

立体構造からみたフォン・ビルブランド因子 (VWF) の機能ドメイン

松井太衛*, 林 宣宏*, 千谷晃一*

3 D Structures of A Domains of Human von Willebrand Factor

Taei MATSUI*, Nobuhiro HAYASHI*, Koiti TITANI*

Key words: von Willebrand factor, 3D structure, A domain, conformational change, platelet adhesion

1. はじめに

フォン・ビルブランド因子 (VWF) は, 血管損傷時の止血血栓形成や, 凝固第 VIII 因子 (FVIII) の保護と運搬に必須の血漿タンパク質であり¹⁾²⁾, 量的減少や構造異常 (機能不全) などにより出血時間が延長するフォン・ビルブランド病 (VWD) を発症する³⁾. VWF の遺伝子は第 12 染色体短腕にあり, ささまざまなタイプの VWD について塩基置換や挿入などの点突然変異が同定されている (性質を表 1 にまとめる).

VWF は 15~18% の糖を含んだ糖タンパク質であり, 270 kDa (2,050 アミノ酸残基) のサブユニットからできている. VWF のタンパク質全一次構造は, Ginsburg らや Sadler ら⁴⁾ による cDNA 構造解析 (1985 年) と, 千谷ら⁵⁾ によるアミノ酸配列分析 (1986 年) から明らかにされ, N-結合糖鎖と O-結合糖鎖の構造に関しても, 1992 年までにその全容が明らかにされている⁶⁾. VWF は多くの血漿タンパク質と異なり, 血管内皮細胞と骨髄巨核球で特異的に合成され, 血液型抗原を発現し, 血管内皮細胞から

は常時分泌されるほか, Weibel-Palade 体 (血管内皮細胞) や血小板 (巨核球) の α 顆粒に貯蔵され, 必要に応じて局所的に分泌される. 合成直後の VWF は, シグナルペプチド (22 残基), プロポリペプチド (741 残基) および VWF サブユニット (2,050 残基) からなり, シグナルペプチド除去後, C 末端側で S-S 結合してダイマーとなる (図 1). プロポリペプチドは furin によって切断され, サブユニットダイマー同志が今度は N 末端側で S-S 結合を形成して, 分子量 2 千万におよぶ巨大な多重合体として分泌される. 分泌された VWF は, 血中を循環しながら血漿中のプロテアーゼによって部分的に限定分解 (VWF 分子の Tyr 842-Met 843 間を特異的に切断) を受け, ささまざまなサイズのマルチマーを生じ, 肝臓で代謝される. この VWF プロテアーゼの本体は現在不明であるが, Ca^{2+} などの 2 価イオンを必要とし, EDTA で阻害されることからメタロプロテアーゼの 1 種と考えられ, VWF の活性調節に重要な役割を持つことが次第に明らかになってきている⁷⁾.

* 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 [〒 470-1192 愛知県豊明市番掛町田楽ヶ窪 1-98]

Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University [1-98 Toyoake, Aichi 470-1192, Japan.] Tel. 0562-93-9381, Fax. 0562-93-8832, e-mail: tmatsui@fujita-hu.ac.jp

表 1 ヒト VWF の性質

生理機能	障害血管壁への血小板の粘着による止血血栓形成。凝固第 VIII 因子と非共有結合し、保護および運搬。
欠乏による疾病	フォン・ビルブランド病 (VWD). 出血時間の延長, リストセチン凝集能 (RCof) の低下, 第 VIII 因子活性 (VIII:C) の低下などを特徴とする。病型 (病因) は type 1 (VWF の量的減少), type 2 (VWF の構造的機能異常), type 3 (VWF の欠如) に大きく分類される。
染色体マッピング	第 12 番染色体短腕 (12p12-12pter). 第 22 番染色体 (22q11.2) に偽遺伝子が存在する。
遺伝子	52 エキソン (180 kb). エキソン 28 が最大で (1,379 bp), A1, A2 ドメインをコードする。mRNA は 8.2 kb.
分子量	$5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ Da. サブユニット (約 270 kDa) が S-S 結合した多重合体 (2~80 量体)。サブユニットは 2,050 アミノ酸残基からなる。
糖鎖	糖含量 (15~18%), サブユニットあたり N-結合糖鎖を 12 本, O-結合糖鎖を 10 本含む。Asn384, Asn468 の糖鎖は硫酸化されている可能性。N-結合糖鎖に ABO 血液型抗原が存在する。O-結合糖鎖はほとんどシアル化されている。
S-S 結合	サブユニットあたり 169 残基 (8.2%) の Cys を含み, すべて S-S 結合を形成する。このうち Cys379, Cys459, Cys462, Cys464 がマルチマー形成に関与し, C 末の Cys2010 がダイマー形成に関与する。
血中濃度	~10 $\mu\text{g/ml}$ (モノマー換算で ~50 nmol/l)。
生合成部位	血管内皮細胞と骨髄巨核球。 血管内皮細胞のマーカー・タンパク質の 1 つ。
リガンド分子	凝固第 VIII 因子, 血小板膜タンパク質 (GP) Ib, GPIIb/IIIa (インテグリン $\alpha\text{IIb}\beta 3$), コラーゲン (type I, III, VI など), ヘパリン, 硫酸化糖脂質, リストセチン, ボトロセチン, ピチセチンなど。

2. VWF のドメイン構造

VWF は生体内に存在するもっとも巨大な分子の 1 つであるが, サブユニットは A から D であらわされる比較的相同性の高い部分 (ドメイン) のくり返しからなり⁵⁾, 各ドメインはそれぞれ VWF の特定の機能を受け持っている (図 1)。すなわち FVIII との結合部位は, N-末端側の D', D3 ドメインに存在し, 血小板膜タンパク質 (GP) Ib や type VI コラーゲン, ヘパリン, 硫酸化糖脂質 (スルファチッド), 蛇毒モジュレーターであるボトロセチンなどの結合サイトは A1 ドメインに, type I, type III コラーゲ

ンの結合は A3 ドメイン, GPIIb/IIIa との結合部位は C1 ドメインに存在する¹⁾²⁾。特に A1 と A3 ドメインは, それぞれ 1 つの S-S 結合で大きなループを形成し, 止血血栓の形成に重要な機能ドメインである。VWF の A ドメインと相同性を持つ構造は補体 C2 や B 因子, 白血球のインテグリンである LFA-1, CR3 (Mac-1), VLA-1, -2 などの I ドメイン, 軟骨マトリックスタンパク質 (CMP), type VI, VII, XII コラーゲン α 鎖などにも見つかり, 防御や接着に関与するタンパク質に共通するきわめて重要な認識ドメインの 1 つであると考えられる。これらの A ドメインの二次構造予測や類似物質の既

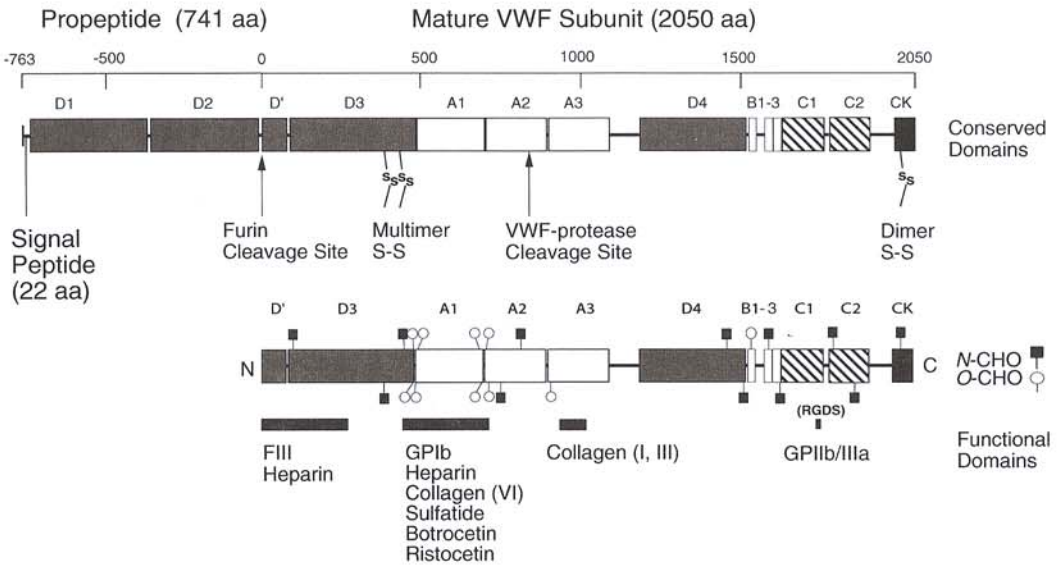


図1 VWFのドメイン構造

VWFはシグナルペプチド(22残基)とプロペプチド(741残基)を合わせた2,813残基の前駆体(上)として合成され、小胞体でダイマーとなった後、ゴルジ体でマルチマー形成、糖鎖のトリミング、プロペプチドの切断などを受け、2,050残基の成熟サブユニット(下)からなるVWFマルチマーとなる。分子内相同性を示す部分をA-Dで示す。C末端側90残基にはcystine knot(CK)と呼ばれるNGFやTGF- β などのダイマーを形成するタンパク質などに保存されているドメインが存在する。VWFの機能ドメインをバーで示す。残基番号は成熟サブユニットを基準として示す。

図2 VWF A3ドメインとA1ドメインの立体構造モデル

VWFのA3ドメイン(A)とA1ドメイン(B)のリボンモデル(a)と空間充填モデル(b)を示す。それぞれ α 3ヘリックスが正面にくるむきとなっている。図中いくつかの残基に関しては、アミノ酸の種類(一文字表記)とともに、その残基番号を表示した。(a) α ヘリックス、 β ストランド、ループをそれぞれ、青、黄、赤で表し、N末端側から順に番号を付した。S-S結合するCysは主鎖の α 炭素をCPKモデル(灰色の球)で表示した。A3では金属イオン結合モチーフの一部(D934, S936, S938)を緑で、それと向き合うT1038, D1039を黒で示した。A1ではGPIbとの結合に重要な残基(G561, E596, K599)を緑で表示した。(b)A3では図A(a)と同様に、金属イオン結合モチーフの一部(D934, S936, S938)を緑で、それと向き合うT1038, D1039を黒で示した。また、酸性アミノ酸残基を赤、塩基性アミノ酸を青で示した。A1ではGPIb結合サイトの候補である β 3ストランドを黄色、 α 3、 α 4bヘリックスを青で表示した。また、図B(a)と同様に、GPIbとの結合に重要な残基(G561, E596, K599)を緑で示し、さらに、type 2 VWDで報告されている主な点突然変異残基の位置を空白(R545とW550のみ1部見えるが、P503, H505, R543, V551, V553, P574, R578, L697, A698などの残基は裏側に位置するためこの図では見えない)で表示した。また、オレンジ色の部分はボトロセチン結合に重要な残基(R629, R632, R636, K667)を示している。A3とA1の図の作成にはHuizingaら¹⁴⁾が報告している結晶構造(PDB: accession number 1atz)と、Emsleyら¹⁵⁾が報告している結晶構造(PDB: accession number 1auq)をそれぞれ用いた。また、リボンモデル、空間充填モデルは、モレキュラーシミュレーション社(米)のInsightIIソフトウェアを使用して作成した。

図3 VWF分子の立体構造変化

ずり応力によるVWF分子の立体構造変化を、原子間力顕微鏡観察画像からモデル化したもの(文献18より許可を得て引用)。ずり応力のほとんどない状態では(左)、VWF分子は疎水性面に対して結合して球状構造をとる。数ナニュートンのずり応力によってVWF分子はゆるみはじめ、個々の球状ドメインが観察されるようになり(中央)、35 dyn/cm²以上のずり応力下では、ずり応力負荷方向に長くのびた(146~774 nmにおよぶ)構造をとる(右)。

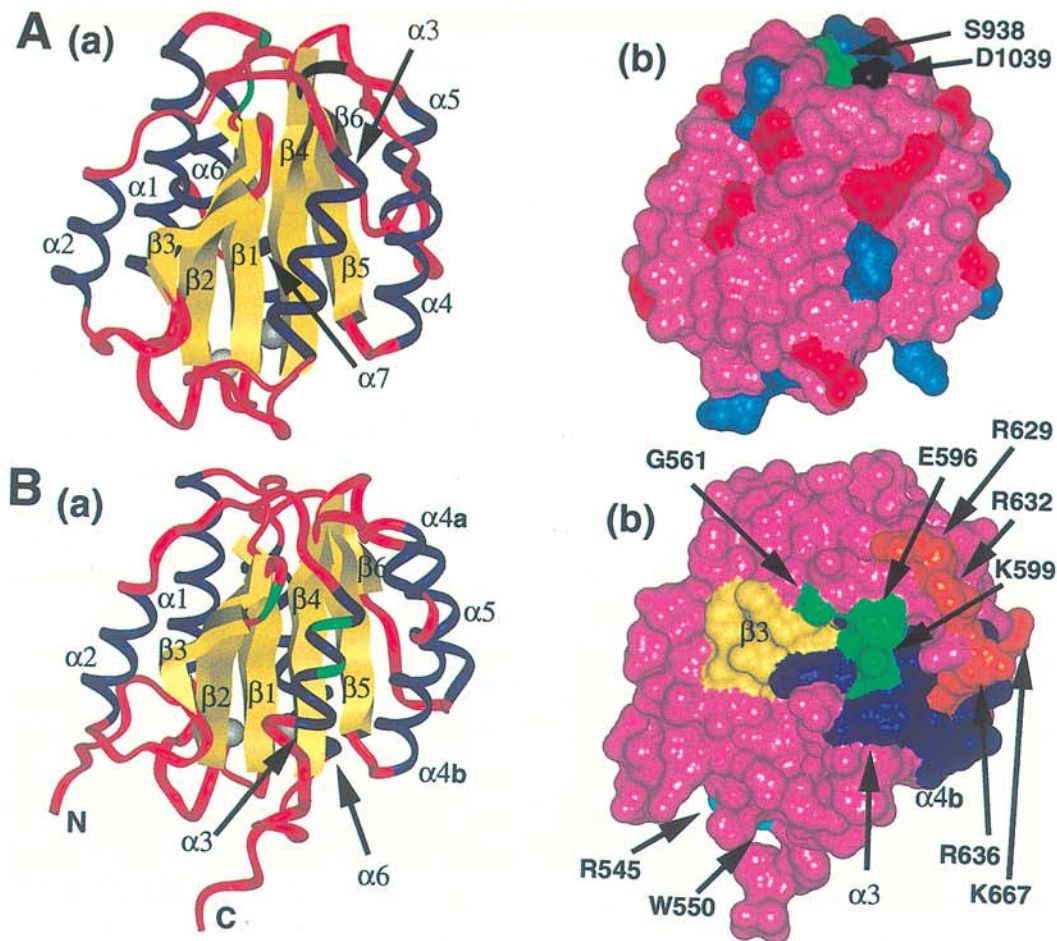


図 2 (図説は前頁脚注参照)



Globular vWF Short Extended Chain Extended Chain

図 3 (図説は前頁脚注参照)

知構造との比較から、VWFのAドメインの立体構造予測がPerkins⁹⁾やRussell⁹⁾らによって行われた。その後、CR3などのIドメインの立体構造が明らかになり¹⁰⁾、これを端緒として1997年から1998年にかけて、A3とA1ドメインの立体構造が2つのグループで相次いで明らかにされた。

3. VWF A3ドメイン (コラーゲン主要結合ドメイン) の結晶構造

1997年にHuizingaら¹¹⁾とBienkowskaら¹²⁾によって、VWFのA3ドメインの立体構造がまず明らかにされた(図2A)。彼らは、A3

ドメイン (残基 923-1109) を含む領域を大腸菌で大量発現させ、X線結晶構造解析を行った。その結果、インテグリンIドメインと同じく、中央に疎水性の6本のストランドからなる平行 β シート (1本は逆平行) が束を作り、そこから外側に折れ曲がる向きに、3本と4本の α ヘリックスが左右からサンドイッチするように β シートを包み込んでいる、いわゆる dinucleotide-binding fold (α/β fold) 構造が明らかにされた (図 2A(a))。インテグリンなどでは、 Mg^{2+} などの金属イオンがリガンドとの相互作用に必須であり、Iドメインの上端部にあたる β シートから α ヘリックスへのループ部分に、DXSXSの配列からなる金属イオン結合モチーフの1部が存在する¹⁰⁾。VWF A3ドメインでも、この部分 (D 934, S 936, S 938) は保存されているが、別のループの Thr 1038 と Asp 1039 がキレーションサイトに入り込むことで、金属イオンは結合できず、実際に Mg^{2+} 存在下でも、 Mg^{2+} の結合は認められない¹²⁾ (図 2A(a)(b))。しかしながら、A3ドメインのコラーゲン結合には金属イオンを必要としない。

A3の立体構造からは、はっきりとしたリガンド結合サイトを予想させるような分子のくぼみやクレバスは見出されないが、インテグリン分子との比較から、分子の上端表面でコラーゲンと相互作用するものと考えられる。A3ドメインの表面はS-S結合を持つ下面を除いて全体的に親水性であり、特に上端表面(β シートから α ヘリックスを結ぶループ部分が集まっている部分)は、酸性アミノ酸残基が多く平坦で、比較的マイナス荷電に富んでいる (図 2A(b))。Bienkowska ら¹²⁾ は、この部分とコラーゲンの3重ヘリックス構造のプラス荷電部分が親和性を示すと考えている¹²⁾。このアフィニティーは、A3ドメイン単独では弱いですが、VWFがマルチマー構造をとることで増強される。一方、ほかのコラーゲン結合タンパク質であるフィブロネクチン (type-2 module¹F2) では、お互いの疎水性部分で相互作用することや、コラゲナーゼ

では2つの結合サイトの存在が示されている。最近、Emsley ら¹³⁾ は、コラーゲンレセプターである $\alpha 2\beta 1$ インテグリンの $\alpha 2$ -Iドメインの結晶構造解析を行い、コラーゲンの3重ヘリックスのGlu残基が、Iドメインの金属イオン依存性結合サイトにフィットすることを示している。これらのことから、VWFはこれらのコラーゲン結合分子とは異なった様式でコラーゲンと結合すると思われる。

4. VWF A1ドメイン (GPIb 結合ドメイン) の結晶構造

続いて1998年にCelikel ら¹⁴⁾ とEmsley ら¹⁵⁾ によって、独立にA1ドメインの結晶構造が明らかにされた (図 2B)。全体構造としては、基本的にA3ドメインと同じく、5本のストランドからなる平行 β シートを中心に1本の短い逆平行 β ストランドを一方のへりに出し、左右に3本ずつの α ヘリックスが取りまいた6面体様構造 (高さ4 nm, 3×4 nm) を示す (図 2B(a))。金属イオン結合モチーフは保存されておらず、A1ドメインの機能発現に金属イオンは必要としない。A1ドメインでは、第4番目の α ヘリックスが短い β ターンをはさんで2つ ($\alpha 4a$ と $\alpha 4b$) に分断されている。また、最後のヘリックスは、A3ドメインでは90度交差した2つのヘリックス ($\alpha 6$ と $\alpha 7$) に分かれているのに対して、A1ドメインでは1本の α ヘリックス ($\alpha 6$) となっている。A1の底面をとり囲むように電荷アミノ酸が交互に並んで塩橋を形成し、構造の安定化を担っている¹⁵⁾。

Celikel ら¹⁴⁾ は、VWFとGPIbの結合を阻害する抗VWFモノクローン抗体であるNMC-4 (Fab) との複合体を用いて結晶構造を調べているが、NMC-4のエピトープは、 $\alpha 4a$ から β ターンおよび $\alpha 4b$ のN末側部分であることが示されている。一方、松下とSadler¹⁶⁾ によって、荷電アミノ酸残基をAlaに順次置換する方法で、GPIbやボトロセチンの結合に重要な荷

電アミノ酸残基が詳細に調べられている。彼らによると, Glu 596 や Lys 599 (いずれも $\alpha 3$ ヘリックス), Lys 642~645 ($\alpha 4$ b ヘリックスの C 端側から $\beta 5$ スtrand へのループ) を Ala に置換することで GPIb 結合能が低下した。また, 血小板との結合の欠如を伴うある種の VWD で, Gly 561 ($\beta 2$ から $\beta 3$ スtrand へのループ) の Ser への置換が見つかっている。これらの事実を立体構造モデルにあてはめると, A1 ドメインにおける GPIb 結合サイトは, $\alpha 3$, $\alpha 4$ ヘリックスと $\beta 3$ スtrand が作り出す浅いくぼみ部分であると推定される¹⁴⁾ (図 2B(b))。また, ボトロセチンの結合に必須なアミノ酸残基 (Arg 629, Arg 632, Arg 636, Glu 666, Lys 667)¹⁶⁾ は, $\alpha 4$ a から $\alpha 4$ b と $\alpha 5$ ヘリックスに存在することから, $\alpha 4$ と $\alpha 5$ ヘリックスにまたがる部分がボトロセチン結合サイトと考えられる¹⁵⁾。NMC-4 はボトロセチンの結合も阻害するが, これは両者の認識サイトが非常に近いことによる立体障害で説明がつく。

VWF の GPIb への親和性が増加 (gain of function) する type 2 B VWD の点突然変異の場所は, いずれも A1 ドメインの底部 ($\alpha 1$ から $\beta 2$ へのループ, $\alpha 2$, $\alpha 6$ の C 末側など) や, これと接する S-S 結合を形成するヒンジ部分に集中している (図 2B (b) に 1 部がのぞく)。この部分の構造変異が, なぜ離れた GPIb 結合サイトの親和性を変化させるのかは今後の問題であるが, 規則正しくパッキングされた塩橋ネットワークを乱すことで, アロステリックに GPIb 結合サイトのコンフォメーションを変化させるのではないかと考えられている。

5. VWF 分子の全体像

VWF 自身が巨大なタンパク質であるため, 顕微鏡を用いて直接その構造を観察することも可能である。1985 年に, Fowler ら¹⁷⁾ は透過型電子顕微鏡を使って, VWF ダイマーが約 5 nm の

球状構造を中心に, 2 本のフレキシブルな棒状構造 (34×2 nm) と, それに続く 2 つの大きな球状構造 (26×6.5 nm) からできていることを示した。棒状構造と 5 nm の球状構造部分は, VWF サブユニットの D4-B1-B2-B3-C1-C2 ドメインと, C 末側の S-S 結合を含む部分 (CK) であり, 大型の 2 つの球状構造には, D'-D3-A1-A2-A3 ドメインが含まれる。VWF マルチマーは, この約 120 nm の単位が大型球状構造部分でつながってできている。

これまで VWF はコラーゲンなどと結合することで, (A1 ドメインの) 立体構造が変化し, GPIb との親和性が高くなると考えられてきた。Siedlecki ら¹⁸⁾ は, 原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy) で, 疎水面に対して非特異的に粘着した VWF が, ずり応力のないところでは丸い形状をしているが, 35 ± 3.5 dyn/cm² 以上のずり応力の負荷によって負荷方向に伸ばされ, 球状ドメイン構造が露出することを報告している (図 3)。すなわち, 血流中では丸まった形態をとるが, 血管内皮下組織 (コラーゲン) に結合した VWF では, 一定のずり応力を受けることで分子全体の構造が変化することが示唆され, その結果一挙に相互作用可能な GPIb 結合サイトの露出度が増加し, 親和性が高まるのではないかと考えられる。

Ruggeri ら²¹⁹⁾ は, GPIb への親和性が高くなるような A1 ドメイン自身の特別な構造変化を考えなくとも, 高密度で固相化された VWF が, ずり応力下に血小板の動きを遅くするだけの弱い相互作用を与えることが重要であり, この刺激が蓄積されて, 血小板の活性化によるインテグリンを介した強い結合を引き出すことにつながると考えている。一方, Bendetowicz ら²⁰⁾ は, コラーゲン (type VI) と結合した VWF では, FVIII との親和性が低下することから, A ドメインとコラーゲンなどの相互作用は, 離れた場所の D' ドメインの立体構造にも影響を与え, その結果遊離される FVIII は凝固系の活性化に速やかに機能すると考えている。

6. おわりに

VWFのきわめてミクロな部分立体構造から、マクロな全体像のダイナミックな構造変化まで最近明らかになってきたが、Aドメインにおける実際のさまざまなリガンド結合サイトは、まだ決定的ではない。NMC-4のエピトープが決まったように、蛇毒やGPIb、コラーゲンなどの複合体の立体構造解析を通して、結合サイトが今後より明確にされるであろう。特に、蛇毒ボトロセチンが結合することで、GPIb結合サイトがどのような構造をとるのかは興味深い。糖鎖構造に関しては、大腸菌でのリコンビナントタンパク質を結晶解析に用いているため立体構造に反映されていないが、A1ドメインでは、根もとのS-Sループ構造をはさんで4本ずつのO-結合糖鎖がA1ドメインを包み込むように配置しており(図1)、シアル酸残基による強力なチャージは、A1ドメインの立体構造に大きな影響を与えていることが予想される。実際、脱シアル化VWFでは、補助因子なしでもGPIbとの相互作用を起こすことが知られている。今後、各種のVWDにおける実際の立体構造変異や、VWFプロテアーゼの切断部位を含むA2ドメイン、FVIII結合サイトの立体構造も含めて、VWFの構造と機能の相関がさらに詳細に明らかになるものと期待される。

文 献

- 1) Sadler JE: Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* **67**: 395-424, 1998.
- 2) Ruggeri ZM: Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* **82**: 576-584, 1999.
- 3) Ginsburg D: Molecular genetics of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* **82**: 585-591, 1999.
- 4) Sadler JE, Shelton-Inloes, BB, Sorace JM, Harlan JM, Titani K, Davie EW: Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6394-6398, 1985.
- 5) 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.
- 6) 松井太衛: von Willebrand 因子の糖鎖の構造と機能. *日本血栓止血学会誌* **6**: 421-432, 1995.
- 7) 藤村吉博, 八木秀男, 朴永東: 血漿中の von Willebrand 因子重合体プロセッシング酵素活性の測定. *日本血栓止血学会誌* **10**: 278-284, 1999.
- 8) Perkins SJ, Smith KF, Williams SC, Haris PI, Chapman D, Sim RB. The secondary structure of the von Willebrand factor type A domain in factor B or human complement by fourier transform infrared spectroscopy: its occurrence in collagen types VI, VII, XII and XIV, the integrins and other proteins by averaged structure predictions. *J Mol Biol* **238**: 104-119, 1994.
- 9) Russell RB, Copley RR, Barton GJ: Protein fold recognition by mapping predicted secondary structures. *J Mol Biol* **259**: 349-365, 1996.
- 10) Lee J-O, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R: Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**: 631-638, 1995.
- 11) Huizinga EG, van der Plas RM, 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.
- 12) Bienkowska J, Cruz M, Atiemo A, Handin R, Liddington R: The von Willebrand factor A3 domain does not contain a metal ion-dependent adhesion site motif. *J Biol Chem* **272**: 25162-25167, 1997.
- 13) Emsley J, King SL, Bergelson JM, Liddington RC: Crystal structure of the I domain from integrin $\alpha 2\beta 1$. *J Biol Chem* **272**: 28512-28517, 1997.
- 14) Celikel, R, Varughese KI, Madhusudan, Yoshioaka A, Ware J, Ruggeri ZM: Crystal structure of the von Willebrand factor A1 domain in complex with the function blocking NMC-4 Fab. *Nat*

- Struct Biol 5: 189-194, 1998.
- 15) 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.
 - 16) Matsushita T, Sadler JE: Identification of amino acid residues essential for von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib: charged-to-alanine scanning mutagenesis of the A1 domain of human von Willebrand factor. J Biol Chem 270: 13406-13414, 1995.
 - 17) Fowler WE, Fretto LJ, Hamilton KK, Erickson HP, McKee PA: Substructure of human von Willebrand factor. J Clin Invest 76: 1491-1500, 1985.
 - 18) Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE: Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. Blood 88: 2939-2950, 1996.
 - 19) Miyata S, Ruggeri ZM: Distinct structural attributes regulating von Willebrand factor A1 domain interaction with platelet glycoprotein Ib α under flow. J Biol Chem 274: 6586-6593, 1999.
 - 20) Bendetowicz AV, Wise RJ, Gilbert GE: Collagen-bound von Willebrand factor has reduced affinity for factor VIII. J Biol Chem 274: 12300-12307, 1999.