藤村 吉博*

Yoshihiro FUJIMURA*

Key words: von Willebrand factor, platelet glycoprotein I b, II b/IIIa, factor V III

I. Multimeric 構造

正常ヒト血漿中の vWF を SDS agarose gel電気泳動法⁴⁾にて解析すると分子量 500 kDa 前後から $10-20 \times 10^3$ kDa と多岐にわたる multimeric 構造を持つことが明らかにされている。しかしながら分子内のジスルフィド結合 (SS 結合) を化学還元すると分子量ほぼ 270 kDa の均一蛋白からなる subunit となる。この subunit は後述の如く 2050 のアミノ酸配列からなりたっている⁵⁾。個々の multimer を形成しているバンドはショートゲル SDS agarose gel 電気泳動ではトリプレット構造をとり、ロングゲルの SDS agarose gel 電気泳動ではその倍の 5~6 本のバンドからなりたっているがその理由は不明である。一般に multimeric 構造の高いものほど、すなわち分子量の大きなもの程 *in vivo* での止血効果が高く、*in vitro* での種々 vWF 機能もよりアクティブである。

* 奈良県立医科大学附属病院輸血部 (〒634 奈良県橿原市四条町 840); Department of Blood Transfusion, Nara Medical College, Kashihara City, Shijyocho-840, Nara, Japan.

図 1 vWF subunit の生合成過程 (Coller et al.⁸⁾, 1987)

N末端とN末端(head-to-head)そしてC末端とC末端(tail-to-tail)の様式で結合し multimer を形成していることを明らかにした。

II. 生 合 成

vWF蛋白生合成の遺伝情報は第12番目の常染色体上に位置する⁷⁾。これに対応する mRNA は8.5-9 kbの長さを持ち、蛋白に翻訳されると2813のアミノ酸残基からなる pre-pro-vWF subunit となる⁸⁾(図1)。翻訳されると間もなく pre-pro-vWF は rough endoplasmic reticulum(RER) でC末端付近の SS 結合を介して dimer となる。その後、22個のアミノ酸残基よりなる signal peptide の遊離、糖側鎖付加、無機硫黄付加を経て pro-vWF dimer となる。これよりN末端から741個のアミノ酸残基よりなる propeptide (vW antigen

II) が分離する。これにて mature vWF subunit を構成するアミノ酸残基は2050個となる。

500 kDa~10-20×10³ kDa と多岐にわたる分子量形を示す vWF の multimer は pro-vWF dimer よりN末端付近の SS 結合が形成されて起こる。貯蔵は血管内皮細胞の Weibel-Palade 体で行われ、これより血漿中に分泌される。また分泌された vWF の一部は内皮細胞下組織の一つである extracellular matrix に結合した状態で存在する。一方、骨髓巨核球内で合成された vWF は血小板の α 顆粒に貯蔵され、血小板が刺激により活性化された時に放出される。

propeptide の切断が起こる部位と時期については当初、血管内皮細胞の膜表面で vWF が放出される時と考えられていたが、ごく最

近, propeptide のくっついた vWF (pro-vWF) が流血中に出現する型の von Willebrand 病型⁹⁾が発見されたので, 現在この説は否定されている。

川合ら¹⁰⁾は純化した分子量~100 kDa の propeptide (vW antigen II) は self-association を起こし易いという現象を発見し, これより pro-vWF dimer の段階で propeptide 部分が“ひき船”のような作用をする事により両 dimer は互いにN末端でSS結合を形成し, 重合体を構築してゆくのではないかと仮説を述べた。最近, この仮説は vWFcDNA (pMT2-vWF-WT: Bonthron ら¹¹⁾) のヌクレオチドの一部を実験室レベルで変化せしめ継代培養可能なサル腎細胞 (COS-1) で蛋白表現する手法 (oligonucleotide directed mutagenesis) を用いて証明された¹²⁾。すなわちプラスミド pMT2-vWF-WT (野性型) に見られる ⁻²Lys-⁻¹Arg-⁻¹Ser(KRS)を, ⁻²Lys-⁻¹Lys-⁻¹Ser(KKS)に変化せしめたプラスミド pMT2-vWF-KKS では培養細胞から分泌される vWF は WT (野性型) と同様 larger multimer を形成している。しかし propeptide 部を欠くプラスミド pMT2-vWF-ΔPro では mature vWF subunit は形成されるも, 重合は dimer の段階で停止し multimer は形成されない。

一方, プラスミド pMT2-vWF-ΔPro と mature vWF 部を欠くプラスミド pMT2-vWF-KRX をそれぞれ同じ COS-1 細胞に感染せしめ蛋白発現実験を行うと, おおのの単一 subunit の形成はもちろんのこと, WT (野性型) に見られる larger multimer の形成が見られた。細胞内での両プラスミドの再接合は実験レベルで否定されているので, これより multimer を形成するためには propeptide は mature vWF subunit と必ずしも同一分子上で連結している必要はないことが証明された。

III. vWF subunit の一次構造

ヒト vWF subunit を構成する 2050 のアミノ酸配列の全一次構造は千谷ら⁵⁾による蛋白生化学的手法, 及び Sadler ら^{13),14)}による分子クローニング法の双方より解明された。両者の結

図2 vWF subunit の反復 domain 構造 (A), cysteine 残基 (B), 及び糖側鎖付着部位 (C), 白丸は O-linked, 黒丸は N-linked 糖鎖を示す (Sadler¹⁵⁾, 1987)。

果は極く一部 (残基 7 および 709) を除き完全に一致した。一部の相違は遺伝子の多型性に基づくものと解釈されている。

Sadler¹⁵⁾は vWF subunit のアミノ酸配列のコンピューター解析を行ない, subunit 内の 90% 以上のアミノ酸配列は ABCD の 4 つの基本的な domain 構造の反復により成り立っていることを明らかにした。これら反復 domain 構造を図 2 に示す。

当初 vWF subunit のアミノ酸配列は極めて特異的で, 他の蛋白質との sequence homology (アミノ酸配列相同性) はないと考えられていたが, 後に補体の factor B について, そのアミノ酸配列 230-454 のうちほぼ 20% が vWF の A domain と homology を示すことが判明した。また最近, 山形ら¹⁶⁾によりニワトリ繊維芽細胞 cDNA ライブラリーより細胞外マトリックスを構築する一蛋白成分に相当する 6.4 kb の cDNA がクローン化され, このものが von Willebrand 因子の factor B 相同構造と, かつ fibronectin や tenascin に見られる type III フィンガー構造を有する所謂 chimera 蛋白であるという興味ある知見が報告されている。

図 3 mature vWF subunit 上の種々機能 domain と分子内ジスルフィド結合の位置関係 (Marti, et al., 1987¹⁷⁾ より改変).

図 4 vWF を SP-V8 で消化して生ずるフラグメントと, trypsin 及び subtilisin で二次分解して生ずる小フラグメントの模式図 (Titani and Walsh, 1988²⁶⁾).

vWF subunit のアミノ酸配列一次構造について極めて特異的と考えられる点は、その分子内に全アミノ酸組成の 8.3% に相当する大量の Cys が存在することである。図 2B に示す如く、Cys の位置はとりわけ N 末端に数多く分布し、中央部は比較的少ない。Marti ら¹⁷⁾ は最近、subunit の N 末端よりアミノ酸残基 1365 までに含まれる Cys 残基のうち 26 個の分子内 SS 結合の存在部位を明らかにした (図 3)。

vWF は約 18.7% (W/W) の糖鎖を含んでいるが、精製蛋白質を用いた解析から subunit 1 ヶ当り 12 ヶ所の Asn (N) 結合糖鎖と 10 ヶ

所の Thr/Ser (O) 結合糖鎖の結合位置が明らかとなった (図 2 C)。かかる大量の糖側鎖の存在が vWF 機能に果たす役割はまだ不明の点が多いが、Federici ら¹⁸⁾ は vWF の糖側鎖を種々のグリコシダーゼで除去すると multimer 構造は残っているが plasmin 等のプロテアーゼの影響を受けやすくなると報告している。

IV. vWF の構造と機能

この分野の研究は vWF subunit の一次構造の解明と相まって過去数年間に飛躍的進歩を

図5 vWF の trypsin 分解, そして還元・アルキル化後精製された 52/48 kDa フラグメントのアミノ酸配列(Titani et al 1986). 白丸は O-linked, 黒丸は N-linked 糖鎖を示す. 斜線部はリストセチン存在下に表現される vWF の GPIb 結合 domain のアミノ酸配列である.

遂げた¹⁹⁾. vWF の *in vivo* における役割は *in vitro* における次のような観察結果より想定される. 1) 血漿中において vWF は凝固第Ⅷ因子と複合体を形成して存在する. 2) 抗生物質の一種であるリストセチンならびに蛇毒ボトロセチンの存在下に vWF は血小板膜糖蛋白 GPIb に結合する. この反応には血小板代謝を必要としない. 3) 静止期の洗浄血小板を ADP やトロンビンで刺激活性化すると vWF は血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa に結合する. 4) vWF は血管内皮細胞下組織である collagen に結合する. また生理的機能は不明であるが heparin あるいは硫酸デキストラン等の陰性荷電を持つ物質とも強く結合する.

その他, Wagner ら²⁰⁾は vWF は培養された血管内皮細胞より分泌された extracellular matrix に固く結合していること, そしてその結合様式はコラゲナーゼで処理しても不変であることを, また Fauvel ら²¹⁾は牛大動脈のホモジェネートよりグアニジン可溶化分画を得, この中の微細繊維構造を持つ物質が vWF-GPIb 依存性の血小板凝集を引き起こすとの知見を報告し, このものが collagen とは異質のものであることを示している. 同様に vWF 結合能を有しコラゲナーゼ処理に不応性である分子量 150 kDa を示す蛋白が, Rand ら²²⁾によりヒト臍帯静脈から 2% SDS, 8M 尿素可溶性物質として抽出されている.

V. GPIb 結合 domain

1977 年 Zucker ら²³⁾は ¹²⁵I で標識した純化第Ⅷ因子/vWF 複合体がリストセチン存在下に血小板に結合し, 互いに血小板を凝集せしめる事を報告した. 鈴木ら²⁴⁾は第Ⅷ因子を解離した純化 vWF を β-mercaptoethanol 還元し, 分子量 ~220 kDa の subunit にするとリストセチン依存性の血小板凝集能は消失するが, 血小板への結合能は残っていることを証明した.

Girma ら²⁵⁾は vWF を staphylococcus protease V8(SP-V8) で酵素分解し, N末端由来の FⅢ (分子量 315 kDa) を得た. これは分子量 170 kDa の homodimer であったが, 彼等はこのポリペプチドがリストセチン存在下に GPIb に結合することを示した. これに対し, C末端由来の FⅡ (分子量 235 kDa) は 110 kDa の homodimer で, トロンビン刺激を受けた GPⅡb/Ⅲa に結合した. さらに長時間の分解にて monomeric の FⅠが FⅢより分離されることを認めた. これらポリペプチドのアミノ酸配列は FⅢ (アミノ酸残基 1~1365), FⅡ (残基 1366~2050), そして FⅠ (残基 911~1365) であった²⁶⁾ (図4).

著者ら²⁷⁾は vWF のトリプシン分解産物を還元・アルキル化処理し, HPLCクロマトフォーカシングカラムで精製することにより分子量 52/48 kDa の doublet ペプチドを得た. このペプチドはリストセチン依存性の ¹²⁵I-vWF の

図 6 vWF subunit 上のリストセチン依存性血小板膜 GPIIb 結合 domain の限局化。

GPIIb への結合を IC_{50} $0.52 \mu M$ で完全に抑制した。また, endo- β -N-acetylglucosaminidase F (endo F) で糖側鎖を 70% 除去すると 46 kDa の単一ペプチドになること, また doublet はそれぞれ同じ N 末端アミノ酸配列を持つことより, 分子量の差は糖側鎖の heterogeneity と考えられた。その後, このポリペプチドは vWF subunit の残基 449~728 に相当することを示した²⁸⁾(図 5)。新家ら²⁹⁾は最近, リストセチン存在下に ^{125}I -vWF の GPIIb への結合を $IC_{50} \sim 1 \mu g/ml$ で阻害する高アフィニティーを有する抗 vWF モノクローナル抗体 (NMC-4) を固相化したカラムを用い, これにて vWF のトリプシン分解産物の中より分子量 97 kDa の fragment を精製した。この蛋白のアミノ酸分析及び N 末端アミノ酸配列結果より, これが前述の 52/48 kDa fragment の homodimer であることが明らかとなった。以上, 蛋白質レベルでの競合的バインディングアッセイの結果ならびに NMC-4 のエピートープ解析とともに, vWF の GPIIb 結合 domain は subunit の残基 449-728 上にあることを示している。Marti ら¹⁷⁾は SP-V8 消化 FIII をトリプシンで二次分

解して得られたもう一つのポリペプチド III-T2 は vWF subunit の残基 273-511 の H 鎖と残基 674-728 の L 鎖がそれぞれ 2 ケつづ互いに SS 結合にて連結した homodimer であり, このポリペプチドは $100 \mu M$ の濃度でリストセチン依存性の vWF の GPIIb への結合を完全に抑制することを示した。著者³⁰⁾らはさらに monomeric 52/48 kDa fragment を Achromobacter protease I で Lys 残基を特異的に切断生じた 8 種のポリペプチドを HPLC 逆相カラムで精製し, N 末端由来の残基 449~549 及び C 末端由来の残基 674~728 の 2 つのポリペプチドがリストセチン依存性の vWF の GPIIb への結合を終濃度 $100 \mu M$ で完全に抑制することを示した。したがって GPIIb 結合 domain は両者のオーバーラップした非連続部位, 即ちアミノ酸残基 449-511 と 674-728 にあると思われる (図 6)。Marti ら¹⁷⁾は III-T2 分子内の 2 ケ所の SS 結合の位置を決定しているので, NMC-4 を用いた新家らの実験結果と照合すれば subunit の残基 459, 462, 464 に位置する Cys のうち 1 ケ又は 3 ケ所が subunit 間の SS 結合の形成に関与しているものと考えら

れる (図3)。

VI. GPIIb/IIIa 結合 domain

藤本ら³¹⁾は、トロンビンまたは ADP のようなアゴニストにても vWF が血小板に結合することを見出した。この反応はリストセチンの場合とは異なり、二価の陽イオン依存性で、血小板の代謝を必要とし、内的 ADP によって反応がより促進された。Ruggeri ら³²⁾はこの反応においては血小板膜の全く異なったレセプター部位、すなわち GPIIb/IIIa が関与していることを明らかにした。この結論は GPIIb/IIIa を先天性に欠く Glanzman 血小板無力症、そして GPIb を先天性に欠く Bernard-Soulier 症候群の患者より得られた血小板に対する vWF の結合様式を調べて見出されたものである。

一方、Fibronectin の細胞接着機構の研究を通じて 1984 年 Pierschbacher & Ruoslahti³³⁾によって4つのアミノ酸配列 Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) がこの機構に極めて重要であることが明らかにされた。間もなくこの RGDS 配列はいくつかの血漿蛋白に共通して存在することが明らかとなったが、Sadler ら¹³⁾、千谷ら⁵⁾はこれが vWF subunit の残基 1744~1747 にあることを発見した。Plow ら³⁴⁾はトリペプチドである RGD がその機能保持に重要であることを発見し、トロンビン刺激された血小板への fibrinogen, fibronectin および vWF の結合は二価の陽イオン依存性で、3つの蛋白質は同じ GPIIb/IIIa レセプターへの結合を競合することを明らかにした。

最近、Berliner & 新谷ら³⁵⁾は RGDS を含む vWF subunit の 15 アミノ酸残基 Glu¹⁷³⁷-Ser¹⁷⁵⁰ よりなる合成ペプチドを作り、これに対するポリクローナル、およびモノクローナル抗体を作成した所、おのおの1種の抗体が vWF の GPIIb/IIIa への結合を特異的に抑制するも、同じ RGDS 配列を有する蛋白である fibrinogen, fibronectin および vitronectin の GPIIb/IIIa への結合は全く阻害されないことを示した。また作成したペプチドを micro well plate に固相化し、これら2種の抗体の結合様

図7 血小板粘着反応の分子機作。

式を酵素免疫測定法 (ELISA) で調べた所、Pro¹⁷⁴³→Phe¹⁷⁴³に置換すると全く抗体が反応しなくなったことより、vWFに特異的な GPIIb/IIIa 結合 domain の conformational epitope を形作るものとして Pro¹⁷⁴³ の重要性を指摘した。

VII. Collagen 結合 domain

1984 年 Sixma ら³⁶⁾は vWF と collagen の相互作用を特異的にブロックする抗 vWF モノクローナル抗体 CLB-RAg 201 が 48 kDa (還元にて 58 kDa) の分子量を持つ vWF トリプシン分解産物を免疫沈降せしめることを報告した。同じグループの Houdijk ら³⁷⁾は ¹²⁵I-vWF をトリプシン分解し、得られた fragment の中で分子量 48 kDa のポリペプチドが選択的にヒト臍帯由来の type III collagen に結合することを示した。このポリペプチドは著者らが vWF をトリプシン分解し、還元・アルキル化した後 HPLC クロマトフォーカシングカラムで精製した 55 kDa fragment (残基 730-1114) と同一のものと考えられている。一方、Sakariassen ら³⁸⁾は vWF の SP-V8 分解で得られた N 末

端由来の F III は type I および III collagen に直接的に結合するが、C末端由来の F II は結合しないことを明らかにした。その後 Pareti ら³⁹⁾、そして Kalafatis ら⁴⁰⁾は F III より分離して生ずる F I (残基 911-1365) が同様の collagen 結合機能を有することを示した。これより collagen 結合 domain は両ペプチドのオーバーラップした部位、すなわち subunit の残基 911~1114 にあるものと考えられる。この domain 機能は SS 結合を化学還元すると消失した。一方、Pareti ら³⁹⁾は還元・アルキル化した 52/48 kDa のトリプシン分解産物、すなわち前述の GPIb 結合 domain、そして後述の heparin 結合 domain と同じ残基 449-728 のポリペプチドが牛腱鞘由来の酸不溶性微細繊維コラーゲン type I への vWF の結合を競合的に阻害するも、自然界に存在する型の type I および III collagen への vWF の結合は抑制しないことを示した。さらに Roth⁴¹⁾ らは還元・アルキル化した vWF subunit の CNBR 分解産物である残基 542-622 と 948-998 の2つの非連続ポリペプチドがペプシン消化した monomeric type III collagen への vWF の結合を抑制することを明らかにした。また2つのポリペプチド間には部分的な sequence homology が見られた。これらの結果より collagen 結合 domain がほぼ SP-V8 消化 F I 上にあることはほぼ疑う余地のないものと考えられるが、GPIb 結合 domain とオーバーラップする第2の collagen 結合 domain の機能的特異性に対する評価はまだ一定していない。

最近 Vink ら^{42,43)}は血小板粘着を完全に抑制する抗 vWF モノクローナル抗体 CLB-RAg38 のエピトープ解析を vWF cDNA を用いての蛋白発現手法にて行い、これが SP-V8 F II 上のアミノ酸残基 1365-1538 ないし 2004-2050 上にあることを示した。またこの抗体は vWF-collagen の相互作用は全く抑制しなかったことから血管内皮細胞下組織への vWF の結合には collagen 以外の未知物質が重要との知見が得られた。

VIII. heparin 結合 domain

vWF が heparin に結合するという知見は Madalas ら⁴⁴⁾によって最初報告された。著者ら²⁸⁾は heparin を固相化した Sepharose gel に ¹²⁵I-vWF を結合せしめるバインディングアッセイを確立し、SP-V8 分解にて得られる F III と還元・アルキル化した 52/48 kDa fragment (GPIb 結合 domain) の両方がこの vWF の結合を競合的に阻害することを証明した。さらにリストセチン依存性の vWF の GPIb への結合を抑制する抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-4 は、ほぼ同じ IgG 濃度で vWF の heparin-Sepharose への結合を抑制することが、最近新家ら²⁹⁾によって示された。このアッセイシステムにて Hamilton ら⁴⁵⁾の作成した vWF のプラスミン分解産物、32 kDa フラグメント (アミノ酸残基 1~298) もまた vWF の heparin への結合を抑制した。しかしその抑制効果 (モル濃度比較) は 52/48 kDa fragment よりはるかに弱かった。一方、¹²⁵I-vWF の heparin-Sepharose への結合は、純化した fibronectin によっても競合的に抑制されたことより、これら蛋白を結合せしめる heparin の部位は同じないし非常に近傍であると考えられる (著者ら、未発表)。

現時点では vWF の heparin 結合 domain の生理学的役割は不明である。

IX. 第 VIII 因子結合 domain

Foster ら⁴⁶⁾は純化 vWF をポリスチレンボールに固相化し、これに純化第 VIII 因子を一定量加え、同時に種々の vWF 由来の競合的リガンドを加えた後、¹²⁵I-抗第 VIII 因子モノクローナル抗体にて結合した残存第 VIII 因子蛋白を定量するという競合的阻止に基づくバインディングアッセイ法を確立し、vWF の SP-V8 分解で得られた F III がこの反応を阻止することを発見した。さらに Marti ら⁴⁷⁾は F III をトリプシンで二次分解し、得られた N 末端由来のアミノ酸残基 1~272 の monomeric フラグメント (III-T4) も同活性を有することを示した。同様に vWF subunit の N 末端にこの第 VIII 因子結合 domain

のあることを示す成績は高橋ら⁴⁷⁾, そして Koedam ら⁴⁸⁾によっても報告されている。

vWF が第Ⅷ因子と結合している生理学的理由として第Ⅷ因子の安定化作用とともに, 第Ⅷ因子の血管内皮細胞からの放出にも関与していると考えられている。前者について, Type III (homozygous) von Willebrand 病では vWF 蛋白の欠失と共に, 第Ⅷ因子活性も通常<10%と低い。それぞれの遺伝子が第12番目の常染色体上, および染色体上とかけ離れた所にあることを考え合わせると両遺伝子の同時欠失は考え難い。また臨床的に軽~中等症の von Willebrand 病患者に第Ⅷ因子/vWF 複合体濃縮製剤の注入を行うと第Ⅷ因子活性は期待値以上に上昇し, その持続期間も生物学的半減期をはるかに超えて長い。これより vWF は細胞内で合成された第Ⅷ因子の流血中への放出促進にも寄与しているのではないかと思われる。

X. 血小板粘着反応の分子機作

血小板は直接 collagen と反応する作用を有しているが, 循環血液中のような high shear rate での血小板の血管壁への粘着反応には前述の如く vWF が重要である。この過程を今迄の知見を基に模式的に示すと 図 7 の如くで, 生理的循環状態での血中では血小板と反応しない vWF multimer は, 一旦傷害を受け内皮細胞下組織が露出した血管壁と接触すると collagen 結合 domain またはC末端側の内皮細胞下未知物質との結合 domain を介して血管壁に結合することによりN末端側の conformational change が起こり, 本来 mask された状態にある GPIIb 結合 domain が“expose”される。この部位に血小板膜の GPIIb が結合し, 血小板が血管壁に接着する反応が“粘着”であり, このシグナルにより GPIIb/IIIa receptor が活性化され, この部位に fibrinogen の結合が起こる。これに energy 依存性の血小板同士の間接結合反応が加味されることにより“凝集”という過程を生ずる。

これが血小板血栓の形成すなわち一次止血と理解される。これより vWF の“分子糊”としての作用を阻止する方法を開発することによ

り強力な抗血栓剤の開発が期待される。これにはさしあたり合成ペプチドによる競合阻害またはモノクローナル抗体による反応阻止が有望視されている。

文 献

- 1) Bloom, A.L., Giddings, J.C. and Wilke, C.J.: Factor VIII on the vascular intima: possible importance in haemostasis and thrombosis. *Nature*, **241**; 217~219, 1973.
- 2) Jaffe, E.A., Hoyer, L.W. and Nachman, R.L.: Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, **52**; 2757~2764, 1973.
- 3) Nachman, R.L., Levine, R., and Jaffe, E.A.: Synthesis of factor antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J. Clin. Invest.*, **60**; 914~921, 1977.
- 4) Ruggeri, Z.M. and Zimmerman, T.S.: von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood*, **70**; 895~904, 1987.
- 5) Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Ashida, K., Walsh, K.A., Chopek, M.W., Sadler, J.E. and Fujikawa, K.: Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*, **25**; 3171~3184, 1986.
- 6) Fretto, L.J., Fowler, W.E., McCaslin, D.R., Erickson, H.P., McKee, P.A.: Substructure of human von Willebrand factor. Proteolysis by V8 and characterization of two functional domains. *J. Biol. Chem.*, **261**; 15679~15689, 1986.
- 7) Ginsburg, D., Handin, R.I., Bonthron, D.T., Donlon, T.A., Bruns, G.A.P., Latt, S.A., and Orkin, S.H.: Human von Willebrand factor (vWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosome localization. *Science*, **228**; 1401~1406, 1985.
- 8) Collier, B.S.: von Willebrand disease; Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. eds. by Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, and Salzman EW. pp. 60~209, Lippincott, Philadelphia, 1987.
- 9) Montgomery, R.R., Dent, J., Schmidt, W., Kyrle, P., Niessner, H., Ruggeri, Z.M. and

- Zimmerman, T.S.: Hereditary persistence of circulating, pro-von Willebrand factor (pro-vWF). *Circulation (Suppl. II)*, **74**; 406, 1986.
- 10) Kawai, Y., Mosesson, M. W., Schmidt, W., Vokac, E., Schullek, J., Montgomery, R.R.: The self-association of vWF: Ag II in plasma, platelet releasate, and endothelial cell lysate. The american heart association's 59th scientific sessions. Abstract (1620), 1986.
  - 11) Bonthron, D.T., Handin, R.I., Kaufman, R.J., Wasley, L. C., Orr, E. C., Mitsock, L. M., Ewenstein, B., Loscalzo, J., Ginsburg, D. and Orkin, S.H.: Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature*, **234**; 270~273, 1986.
  - 12) Wise, R. J., Pittman, D. D., Handin, R. I., Kaufman, R. J. and Orkin, S. H.: The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers. *Cell*, **52**; 229~236, 1988.
  - 13) Sadler, J. E., Shelton-Inloes, B. B., Sorace, J. M., Harlan, J. M., Titani, K. and Davie, E. W.: Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**; 6394~6398, 1985.
  - 14) Shelton-Inloes, B. B., Titani, K. and Sadler, J. E.: cDNA sequences for human von Willebrand factor reveal five types of repeated domains and five possible protein sequence polymorphisms. *Biochemistry*, **25**; 3164~3171, 1986.
  - 15) Sadler, J. E.: Molecular biology of von Willebrand factor; Thrombosis and haemostasis 1987, pp.61~79, 1987.
  - 17) Marti, T., Rosselet, S. J., Titani, K. and Walsh, K. A.: Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry*, **26**; 8099~8109, 1987.
  - 18) Federici, A. B., Elder, J. H., De Marco, L., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: Carbohydrate moiety of von Willebrand factor is not necessary for maintaining multimeric structure and ristocetin cofactor activity but protects from proteolytic degradation. *J. Clin. Invest.*, **74**; 2049~2055.
  - 19) Fujimura, Y., Ruggeri, Z.M. and Zimmerman, T.S.: Structure and function of human von Willebrand factor; Coagulation and bleeding disorders: the role of factor and von Willebrand factor, pp.77-97. eds. by Zimmerman TS & Ruggeri ZM, Marcel Dekker Inc., N.Y., 1989.
  - 20) Wagner, D. D., Urban-Pickering, M. and Marder, V.J.: von Willebrand protein binds to extracellular matrices independently of collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**; 471~475, 1984.
  - 21) Fauvel, F., Grant, M. E., Legrand, Y. J., Souchon, H., Tobelem, G., Jackson, D.S. and Caen, J. P.: Interaction of blood platelets with a microfibrillar extract from adult bovine aorta: requirements for von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**; 551~554, 1983.
  - 22) Rand, J. H., Chu, S. V., Patel, N. D. and Potter, B. J.: Binding of von Willebrand factor (vWF) to human vascular subendothelium (SE). Quantitative binding studies and the isolation and partial characterization of a vWF binding protein. *Blood Suppl. Abstract (1483)*, 1987.
  - 23) Zucker, M.B., Kim, S.-J., Mcpherson, J. and Grant, R. A.: Binding of factor VIII to platelets in the presence of ristocetin. *Br. J. Haematol.*, **35**; 535~549, 1977.
  - 24) Suzuki, K., Nishioka, J. and Hashimoto, S.: The influence of 2-mercaptoethanol on the von Willebrand factor and bovine platelet aggregating factor. *Thromb. Res.*, **17**; 443~452, 1980.
  - 25) Girma, J. P., Chopek, M. W., Titani, K. and Davie, E. H.: Limited proteolysis of human von Willebrand factor by staphylococcus aureus V-8 protease. Isolation and partial characterization of a platelet binding domain. *Biochemistry*, **25**; 3156~3163, 1986.
  - 26) Titani, K. and Walsh, K. A.: Human von Willebrand factor: the molecular glue of platelet plugs. *TIBS*, **13**; 94~97, 1988.

- 27) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. C., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: von Willebrand factor; a reduced and alkylated 52/48 KDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.*, **261**; 381~385, 1986.
- 28) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Roberts, J. R., Kostel, P., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. *J. Biol. Chem.*, **262**; 1734~1739, 1987.
- 29) 新家 興, 藤村吉博, 中井寛明, 高瀬俊夫, 吉岡 章, 福井 弘, 千谷晃一, 小山理恵子, 宇佐美好子: リストセチン血小板凝集を抑制する抗 vWF モノクローナル抗体 (NMC-4) のエピトープ解析・第 11 回 日本血栓止血学会誌抄録 (187), 1988 年.
- 30) 新家 興, 藤村吉博, 西尾健治, 嶋 緑倫, 吉岡 章, 福井 弘, 千谷晃一, 宇佐美好子: vWF-52/48 kDa 及び 97 kDa fragment の酵素処理物によるリストセチ依存性 GPIb 結合ドメインの検討. 第 51 回日本血液学会総会誌抄録, 1989 年.
- 31) Fujimoto, T., Ohara, S. and Hawiger, J.: Thrombin-induced exposure and prostacyclin inhibition of the receptor for factor VIII/von Willebrand factor on human platelets. *J. Clin. Invest.*, **69**; 1212~1222, 1982.
- 32) Ruggeri, Z. M., Bader, R., De, Marco, L.: Glanzman thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**; 6038~6041, 1982.
- 33) Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, **309**; 30~33, 1984.
- 34) Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. A. and Ginsberg, M. H.: The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**; 8057~8061, 1985.
- 35) Berliner, S., Niiya, K., Roberts, J. R., Houghten, R. A. and Ruggeri, Z. M.: Generation and characterization of peptide-specific antibodies that inhibit von Willebrand factor binding to glycoprotein IIb-IIIa without interacting with other adhesive molecules. *J. Biol. Chem.*, **263**; 7500~7505, 1988.
- 36) Sixma, J. J., Sakariassen, K. S., Stel, H. V., Houdijk, W. P. M., In der Maur DW, Hamer RJ, de Groot PhD, and van Mourik JA: Functional domains on von Willebrand factor. Recognition of discrete tryptic fragments by monoclonal antibodies that inhibit interaction of von Willebrand factor with platelets and with collagen. *J. Clin. Invest.*, **74**; 736~744, 1984.
- 37) Houdijk, W. P. M., Schiphorst, M. E. and Sixma, J. J.: Identification of functional domains on von Willebrand factor by binding of tryptic fragments to collagen and to platelets in the presence of ristocetin. *Blood*, **67**; 1498~1503, 1986.
- 38) Sakariassen, K. S., Fressinaud, E., Girma, J.-P., Baumgartner, H. R. and Meyer, D.: Mediation of platelet adhesion to fibrillar collagen in flowing blood by a proteolytic fragment of human von Willebrand factor. *Blood*, **67**; 1515~1518, 1986.
- 39) Pareti, F. I., Niiya, K., Kostel, P. J., McPherson, J. M. and Ruggeri, Z. M.: Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J. Biol. Chem.*, **262**; 13835~13841, 1987.
- 40) Kalafatis, M., Takahashi, Y., Girma, J.-P. and Meyer, D.: Localization of a collagen interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues gly-911 and glu-1365. *Blood*, **70**; 1577~1583, 1987.
- 41) Roth, G. J., Titani, K., Hoyer, L. W., Hickey, M. J.: Localization of binding sites within human von Willebrand factor for monomeric type III collagen. *Biochemistry*, **25**; 8537~8561, 1986.

- 42) Vink, T., Schiphorst, M., van Mourik, J.A., Sixma, J.J., de Groot, P.G.: The primary binding site of von Willebrand factor in the subendothelium is not collagen. The 2nd Bari International Conference on factor VIII/von Willebrand factor Biological and Clinical Advances. Abstract: p.9, 1988.
- 43) de Groot, P.G., Ottenhof-Rovers, M., van Mourik, J.A., Sixma, J.J.: Evidence that the primary binding site of von Willebrand factor that mediates platelet adhesion on subendothelium is not collagen. J.Clin. Invest., **82**; 65~73, 1988.
- 44) Madalas, F., Bell, W.R., and Castaldi, P.A.: Isolation and insolubilization of human FVIII by affinity chromatography. Haemostasis, **7**; 321~331, 1978.
- 45) Hamilton, K. K., Fretto, L. J., Grierson, D. S. and McKee, P. A.: Effects of plasmin on vWF multimers. Degradation *in vitro* and stimulation of release *in vivo*. J.Clin. Invest., **76**; 261~270, 1985.
- 46) Foster, P.A., Fulcher, C.A., Marti, T., Titani, K. and Zimmerman, T. S.: A major factor VIII binding domain resides within the aminoterminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. J.Biol. Chem., **262**; 8443~8446, 1987.
- 47) Takahashi, Y., Girma, J.-P., Kalafatis, M., Sewerin, K., Andersson, L.-O. and Meyer, D.: Localization of a factor binding domain on the N-terminal portion (Fragment SpIII) of von Willebrand factor. Thrombosis and haemostasis. Abstract (77), 1987.
- 48) Koedam, J. A., Hamer, R. J., Beeser-Visser, N. H., Tjoen. San, E. J., Schippers, K, and Sixma, J.J.: The interaction between factor VIII and von Willebrand factor. Thrombosis and haemostasis. Abstract (1972), 1987.
-