

von Willebrand 因子の機能と構造 —A1 ドメインと GPIb α の力学的相互作用について—

Function and structure of von Willebrand factor
—mechanical interaction between A1 domain and GPIb α —



塩崎聖治

塩崎聖治*
Seiji SHIOZAKI

2007年 東京大学大学院工学系
研究科博士課程 修了
2007年～2008年 東京大学大学
院工学系研究科 特任研究員
2008年～2010年 東洋大学計算
力学研究センター 研究助手
2010年～2012年 理化学研究所
特別研究員
2012年～ 東海大学医学部循環
器内科 助教

Key words: platelet, glycoprotein Iba, A1 domain, AFM, optical tweezers

Points

- ① von Willebrand 因子や glycoprotein Iba を始めとしたタンパク質は血小板凝集の重要な力学的因子であるが、近年、実験やコンピュータシミュレーションによって、タンパク質間に形成される結合についての知見が得られつつある。
- ② 単分子操作技術の発展に伴い、原子間力顕微鏡や光ピンセットを用いて、von Willebrand 因子 A1 ドメインと glycoprotein Iba 間の結合力が数 pN から数十 pN であると報告されており、結合の切断速度についてのモデル化も行われている。
- ③ 分子スケールの実験、そしてその実験結果を反映したシミュレーションによって、血小板凝集のミクロスケールからの理解が深まり、そのメカニズムの解明が進むことが期待されている。

1. はじめに

血小板凝集を理解する上でタンパク質間結合についての力学的相互作用は非常に重要な要素となる。図 1 に示す通り血小板凝集には、von Willebrand 因子(VWF)とコラーゲン、glycoprotein Iba(GPIba)と VWF、glycoprotein IIb/IIIa(GPIIb/IIIa)と VWF もしくはフィブリノゲンとの結合など、様々なタンパク質間結合が関与している。タンパク質間相互作用を理解するためには分子動力学法などのコンピュー

ターシミュレーションのほかに、近年、単分子操作を可能とする実験による解析が注目されている。本稿では、最近の報告を元に血小板凝集において最も重要なタンパク質の 1 つである VWF の分子構造、そして、GPIba との力学的相互作用について概説する。

2. VWF の基本構造

血管内皮細胞と骨髄巨核球で産生される VWF は止血・血栓形成において重要な役割を担うタンパク質である。血小板の α 顆粒や血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体に蓄えられている VWF は血小板の活性化や血管内皮が損傷した際に放出され、血小板表面の膜タンパク質と結合を形成し、血小板血栓の形成

*責任者連絡先:

東海大学医学部内科学系循環器内科学
〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143
Tel: 0463-93-1121 (内線 2228), Fax: 0463-93-6679
E-mail: shios@tokai-u.jp

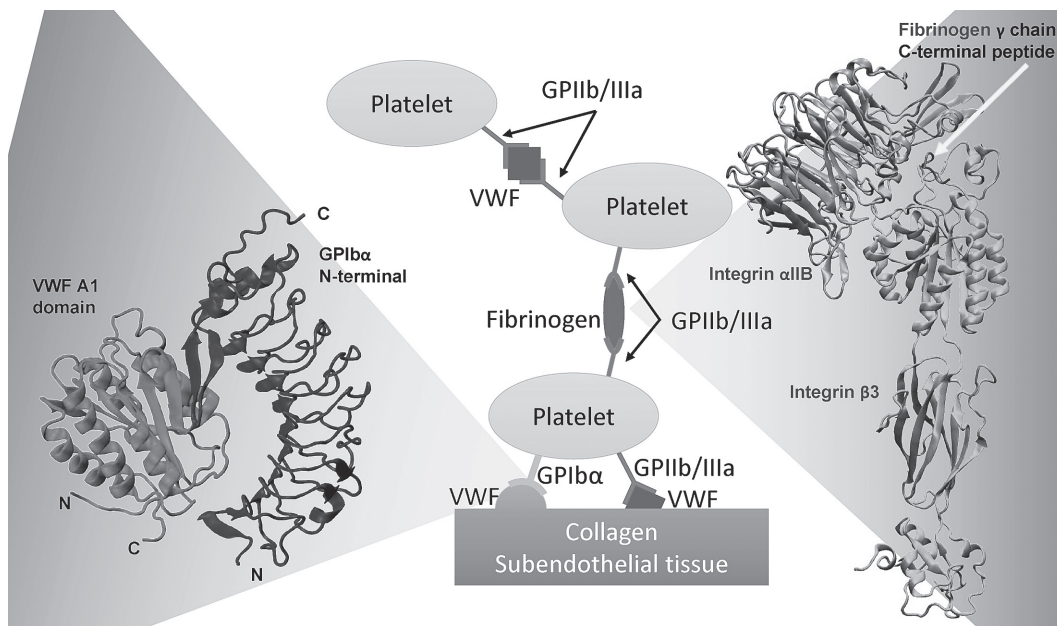


図1 タンパク質結合の形成による血小板凝集の概要

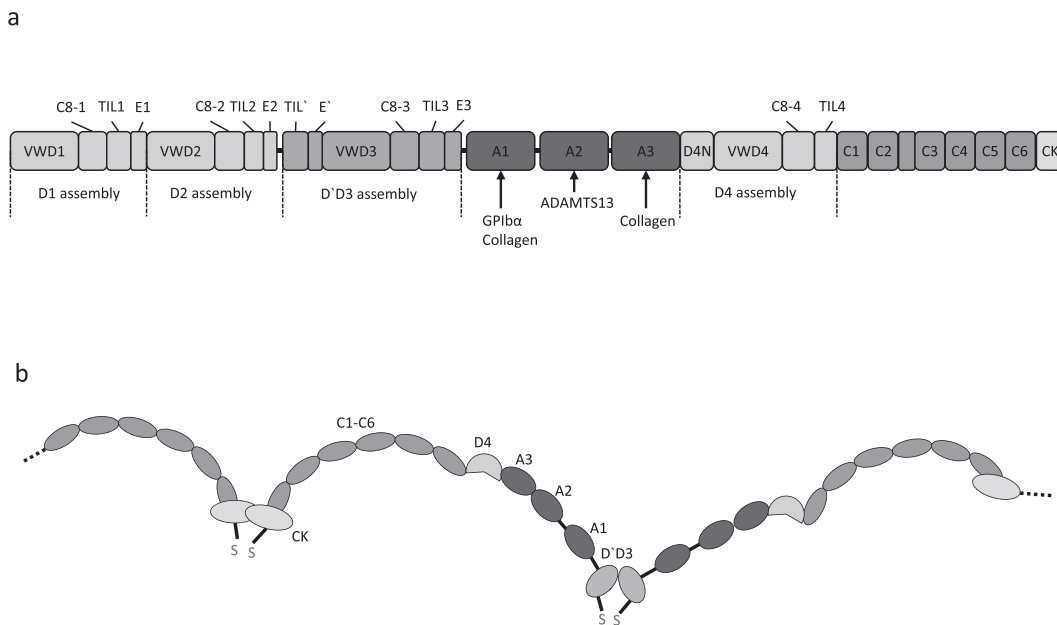


図2 von Willebrand 因子の構造(文献2を参考に作成)
 a) VWF サブユニットの基本構造, b) マルチマー構造の形成

を促す。また、血漿中で血液凝固第 VIII 因子と結合し、in vivo proteolysis から第 VIII 因子を守り、安定化する作用と、血小板血栓部位への凝固血栓誘導作用を担っている¹⁾。図 2a に VWF サブユニットの構造の概要を示す^{2,3)}。サブユニットの構造は cysteine knot(CK)ドメイン、D アセンブル、cysteine-8

(C8), trypsin inhibitor-like(TIL), E モジュール、そして A1 から A3 までの 3 つの A ドメインで構成されている。このうち A1 ドメインは GPIIb α と、A3 ドメインはコラーゲンとの結合を形成し、血小板凝集において非常に重要な役割を果たす。VWF はサブユニットの C 末端(CK ドメイン)での分子間ジス

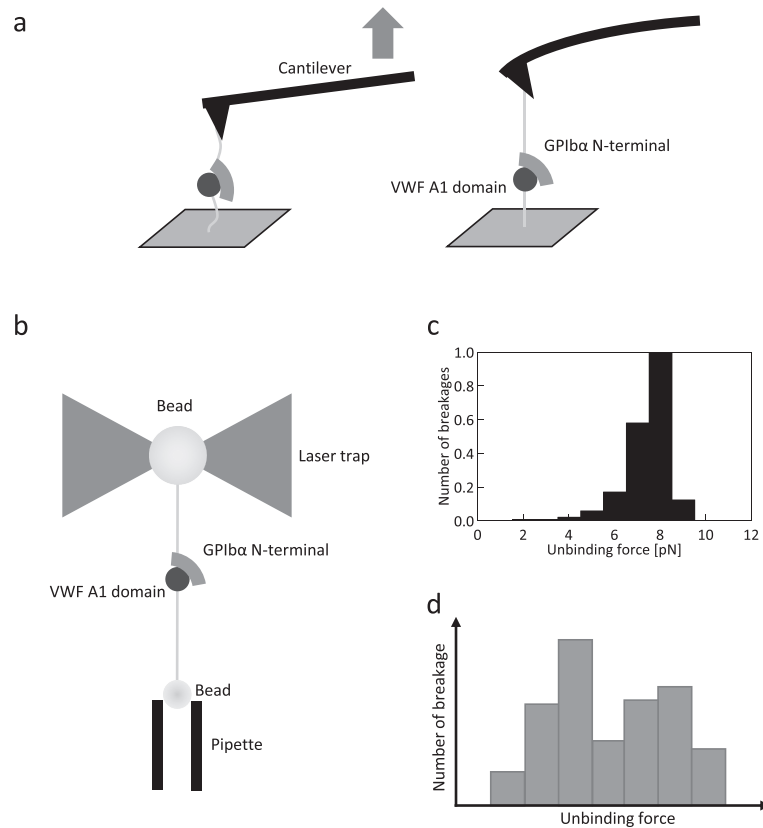


図3 単分子操作による実験の概要

a) 原子間力顕微鏡(AFM)による単分子操作, b) 光ピンセットによる単分子操作, c) モンテカルロ法を用いて求めた準静的に引っ張った場合の GPIb α N 末端と VWF A1 ドメインの切断力分布, d) 20 nm/秒から 40 nm/秒で引っ張った場合の GPIb α -VWF 結合の切断力分布の模式図

ルフィド(S-S)結合(tail-to-tail 結合)にて二量体を形成し, N 末端での分子間 S-S 結合(head-to-head 結合)により多重体(マルチマー)構造を持つ巨大タンパク質となる(図 2b)。

3. 単分子操作による力学的相互作用の解析

近年, 原子間力顕微鏡(AFM: Atomic Force Microscope)や光ピンセットを用いた単分子操作によって, 高分子やタンパク質結合の力学特性についての知見を得ることが可能となっている。光ピンセットの最大捕捉力は 100 pN 程度, AFM は固いカンチレバーを使うことで, 数百 pN 以上の大きな力で捕捉することができる。

3.1 原子間力顕微鏡

Tobimatsu ら⁴⁾は AFM を用いて GPIb α の N 末端と

VWF A1 ドメインとの間の力学特性についての解析を行い, タンパク質結合 1 対の結合力を 54 pN と推定した。図 3a に示す通り, AFM によるタンパク質伸長実験では, まず GPIb α を AFM のカンチレバーに, VWF A1 ドメインをステージにそれぞれ固定する。タンパク質をつかんだカンチレバーがステージから遠ざかるにつれ, 吊り上げたタンパク質に張力が掛かり, カンチレバーをしならせる。レバーのしなりとバネ定数から分子にかかる力が求まり, 伸びと力の関係であるフォースカーブが得られる。

3.2 光ピンセット

Kim ら^{5,6)}は光ピンセットを用いて GPIb α の N 末端と VWF A1 ドメインの 1 対の結合が切断される力の分布を求めた。高い強度のレーザービームを集光すると, 放射圧により焦点に細胞などの小さな微粒子を捕捉し操ることができる。これは光ピンセッ

表1 GPIb α -VWF 結合の切断速度パラメーター⁶⁾

	$K_{1off}^0 [s^{-1}]$	$\sigma_1 [nm]$	$K_{2off}^0 [s^{-1}]$	$\sigma_2 [nm]$
Wild-type	0.0047 \pm 0.0015	2.52 \pm 0.17	0.0022 \pm 0.0007	1.62 \pm 0.10
GPIb α M239V	0.0029 \pm 0.0007	1.92 \pm 0.11	0.0005 \pm 0.0003	1.59 \pm 0.13
VWF A1 R1306Q	0.0055 \pm 0.0015	1.66 \pm 0.11	0.0018 \pm 0.0006	1.06 \pm 0.06

トと呼ばれ、生物学において広く利用されてきている(図3b)。VWF A1ドメインとGPIb α N末端をビーズに接着し、片方をマイクロピペットで固定し、もう片方をこの光ピンセットで捕捉し、タンパク質結合を引っ張ることによって、フォースカーブを得る事ができ、フォースカーブの不連続部からタンパク質結合の切断時の力を知ることが可能である。タンパク質結合の切断はタンパク質分子自身の熱的な揺らぎ、そして周辺水分子との相互作用による揺らぎの中で起きる現象であるため、図3cのような切断時の力の分布を得ることができる。図3cはモンテカルロ法というシミュレーション手法⁷⁾によって求めた、10 nm/秒で引っ張った場合のGPIb α N末端とVWF A1ドメインの切断力の分布である。これは準静的にゆっくりと引っ張った場合であるが、GPIb α とVWFの切断力は数pNとなっている。この切断力分布は引っ張り速度に依存しており、速く引っ張るほど切断力は大きくなる。切断力の分布からDudko-Hummer-Szaboの式によって、一定の外力で引っ張った場合の結合の寿命を求めることができ、外力と結合寿命の関係を知ることができる。この外力-結合寿命の関係からGPIb α -VWFの切断速度 k_{off} のモデル化が可能である。このモデル化にはタンパク質による細胞接着のモデルとしてよく用いられるBellの式⁸⁾が用いられ、

$$k_{off}(F) = k_{off}^0 \exp(\sigma F / k_B T)$$

という形で表現される。ここで F は外力、 k_{off}^0 は外力0の場合の切断速度、 σ は定数、 k_B はボルツマン定数、 T は温度である。Springerらは20 nm/秒から40 nm/秒程度で引っ張った場合にGPIb α -VWFの切断力分布のピークが2つできる(図3dに模式図)こ

とから、状態1と状態2の2種類のGPIb α -VWF結合の存在を仮定している。状態1は外力が加えられていない場合の結合状態で、約10 pNの外力を加えてやることで結合は状態2に遷移する。状態2は状態1に比べて切断速度が小さい、即ち結合が切断されにくい状態である。力を加えると結合が切断されにくくなる、この通常の感覚とは逆の挙動を示す結合はcatch bondと呼ばれ、L-selectinとPSGL-1の結合にも見られる結合状態である。Wild-type、そしてGPIb α とVWFにそれぞれgain-of-functionのmutationを導入した場合の状態1と状態2について、Bellの式のパラメーターを表1に示す。GPIb α とVWFの結合がcatch bondであることを示すこれらの結果は、ずり応力によって惹起される動脈内における血小板凝集のメカニズムを解明する鍵になる可能性を秘めている。

4. おわりに

以上、本稿では単分子操作によるVWF A1ドメインとGPIb α N末端の力学的相互作用について述べた。タンパク質1対のミクロスケールの相互作用の知見を出発点として、細胞間相互作用、血小板や赤血球を含む血流についてのマクロな現象の相互作用までのマルチスケール・マルチフィジックスの血栓形成の理解が*in silico*血栓形成モデルの構築に繋がりが、医療画像から再構成した血管の3次元モデルに対するダイレクトなコンピューターシミュレーションによる個別化医療、ステント血栓症に対するステント形状の最適化などが実現されることを期待している。

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

- 1) 八木秀男, 藤村吉博: von Willebrand 因子, 血小板生物学, メディカルレビュー社, 341-348, 2004.
- 2) Springer TA: von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* **124**: 1412-1425, 2014.
- 3) Yee A, Kretz CA: Von Willebrand factor: form for function. *Semin Thromb Hemost* **40**: 17-27, 2014.
- 4) Tobimatsu H, Nishibuchi Y, Sudo R, Goto S, Tanishita K: Adhesive Forces between A1 Domain of von Willebrand Factor and N-terminus Domain of Glycoprotein Iba α Measured by Atomic Force Microscopy. *J Atheroscler Thromb* 2015 in press.
- 5) Kim J, Zhang CZ, Zhang X, Springer TA: A mechanically stabilized receptor-ligand flex-bond important in the vasculature. *Nature* **466**: 992-995, 2010.
- 6) Kim J, Hudson NE, Springer TA: Force-induced on-rate switching and modulation by mutations in gain-of-function von Willebrand diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 4648-4653, 2015.
- 7) Shiozaki S, Ishikawa KL, Takagi S: Numerical study on platelet adhesion to vessel walls using the kinetic monte carlo method. *J Biomech Sci Eng* **7**: 275-293, 2011.
- 8) Bell GI: Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* **200**: 618-627, 1978.