

## 血漿タンパク質フォン・ヴィレブランド因子の食塩濃度に依存した力学応答の原子レベル解析

森本 大智<sup>1</sup>, 菅瀬 謙治<sup>2</sup>, Erik Walinda<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 京都大学大学院工学研究科, <sup>2</sup> 京都大学大学院農学研究科, <sup>3</sup> 京都大学大学院医学研究科

**概要** 血管が損傷を受け、出血してしまったとき、損傷部位に血小板が集積し、出血は止まる。血小板は止血において無くてはならないが、出血を感知するのは血小板ではなく、血漿タンパク質であるフォン・ヴィレブランド因子(vWF)である。出血時に発生する大きな流体力学的ストレスによって、vWF内にあるA2ドメイン(vWF-A2)の立体構造が解ける。解けたvWF-A2は切断され、血小板と適切な結合能を持ったvWF多量体になり、損傷部位に血小板を集積させる。このようなvWF-A2の力学応答は止血の初動で重要だが、応答が敏感すぎても鈍感すぎてもよくない。特に、食塩が高濃度に存在するときvWFの切断がうまくいかず、vWFは過剰な血小板結合能を有し、冠動脈血栓症などの血栓症のリスクが上がる。血中ナトリウム濃度は脱水や食塩の過剰摂取によって容易に上昇し、実際、血中ナトリウム濃度が上がると、vWFの異常凝集による血栓が形成する。しかし、どのように食塩がvWFの力学応答に影響するのかよく分かっていない。

力学応答つまり構造変化を詳細に解析するためには、構成する一つ一つのアミノ酸の原子レベルの観察が必要である。そこで本研究では、独自に開発したレオロジー核磁気共鳴(NMR)法を用いて、出血時と同等の流体力学的ストレスを掛けたvWF-A2を原子レベルかつリアルタイムで観察し、食塩濃度と力学応答の関係を解析した。

まず、安定同位体標識をしたvWF-A2を大腸菌発現系により調製し、蛍光分光法により、異なる食塩濃度下で構造安定性を調べた。すると、より高い食塩濃度下でvWF-A2の構造は安定化されることがわかった。これは食塩によってvWF-A2の構造が解けにくくなることを示している。しかし、レオロジーNMR法を用いて流体力学的ストレス下でvWF-A2の構造変化を追跡したところ、より高い食塩濃度下ではvWF-A2はタンパク質表面ではなく、構造内部から解かれやすくなることがわかった。この観察結果は、流体力学的ストレス下のタンパク質の構造変化をシミュレーションできるレオロジー分子動力学(MD)計算によっても裏付けられた。

最近の研究において、vWF-A2の切断反応自体が食塩添加によって阻害されることが報告されたため、高食塩濃度下ではvWF-A2の構造内部は解けやすくなるものの、それを上回る切断反応に対する阻害効果があると考えられる。このように、食塩濃度増加によりvWF-A2の構造内部の安定性は上昇するものの、流体力学的ストレスに対する力学応答は鋭敏になることが原子レベルで明らかにすることができた。今後、食塩のvWF-A2の力学応答への影響をより詳細に調べることで、食塩過剰摂取等による血中ナトリウム濃度の上昇と血栓症との関係の解明につながると考える。

### 1. 研究目的

血管が損傷を受け、出血してしまったとき、損傷部位に血小板が集積し、出血は止まる。血小板は止血において無くてはならないが、出血を感知するのは血小板ではなく、血漿タンパク質であるフォン・ヴィレブランド因子(vWF)で

ある。出血時に発生する大きな流体力学的ストレス(血流が血管壁を擦ることで生じるストレス)によって、vWF内にあるA2ドメイン(以下vWF-A2と略す)の立体構造が解けた構造に変化する(図1)。その後、解けたvWF-A2は、切断酵素ADAMTS13によって切断を受け、血小板と適切

な結合能を持った vWF 多量体に調整されることで、損傷部位に血小板を集積させる。このような vWF-A2 の力学応答は止血の初動で重要だが、応答が敏感すぎても鈍感すぎてもよくない。特に、食塩が高濃度に存在するとき、vWF の切断がうまくいかないことが報告されている<sup>[1]</sup>。切断がうまくいかないと vWF は過剰な血小板結合能を有してしまい、出血が無くても血栓ができ、冠動脈血栓症などの血栓症のリスクが上がる。血中ナトリウム濃度は脱水や食塩の過剰摂取によって容易に上昇してしまい、実際、血中ナトリウム濃度が上がると、vWF の異常凝集による血栓が形成する<sup>[2]</sup>。

しかし、どのように食塩が vWF の力学応答に影響するのかよく分かっていない。そもそも一般的なタンパク質の力学応答自体よく分かっていない。タンパク質の力学応答

つまり構造変化を追跡するためには、構成する一つ一つのアミノ酸の原子レベルの観察が必要だが、流体力学的ストレスを与えながら原子レベルでタンパク質を観察する手法は存在しない。このような背景のもと、我々は、流体力学的ストレスを加えながら原子レベルでタンパク質を観察できるレオロジー核磁気共鳴(NMR)法を開発した<sup>[3-5]</sup>。独自に開発した固定棒を使ってタンパク質試料に剪断流を与えると(特許 7255801)、血中の流体力学的ストレスを再現することができる(図 2)。本研究では、異なる食塩濃度における vWF-A2 の力学応答をレオロジー-NMR 法により原子レベルで解析し、食塩濃度と力学応答の関係を説明する(図 1)。本研究で得られる知見は、食塩過剰摂取等による血中ナトリウム濃度の上昇と血栓症との関係を理解する上で重要な知見となると期待される。

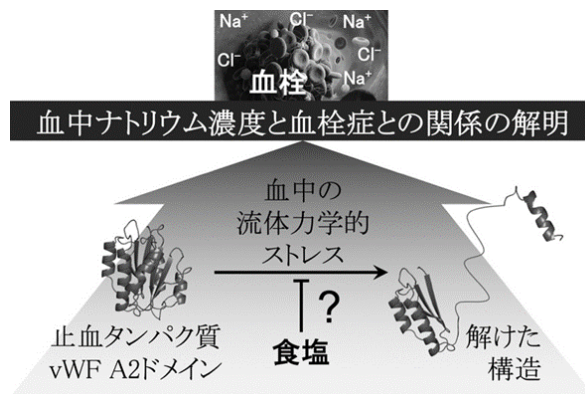


図 1. 本研究の概念図。

vWF-A2 は出血時に発生する大きな流体力学的ストレスにより解けた構造に変化する。食塩が高濃度に存在するとき、vWF-A2 の力学応答が鈍化し、切断がうまくいかないことが報告されているが<sup>[1]</sup>、その機構は明らかになっていない。本研究では、異なる食塩濃度における vWF-A2 の力学応答を説明し、食塩過剰摂取等による血中ナトリウム濃度の上昇と血栓症との関係を理解する。

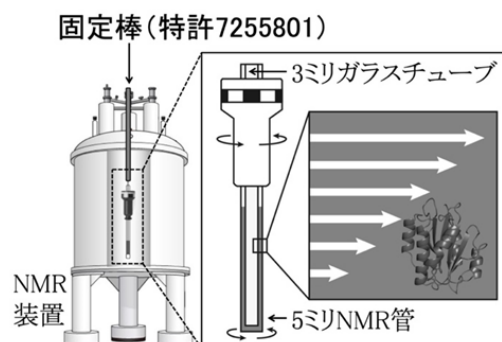


図 2. レオロジー-NMR 法による構造変化誘導の概略図。

レオロジー-NMR 法とは NMR 試料管に固定棒(特許 7255801)を挿入し、試料溶液を攪拌することで、タンパク質が変形する「その場」を原子レベルかつリアルタイムで解析する手法である。

## 2. 研究方法

本研究では、我々が世界に先立って開発したレオロジー-NMR法を用いて、食塩濃度に依存したvWF-A2の力学応答を原子レベルかつリアルタイムで追跡する。具体的には、vWF-A2に血流と同程度の流体力学的ストレスを与え、生理的食塩濃度条件(140 mM)と高食塩濃度条件(250 mM)下でどのようにNMRシグナルの変化に違いが生じるのか、アミノ酸レベルで解析する。特に、過去の報告に基づき<sup>6)</sup>、流体力学的ストレスにより立体構造が解ける部分(構造の中心部分にあるTyr1605)や食塩が影響しやすいと予想される電荷を持つアミノ酸を中心に解析をおこなう。

さらに、最近我々はレオロジー分子動力学(MD)法を開発し、レオロジー-NMR法で得られた現象をシミュレーションによって再現および補完する解析手法を確立した<sup>7)</sup>。本研究では、vWF-A2の異なる食塩濃度条件下における構造変化をシミュレーションし、どのように違いが生じるのか、レオロジー-NMR法によって得られた結果と照らし合わせ、原子レベルで解析する。

## 3. 研究結果

まず、vWF-A2の安定同位体標識体(<sup>15</sup>N標識体)を高純度かつ大量に調製した(図3)。先行研究において、vWF-A2は動物細胞を用いた調製方法しか報告されておらず、大腸菌を用いた大量調製法は確立されていなかった。そのため、異種核NMR測定など高分解能のNMR実験を行なうことが困難であった。そこで、本研究ではvWF-A2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、グルタチオンSトランスフェラーゼタグを連結させたvWF-A2を大腸菌内で大量発現させ、精製する調製法を確立し、NMR実験に十分な<sup>15</sup>N標識体を得ることができた。

タンパク質の構造変化をしやすさを調べる上で、タンパク質の構造安定性は重要なパラメータとなる。事実、過去の報告において、vWF-A2を含むvWF-A1-A2-A3ドメイン連結体は食塩濃度依存的に構造安定性が上昇することが報告された<sup>1)</sup>。そこで、本研究では生理的食塩濃度条件(140 mM)と高食塩濃度条件(250 mM)におけるvWF-A2単体の熱力学的な構造安定性を蛍光分光法で調べた。サイプロオレンジ色素は折り畳まれていないタンパク質の疎水性領域に強く結合する環境感受性色素であり、タン

パク質の熱変性を調べるためによく用いられている<sup>8)</sup>。そこで、本研究ではサンプルオレンジ色素共存下でタンパク質溶液を昇温し、色素の蛍光強度変化を解析した。すると、昇温するにしたがって、シグモイド曲線様に蛍光強度が上昇した。熱変性曲線の変曲点から熱転移温度を見積もったところ、生理的食塩濃度条件に比べて高食塩濃度条件下における熱転移温度は高いことがわかった(図4)。これは、食塩が高濃度存在する環境下において、vWF-A1-A2-A3ドメイン連結体と同様に、vWF-A2の立体構造は安定化されることが示している。

次に、どのように高濃度の食塩が立体構造を安定化するのか理解するために、生理的食塩濃度と高食塩濃度条件下におけるvWF-A2の主鎖の化学的環境の違いを調べた。溶液NMR法により<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N二次元相関スペクトルを測定し、両条件のアミド水素の化学シフトを比較した(図5)。化学シフト変化量は限定されたものではあったが、比較的大きな化学シフト変化を示したアミノ酸は立体構造の内部に位置していることがわかった(図5右)。一般的に溶媒中に存在する食塩(ナトリウムイオンと塩化物イオン)はタンパク質表面に位置するアミノ酸の側鎖に影響を及ぼす。したがって、今回得られた化学シフト変化はタンパク質表面と食塩との相互作用の二次的な効果であると考えられ、この効果によって立体構造が安定化されたと示唆される。

そして、食塩による構造安定化がvWF-A2の力学応答にどのように影響するのか明らかにするため、開発したレオロジー-NMR装置を用いて、血流と同程度の流体力学的ストレス(剪断速度290-540 s<sup>-1</sup>)をタンパク質溶液に与え、vWF-A2の構造変化を追跡した。まず、生理的食塩濃度条件下でvWF-A2の主鎖のアミド水素のNMRシグナルを追跡したところ、流体力学的ストレス下で化学シフトはほとんど変化しなかった一方、それぞれのピーク強度が時間とともに減衰することがわかった(図6)。実際、レオロジー-NMR測定後のタンパク質溶液を観察したところ、凝集体が含まれていた(図6写真)。これらの結果から、流体力学的ストレスによってvWF-A2の立体構造はほどかれ、露出した疎水性面を介して分子間で相互作用し、結果的に溶液NMR法では測定できないほど高分子量の会合体つまり凝集体を形成したと考えられる。

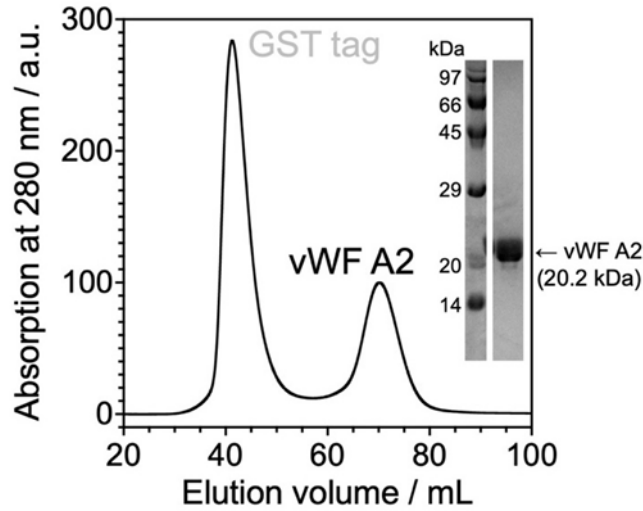


図3. 大腸菌発現系による vWF-A2 の  $^{15}\text{N}$  標識体の高純度大量調製.

M9 最小培地による培養により大腸菌内で大量に vWF-A2 を発現させ、その後、超音波破碎、各種クロマトグラフィーにより精製した。図は最終ステップである分子排斥クロマトグラフィーのチャートを示している。右上: ポリアクリルアミド電気泳動解析により vWF-A2 が高純度に精製されていることを確認した(クマシーブリリアントブルー染色)。

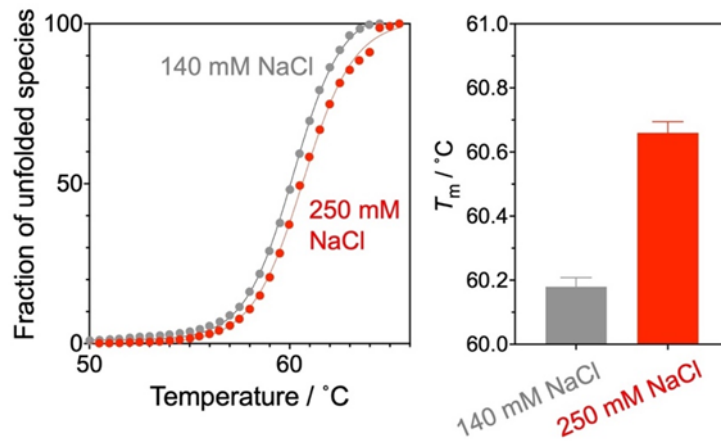


図4. 食塩濃度依存的な vWF-A2 の構造の熱安定性の変化.

左: サンプロオレンジ色素共存下でタンパク質溶液を昇温し、色素の蛍光強度変化をもとにタンパク質のほどかれた状態の割合を算出した<sup>[8]</sup>。灰色が 140 mM NaCl 条件, 赤色が 250 mM NaCl 条件を示す。

右: 熱変性曲線の変曲点から熱転移温度を見積もったところ、生理的食塩濃度条件に比べて高食塩濃度条件における熱転移温度は高いことがわかった。

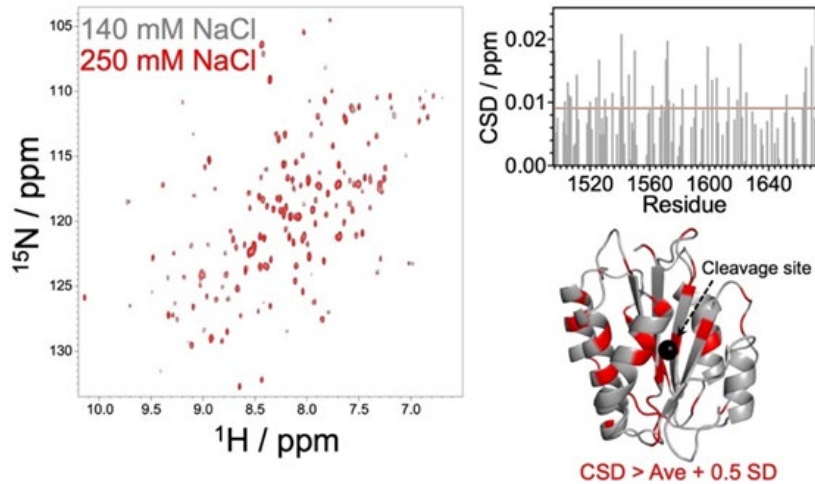


図 5. 異なる食塩濃度における vWF-A2 の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  二次元相関スペクトル。

左: 灰色が 140 mM NaCl 条件, 赤色が 250 mM NaCl 条件を示す。

右上: 各クロスピークの化学シフト変化をアミノ酸に対してプロットしている。赤線は化学シフト変化の平均値 (Ave) に標準偏差 (SD) に 0.5 を掛けたものを加えた値 (Ave + 0.5 SD) を示す。

右下: 化学シフト変化が Ave + 0.5 SD より大きい値を示すアミノ酸を vWF-A2 の立体構造上に赤色でマッピングしている。ADAMTS13 による切断箇所を黒丸で示している。

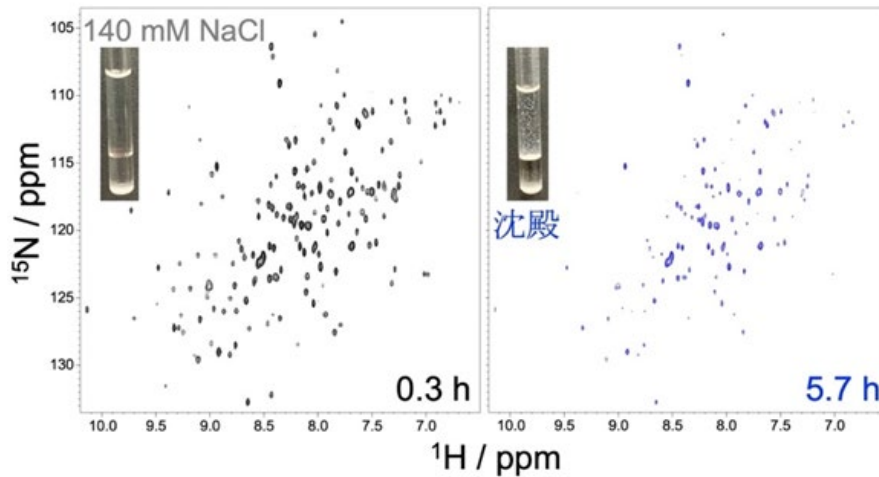


図 6. 流体力学的ストレス下における vWF-A2 の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  二次元相関スペクトルの変化。

実験開始後 0.3 時間後 (左) および 5.7 時間後 (右) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  二次元相関スペクトルを示している。全てクロスピークのピーク強度が時間経過と共に減衰していた。

各スペクトル内の左上写真はそれぞれにおける NMR 試料管の写真である。5.7 時間後には白色の沈殿が生じていた。

さらに、流体力学的ストレスによる NMR シグナル変化を定量的に解析したところ、アミノ酸部位によって減衰速度が異なることがわかった (図 7)。vWF-A2 は出血時に発生する大きな流体力学的ストレスによって構造がほどかれ、構造中心部に位置する特定のペプチド結合 (構造の中心部分にある Tyr1605 と Met1606 と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 (図 7 黒球)。減衰速度が速い部位は切断箇所から離れた  $\alpha$  ヘリ

ックスに集中していた一方 (図 7 赤)、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 7 青)。vWF-A2 はレオロジー NMR 装置で発生した流体力学的ストレスによって凝集したため、NMR シグナル減衰速度は構造がほどかれる速度 (凝集体を形成する速度) に依存していると考えられる。したがって、流体力学的ストレスによって vWF-A2 は切断箇所から遠い部位から構造がほどかれることが示唆された。



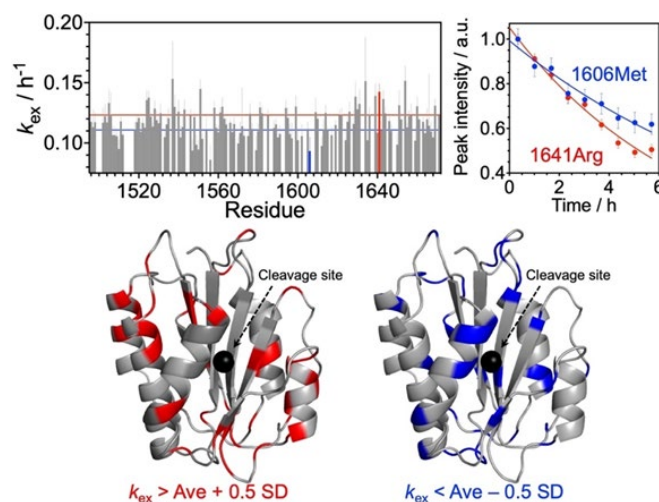


図 7. 生理的食塩濃度条件下における流体力学的ストレスによる vWF-A2 の NMR シグナル減衰のアミノ酸特異的速度論解析。

左上:シグナル減衰プロファイルを一次反応式でフィッティングし, 得られた速度定数  $k_{ex}$  をアミノ酸に対してプロットしている。赤線は  $k_{ex}$  の Ave + 0.5 SD, 青線は Ave - 0.5 SD を示している。

右上:特徴的なシグナル減衰プロファイルを表している。対応するアミノ酸は左上のプロット内で色をつけて表示している。

下: $k_{ex}$  が Ave + 0.5 SD よりも大きい(左, 赤), Ave - 0.5 SD よりも小さい(右, 青)アミノ酸を vWF-A2 の立体構造上にマッピングしている。ADAMTS13 による切断箇所を黒丸で示している。

高食塩濃度条件下における vWF-A2 の構造変化を生理的食塩濃度条件下と同様に調べたところ, 流体力学的ストレスによって vWF-A2 は凝集体を形成したが, シグナル減衰速度は全体として生理的食塩濃度条件と比較しほとんど違いがなかった(図 8)。蛍光分光法による立体構造の熱安定性解析により, 高食塩濃度条件下で vWF-A2 の立体構造は安定化していたため(図 4), 構造がほどかれにくくなることが予想された。しかし, 全体としてのシグナル減衰速度の違いは限定的であった。ただ, 興味深いことに, シグナル減衰速度の違いは部位特異的であることがわかった(図 8)。減衰速度が速くなった部位は切断箇所の近くに位置していた一方(図 8 赤), 減衰速度が遅くなった部位は切断箇所から離れた  $\alpha$  ヘリックスに集中していた(図 8 青)。つまり, 高食塩濃度条件下では切断箇所に近い構造内部は流体力学的ストレスによってほどかれやすくなり, 切断箇所から離れた部位はほどかれにくくなったことを意味する。しかし, 食塩濃度依存的な化学シフト変化解析から, 切断箇所の近くの構造内部において, より大きな化学的環境変化が観察されており, 構造内部の変化が熱力学的な構造安定化に関与していることが示唆されている(図 5)。したがって, 流体力学的ストレスによる力学応答は熱力学的な構造安定化と逆の表現型を持つと考えられる。本来, タンパク質と溶媒中の食塩(ナトリウムイオンと塩化物イオン)はブラウ

ン運動によってランダムに動いているが, 流体力学的ストレスによって異方的な運動(水流方向への運動)が誘起される。そのため, タンパク質と食塩との相互作用が不安定化する可能性があり, 食塩濃度依存的に構造学的に影響があった vWF-A2 の構造内部が結果的にほどけやすくなったと考えられる。

最後に, レオロジー-NMR 法で観察された食塩濃度依存的な凝集体形成速度の違いをレオロジー-MD 法によりシミュレーションした。より短い計算時間で構造変化を見るため, 剪断速度はレオロジー-NMR 法より大きな値に設定し( $0.75 \text{ nm ps}^{-1}$ ), 生理的食塩濃度と高食塩濃度条件下において vWF-A2 の構造がどのようにほどかれるかを追跡した(図 9)。すると, 生理的食塩濃度条件下に比べ, 高食塩濃度条件下において vWF-A2 の構造がより速くほどかれることがわかった。さらに, 両条件下における 25%ならびに 50%構造がほどかれた状態を解析したところ, レオロジー-NMR 法の定量的なシグナル減衰速度解析の結果と同様に, 高食塩濃度条件下において切断部位に近い構造内部がより速くほどかれ, 切断部位から遠い構造は二次構造を比較的維持していることが観察された。この結果はレオロジー-NMR 法で得られた結果を支持するものであり, 高濃度の食塩は vWF-A2 の構造内部の流体力学的な不安定化に寄与することが示唆された。

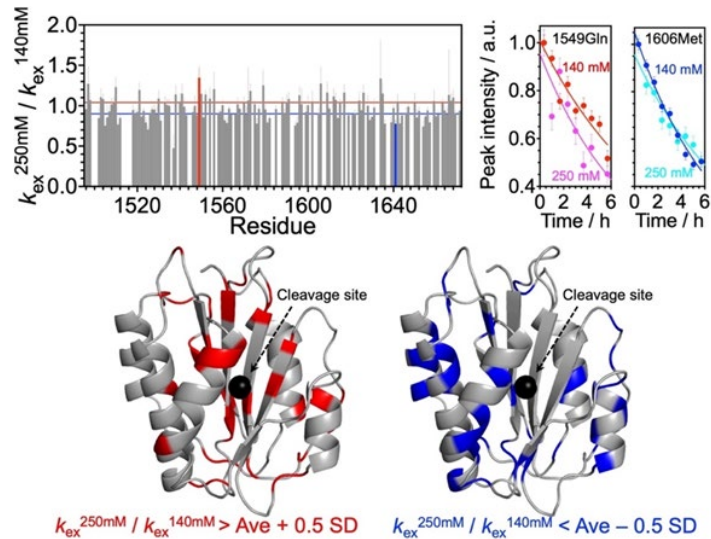


図 8. 生理的食塩濃度条件下と高食塩濃度条件下における流体力学的ストレスによる vWF-A2 の NMR シグナル減衰の速度定数の比較。

左上: 生理的食塩濃度条件下と高食塩濃度条件下における速度定数  $k_{ex}$  の比をアミノ酸に対してプロットしている。赤線は  $k_{ex}$  の比の Ave + 0.5 SD, 青線は Ave - 0.5 SD を示している。  
 右上: 特徴的なシグナル減衰プロファイルの比較を表している。対応するアミノ酸は左上のプロット内で色をつけて表示している。  
 下:  $k_{ex}$  の比が Ave + 0.5 SD よりも大きい(左, 赤), Ave - 0.5 SD よりも小さい(右, 青)アミノ酸を vWF-A2 の立体構造上にマッピングしている。ADAMTS13 による切断箇所を黒丸で示している。

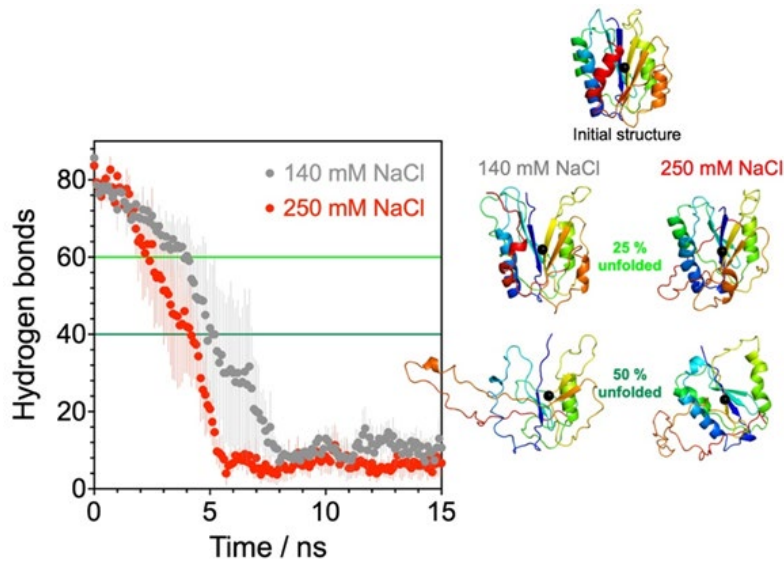


図 9. レオロジーMD 法による vWF-A2 の構造変化の追跡。

開発したレオロジーMD 法<sup>[7]</sup>を用いて, 0.75 nm ps<sup>-1</sup> の剪断速度における構造変化を 15 ナノ秒間追跡した。生理的食塩濃度条件下(140 mM NaCl)と高食塩濃度条件下(250 mM NaCl)において, それぞれ独立した計算を 3 回ずつ実施した。  
 左: 得られたトラジェクトリーから vWF-A2 分子内の水素結合の総数を時間に対してプロットした(灰色: 生理的食塩濃度条件, 赤色: 高食塩濃度条件)。各点は各時間における 3 回の計算の平均値を示しており, エラーバーは標準誤差を示している。  
 右: 25%(中央, 黄緑色)ならびに 50%(下, 緑色)水素結合が現象した時点での構造を表している(左: 生理的食塩濃度条件, 右: 高食塩濃度条件)。どの部位がどのように変化したのかわかりやすくするために N 末端から C 末端までを青色から赤色に着色している。  
 右上: 計算開始時の vWF-A2 の初期構造を表している。

#### 4. 考察

先行研究において、血中ナトリウム濃度が上がると、vWF の異常凝集による血栓が形成することが報告されている<sup>[2]</sup>。適切に vWF-A2 の立体構造がほどこけ、切断酵素 ADAMTS13 によって切断されないと、vWF は過剰な血小板結合能を有し、出血が無くとも血栓ができてしまう。したがって、研究開始時、高食塩濃度下では vWF-A2 の立体構造はほどこけにくくなり、結果的に血栓を形成しやすくなることを予想していた。しかし、本レオロジー-NMR 実験およびレオロジーMD 計算によって得られた結果は予想に反するものであり、高食塩濃度条件では生理的食塩濃度条件下に比べ、vWF-A2 の構造内部はほどこけやすくなることがわかった。最近の研究において、ADAMTS13 による切断反応は食塩濃度に大きく依存し、食塩濃度が高ければ高いほど切断反応は阻害されることが報告されている<sup>[9]</sup>。したがって、高食塩濃度条件では vWF-A2 の構造内部はほどこけやすくなるものの、それを上回る切断反応に対する阻害効果があるため、結果的に vWF は切断されにくくなり血栓を形成しやすくなると考えられる。レオロジー-NMR 実験において、vWF-A2 単体はほどこかれた状態にあると即座に自己会合し凝集したため、切断反応が阻害されると、血小板との結合に関わらず血中で異常な凝集体が形成すると考えられる。また、食塩濃度と vWF-A2 の構造内部のほどこかれやすさとの関係は、食塩濃度と切断反応効率との関係と逆であったため、vWF-A2 の力学応答は、食塩の持つ切断反応への阻害効果を補う効果があると考えられる。つまり、血中の多少の食塩濃度の増減があったとしても、物理的(vWF-A2 の力学応答)かつ化学的(切断反応の阻害)に調節されることで適切な止血が維持されると示唆される。

#### 5. 今後の課題

本研究では生理的食塩濃度条件と高食塩濃度条件のみの vWF-A2 の流体力学的ストレス下の挙動を調べたが、将来的には、食塩濃度の増減で vWF-A2 の立体構造のほどこけやすさはどのように変化するのか、さらには切断酵素 ADAMTS13 による切断反応はどのように関与す

るのかを詳細に調べることは興味深い。また、vWF は成熟体で 2000 アミノ酸ほどもある巨大なタンパク質であり、数多くのドメインから構成される。本研究では流体力学的ストレスの力学応答の根幹を担う vWF の A2 ドメインのみを解析したが、A2 ドメインは隣接する A1 ドメインと A3 ドメインと協調的に力学応答を示すことが報告されている<sup>[10]</sup>。したがって、今後はより大きなフラグメントを用いて、力学応答ならびにその食塩濃度依存性を原子レベルで明らかにすることによって、血中における真の vWF の力学応答の理解につながると考えられる。そして、得られる知見は、血中ナトリウム濃度の上昇と血栓症との関係を理解する上で重要になるであろう。

#### 6. 文献

1. R. De Cristofaro, F. Peyvandi, L. Baronciani, R. Palla, S. Lavoretano, R. Lombardi, E. Di Stasio, A. B. Federici, P. M. Mannucci, *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 30400–30411.
2. N. I. Dmitrieva, M. B. Burg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, 111, 6485–6490.
3. D. Morimoto, E. Walinda, N. Iwakawa, M. Nishizawa, Y. Kawata, A. Yamamoto, M. Shirakawa, U. Scheler, K. Sugase, *Anal. Chem.* 2017, 89, 7286–7290.
4. N. Iwakawa, D. Morimoto, E. Walinda, M. Shirakawa, K. Sugase, *J. Am. Chem. Soc.* 2021, 143, 10604–10613.
5. D. Morimoto, E. Walinda, A. Yamamoto, U. Scheler, K. Sugase, *Curr. Protoc.* 2022, 2, 1–15.
6. T. A. Springer, *Blood* 2014, 124, 1412–1425.
7. E. Walinda, D. Morimoto, M. Shirakawa, U. Scheler, K. Sugase, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2020, 1864, 129383.
8. F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nat. Protoc.* 2007, 2, 2212–2221.
9. R. De Cristofaro, F. Peyvandi, R. Palla, S. Lavoretano, R. Lombardi, G. Merati, F. Romitelli, E. Di Stasio, P. M. Mannucci, *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 23295–23302.
10. O. Languin-Cattöen, E. Laborie, D. O. Yurkova, S. Melchionna, P. Derreumaux, A. V. Belyaev, F. Sterpone, *Polymers (Basel)*. 2021, 13, 1–21.



## Atomic-Level Analysis for Salt Concentration-Dependent Structural Responses of a Plasma Protein von Willebrand Factor

Daichi Morimoto<sup>1</sup>, Kenji Sugase<sup>2</sup>, Erik Walinda<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering, Kyoto University,

<sup>2</sup> Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

<sup>3</sup> Graduate School of Medicine, Kyoto University

### Summary

Under significant fluid dynamic stress in blood vessels during bleeding, the tertiary structure of the A2 domain of von Willebrand factor (vWF-A2) is unfolded. The unfolded vWF-A2 is cleaved, and the cleaved vWF forms multimers with the appropriate binding capacity for platelets, leading to platelet accumulation at the injury site. This mechanical response of vWF-A2 is crucial in the initial phase of hemostasis but should not be overly sensitive or insensitive. Increased blood sodium concentration due to dehydration or excessive salt intake hinders the cleavage of vWF, resulting in excessive platelet binding and an increased risk of thrombosis. However, the influence of salt on the mechanical response of vWF remains poorly understood. To analyze the mechanical response of vWF-A2 in detail, we employed rheology nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) to observe vWF-A2 at the atomic level and in real-time under the physiological fluid dynamic stress.

First, we prepared isotope-labeled vWF-A2 in *Escherichia coli* and examined its structural stability at different salt concentrations using fluorescence spectroscopy. We found that higher salt concentrations stabilized the core structure of vWF-A2. Nonetheless, under fluid dynamic stress, rheology NMR revealed that the core structure of vWF-A2 was more likely to be unfolded at higher salt concentrations. This observation was supported by rheology molecular dynamics (MD) simulations that traced the protein unfolding under fluid dynamic stress.

A recent study has shown that salt addition inhibits the cleavage reaction of vWF-A2. Therefore, while the core structure of vWF-A2 is more prone to unfolding under fluid dynamic stress at high salt concentrations, the inhibitory effect of salt on cleavage surpasses the unfolding effect. Thus, the stability of the core structure of vWF-A2 increased with higher salt concentration, making the mechanical response to fluid dynamic stress more sensitive, as revealed at the atomic level. Further investigation into the influence of salt on the mechanical response of vWF-A2 may contribute to understanding the relationship between elevated blood sodium concentration and thrombosis.