

Type II A 及び II B von Willebrand 因子と精製蛇毒 Botrocetin の相互作用に関する研究

奈良県立医科大学小児科学教室

金 田 美喜夫

STUDIES ON THE INTERACTION BETWEEN PURIFIED BOTROCETIN AND VARIANT FORMS OF VON WILLEBRAND FACTOR (TYPE II A AND TYPE II B)

MIKIO KANEDA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received March 18, 1992

Summary: Recent studies demonstrate that purified botrocetin, a protein isolated from the venom of the snake *Bothrops jararaca*, initiates binding of von Willebrand factor (vWF) to platelet glycoprotein (GP) Ib similarly to the antibiotic ristocetin. More precisely, botrocetin binds to the GPIb binding domain of constituent vWF subunit (amino acid residue 449-728), and forms an "activated complex" with vWF, which then binds to platelet GPIb.

The present report indicates that purified botrocetin binds to vWF from plasmas of patients with two variant forms of von Willebrand disease, IIA and IIB, and that its interaction is indistinguishable from that with vWF from normal individuals. However, an "activated complex" formed between botrocetin and IIB vWF expresses an enhanced biological activity for binding to GPIb, whereas the complex with IIA vWF has decreased binding activity. Among several anti-vWF monoclonal antibodies (MoAb) which inhibit ristocetin-induced platelet aggregation and/or vWF binding to GPIb, only two MoAbs (NMC-4 and PFF VIII RAG : 1) abolished direct binding between botrocetin and vWF. This suggests that they recognize an epitope on the vWF molecule in close proximity to the botrocetin binding site (s).

Index Terms

botrocetin, von Willebrand factor (vWF), glycoprotein Ib

緒 言

von Willebrand factor(vWF)はヒト染色体No.12 短腕先端上の vWF 遺伝子の支配をうけ血管内皮細胞および骨髄巨核球内で合成される糖蛋白質である。ヒト血漿中では、vWF は分子量 270 kDa の subunit が種々に重合し $0.5 \times 10^3 \sim 20 \times 10^3$ kDa にいたる multimer series の状態で存在し、且つ、凝固第VIII因子(F. VIII)と非共有結合

による複合体を形成している¹⁾。vWF の subunit の一次構造は Sadler ら²⁾(1985)の cDNA 解析および千谷ら³⁾(1986)による蛋白生化学的手法により解析され、2050 個のアミノ酸配列より構成されることが明らかにされた。vWF subunit は機能面よりアミノ酸残基 1~272 の部は F. VIII との結合 domain⁴⁾⁵⁾、449~728 の部は血小板膜上の glycoprotein(Gp)Ib 結合ならびに heparin 結合 domain⁶⁾⁻¹⁰⁾で、911~1114 の部は collagen 結合

domain¹¹⁾¹²⁾, 1744~1747のArg-Gly-Asp-Ser(RGDS)配列部はGP II b/III aとの結合domain²¹⁾¹³⁾であることが知られるようになった。

vWFの先天性機能障害に基づく出血性疾患はvon Willebrand病(vWD)と呼ばれるが、患者血漿中のvWF蛋白の抗原量(vWF: Ag)およびvWF multimersのパターンから1. vWF: Ag量は低下するもmultimerの各seriesは正常と同様に存在するType I, 2. vWF: Ag量は必ずしも低下しないがmultimer構造に異常がみられるType II, 3. vWF: Agが欠如し、すべてのmultimerを欠くType IIIに大別される。

vWDの診断は遺伝関係、出血症状に加えて、検査上抗生物質の一種ristocetinによる患者血小板多血漿の凝集反応(ristocetin-induced platelet aggregation, RIPA)とRIPAにもとづいた患者血漿の凝集能(ristocetin cofactor)測定、vWF: AgならびにvWF multimerパターンの観察が必要である。vWDのうちType IIはvWF蛋白の質的異常の病型で現在までにA~Hまでの亜型が知られているが、そのうちType II Aは最も頻度が高くRIPAの著しい低下を特徴とする。またType II BはRIPAの亢進を特徴とする病型である¹⁾。

RIPAに関与する血小板側のreceptorは血小板膜上のGPIbで一方、血漿因子はvWFである。この反応に関与するvWF機能domainはvWF subunit組成中のアミノ酸残基449~728番に相当する52/48 kDa fragmentであることがFujimura et al. (1987)⁹⁾により明らかにされた。

Ristocetinとよく似てヒト血小板多血漿を凝集せしめる物質としてRead et al. (1978)¹⁴⁾はBothrops jararaca種の蛇毒よりbotrocetinを精製した。Fujimura et al. (1987)⁹⁾はbotrocetinによる血小板凝集も52/48 kDa fragmentを介することを報告した。教室の西尾はホルマリン固定血小板を用いてbotrocetin存在下の血漿中vWF活性(Botrocetin cofactor)測定法を開発し、更に血漿中vWFの血小板GPIbへの結合能を検討しristocetinならびにbotrocetin存在下血小板結合能はType II A vWDでは低下しType II Bでは亢進していることを報告した¹⁵⁾¹⁶⁾。最近Read et al.¹⁷⁾は高度に純化したbotrocetinはvWFと活性型複合体を形成すること、またAndrews¹⁸⁾らは純化した2本鎖botrocetinはGPIb結合domain(アミノ酸残基449~728)に結合することを観察した。藤村、宇佐見らは¹⁹⁾²⁰⁾、一本鎖、二本鎖の異なる二種類のbotrocetinを純化し、その全アミノ酸構造を決定し、二本鎖botrocetinは一本鎖botrocetinに比し約30倍強い比活性を示し、両botrocetinはvWF

と液相で活性化複合体を形成することを報告した。

著者は高度純化二本鎖botrocetinを用いて、Type II AおよびII B vWD患者血漿中のvWF, botrocetinとGPIb結合domainの相互作用について検討した。

試材および方法

1) 対象: von Willebrand病Type II A 2例, Type II B 3例, 健康成人男子5名, 女子5名について検索した。

2) 血漿: プラスチック製ディスボザブル注機器に21 G注射針を接続し、健康成人, vWD患者の各々肘静脈よりすみやかに採取した全血9容を直ちに3.8%クエン酸ナトリウム1容の入ったプラスチック製試験管に加え、さらにprotease inhibitorとして終濃度1 mM leupeptin, 5 mM NEM, 5 mM EDTA, 200 KI unit/ml aprotininを加え混和し、3000回転15分間遠心し血漿を得た。これらの血漿を少量ずつプラスチックチューブに分注し、用に臨むまで-80℃で保存した。

3) vWFの純化: クリオプレチビレートよりのvWFの純化はFujimura et al.の方法⁹⁾により作製した。

4) Botrocetinの純化: 粗製Bothrops jararaca venom(Sigma Co.)からの二本鎖botrocetinの純化はFujimura et al.の方法²⁰⁾に準じ、以下の方法にて作製した。Bothrops jararaca粗毒を出発材料としDEAE-Sephacel CL-6Bにて0.1 Mから0.7 M食塩で直線勾配溶出をおこない、トロンビン活性がなく血小板凝集活性の認められた分画をブールし、直接Syn Chromapack RP-8逆相クロマトグラフィーにて精製し、純化二本鎖botrocetinを得た。この純化二本鎖botrocetinはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法では還元前27 kDaの一本バンドで、還元後は15/14.5 kDaのdoubletsを示した。

5) ホルマリン固定血小板の作成: 健康成人より採取した全血より、西尾の方法¹⁵⁾によりホルマリン固定血小板を作製した。血小板数 $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ となるよう調整し、4℃保存した。

6) 抗vWFマウスモノクローナル抗体(MoAb): vWFに対する5種のMoAbを用いた。このうち、NMC-4は教室の嶋ら²¹⁾により作製され、RFF-VIII RAG:1はDr. Tuddenham(英国, Clinical Research Center)より恵与されたが、いずれもvWFのGPIb結合domain(アミノ酸残基449~728)を認識し、ristocetin及びbotrocetinによるvWFとGPIbとの結合反応を阻害するMoAbである¹⁰⁾。RG-46及び52 K-8はDr. Zimmerman(Scripps clinic, USA)より提供を受けたが、こ

れらは GPIb 結合 domain の N 末側(アミノ酸残基 449-549)及び C 末側(アミノ酸残基 674-728)を各々認識し、いずれも ristocetin により vWF-GPIb 結合反応は阻害するものの、botrocetin による vWF-GPIb 結合反応は阻害しない MoAb である⁶⁾⁹⁾¹⁰⁾。40-1 は片山政彦氏(宝酒造株式会社、大津市)より供与を受けたが、vWF subunit の C 末端側(アミノ酸残基 1926-2050)を認識し ristocetin 及び botrocetin 惹起血小板凝集、collagen 結合、血小板 II b / III a への結合および F. VIII 結合等の既知の vWF 機能に全く影響を与えない性状のものであった²²⁾。これら各 MoAb は、Protein A-Sepharose CL-6B カラムを用いて、Ey et al.²³⁾の方法に準じて IgG 分画を作製した。

7) Iodination: vWF の機能をおさえずに vWF を標識する目的で、MoAb 40-1 を Fraker and Speck の方法²⁴⁾に準じ、Iodogen 法にて¹²⁵I 標識を行った。¹²⁵I 標識した 40-1 の比活性は 0.64×10^9 cpm/mg であった。

8) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いた。vWF: Ag の測定: 抗 vWF 家兎ポリクロナール抗体を固相化一次抗体とし、抗 vWF MoAb 40-1 を Nakane and Pierce²⁵⁾の方法に準じて作製した peroxidase 標識二次抗体とし、o-phenylenediamine を発色基質として用いたサンドイッチ ELISA にて vWF: Ab を測定した。

9) Botrocetin-vWF 活性型複合体の血小板膜 GPIb との結合能測定: 被検血漿 $70 \mu\text{l}$ 、^[125 I] 40-1 $10 \mu\text{l}$ (0.64 cpm)、インヒビターカクテル $20 \mu\text{l}$ (10 mM EDTA-2 Na, 10 u/ml ヒルジン, 20 mM 塩酸ベンザミジン及び 10 mM ロイペプチン, pH 7.35) をエッペンドルフチューブ内で混和し、37°C 2 時間インキュベートし血漿中 vWF を ^[125 I] 40-1 で間接的にラベルした。次に、ホルマリン固定血小板 $12.5 \mu\text{l}$ (10^9 /ml) と botrocetin $12.5 \mu\text{l}$ を終濃度 3, 5, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え混合し、30 分間室温放置した。溶液を 2 分して、20% sucrose を $300 \mu\text{l}$ 入れたサルステッドチューブに $50 \mu\text{l}$ ずつ重層し、さらに 12,000 回転/分 5 分間遠心し、沈渣部分をペンチでカットし、ガンマカウンターにて放射活性を測定した。非特異的血小板結合能として、測定系に 50 倍過量の非標識 40-1 を添加したときの放射活性を上記測定値より差引、その血漿中の botrocetin-vWF 活性型複合体の結合能とした。

10) Biotin 標識二本鎖 botrocetin の作製: 純化二本鎖 botrocetin (300 μg) を 0.1 M NaHCO₃ で 4°C にて一昼夜透析後、dimethyl sulfoxide で溶解した NHS-LC-biotin と等量(w/w)混合し、室温暗所で 4 時間放置し

た。次いで、20 mM hepes buffered saline (pH 7.4) で再び 4°C にて一昼夜透析し、biotin 標識 botrocetin を得た。これを少量ずつプラスチックチューブに分注し、用いるまで -80°C で保存した。

11) Biotin 標識二本鎖 botrocetin の vWF への直接的結合能の測定: 抗 vWF 家兎ポリクロナール抗体を終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 50 mM 重炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈し、ポリスチレン製 microtiter well (Nunc, Denmark) に $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、4°C にて一昼夜コーティングし、一次抗体を固相化した。次いで、各 well を $200 \mu\text{l}$ ずつの 0.1% Nonidet P-40 含 20 mM hepes buffered saline (HBS/NP-40) にて 3 回洗浄し、洗浄液を十分取り除いた後、同量の 4% bovine serum albumin (BSA) 含 0.1 M 重炭酸緩衝液 (pH 9.6) を分注し、室温一時間ブロッキングし、HBS/NP-40 で 3 回洗浄した。段階希釈した正常プール血漿あるいは患者血漿を各々 $100 \mu\text{l}$ と biotin 標識 botrocetin $20 \mu\text{l}$ (終濃度 $1 \mu\text{l}$) をエッペンドルフチューブ内で混和し、2 時間放置した後、溶液を 2 分して $50 \mu\text{l}$ ずつ well に添外し、室温にて 30 分間放置した。さらに洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、peroxidase 結合 streptavidin を終濃度 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 1% BSA 含 HBS/NP-40 で希釈し、各々 $50 \mu\text{l}$ well に加え室温で 20 分間放置した後、再び洗浄し、o-phenylenediamine (1 mg/ml) を発色基質として用い、492 nm で吸光度を測定した。この測定値を biotin 標識二本鎖 botrocetin-vWF 複合体の量とした。

12) N 末端アミノ酸分析: Applied Biosystems 470A Protein Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて N 末端アミノ酸分析を行った。

13) Electrophoresis: SDS-Polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE), Western blotting 法、オートラジオグラフィは Fujimura et al. の方法¹⁰⁾ に準じて行った。

成 績

1. Botrocetin-vWF 複合体形成とその血小板膜 GPIb 結合能

二本鎖 botrocetin と血漿中 vWF の複合体形成物の血小板 GPIb との結合能について次のごとく検索した。まず vWF subunit の C 末端側を認識して血小板機能には影響を与えず、さらに対象となるすべての vWF subtype の vWF subunit に同等に高いアフィニティを示す MoAb 40-1 を¹²⁵I 標識し被検血漿と混和して、血漿中 vWF を間接的にラベルした。次いで、二本鎖 botrocetin を添加し、vWF subunit と反応させ GPIb 結

合 domain を露出させることによって、ホルマリン固定血小板の凝集を惹起せしめ、血小板と結合した¹²⁵I-vWF をガンマカウンターで測定し% [¹²⁵I] 結合を求めた。

正常血漿との反応では botrocetin 濃度 1 ~ 30 μg/ml

ml まで濃度依存性に血小板 GPIb との結合は増加したが、30 ~ 50 μg/ml ではほぼプラトーに達した。測定系に botrocetin 惹起血小板凝集を完全に抑制する NMC-4 を終濃度 50 μg/ml 加えた場合、botrocetin 濃度を 50 μg/ml にしても放射活性(血小板結合)の上昇は認めら

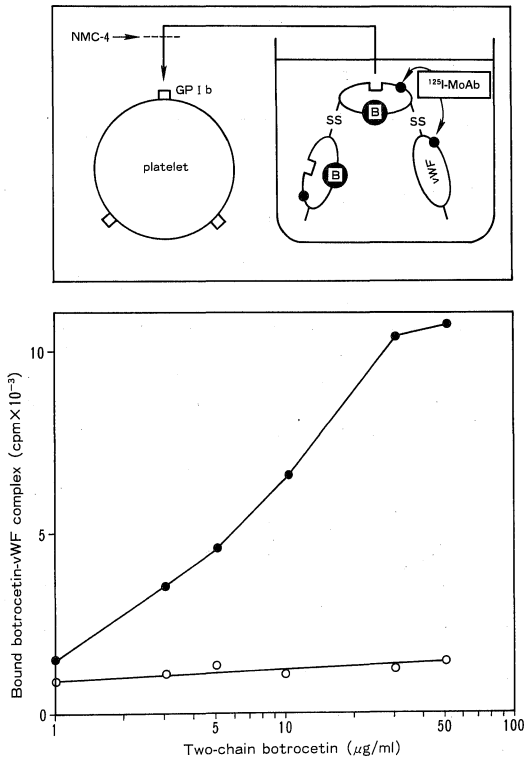


Fig. 1. Formation of an activated botrocetin-vWF complex and its binding to platelet GPIb.

Top panel shows a schematic representation of this assay, in which botrocetin forms an activated complex with vWF indirectly radiolabeled with ¹²⁵I-anti-vWF MoAb 40-1 (IgG), and then the complex binds to GPIb. Bottom panel shows that the amount of this binding is strictly dependent on the concentration of purified botrocetin (indicated as closed circles). The binding was totally blocked in the presence of an anti-vWF MoAb NMC-4 (IgG, 50 μg/ml) (indicated as open circles).

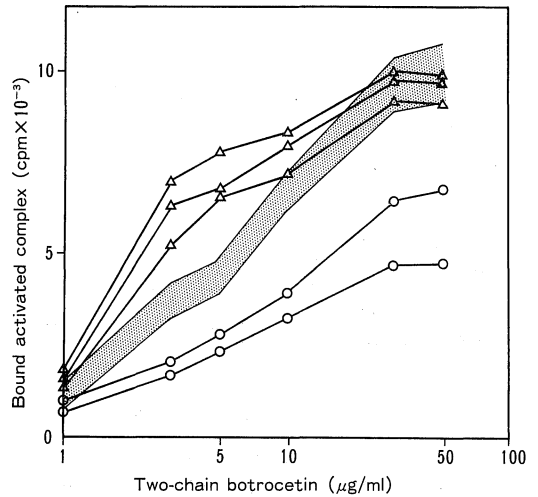


Fig. 2. Botrocetin-induced binding of [¹²⁵I]-MoAb 40-1 labeled vWF to platelet GPIb in ten normal plasmas. three II B plasmas and two II A plasmas.

[¹²⁵I]-MoAb 40-1 (IgG), various plasmas (vWF antigen preadjusted to 55%), and serially diluted purified two-chain botrocetin in the presence of protease inhibitor incubated and the plateletbound radioactivity was determined. The dotted area indicates the range of results from 10 normal plasmas. Open triangles show results from three plasmas with type II B vWD, open circles two type II A vWD.

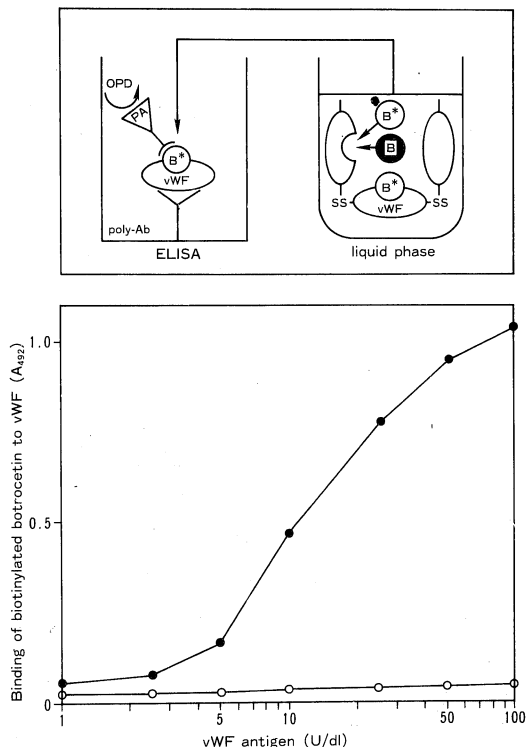


Fig. 3. Direct binding of biotinylated two-chain botrocetin to vWF.

Top panel presents a schematic representation of the assay. In liquid phase, biotinylated two-chain botrocetin (star mark) binds to vWF, and then the "activated" vWF-botrocetin complex captured in polystyrene wells through anti-vWF polyclonal antibody. The measurement of the complex bound to the wells based on biotin-avidin ELISA system. Bottom panel indicates a typical examination of this assay using normal plasma. The intensity of absorbance at 492 nm is clearly dependent on the amount of vWF antigen (indicated as closed circles). Non-specific binding can be measured in the presence of 50-fold excess of unlabeled botrocetin (as open circles).

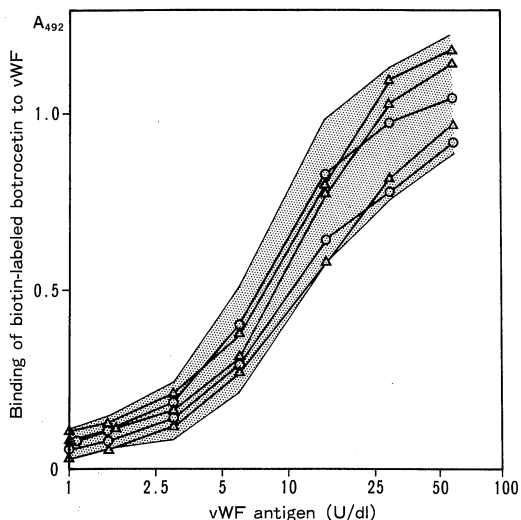


Fig. 4. Direct binding of biotinylated two-chain botrocetin to vWF from normal individuals and II A or II B vWD patients.

The binding ability of various plasmas (vWF antigen preadjusted to 55%) with purified two-chain botrocetin were tested. Dotted area indicates the range of results from 10 normal plasmas. Open triangles show results from three plasmas with type II B vWD, open circles two type II A vWD.

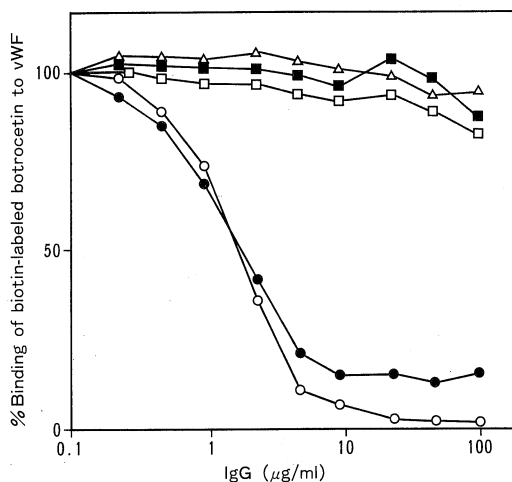


Fig. 5. Incibitory effect of anti-vWF Moabs on the formation of "activated" two-chain botrocetin and vWF complex.

The binding assay utilizing biotinylated botrocetin was used, where purified vWF was used instead of normal plasma. Open circles show MoAb NMC-4, closed circles MoAb RFF VIII RAG : 1, open squares MoAb 52K-8, closed squares MaAb RG 46, and open triangles anti-thyroglobulins MoAb.

れなかった(Fig. 1).

健常成人 10 例及び vWD Type II A 2 名, Type II B 3 名について血漿中 vWF の二本鎖 botrocetin 複合体と血小板 GPIb との結合能を検討した. 測定前に, 各血漿中の vWF: Ag 量を 50 U/dl(MoAb40-1 を用いた ELISA にて測定)に 4% BSA 含 HBS にて希釈し調整した. Type II B では botrocetin 濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低濃度で結合能の亢進がみとめられ, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度では正常の結合能を示した. 一方, Type II A では botrocetin のほぼすべての濃度で著明な結合能の低下が認められた(Fig. 2).

2. Biotin 標識二本鎖 botrocetin の vWF への直接的結合能

液相で vWF と biotin 標識 botrocetin を反応させ, この botrocetin-vWF 複合体を, 抗 vWF 家兎ポリクロナール抗体を固相化した well に補足せしめ, そこに peroxidase 結合 streptavidin を結合させ, o-phenyleniamine を発色基質として用い 492 nm にて吸光度を測定して, 血漿中の vWF への botrocetin の直接結合能とした. 正常血漿中の vWF への botrocetin の直接結合能は vWF 濃度依存性に増加した(Fig. 3).

健常成人 10 例及び vWD 各病型(Type II A 2 名, Type II B 3 名)について vWF への botrocetin の直接結合能を検討した. 測定前に, 各血漿中の vWF: Ag 量を 50 U/dl(MoAb 40-1 ELISA にて測定)に 4% BSA 含 HBS にて希釈し調整した. Type II A, Type II B いずれにおいても biotin 標識二本鎖 botrocetin の vWF への直接的結合能は vWF 濃度依存性に増加し, その測定値は正常範囲内であった(Fig. 4).

3. 二本鎖 botrocetin の vWF への直接的結合に対する vWF モノクロナール抗体の抑制効果

Biotin 標識二本鎖 botrocetin の vWF への直接的結合能の測定系において正常人血漿の代わりに純化 vWF (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用い, 競合リガンドとして抗 vWF MoAb(NMC-4, RFF-VIII RAG: 1, RG46, 52K-8) を, 対照として抗ヒトサイグロブリンモノクロナール抗体を段階希釈として測定系に加えて行った. 100% 結合は競合リガンドとしての IgG をまったく測定系に加えないときの測定値とした.

NMC-4 は終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上にて 98% の結合抑制をしめしたが, RFF-VIII RAG: 1 は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 80% 阻害され部分的に抑制されるにすぎなかった. また, RG-46 および 52 K-8 では 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においても全く抑制されなかった(Fig. 5).

考 案

近年, vWF-GPIb 結合反応を定量的に再現し, その相互作用機序の解明のために Bothrops jararaca 種の蛇毒より精製された botrocetin が有用な試剤として注目されるようになってきている¹⁴⁾⁻²⁰⁾. 教室の西尾ら¹⁶⁾は ristocetin と同様に botrocetin 存在下血小板結合能は Type II A では減少し, Type II B においては亢進していることを観察した. 藤村ら¹⁹⁾²⁰⁾は一本鎖, 二本鎖の異なる二種類の botrocetin を純化し, その全アミノ酸構造を決定し, 二本鎖 botrocetin は一本鎖 botrocetin に比し約 30 倍強い比活性を示すこと, 両 botrocetin は vWF と液相で複合体を形成することを報告した. 上記の事実をふまえて, 著者は今回, 末端側を認識して血小板機能には影響を与えず, さらに対象となるすべての vWD subtype の vWF subunit に同等に高いアフィニティーを示す MoAb 40-1²²⁾を¹²⁵I で標識して, 被検血漿と混合し, 血漿 vWF を間接的にラベルにした後, 二本鎖 botrocetin を添加し, botrocetin-vWF 複合体を形成せしめ, ホルマリン固定血小板と反応せしめて botrocetin-vWF 複合体と血小板 GPIb の結合能を測定した. Botrocetin-vWF 複合体の血小板 GPIb への結合は botrocetin 濃度依存性に増加した. vWD の Type II B 患者では botrocetin-vWF 複合体の血小板 GPIb への結合は亢進一方 Type II A 患者では減少していることを観察した. Botrocetin-vWF 複合体の血小板 GPIb への結合能が Type II A と Type II B で異なることは, それぞれの vWF subunit における GPIb 結合 domain の機能表現の差異を反映していると推察された. この場合, botrocetin の vWF subunit への直接的結合能が Type II A と II B 患者血漿で異なるかどうかが問題である.

著者は二本鎖 botrocetin を biotin 標識し, 液相で vWF と反応させ, この botrocetin-vWF 複合体を抗 vWF 家兎ポリクロナール抗体を固相化した well に補足させることによって, 被検血漿中の vWF への botrocetin の直接結合能を検討した. Type II A および II B vWF の二本鎖 botrocetin との直接的結合能は正常 vWF の場合と相違を認めなかった. 従って, 純化 botrocetin は正常 vWF, II A vWF あるいは II B vWF と直接結合し, それらの結合能には差異がないが, GPIb 結合 domain が露出されておこる GPIb との結合反応の差異は両 vWD subtype の vWF 機能によるものと考えられた. これを模式化すると Fig. 6 の如くである.

また ristocetin 惹起 vWF-血小板結合を抑制する MoAb は必ずしも botrocetin 惹起 vWF-血小板結合

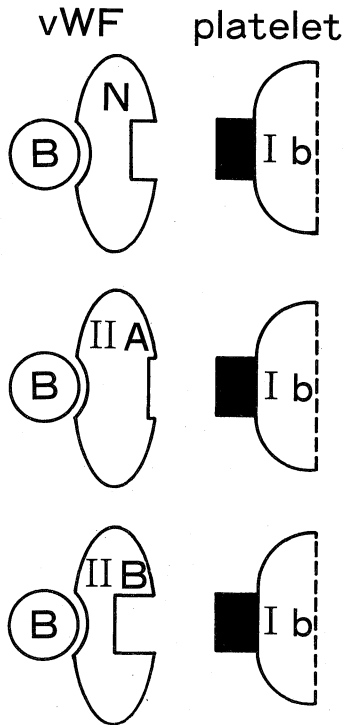


Fig. 6. A schematic representation on the interaction of botrocetin and normal (N) vWF, II A vWF, or II B vWF.

を抑制しないが、両方を抑制する MoAb である NMC-4 および RFF-VIII RAG: 1 は、二本鎖 botrocetin の vWF への直接的結合を阻害することを観察した。従って、NMC-4 および RFF-VIII RAG: 1 の vWF 上の epitope は botrocetin の結合部位と同様かまたは近接に存在することが示唆され、これらの epitope または結合部位の決定が vWF 機能解明に重要な役割を果たすと考えられる。

結 語

純化二本鎖 botrocetin を用い、正常ならびに Type II A, II B vWF subunit 中の GPIIb 結合 domain との相互作用について解析した。

1. Botrocetin で惹起される botrocetin-vWF 複合体の血小板 GPIIb への結合能は botrocetin 濃度依存性に増加した。

2. Botrocetin-vWF 複合体の血小板 GPIIb への結合能は Type II B vWF では充進し、Type II A vWF で

は減少していた。

3. Type II A, II B いずれの vWF subunit においても botrocetin の vWF subunit への直接的結合能は正常 vWF と相違はなかった。

4. Ristocetin 及び botrocetin 惹起 vWF-血小板結合の両方を抑制する抗 vWF モノクローナル抗体である NMC-4, RFF-VIII RAG: 1 は二本鎖 botrocetin の vWF への直接的結合を阻害した。

本論文要旨は第 53 回日本血液学会総会で発表した。なお、本研究は平成 2 年および 3 年度文部省科学研究「Von Willebrand 病の各病型の分子遺伝学的解析」の研究費補助によった。

文 献

- 1) Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 70: 895-904, 1987.
- 2) 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.
- 3) Titani, K., Kumer, S., Takio, K., Ericsson, 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.
- 4) 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.
- 5) Takahashi, Y., Kalafatis, M., Girma, J. P., Sewerin, K., Andersson, L. O. and Meyer, D.: Localization of factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal protein portion of von Willebrand factor. *Blood* 70: 1679-1682, 1987.
- 6) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. C., Robert, J. R., Elder, 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.
- 7) **Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Robert, 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.
 - 8) **Fujimura, Y., Holland, L. Z., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.** : The von Willebrand factor domain mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein Ib lies between Val 449-Lys 728. Blood **70** : 985-988, 1987.
 - 9) **Mohri, H., Fujimura, Y., Shima, M., Yoshioka, A., Houghten, R. A., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.** : Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. J. Biol. Chem. **263**: 17901-17904, 1988.
 - 10) **Fujimura, Y., Usami, Y., Titani, K., Niinomi, K., Nishio, K., Takase, T., Yoshioka, A. and Fukui, H.** : Studies on anti-von Willebrand factor(vWF) monoclonal antibody NMC-4, which inhibits both ristocetin and botrocetin-induced vWF binding to platelet glycoprotein Ib. Blood **77** : 113-120, 1991.
 - 11) **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.
 - 12) **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 type I and III. J. Biol. Chem. **262**: 13835-13841, 1987.
 - 13) **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 platelet. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**: 8057-8061, 1985.
 - 14) **Read, M. S., Shermer, R. W. and Brinkhous, K. M.** : Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**: 4514-4518, 1978.
 - 15) **西尾健治** : 蛇毒 Botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性に関する研究 I. Botrocetin cofactor 活性測定の検討. 奈医誌. **39** : 673-682, 1988.
 - 16) **西尾健治** : 蛇毒 Botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性に関する研究 II. von Willebrand 病名病型における Botrocetin cofactor 活性測定の検討. 奈医誌. **41** : 19-29, 1990.
 - 17) **Read, M. S., Smith, S. V., Lamb, M. A. and Brinkhous, M. K.** : Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor. Blood **74** : 1031-1035, 1989.
 - 18) **Andrews, R. K., Booth, W. J., Gorman, J. J., Castaldi, P. A. and Berndt, M. C.** : Purification of botrocetin from Bothrops jararaca venom. Analysis of botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. Biochemistry **28** : 8317-8326, 1989.
 - 19) **Usami, Y., Suzuki, M., Ozaki, Y., Nishio, K., Fukui, H., Fujimura, Y. and Titani, K.** : Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from venom of Bothrops jararaca. in press.
 - 20) **Fujimura, Y., Titani, K., Usami, Y., Suzuki, M., Oyama, R., Matui, T., Fukui, H., Sugimoto, M. and Ruggeri, Z. M.** : Isolation and characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the snake venom of Bothrops jararaca. Biochemistry **30** : 1957-1964, 1991.
 - 21) **嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡章, 福井 弘** : von Willebrand 因子(vWF)に対するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. 奈医誌. **36** : 662-669, 1985.
 - 22) **宮田茂樹** : GPIb 結合ドメインならびに C 末端部分を認識する抗 von Willebrand 因子(vWF)モノクローナル抗体を用いた vWF 抗原量の測定. 奈医誌. **42** : 437-448, 1991.
 - 23) **Ey, P. L., Prowse, S. J. and Jenkin, C. R.** : Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-

Sepharose. *Immunochemistry* **15**: 429-436, 1978.

849-857, 1987.

- 24) **Fraker, D. J.** and **Speck, J. C.** : Protein and cell membrane iodination with sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6, -tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biophys. Res. Commun.* **80**:

- 25) **Nakane, P. K.** and **Pierce, G. B.** : Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell. Biol.* **33**: 307-, 1967.