研究成果概要

1.研究課題

和 文

新型コロナ感染の重症化を引き起こす vWF の構造変化機構の解明

英 文

Elucidation of the mechanism of structural changes in vWF that cause severe COVID-19 infection

2.申請者名(代表研究者)

氏名	ローマ字表記
菅瀬 謙治	Kenji Sugase
所属大学・機関名	英訳表記
京都大学	Kyoto University
研究科専攻名・部課名等	英訳表記
大学院農学研究科応用生命科学専攻	Division of Applied Life Sciences
	Graduate School of Agriculture
役職名	英訳表記
教授	Professor

3.共同研究者(下段 英訳表記)

氏 名	所属機関名・研究科等名・役職
(氏 名)	
森本 大智	京都大学・大学院工学研究科分子工学専攻・助教
(英訳表記)	(英訳表記)
Daichi Morimoto	Assistant Professor
	Department of Molecular Engineering
	Graduate School of Engineering, Kyoto University

4.研究目的、成果、今後の見通し

研究目的

今まさに人類の脅威である新型コロナウイルス感染症では、von Willebrand factor(vWF)と呼ばれるタンパク質が、血流によってその立体構造がほどけ、血小板とともに凝集する。問題はこれが血栓となり重症化することである [Wool, Pathology 2021]。重症化率が血液型で異なることや [Ward, Blood 2020]、A 社製ワクチンで血栓ができやすいことも、この流れと vWF の仕業である。新型コロナウイルス感染症の後遺症が長引くことも、vWF が引き起こす血栓症が原因と言われている。さらに、現在 猛威を振るうデルタ株では従来の株よりも重篤な血栓症が観察されている。そのため人類が新型コロナウイルス感染症に打ち勝つためには、ワクチン接種により新規

感染者数を減らすともに、vWF が引き起こす 血栓症を何とか抑える必要がある。しかし、何 とか抑えようとするにしても、そもそも流れに よって vWF がどのように構造変化し、凝集するのかがよく分かっていない(図1)。



図1. 流れによるvWFの構造変化

申請者は、流れにより vWF が構造変化するメカニズム解明を喫緊の課題と捉え、その研究に取り組んでいる。この研究で重要な技術的課題は、流れによる vWF の構造変化をいかに解析するかということである。vWF の構造変化の解析は分子レベルではすでに実施されており、どれくらいの流れの力で vWF の立体構造がほどけるのかが明らかにされている [Schneider, Proc Natl Acad Sci USA 2007]。しかし、どのようにほどけるのかについては未だ明らかでない。そのため、vWF の構造変化のメカニズムを解明するためには、より詳細な、すなわち原子レベルの解析が求められる。しかし、既存の分析装置では流れの中のタンパク質の振る舞いを原子レベルでは解析できない。

このような背景のもと申請者は、タンパク質溶液中に流れを発生させながら NMR 測定ができる高感度 Rheo-NMR 装置を開発した(図 2) [Morimoto, *Anal Chem* 2017]。図 2 に示すように、

この装置では NMR 管にガラス棒を挿入し、NMR 管だけを回転させることによって流れを発生させる。申請者は、同装置を用いてタンパク質のアミロイド線維化過程を世界で初めて原子レベルで明らかにした実績を持つ
[Iwakawa, JAm Chem Soc 2021]。同様な解析は他の分析装置ではできない。本研究では、この Rheo-NMR を用いて流れにより vWF が構造変化し、凝集するメカニズムを原子レベルで明らかにすることを目的とする。

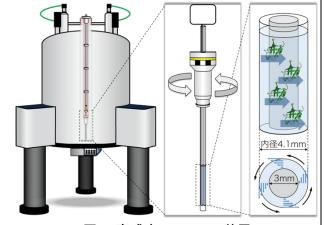


図2. 高感度Rheo-NMR装置

成果

解析対象である vWF の A2 ドメイン(以下 vWF)の調製は、過去の研究では動物細胞を用いた vWF の調製方法しか報告されていなかった。そのため、安定同位体標識試料を必要とする NMR 実験を行なえなかった。本研究では vWF に連結するタンパク質タグや遺伝子配列を最適化した

結果、大腸菌を用いた vWF の試料調製法を確立することに成功した。

調製した 15 N 標識試料を用いて、Rheo-NMR の流れによる vWF の変化を解析した。回転周波数 20 Hz(剪断速度 290-540 s^{-1})で vWF 溶液に流れを与えながら二次元 $^{1}H^{-15}N$ 相関スペクトルを連続測定したところ、時間ととともに NMR シグナルが減衰した(図 3)。測定後の試料には沈殿が見られた。このことは、流れによって vWF の構造がアンフォール

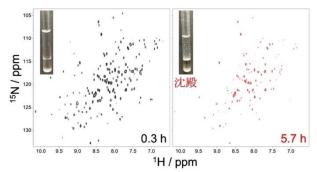


図3. 流れによるvWFのNMRスペクトルの変化

ドし、露出した疎水性面を介して vWF が凝集したためと考えられる。

この流れによる NMR シグナル変化を定量的に解析したところ、部位によって減衰速度が異なっていた(図 4)。 vWF は血流によって構造がアンフォールドし、構造中心部に位置するアミノ酸

配列(…NLVYM…)内のYとMの間のペプチド結合がプロテアーゼ ADAMTS13 によって切断されることが知られているが(図4黒球)、今回の解析で減衰速度が速い部位は切断箇所から離れた α へリックスに集中していた(図4赤)。一方、減衰速度が遅い部位は切断箇所の近くに位置していた(図4青)。vWFは流れによって凝集したため、減衰速度はvWFがアンフォールドする速度に依存していると示唆される。したがって、流れによってvWFは切断箇所から遠い部位から構造がほどかれることが本研究で得られた Rheo-NMR データによって示された。

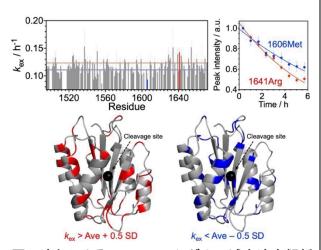


図4. 流れによるvWFのNMRシグナル減衰速度解析

今後の見通し

Rheo-NMR を用いたタンパク質の研究は申請者が独自に開始したもので、解析例は主にタンパク質のアミロイド線維化に限られていた[Morimoto, Anal Chem 2017; Iwakawa, Int J Mol Sci 2017; Iwakawa, JAm Chem Soc 2017]。一方、本研究では、流れの中で変化する vWF を Rheo-NMR を用いるとアミノ酸残基特異的に定量解析できることを示せた。すなわち、このことは Rheo-NMR 研究の新しい幕開けと言える。解析対象の vWF は血流によって凝集して血栓を作ったり、ADAMTS13 によって分解されたりする。これらの現象は、新型コロナウイルスの重症化や脳梗塞などの血栓症や血が固まりにくい血友病と関わる。また、vWF は塩濃度や酸化還元状態の違いによってもその構造安定性が変化することが分かっている。すなわち、vWF は血液の流れだけでなく、血中の塩濃度や酸化還元状態を検知するセンサーとして働いていることが示唆される。ゆえに、今後の研究では、流れの中における ADAMTS13 による vWF の分解機構の解明、血友病の原因となる vWF 変異体を用いた解析、および塩濃度や酸化還元状態を変化させた同様な解析などについて取り組み、このような研究を通じて人々の健康増進に貢献していく所存である。