立している。このうち、4 番目の α ヘリックス ($\alpha 4$) が A2 ドメインでは欠如している (図3)。この部分はアミノ酸残基が少なく、ループ構造となっていることから $\alpha 4$ -less loop と名付けられた¹³⁾。また、A1, A3 ドメインでは、N 末端と C 末端付近にそれぞれ 1 残基の Cys が存在し、SS 結合してドメインを安定化させるのに対して、A2 では C 末端に 2 個の連続した Cys が存在し、N 末端とは結んでいない。さらに A2 では、 $\alpha 3$ - $\beta 4$ 間の 4 アミノ酸と $\beta 1$ の N 末端側の 1 アミノ酸で Ca^{2+} を結合しており、この Ca^{2+} の配位によってドメインが安定化される^{14) 15)}。その他、2 本の N 結合糖鎖が A2 には存在することも特徴と言える。このような A2 ドメインだけに見られる構造的な特徴が、血流というずり応力のかかった生理的環境下で重要な意味を持つことが分かってきた。

ADAMTS13 は、VWF の生理的な切断酵素と

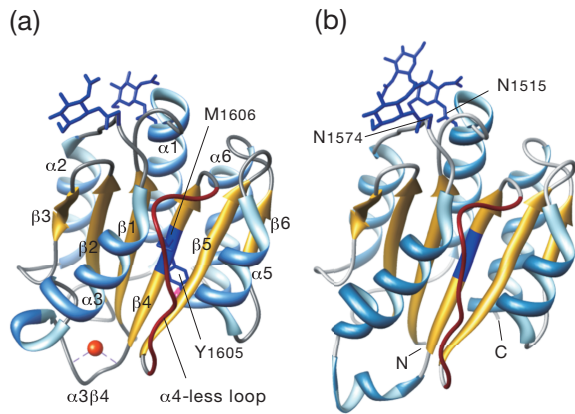


図3 VWF A2ドメインの立体構造モデル
(a) Ca^{2+} 結合型 A2ドメインの立体構造モデル¹⁴⁾ (PDB ID 3ZQK) と, (b) Ca^{2+} 非結合時の A2ドメインの立体構造モデル¹³⁾ (PDB ID 3GXB). α ヘリックスを淡青色, α 4-less loop を赤で示し, β シートを黄色で示す. オレンジ色のボールは Ca^{2+} を, ピンク色は SS 結合を示す (a). 上方の青のスティックは2本の N 結合糖鎖(部分)を示す. β 4の中央部の ADAMTS13 切断サイト (Y1605-M1606) を青で示す. α 3- β 4ループ部分の Ca^{2+} の存在は, A2ドメインの fold を安定化し, 生理的にはこの構造をとると考えられる.

して, 様々な大きさのマルチマー構造の形成に決定的な役割を担っており, その異常は TTP¹⁶⁾ や Upshaw-Schulman 症候群¹⁷⁾ の原因となる. AD-AMTS13 は, A2ドメインの Tyr1605-Met1606間を特異的に切断する. この切断部位は4番目の β シート (β 4) の中央にあり, ドメイン内に埋もれているため, 酵素がアクセスするためにはこの部分が露出する必要がある. 初期の AD-AMTS13 活性の測定には, 高濃度の塩酸グアニジンや尿素が VWF の切断に必須であり, 変性剤の存在下で立体構造が緩んで初めて切断部位が露出すると考えられた¹⁸⁾. これに対して生理的条件下では, 高ずり応力によって A2ドメインが引き延ばされることで, β 4が露出すると予想された. 実際に VWF は, 静水条件下ではゆるく丸まった形態をとるが, 正常な血管内で負荷されている最大ずり応力の $100\text{dyn}/\text{cm}^2$ (ずり速度, $5,000/\text{s}$) では, マルチマーは引き延ばされて線状となる. 1996年に原子間力顕微鏡によって初めてとらえられた VWF のずり応力負荷による形態変化像は, ぼんやりとしたイメージだったが¹⁹⁾, Schneiderらは, 蛍光ラベルした VWF を

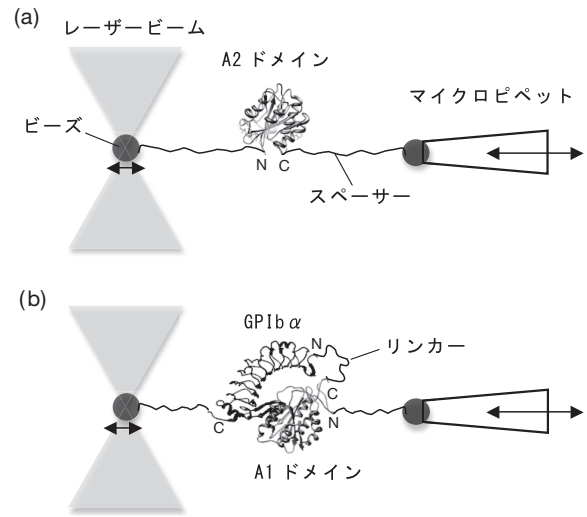


図4 レーザーピンセットの模式図
レーザー光線の焦点部では分子を捕捉できる. この性質を利用して, 1分子レベルで核酸やタンパク質の分子間相互作用を計測することができる. DNA をスペーサーとして, A2ドメインや (a), A1ドメインと GPIb α をリンカーペプチドで連結したものを (b) ビーズにビオチン-アビジン, 抗体等を利用して接続する. 片方をマイクロピペットで保持し, 張力を与えながらレーザー焦点内のビーズの動きを測定し, 働いた張力を計算する (注: 装置及び各ドメインは, 実際の大きさを示したものではない).

用いて, 球形の VWF が, $5,000/\text{s}$ 以上のずり速度負荷によって劇的に引き延ばされた形に移行すること, 固相化コラーゲンへの粘着がやはり $5,000/\text{s}$ 以上のずり速度で増加することをリアルタイムに報告している²⁰⁾. さらに, レーザーピンセット技術を用いて1分子を対象としたナノレベルでの解析がなされるようになった. Springerらのグループは, 発現させた A2ドメインの N 末端と C 末端にそれぞれ適当な長さの DNA をスペーサーとして接続し, 先端をビオチン-アビジンやジゴキシゲニン-抗体を介してプラスチックビーズに結合させた (図 4a). このビーズをレーザーピンセットとマイクロピペットで両端から保持し, 1分子の A2ドメインに対して微小な張力 (pN : ピコニュートンのオーダー) を負荷して A2ドメインが引き延ばされるかどうかを調べてみた. この装置で A2ドメインを引き延ばしていくと, $7\text{-}14\text{pN}$ 付近で張力の瞬間的な減少が観察され, それと同時に全体の長さが $57 \pm 5\text{nm}$ 分急激に伸びることが分かった. この張力の減少

はA2でunfoldingが起こったことを示し、長さの変化量は、A2を構成する177アミノ酸から計算されるリニアなペプチドの長さとも良く合っていた。また、一度unfoldingさせたA2の張力を0に戻して数秒後に張力を負荷していくと、再度同じ現象が起こることを観察し、このA2のunfoldingは可逆的で、refoldingも起こることも示された²¹⁾。refoldingはA2のCa²⁺によって促進される²²⁾。A2のunfoldingは、N末端とC末端を結ぶSS結合がないことや α 4-less loop構造にも起因し、比較的動きやすいC末端側から起こることが推定される。さらに、ADAMTS13が存在すると、unfoldingしたA2では切断されて張力が0になるが、foldingしたままのA2では切れないことも明らかになった。こうして実際にA2ドメインは外的な力によって引き伸ばされたり、元に戻ったりすることが証明され、引き伸ばされた状態のA2のみがADAMTS13の切断を受けることが明らかとなった。Springerによると、ULVWFが血流中では必ずり応力負荷によって回転しながら圧縮、伸展を繰り返していると仮定した場合、サブユニットが200以上連結したマルチマーではその中央部で最大11pNの張力がかかっていると計算される。この張力はマルチマーの中央部付近のA2ドメインのunfoldingに働き、この部分からADAMTS13によって開裂すると考えられた³⁾。Yingらも同様の実験をA1-A2-A3ドメインを用いて行い、A1とA3ドメインがあってもA2ドメインのunfoldingが起こるが、 ~ 20 pNの張力が必要であり、VWF全体ではA1、A3(及び他のドメイン)がA2のfoldを安定化している可能性を示唆している²³⁾。いずれにしても、A2ドメインの特異な構造は、まさにADAMTS13に対する絶妙な切り口となっており、流動的な血中環境で動的に血栓性の制御に関わっていることが示された。

ADAMTS13側からのアプローチではVWFとの結合サイトが明らかにされている。秋山らは、VWFとの結合に関わる3つのエクソサイトを報告している²⁴⁾。この3つは、それぞれディスインテグリン様、Cysリッチ、スパーサーの各ドメインにまたがり、unfoldingされたA2ドメインに結合して初めて、メタロプロテアーゼドメインの

触媒部位がTyr1605-Met1606間を切断するものと考えられる。さらに、5%程度のADAMTS13は、VWFに結合したまま循環しており、この結合はADAMTS13のC末端側領域(TSP5-8・CUB1-2ドメイン)と、VWFのC末端側領域(D4~CKドメイン)間でなされる。ADAMTS13の血中濃度は0.5~1 μ g/mLであり、VWFも10~ μ g/mL程度であることを考えると、微量分子同士が効率よく出会い、酵素反応を実行するために前もって結合していることは合理的に見える²⁵⁾。

4. VWF A1 ドメインと GPIb の相互作用

A1ドメインと血小板との相互作用は、細動脈での止血において血流に抗するに十分である必要がある。GPIbとA1の分子間相互作用もまた、レーザーピンセット法で解析されている。Kimらは、A1とGPIb α を数十残基のリンカーペプチドで繋いだユニークな分子を設計し、レーザーピンセットで両者間の相互作用を解析した(図4b)²⁶⁾。この分子に張力を加えていくと全体が引き伸ばされていくが、10pN付近で急激な伸びの変化が起こる。逆に引き伸ばしたものを緩めていくと、やはり急激な収縮がある点で起こることから、確かに両者の結合が1分子レベルで起きていることが明らかにされた。また、GPIb-A1間の結合には2段階あり、GPIb α のA1結合サイトが屈曲して、弱くA1に結合する場合と、伸びた状態で強く結合する場合があることを示した。この両モード間は、張力によって段階的に入れ替わり、より広範な張力に対応して相互作用を維持すると考えられる。リストセチンによるA1とGPIb α の結合もこのような2相性を示したが、ボトロセチンの場合は1相性で、しかも、より高い張力に耐える親和性を示した。GPIb α のN末端にある連続した7つのLRR(Leu rich repeat)のうち、2~4番目のLRRは、ボトロセチン惹起血小板凝集では関与しないが、リストセチン凝集や高ずり応力条件下ではVWFとの結合に必須であり、2つの接触相と関連していることが示唆されている。Autonらは、A1のN末端側Gln1238-Glu1260がA1-A2-A3ドメインの安定化に関与し、高ずり応力下でGPIbと勝手に結合

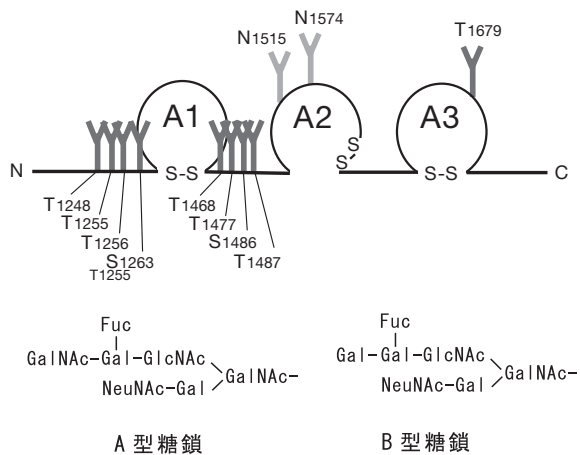


図5 Aドメインの糖鎖分布とO結合糖鎖のA, B型構造。アミノ酸配列分析から予想されるAドメイン近傍のN結合糖鎖(■)とO結合糖鎖(■)の位置をアミノ酸残基で示す。A1ドメインの隣接領域には、N末, C末側にそれぞれ4本のO結合糖鎖のクラスターが推定され、A2ドメイン表面には2本のN結合糖鎖が存在する(図3も参照)。下は、報告されたO結合型糖鎖のうち、A, B型糖鎖構造を持つものを示す³²⁾。Fuc(フコース), Gal(ガラクトース), GalNAc(Nアセチルガラクトサミン), GlcNAc(Nアセチルグルコサミン), NeuNAc(Nアセチルノイラミン酸)。

するのを阻害しているらしいこと、この部分を欠如するとGPIIbとの結合能が増加することを示している²⁷⁾。この部分には、O結合糖鎖が存在し(図5)、後述の糖鎖の影響も考えられる。

5. VWFの糖鎖とその機能

VWFにはサブユニットあたり、12本のN結合糖鎖と10本のO結合糖鎖が存在するとされている。N結合糖鎖は分子全体に比較的分散して結合しているのに対して、O結合糖鎖はA1ドメインをはさむ隣接領域に集中している(図1)。千谷らはO結合糖鎖結合位置として、Thr1248, Thr1255, Thr1256, Ser1263, Thr1468, Thr1477, Ser1486, Thr1487を報告しているが(図5)²⁸⁾、O結合糖鎖はN結合糖鎖と異なり付加配列モチーフがなく確定的ではない。依然として糖鎖の結合は完全には証明されていないが、A1ドメインのO結合糖鎖をめぐる、様々なアプローチがなされている。Schulte am Eschらは、A1ドメインに隣接している8本のO結合糖鎖について、デー

タベースに基づくアルゴリズムを使って糖鎖付加位置を予測し、N末端側の4箇所(Thr1248, Ser1253, Thr1255, Thr1256)とC末端側の1箇所のアミノ酸残基(Thr1468)をO結合糖鎖の付加位置と推定した²⁹⁾。さらに、これらをAlaに置換した変異導入A1ドメインを用いて血小板凝集能を測定したところ、N末端側のSer1253, Thr1255, Thr1256のO結合糖鎖の合成を抑えると、血小板凝集能が高くなることからこれらがA1とGPIIbとの相互作用に抑制的に機能することを示唆した。しかし、5箇所とも変異させたり、C末端側のThr1468のみを変異させると逆に血小板凝集活性が低下したことから、特にC末端側のO結合糖鎖はA1の立体構造に関与することを示唆している。Nowakらも、A1のN末端側のO結合糖鎖の不全は、リストセチンによるGPIIbとVWFの結合を増加させ、高ずり応力下でのコラーゲンとVWFの結合やGPIIbとの結合を促進することを見出している³⁰⁾。O結合糖鎖は、高ずり応力下でのA1ドメインの構造変化を抑制していると考えられる。また、Badirouらは、A1のO結合糖鎖を欠失させたVWFをVWF欠損マウスに強制発現させて止血動態を観察し、Thr1255, Thr1256, Ser1486の糖鎖はVWFの止血機能に関与すること、O結合糖鎖はクリアランスに関与することなどを報告している³¹⁾。A1のO結合糖鎖の機能はまだ不明な点があるが、マルチマー形成や分泌などの生合成には必須ではないことは明らかなようである。O結合糖鎖の構造決定に関しては、これまで情報は少なかったが、MS分析により詳細な構造が解明され、O結合糖鎖にもごく微量であるが血液型抗原が存在することが明らかにされた(図5)³²⁾。

血液型との関連に関しては、VWFの血中濃度がABO血液型の影響を受け、VWF自身にABO(H)血液型抗原が存在すること³³⁾、さらにA2ドメインに2本のN結合糖鎖(Asn1515, Asn1574)が存在することから(図3, 図5)、N結合糖鎖、とりわけその血液型糖鎖がADAMTS13感受性に影響することが示唆された³⁴⁾。実際、ABO血液型糖鎖を持たないボンベイ型血液由来のVWFでは、ADAMTS13による切断感受性が高くなること³⁵⁾、O型由来のVWFは、他

の血液型由来のVWFに比べてADAMTS13による切断を受けやすいことなどが報告された³⁶⁾。McKinnonらは、N結合糖鎖を酵素的に除去するとADAMTS13との結合親和性が4倍増強し、切断も促進されることを示し、さらに2箇所のア2ドメインのN結合糖鎖のうち、Asn1574の糖鎖がADAMTS13感受性に強く関与することを明らかにした³⁷⁾。これらの結果は、A2ドメインのN結合糖鎖がADAMTS13に対して抑制的に作用しており、糖鎖構造が感受性に影響することを示している。O型では血中VWF濃度が低く、type1 VWDがO型で多いことが古くから知られているが、1つの要因として、A、B型糖鎖に比べて、H型糖鎖では、糖が1残基少ないことが、その立体障害に影響するのではないかと考えられる。一方では、血液型糖鎖とは別に末端のシアル酸残基が、ADAMTS13による切断を促進するという報告もある³⁸⁾。一般にはシアル酸残基のようなマイナス荷電は、酵素切断には抑制的に作用することを考えるとこの結果は興味深い。

6. おわりに

VWFは、凝集体を作って沈殿しやすいため、非常に扱いにくい生体高分子である。例えば、抗体カラムによる精製を試みても、担体に吸着はするが、酸性条件や塩基性条件、DMSOや尿素、グアニジン塩酸を用いても溶出されてこない。最後は抗体ごと溶出させるしかない。このような気難しい巨大分子がどのように作られ、パッキングされ、分泌され、適度な大きさに切断され、そしてクリアランスされていくのか。あるいはそれぞれのリガンドと相互作用するのかといった問題が、ここ数年で次第に解明されてきた。そこには、定番となったアミノ酸変異導入体の解析と立体構造解析のほか、レーザーピンセットのような1分子のレベルで分子間相互作用を解析するといった技術の応用がある。このような解析法によって、気難しいVWF分子が丁寧に解剖された結果、驚くほどスマートで、合理的に作られていることが明らかになってきた。VWFがpH感受性を持ち、そのマルチマー形成を制御していることや、ずり応力感受性を持ち、その立体構造がダイナミック

に変化すること、ピンポイントで糖鎖が存在することなど、VWFが非常に計算された分子であり、その精緻な分子設計には驚くばかりである。今後、残された未知領域の生理機能の解明も時間の問題と思われる。

謝 辞

長年にわたりVWFをはじめ多数の血漿タンパク質の構造研究に尽力され、2012年12月に逝去された千谷晃一博士（本学会会員、藤田保健衛生大学名誉教授）に本稿を捧げます。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Emsley J, Cruz M, Handin R, Liddington R : Crystal structure of the von Willebrand Factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* **273** : 10396-10401, 1998.
- 2) Huizinga EG, Martijn van der Plas R, Kroon J, Sixma JJ, Gros P : Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor : implications for collagen binding. *Structure* **5** : 1147-1156, 1997.
- 3) Springer TA : Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost* **9** Suppl 1 : 130-143, 2011.
- 4) 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 U S A* **104** : 15647-15652, 2007.
- 5) Purvis AR, Sadler JE : A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization. *J Biol Chem* **279** : 49982-49988, 2004.
- 6) Weibel ER, Palade GE : New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol* **23** : 101-112, 1964.
- 7) Zenner HL, Collinson LM, Michaux G, Cutler DF : High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis. *J Cell Sci* **120** : 2117-2125, 2007.
- 8) Berriman JA, Li S, Hewlett LJ, Wasilewski S, Kiskin FN, Carter T, Hannah MJ, Rosenthal PB : Structural organization of Weibel-Palade bodies revealed by cryo-EM of vitrified endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 17407-17412, 2009.
- 9) 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 U S A* **105** : 482-487, 2008.
- 10) Dang LT, Purvis AR, Huang RH, Westfield LA, Sadler JE : Phylogenetic and functional analysis of histidine residues essential for pH-dependent multimerization of von Willebrand factor. *J Biol Chem* **286** : 25763-25769, 2011.
- 11) 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.
- 12) De Ceunynck K, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K : Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood*, 2012.
- 13) Zhang Q, Zhou YF, Zhang CZ, Zhang X, Lu C, Springer TA :

- Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 9226-9231, 2009.
- 14) Jakobi AJ, Mashaghi A, Tans SJ, Huizinga EG : Calcium modulates force sensing by the von Willebrand factor A2 domain. *Nat Commun* **2** : 385, 2011.
 - 15) Zhou M, Dong X, Baldauf C, Chen H, Zhou Y, Springer TA, Luo X, Zhong C, Grater F, Ding J : A novel calcium-binding site of von Willebrand factor A2 domain regulates its cleavage by ADAMTS13. *Blood* **117** : 4623-4631, 2011.
 - 16) Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN : Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* : 407-423, 2004.
 - 17) Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, Murata M, Miyata T : Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost* **9** Suppl 1 : 283-301, 2011.
 - 18) Tsai HM : Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* **87** : 4235-4244, 1996.
 - 19) 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.
 - 20) Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, Schneider MF : Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** : 7899-7903, 2007.
 - 21) 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.
 - 22) Xu AJ, Springer TA : Calcium stabilizes the von Willebrand factor A2 domain by promoting refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** : 3742-3747, 2012.
 - 23) 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.
 - 24) Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T : Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** : 19274-19279, 2009.
 - 25) Miyata T, Kokame K, Akiyama M, Banno F, Nakayama D, Takeda S : [Advances in ADAMTS13 research]. *Rinsho Ketsueki* **53** : 672-679, 2012.
 - 26) Kim J, Zhang CZ, Zhang X, Springer TA : A mechanically stabilized receptor-ligand flex-bond important in the vasculature. *Nature* **466** : 992-995, 2010.
 - 27) Auton M, Sowa KE, Behymer M, Cruz MA : N-terminal flanking region of A1 domain in von Willebrand factor stabilizes structure of A1A2A3 complex and modulates platelet activation under shear stress. *J Biol Chem* **287** : 14579-14585, 2012.
 - 28) Titani K, Kumar S, Takio K, Ericsson LH, Wade RD, Ashida K, Walsh KA, Chopek MW, Sadler JE, Fujikawa K : Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* **25** : 3171-3184, 1986.
 - 29) Schulte am Esch J, 2nd, Robson SC, Knoefel WT, Eisenberger CF, Peiper M, Rogiers X : Impact of O-linked glycosylation of the VWF-A1-domain flanking regions on platelet interaction. *Br J Haematol* **128** : 82-90, 2005.
 - 30) Nowak AA, Canis K, Riddell A, Laffan MA, McKinnon TA : O-linked glycosylation of von Willebrand factor modulates the interaction with platelet receptor glycoprotein Ib under static and shear stress conditions. *Blood* **120** : 214-222, 2012.
 - 31) Badirou I, Kurdi M, Legendre P, Rayes J, Bryckaert M, Casari C, Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV : *In vivo* analysis of the role of O-glycosylations of von Willebrand factor. *PLoS One* **7** : e37508, 2012.
 - 32) Canis K, McKinnon TA, Nowak A, Panico M, Morris HR, Laffan M, Dell A : The plasma von Willebrand factor O-glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *J Thromb Haemost* **8** : 137-145, 2010.
 - 33) Matsui T, Titani K, Mizuochi T : Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. *J Biol Chem* **267** : 8723-8731, 1992.
 - 34) Jenkins PV, O'Donnell JS : ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels : a biologic function after all? *Transfusion* **46** : 1836-1844, 2006.
 - 35) O'Donnell JS, McKinnon TA, Crawley JT, Lane DA, Laffan MA : Bombay phenotype is associated with reduced plasma-VWF levels and an increased susceptibility to ADAMTS13 proteolysis. *Blood* **106** : 1988-1991, 2005.
 - 36) Bowen DJ : An influence of ABO blood group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. *J Thromb Haemost* **1** : 33-40, 2003.
 - 37) McKinnon TA, Chion AC, Millington AJ, Lane DA, Laffan MA : N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13. *Blood* **111** : 3042-3049, 2008.
 - 38) McGrath RT, McKinnon TA, Byrne B, O'Kennedy R, Terraube V, McRae E, Preston RJ, Laffan MA, O'Donnell JS : Expression of terminal alpha2-6-linked sialic acid on von Willebrand factor specifically enhances proteolysis by ADAMTS13. *Blood* **115** : 2666-2673, 2010.