

主論文の要旨

***Vwf*K1362A resulted in failure of protein
synthesis in mice**

〔 *Vwf*K1362A はマウスではタンパク合成不全を呈する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
高次医用科学講座 臓器病態診断学分野

(指導：中村 栄男 教授)

三田 直美

【緒言】

フォン・ヴィレブランド因子 (VWF) は血管内皮細胞および骨髄巨核球で産生され、血漿、血管内皮下組織および血小板に存在する高分子糖蛋白質である。その主な働きは一次止血において、ずり応力下で、VWF の A1 ドメインが血小板 GPIb と結合し、血小板凝集を惹起させることである。試験管内ではリストセチンやボトロセチンが、ずり応力とは無関係に VWF と GPIb との結合を惹起することが知られており、VWF A1 ドメイン変異体を HEK293 細胞で発現解析した松下らの研究では、K1362A 変異はリストセチン、ボトロセチン存在下でも GPIb との結合が認められず、同部位は GPIb と直接結合する可能性が示唆されたため、今回の研究では詳細な機能解析を目的にノックインマウスを作成した。

【方法】

マウス変異導入ベクターを作成し、Cre-loxP システムを用いて VWF K1362A ノックインマウスを作成した。ES クローンはサザンブロット法および PCR 法でマウス VWF エクソン 28 の導入変異を確認し、ノックインマウスの導入変異は cDNA シークエンスを実施して確認した。マウス肺、心臓、肝臓における *Vwf* mRNA 発現を Reverse Transcript (RT) PCR と Real-time PCR で解析し、野生型マウス (C57BL/6) および VWF ノックアウトマウスと比較した。また血漿中の VWF 抗原量 (VWF:Ag) は ELISA 法にて、第 VIII 因子活性 (FVIII:C) は発色合成基質法にて測定した。心臓と肺の血管内皮細胞に対し、免疫染色を実施して VWF 発現の評価を行った。

【結果】

作成したマウス ES クローンにおいて K1362A 変異が導入されたことをサザンブロット法および PCR 法で確認できた。*Vwf* mRNA 発現は RT PCR においては対象とした肺、心臓、肝臓のすべての臓器で検出されたが、Real-time PCR では評価可能なレベルの発現がみられたのは肺のみで、野生型と比較した K1362A ホモ接合体マウスの肺における *Vwf* mRNA 発現量は 60%、ノックアウトマウスは 7%であった (図 1A)。また cDNA シークエンスを実施し、野生型と K1362A 変異の塩基配列は確認できた (図 1B)。

VWF:Ag は ELISA 法で測定した結果、K1362A ホモ接合体マウスとノックアウトマウスでは感度以下であった (表 1)。FVIII:C は野生型と比較してヘテロ接合体マウスでは $47.9 \pm 0.3\%$ 、ホモ接合体マウスでは $3.3 \pm 0.3\%$ と低下していた (表 1)。また免疫染色では肺の内皮細胞では野生型において VWF の発現が認められたが、K1362A ホモ接合体マウスでは発現が確認できなかった (図 2)。心臓ではどちらのマウスでも VWF 発現は認められなかった。

【考察】

これまでに VWF A1 ドメイン変異体を HEK293 細胞で発現させて血小板 GPIb との結合力を解析した松下らの研究では、K1362A 変異はボトロセチンとの結合は正常である

が、リストセチン、ボトロセチン存在下でも GPIb との結合が認められなかった。VWF の立体構造において K1362 は GPIb の β スイッチ近くの $\alpha 3$ ヘリックスに位置する。リジンからアラニンに置換することで結合に関与する側鎖が短くなると予想され、GPIb との結合力が消失すると考えられる。これまでマウスモデルは、VWF 機能を研究する理想的なツールとして行われてきた。VWF A1 ドメイン構造はヒトとマウスとの間で高い相同性を示すため、遺伝子変異は類似した影響を与える可能性が高い。そのため今回の研究では Lys1362 をアラニンに置換したノックインマウス (K1362A) を作成し詳細な解析を行った。

作成したノックインマウスの K1362A 変異は PCR 法で確認を行った。K1362A マウスの相対的 *Vwf* mRNA 発現量は野生型と比較して約 60%程度であり、これは VWF 蛋白質を合成するのに十分な量であると考えられる。しかしながら、K1362A ホモ接合体マウス血漿中の VWF 抗原は、ELISA 法で感度以下であった。VWF は内皮細胞で合成され、血漿に分泌されることが知られている。心臓、肝臓および肺組織由来の内皮細胞を用いて、内皮細胞中の VWF の発現を確認するために免疫染色を行った。肺内皮細胞において野生型マウスでは VWF の発現を認めたが、K1362A ホモ接合体マウスでは発現を認めなかった。これらの結果から、K1362A 変異により転写後の過程で VWF 合成に異常を来していると推察される。

ヒトとマウス A1 ドメインに K1362A 変異を加えた三次構造モデルを SWISS-MODEL ソフトでシミュレーションし、Pymol ソフトで立体構造解析を行った (PDB:1AUQ、1U0)。その結果、リジンからアラニンへのアミノ酸変化は、アミノ酸側鎖が短くなると考えられ (図 3A、3B)、マウス A1 ドメインでは、K1362A 変異により蛋白質表面に小さな凹みが形成された (図 3C、3D)。また表面電荷も変化することが予測された (図 3C、3D)。K1362A 変異は、正に荷電したリジンの 4-アミノブチル基の損失をもたらすことが推測され、蛋白質構造に予想外の影響を及ぼし得ると考えられる。

以前のヒト VWF cDNA を HEK293 細胞で発現させ解析した実験においては、K1362A は十分に発現したが、GPIb との結合は認められなかった。これまでに 1 型および 3 型のフォン・ヴィレブランド病発症に至るヒト K1362A 変異についての報告がないことを考慮すると、タンパク質構造/発現に対する影響はマウスにおいてのみ観察される可能性がある。しかし、VWF1362 残基の変異として、K1362T (c.4085A>C) の報告がされている。K1362T は組換え VWF (rVWF) の発現および FVIII 結合、VWF マルチマー化においては有意な変化を認めなかったが、T1362rVWF はリストセチンおよびボトロセチン惹起による GPIb 結合能が有意に低下していた。今回、K1362A がマウスでタンパク質合成異常をきたしたことは今までの知見と照らし合わせると、興味深い結果であり、その原因については今後の検討余地がある。

【結語】

K1362A ノックインマウスにおいて VWF の mRNA は確認されたが、血中及び血管内皮細胞中に VWF 抗原を確認できなかった。原因として、転写後の過程で VWF 合成に障害

を来していると考えられた。マウスにおいて K1362 部位は血小板との結合だけでなく VWF 生成においても重要である可能性が示唆された。