

VWF 切断酵素 ADAMTS13 のエキソサイト認識機構

秋山正志¹, 武田壮一¹, 小亀浩市¹,
高木淳一², 宮田敏行¹

ADAMTS13(a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13)は、2001年にフォンビルブランド因子(von Willebrand factor: VWF)切断酵素として同定されたマルチドメインからなるメタロプロテアーゼである。ADAMTS13は、血中の超高分子量VWF多量体を適度な大きさに断片化することにより、止血機能を適切に維持する機能がある。私たちは、ADAMTS13によるVWFの切断にメタロプロテアーゼ(M)ドメインとともに必要とされる、C末側隣接ドメインのディスインテグリン様(D), TSP-1 type-1 repeat (T, T1), Cys-rich (C), スペーサー(S)ドメイン(残基番号297-685)の立体構造を決定した。その結果、(1)Dドメインはディスインテグリン様の立体構造ではないこと、(2)CドメインとDドメインの立体構造が相同であることを明らかにした。さらに、変異を導入した実験から、3箇所のVWF結合エキソサイトは空間的に隔たりながらも直線状に並んでいることが分かった。以上の結果から、ADAMTS13は複数のエキソサイトを通して、ずり応力等でほどけたVWFを広範囲で認識し、VWFに対する特異的な親和性を高めていると考えられた。今回決定した隣接ドメインの基本的な立体構造はADAMTSファミリー間で保存されていると考えられるので、ADAMTS13におけるMドメインのC末側の隣接ドメイン上の複数のエキソサイトを介した基質認識機構は、高い基質特異性を示すADAMTSファミリー全体の特性を説明できると考えられる。

1. はじめに

VWFは血管内皮細胞や骨髄巨核球で産生される糖タンパク質である。血管内皮細胞においては、分子量250 kDa

の単量体がジスルフィド結合により重合し、分子量30,000 kDaの超高分子量多量体としてWeibel-Palade body中に蓄積し、細胞外へと分泌される¹⁾。血中に分泌された超高分子量VWF多量体は強力な血小板凝集活性を示す。ADAMTS13はVWFをA2ドメイン内のTyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶間で特異的に切断し、多量体の分子量を500~20,000 kDaの適度な大きさに保ち、血小板凝集能の調節に関与している¹⁾。プロドメインが存在すると活性が抑制される他のADAMTSと異なって、ADAMTS13は構成的活性型の酵素であり²⁾、その切断反応は基質であるVWFの立体構造に依存して調節されている。ADAMTS13によるVWFの切断は、細小血管などの、血流が非常に速く、「ずり応力」と呼ばれる物体を歪ませようとする物理的な力が高い部位で起こる。血管壁に結合したVWF多量体は、高ずり応力により15 μm近くの糸状構造に引き延ばされて、大きさ2-3

¹ 国立循環器病研究センター研究所 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1)

² 大阪大学蛋白質研究所 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2)

Multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor of ADAMTS13

Masashi Akiyama¹, Soichi Takeda¹, Koichi Kokame¹, Junichi Takagi² and Toshiyuki Miyata¹ (¹National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan; ²Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

μm の血小板が結合する様子が観察されている³⁾。VWF分子の立体構造も、高ずり応力により球状構造のVWF A2ドメインが伸展構造に変化することで、埋もれていた切断部位が露出し、ADAMTS13によりVWFが切断される⁴⁾。ADAMTS13活性が著減すると、超高分子量VWF多量体が血漿中に蓄積して、その強力な血小板凝集能により血小板血栓が形成され、血小板数減少、溶血性貧血、紫斑を典型症状とする血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP)が発症する⁵⁾。ADAMTS13活性著減の原因は、先天性TTP(Upshaw-Schulman症候群)ではADAMTS13の遺伝子異常⁶⁾、後天性TTPでは中和抗体の産生⁷⁾である。

ADAMTS13は2001年にクローニングされた^{6,8,9)}。*in vitro*におけるVWFの切断には、Mドメインに加えて、C末側に隣接するD, T1, C, Sドメインが必要である^{10,11)}。ADAMTS13ではSドメインのC末側に、連続した7個のTドメイン(T2-T8)と2個のCUBドメインが続くが、これらのドメインは*in vivo*での切断効率における増強作用がある¹²⁾。すでにADAMTS1, 4, 5においてM, Dドメインの立体構造が報告されている^{13,14)}。しかしながらT1, C, SドメインについてはどのADAMTSにおいても立体構造が決定されていなかった。なかでもSドメインは、除去すると酵素活性が事実上消失すること^{10,11)}、TTPの大半を占める後天的TTP患者で出現する自己中和抗体のエピトープが集中して存在している^{15,16)}ことから、非常に重要なドメインである。そこで私たちは、エキソサイトの存在するDドメインからSドメインまでの領域(ADAMTS13-DTCS)の立体構造を決定した¹⁷⁾。

2. ADAMTS プロテアーゼ

ADAMTS プロテアーゼファミリーはヒトでは19個の遺伝子から構成される^{18,19)}。すべての成熟ADAMTSは、N末端側からM, D, T1, C, Sドメインが並んでいる(図1a)。ADAMTS4以外のADAMTSでは、SドメインのC末側に各ADAMTS固有のドメインが存在する。進化的に近縁なADAMTSの基質特異性は保存されている(図1b)。ADAMTS1, 4, 5, 8, 15は、プロテオグリカンの中で細胞外基質(extracellular matrix: ECM)や基底膜に存在するアグリカンやパーシカン、ニューロカンといったヒアレクタンの切断酵素として分類される。これらのうち、ADAMTS4, 5は軟骨組織に存在する代表的なプロテオグリカンであるアグリカンに対して強い切断活性を持ち、ADAMTS5は変形関節症における軟骨破壊の原因であると考えられている²⁰⁾。さらにADAMTS9, 20も*in vitro*でのパーシカン切断活性が報告されている。一方、ADAMTS2, 3, 14はECMの主要構成タンパク質であるプロコラーゲンのプロセシング酵素と分類される。また、

ADAMTS7, 12は軟骨オリゴマー基質タンパク質に結合して分解する。残りのADAMTS6, 10, 16, 17, 18, 19は基質が明らかとなっていないオーファン酵素であるが、ADAMTS10, 17はそれぞれ劣性型のヴァイル・マルケサーニ症候群およびヴァイル・マルケサーニ様症候群の原因遺伝子産物である^{21,22)}。さらに、ADAMTSに加え、M, Dドメインを欠きプロテアーゼ活性を持たないADAMTS類似タンパク質として、ADAMTS-like (ADAMTSL)が6遺伝子、ADAMTSLと同様な構造のパピリントタンパク質が1遺伝子存在する²³⁾。ADAMTSLとパピリンは多くのADAMTS同様ECMに存在し、ADAMTSの調節やECMにおけるシグナル伝達に関与している²³⁾。

3. ADAMTS13-DTCSの結晶構造

私たちは格子定数の異なる二つのADAMTS13-DTCS結晶から、2.6 Åと2.8 Åの分解能の立体構造を決定した。両者の構造は互いによく似ており、その一つをリボンモデルで図2aに示す。Cドメインは構造的にC_AドメインとC_Bドメインに分けられ、ADAMTS13-DTCSは球状ドメインのD, C_A, Sの各ドメインが、伸展モジュールであるT1ドメインとC_Bドメインによって連結された構造を取っている。二つのDTCS結晶構造をDドメインもしくはSドメイン同士で重ね合わせると、ドメイン間相互作用がほとんどないD-T1ドメイン間で最もヒンジが曲がりやすく、T1ドメイン先端で大きなずれが生じるのに対し、C_A-Sドメイン間は直接相互作用しているため、ほとんど重なっていることが分かる(図2b)。

ADAMTSに近縁のa disintegrin and metalloproteinase domain (ADAM) プロテアーゼでは、MドメインのC末側に、ディスインテグリンと立体構造が相同なDドメインが存在し、さらにCドメインが続く²⁴⁾。ADAMTS1, 4, 5と同様に、ADAMTS13のDドメインの立体構造はADAMのDドメインとまったく異なり、ADAMのCドメインと相同であることが明らかとなった。したがって、ADAMTSのDドメインをディスインテグリン様ドメインと呼ぶことは誤りである。さらに、C_Aドメインの折り畳み構造はDドメインと相同であった(図3)。すなわち、ADAMTS13のD, C_AドメインとADAMのCドメインの折り畳み構造は互いに相同である。構造に基づいて整列させたアミノ酸配列において、両ドメインは17%の同一性しかない。しかし、ADAMTSファミリーで、両ドメインのジスルフィド結合の位置や構造上重要な残基が保存されており、すべてのADAMTSにおいてDおよびC_Aドメインは類似したコア構造をとると推定される。一方で、ADAMTS間で相同性が低い表面に露出しているループ(図3)の立体構造は、DドメインとC_Aドメインの間でも大きく異なる。これらのループは後述するように、

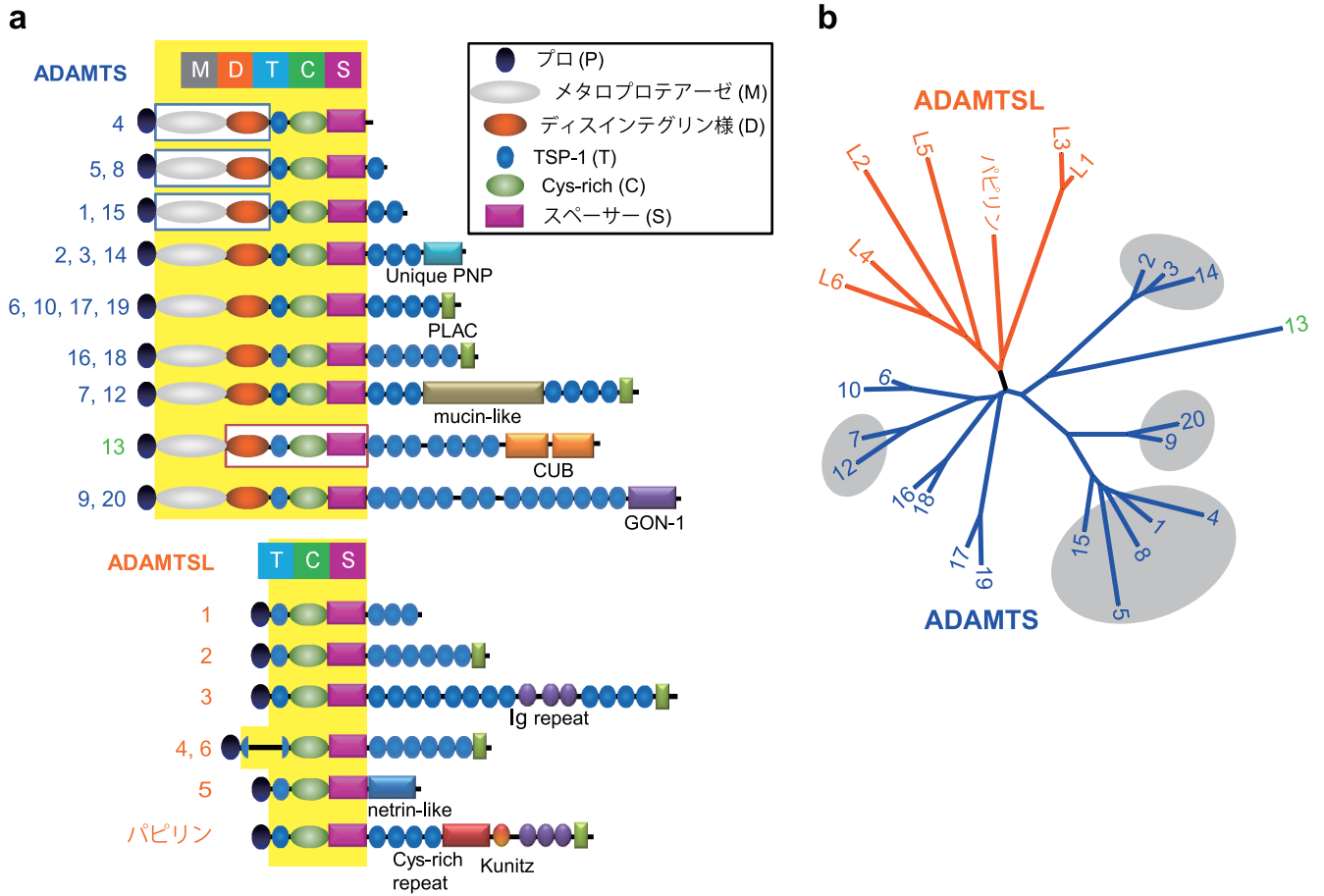


図1 ヒト ADAMTS および ADAMTSL ファミリータンパク質のドメイン構造

a. ヒトでは ADAMTS は 19 個，ADAMTSL は 6 個，パピリンは 1 個の遺伝子から構成される．全ての ADAMTS ファミリーにおいて M, D, T1, C, S ドメインが存在し，プロテアーゼ活性や局在化に必要とされる．ADAMTSL ならびにパピリンは M および D ドメインを欠く．ほぼすべての ADAMTS および ADAMTSL で S ドメインの C 末側に各タンパク質に特有の構成のドメインが存在する．

b. ADAMTS, ADAMTSL, パピリンの全長配列に基づいた無根系統樹．UniProt データベースからダウンロードした全長配列を，MAFFT で多重整列化させ，SeaView を用いて系統樹を作成した．

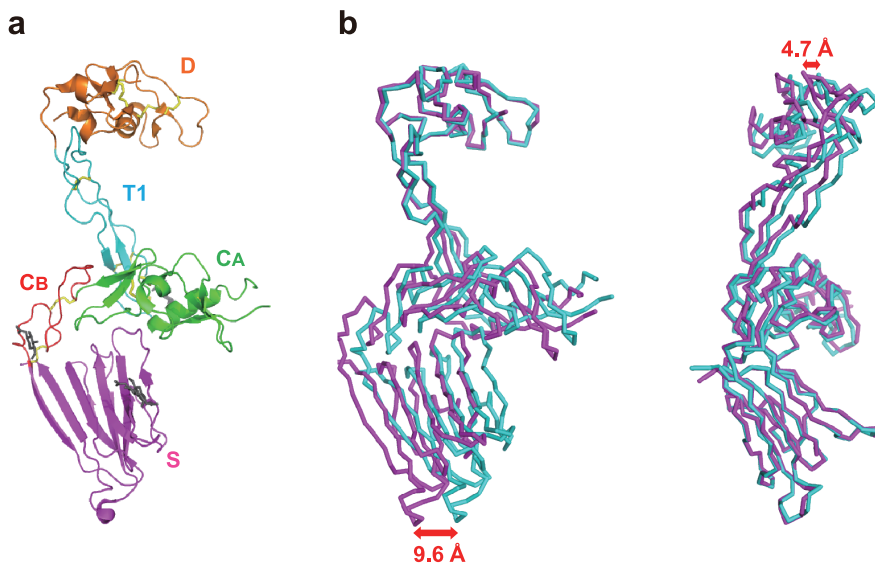


図2 ADAMTS13-DTCS の立体構造とドメイン可動性

a. ADAMTS13-DTCS の結晶構造 [PDB 3GHM] のリボン表示．各ドメインを図 1a の色分けにしたがって表示する．ジスルフィド結合を黄色で示す．

b. 二つの ADAMTS13-MDTCS の結晶構造 [PDB 3GHM (青色), 3GHN (紫紅色)] を D ドメイン (左) および S ドメイン (右) で重ね合わせた場合の C α 原子のトレース．

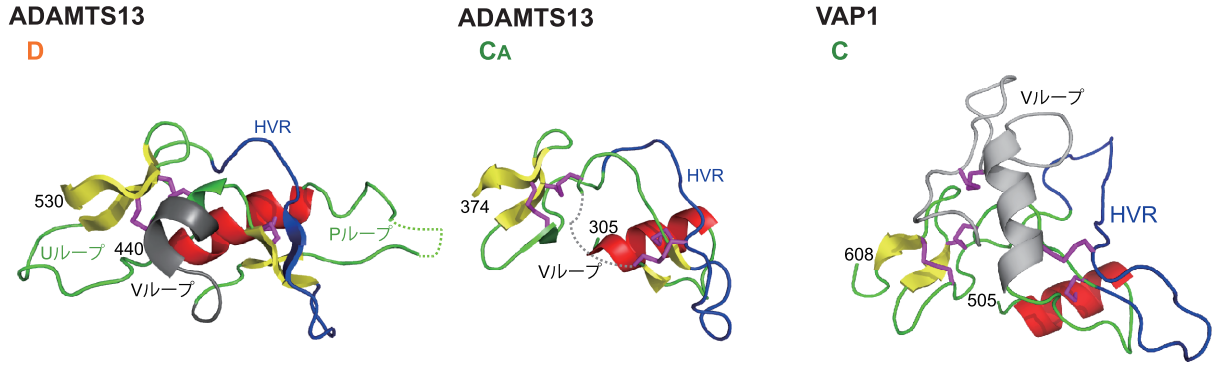


図3 ADAMTS13のDドメインとC_Aドメインの構造の比較

ADAMTS13-DTCSのD、C_AドメインとADAM(VAP1 [PDB 2ERO]²⁴⁾のCドメインのリボン表示. ADAMTS13のD、C_Aドメイン、ADAMのCドメインの折り畳み構造は相同である. 一方で、表面に露出しているP、V、Uループと名付けた三つのループと超可変領域 (hyper variable region, HVR)²⁴⁾の立体構造は、DドメインとC_Aドメインの間で大きく異なる. VループとHVRを灰色と青色で、その他のループは緑色で示す. αヘリックス、βストランド、ジスルフィド結合はそれぞれ赤色、黄色、オレンジで示す. 点線は結晶中の不規則領域を示す.

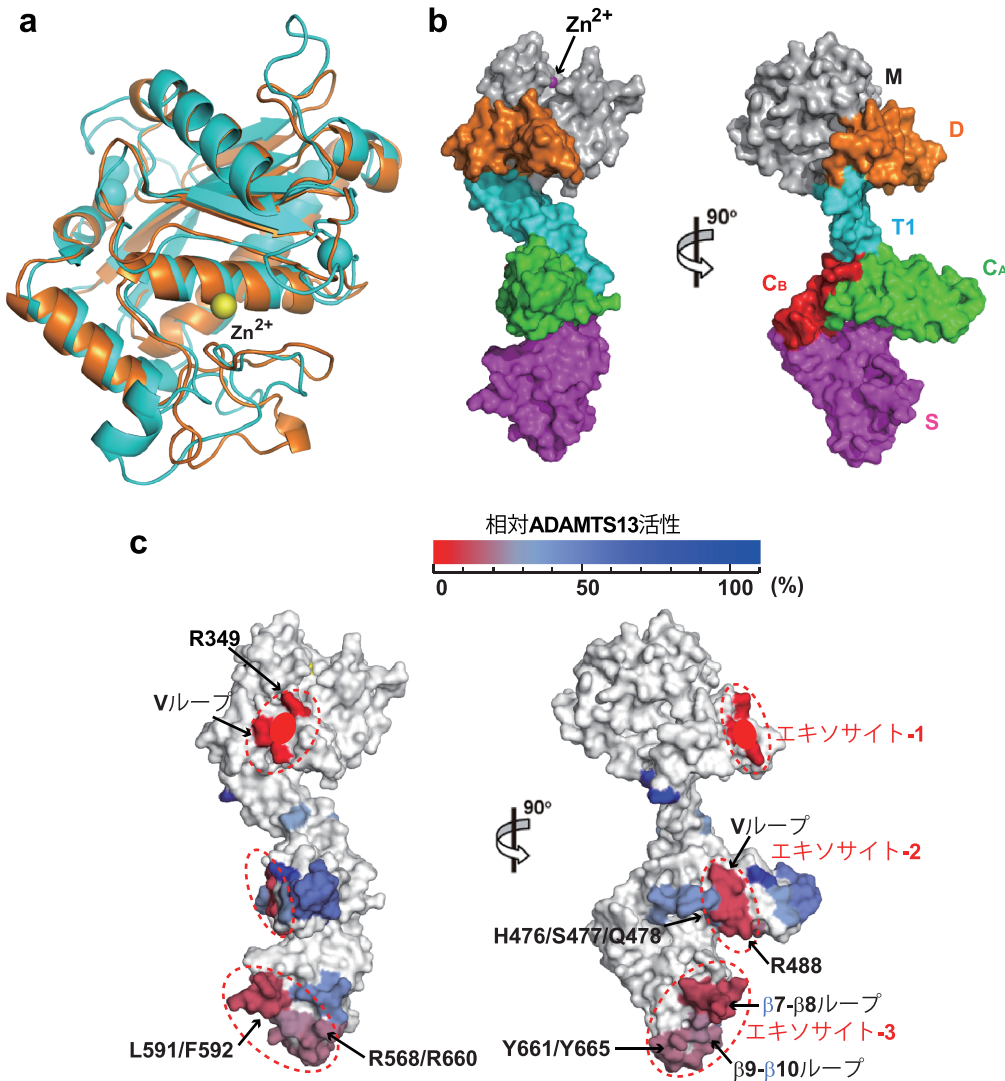


図4 ADAMTS13-MDTCSモデルとエキソサイトマッピング

a. ADAMTS5 [PDB 3HYG] (空色)とADAM33 [PDB 1R55] (橙色)のMドメインの立体構造の重ね合わせ. 黄色の球は触媒部位のZn²⁺を、空色と橙色の球はそれぞれADAMTS5とADAM33に結合しているCa²⁺を示す.

b. ADAMTS13-MDTCSモデルのサーフェイス表示. Mドメインを灰色、残りの各ドメインの色分けは図1aに従い表示する. 活性中心の亜鉛原子は赤色で示す.

c. ADAMTS13活性に対する変異の影響. ADAMTS13-MDTCS変異体活性測定実験の結果を、MDTCSモデル上に色分けして表示している. 活性が大きく低下したものは赤く示される. DドメインのVループは不規則構造なので、楕円で表示する.

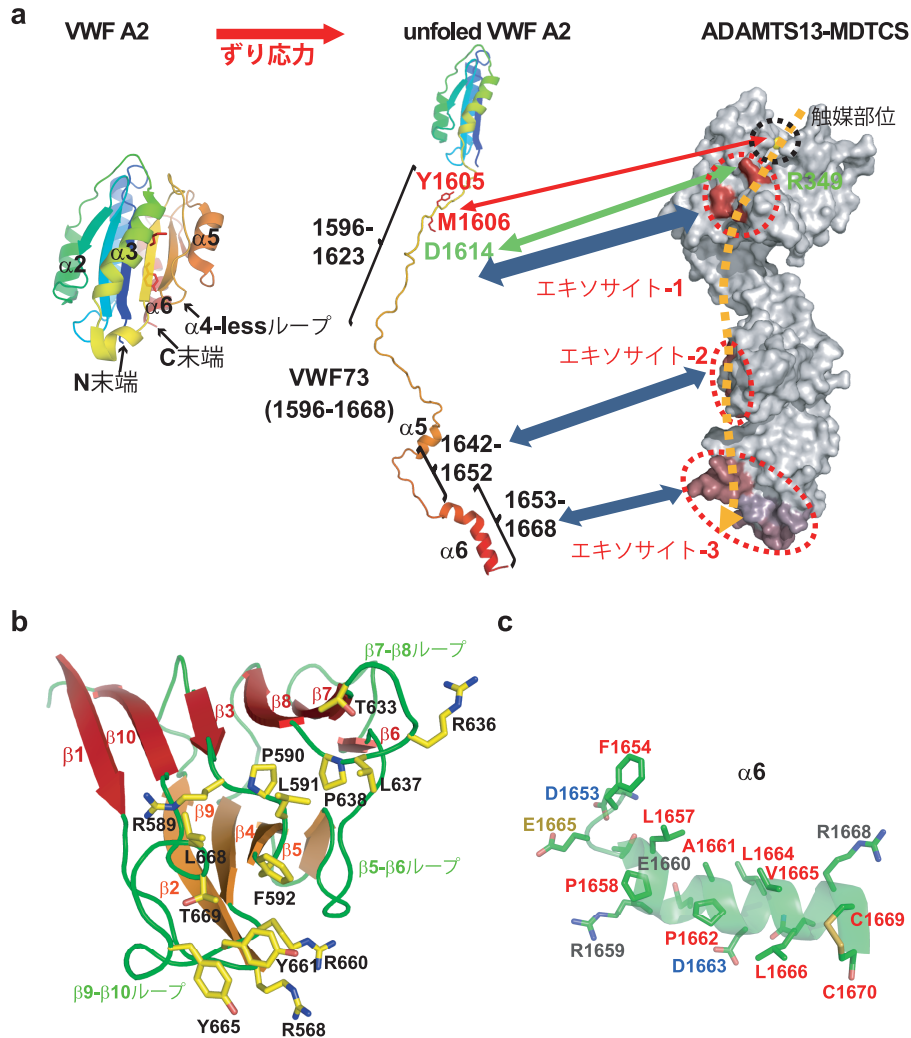


図5 ADAMTS13-MDTCs と VWF A2 ドメインの相互作用モデル

a. 静的状態では ADAMTS13 の切断部位 (Tyr1605–Met1606) は VWF A2 ドメインの内部に埋もれている。VWF A2 ドメインは A1 および A3 ドメインの $\alpha 4$ に対応する領域が α ヘリックス構造をとらない ($\alpha 4$ -less ループ) ので unfold しやすい。VWF が血管内で高いずり応力にあうと、A2 ドメインの C 末側が unfold し、切断部位とエキソサイト結合領域が露出し、広範囲で VWF と ADAMTS13 が相互作用する。その結果、特異的な親和性が高まり、効率的な切断が起こると考えられる。

b. S ドメインのエキソサイト-3 における複数の Arg 残基に囲まれた疎水性クラスター。

c. エキソサイト-3 と相互作用すると考えられる VWF A2 ドメイン C 末側の $\alpha 6$ とその周辺領域 (残基番号 1653–1670)。青色で示された残基は Ala への置換により切断効率が減少し、黄色で示された残基は Ala への置換により切断効率がわずかに上昇する³²⁾。灰色で示された残基は Ala への変異により切断効率が変化しない。赤色で示された残基は調べられていない。

ADAMTS の特異的な基質認識に関わっていると考えられる。

S ドメインは ADAMTS にのみ存在するジスルフィド結合のない約 120 アミノ酸からなる領域である。S ドメインは 10 本の β ストランドが 2 枚の並行した β シートを形成し、 β サンドイッチと呼ばれる構造をとった球状の機能ドメインであることが明らかになった。S ドメインの骨格構造を担うアミノ酸残基は ADAMTS 間で保存されているこ

とから、S ドメインの基本構造も他の ADAMTS で保存されていると考えられる。

4. VWF 結合エキソサイトの同定

これまでに決定された ADAMTS1, 4, 5 の M-D ドメインの結晶構造^{13, 14, 25)} はお互いに類似している。いずれの ADAMTS においても、M ドメインの構造は活性部位ポケットの構造をのぞき、近縁の ADAM やマトリックスメ

タロプロテアーゼと類似している (図 4a). ADAMTS4 の MD²⁵⁾と ADAMTS13-DTCS の立体構造をもとに作成した ADAMTS13-MDTCS モデルを図 4b に示す. MDTCS の全長は約 125 Å と推定される.

VWF が結合する DTCS 内のエキソサイトを同定するため, 立体構造上で基質との相互作用に重要であると考えられるループを中心に 25 箇所に変異を導入した. 変異体の酵素活性は 73 アミノ酸からなる最小蛍光基質, FRETS-VWF73²⁶⁾ を用いて測定し, ADAMTS13-MDTCS モデル上に図示した (図 4c). M ドメインの触媒部位に向かって突出していると考えられる D ドメインのループ上の変異 R349D, ならびにループの荷電残基の置換変異は, 酵素活性をほぼ消失させた. これは Arg-349 が VWF の切断部位の近傍の Asp-1614 と相互作用するという報告²⁷⁾ と一致する. 以上の結果から, M ドメインの基質結合ポケットに近い D ドメイン内の荷電残基のクラスターがエキソサイトとして機能すると考えられ, エキソサイト-1 と名付けた. さらに, D ドメインと相同な C_A ドメインにおいても, V ループと名付けられたループの置換変異やその近傍の R488E 変異が大きな活性低下を引き起こした. そこで C_A ドメインの V ループと周辺の親水性ならびに荷電残基のクラスターをエキソサイト-2 と名付けた. 一方, S ドメインの β ストランドを結ぶ先端側ループの β7-β8 ループおよび β9-β10 ループの置換変異も活性を減少させた. β9-β10 ループ内の構造的に近接する二つの Tyr 残基の変異 (Y661Q/Y665Q) も活性を大きく減少させた. β9-β10 ループは周囲の β3-β4 ならびに β7-β8 ループの残基とともに疎水性クラスターを形成している. このクラスターの中心に位置する β7-β8 ループの残基に変異を入れる (L591Q/F592Q) と活性はかなり低下した. また, 疎水性クラスター周囲に存在する四つの Arg 残基のうち二つを変異 (R568Q/R660Q) させた場合にも活性は大きく低下した. 以上の結果から, S ドメインの Arg で囲まれた疎水性クラスターがもう一つのエキソサイト (エキソサイト-3) であると考えられた. これら三つのエキソサイトは空間的に隔たりながらも直線上に並んでいた (図 4c).

5. ADAMTS13-VWF 相互作用モデル

ADAMTS13 と VWF の相互作用モデルを図 5a に示す. ADAMTS13 の切断部位, Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ は球状の VWF A2 ドメイン内に埋もれている²⁸⁾. 血管内で高ずり応力が加わると, A2 ドメインは構造的に不安定な C 末側からほどけ, 部分的に伸展した構造を取り, 切断部位が露出すると考えられる⁴⁾. A2 ドメイン C 末側 73 アミノ酸残基 (残基番号 1596-1668) は ADAMTS13 の特異的な最小基質 (VWF73) である²⁹⁾. VWF73 は最大 200 Å まで伸展できるので, 部分的に進展した状態で, およそ 90 Å にわたって

直線上に並ぶ ADAMTS13 の触媒部位と複数のエキソサイト領域との間で相互作用できる. その結果, ADAMTS13 は VWF への特異的な親和性を高め, 切断効率が増強されると推察される.

これまでの研究³⁰⁻³²⁾とあわせると, D ドメインのエキソサイト-1 は VWF73 の切断部位近傍領域 (残基番号 1596-1623) と, C_A ドメインのエキソサイト-2 は VWF73 の中間領域 (残基番号 1642-1652) とそれぞれ相互作用していると推定される. S ドメインのエキソサイト-3 の疎水性クラスター (図 5b) は C 末端の αヘリックス (α6) 領域 (残基番号 1653-1668) (図 5c) の疎水性面と相互作用すると推定される. また, ADAMTS13 の S ドメインより C 末側の領域は, *in vivo* での切断効率を増強する働きを持つ³²⁾, これらの領域が VWF の A2 ドメイン以外の領域と相互作用することが報告されている³³⁾. その他の ADAMTS においても, S ドメインより C 末側のドメインが, 基質特異性をさらに高めている可能性がある.

S ドメインに結合する後天性 TTP 患者の中和抗体のエピトープ (残基番号 657-666)¹⁶⁾ はエキソサイト-3 を構成する β9-β10 ループと完全に一致する. β9-β10 ループを構成する残基の変異により, 中和抗体の ADAMTS13 への結合が阻害されることから³⁴⁾, 後天性 TTP 患者では, 中和抗体が β9-β10 ループへ結合することで, ADAMTS13 と VWF の相互作用が阻害され, ADAMTS13 活性が著しく低下している可能性がある.

6. 終わりに

他の ADAMTS においても, M ドメインに隣接する複数のドメインが基質認識・切断に重要であること, さらには組織局在性にも関与していることが知られている. たとえば, ADAMTS1, 9 の隣接ドメインは, アグリカンの分解と ECM への局在の両方に必要である^{35,36)}. また, ADAMTS4 の S ドメインを除去するとアグリカン分解活性が 5% 以下になる一方で, 非アグリカンに対する一般的なプロテアーゼ活性は大幅に上昇する³⁷⁾. また, プロテアーゼドメインを持たない ADAMTSL では, これらのドメインを介した他のタンパク質との相互作用そのものが, 生理機能を担っている. 多くの ADAMTS, ADAMTSL が病態と関連していることが明らかになってきており, 今後研究が進むものと思われる.

ADAMTS13 のクローニングには日本人研究者が関与したが, その後の研究においても, 日本人が大きく貢献している³⁸⁾. ADAMTS13 の研究は 2001 年のクローニング以降急速に進み, ADAMTS 関連の論文の 7 割以上が ADAMTS13 に関するものである. その理由として, 基質が VWF というよく研究されてきたものであったこと, ADAMTS13 活性の消失によって引き起こされる TTP が古

くから知られる疾患であり治療法を誤れば致死的事であること、厚生労働省の難治性疾患に指定されていることなど様々なことがあげられる。さらなる研究の発展が期待される。

文 献

- 1) Sadler, J.E. (2008) *Blood* 112, 11–18.
- 2) Majerus, E.M., Zheng, X., Tuley, E.A., & Sadler, J.E. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 46643–46648.
- 3) Schneider, S.W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R.R., & Schneider, M.F. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 104, 7899–7903.
- 4) Zhang, X., Halvorsen, K., Zhang, C.Z., Wong, W.P., & Springer, T.A. (2009) *Science*, 324, 1330–1334.
- 5) Moake, J.L., Rudy, C.K., Troll, J.H., Weinstein, M.J., Colanino, N.M., Azocar, J., Seder, R.H., Hong, S.L., & Deykin, D. (1982) *N. Engl. J. Med.*, 307, 1432–1435.
- 6) Levy, G.G., Nichols, W.C., Lian, E.C., Foroud, T., McClintick, J.N., McGee, B.M., Yang, A.Y., Siemieniak, D.R., Stark, K.R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S.B., Chandrasekaran, V., Stabler, S.P., Sabio, H., Bouhassira, E.E., Upshaw, J.D., Jr., Ginsburg, D., & Tsai, H.M. (2001) *Nature*, 413, 488–494.
- 7) Tsai, H.M. & Lian, E.C. (1998) *N. Engl. J. Med.*, 339, 1585–1594.
- 8) Soejima, K., Mimura, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamoto, T., Nakagaki, T., & Nozaki, C. (2001) *J. Biochem.*, 130, 475–480.
- 9) Zheng, X., Chung, D., Takayama, T.K., Majerus, E.M., Sadler, J.E., & Fujikawa, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 41059–41063.
- 10) Soejima, K., Matsumoto, M., Kokame, K., Yagi, H., Ishizashi, H., Maeda, H., Nozaki, C., Miyata, T., Fujimura, Y., & Nakagaki, T. (2003) *Blood*, 102, 3232–3237.
- 11) Zheng, X., Nishio, K., Majerus, E.M., & Sadler, J.E. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 30136–30141.
- 12) Banno, F., Chauhan, A.K., Kokame, K., Yang, J., Miyata, S., Wagner, D.D., & Miyata, T. (2009) *Blood*, 113, 5323–5329.
- 13) Gerhardt, S., Hassall, G., Hawtin, P., McCall, E., Flavell, L., Minshull, C., Hargreaves, D., Ting, A., Pauptit, R.A., Parker, A.E., & Abbott, W.M. (2007) *J. Mol. Biol.*, 373, 891–902.
- 14) Shieh, H.S., Mathis, K.J., Williams, J.M., Hills, R.L., Wiese, J. F., Benson, T.E., Kiefer, J.R., Marino, M.H., Carroll, J.N., Leone, J.W., Malfait, A.M., Arner, E.C., Tortorella, M.D., & Tomasselli, A. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 1501–1507.
- 15) Luken, B.M., Turenhout, E.A., Hulstein, J.J., Van Mourik, J.A., Fijnheer, R., & Voorberg, J. (2005) *Thromb. Haemost.*, 93, 267–274.
- 16) Luken, B.M., Turenhout, E.A., Kaijen, P.H., Greuter, M.J., Pos, W., van Mourik, J.A., Fijnheer, R., & Voorberg, J. (2006) *Thromb. Haemost.*, 96, 295–301.
- 17) Akiyama, M., Takeda, S., Kokame, K., Takagi, J., & Miyata, T. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 106, 19274–19279.
- 18) Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L., & Edwards, D.R. (2005) *Biochem. J.*, 386, 15–27.
- 19) Tortorella, M.D., Malfait, F., Barve, R.A., Shieh, H.S., & Malfait, A.M. (2009) *Curr. Pharm. Des.*, 15, 2359–2374.
- 20) Bondeson, J., Wainwright, S., Hughes, C., & Caterson, B. (2008) *Clin. Exp. Rheumatol.*, 26, 139–145.
- 21) Dagoneau, N., Benoist-Lasselin, C., Huber, C., Faivre, L., Megarbane, A., Alswaid, A., Dollfus, H., Alembik, Y., Munich, A., Legeai-Mallet, L., & Cormier-Daire, V. (2004) *Am. J. Hum. Genet.*, 75, 801–806.
- 22) Morales, J., Al-Sharif, L., Khalil, D.S., Shinwari, J.M., Bavi, P., Al-Mahrouqi, R.A., Al-Rajhi, A., Alkuraya, F.S., Meyer, B. F., & Al Tassan, N. (2009) *Am. J. Hum. Genet.*, 85, 558–568.
- 23) Apte, S.S. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 31493–31497.
- 24) Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., & Araki, S. (2006) *EMBO J.*, 25, 2388–2396.
- 25) Mosyak, L., Georgiadis, K., Shane, T., Svenson, K., Hebert, T., McDonagh, T., Mackie, S., Olland, S., Lin, L., Zhong, X., Kriz, R., Reifenberg, E.L., Collins-Racie, L.A., Corcoran, C., Freeman, B., Zollner, R., Marvell, T., Vera, M., Sum, P.E., Lavallie, E.R., Stahl, M., & Somers, W. (2008) *Protein. Sci.*, 17, 16–21.
- 26) Kokame, K., Nobe, Y., Kokubo, Y., Okayama, A., & Miyata, T. (2005) *Br. J. Haematol.*, 129, 93–100.
- 27) de Groot, R., Bardhan, A., Ramroop, N., Lane, D.A., & Crawley, J.T. (2009) *Blood*, 113, 5609–5616.
- 28) Zhang, Q., Zhou, Y.F., Zhang, C.Z., Zhang, X., Lu, C., & Springer, T.A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 106, 9226–9231.
- 29) Kokame, K., Matsumoto, M., Fujimura, Y., & Miyata, T. (2004) *Blood*, 103, 607–612.
- 30) Gao, W., Anderson, P.J., Majerus, E.M., Tuley, E.A., & Sadler, J.E. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 19099–19104.
- 31) Gao, W., Anderson, P.J., & Sadler, J.E. (2008) *Blood*, 112, 1713–1719.
- 32) Wu, J.J., Fujikawa, K., McMullen, B.A., & Chung, D.W. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 18470–18474.
- 33) Zanardelli, S., Chion, A.C., Groot, E., Lenting, P.J., McKinnon, T.A., Laffan, M.A., Tseng, M., & Lane, D.A. (2009) *Blood*, 114, 2819–2828.
- 34) Pos, W., Crawley, J.T., Fijnheer, R., Voorberg, J., Lane, D.A., & Luken, B.M. (2010) *Blood*, 115, 1640–1649.
- 35) Kuno, K. & Matsushima, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 13912–13917.
- 36) Somerville, R.P., Longpre, J.M., Jungers, K.A., Engle, J.M., Ross, M., Evanko, S., Wight, T.N., Leduc, R., & Apte, S.S. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 9503–9513.
- 37) Kashiwagi, M., Enghild, J.J., Gendron, C., Hughes, C., Caterson, B., Itoh, Y., & Nagase, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 10109–10119.
- 38) 副島見事, 小亀浩市, 松本雅則 (2009) 日本血栓止血学会誌, 20, 377–397.