

血小板細胞接着に寄与する糖蛋白 GPIba と von Willebrand

因子の分子間力 *in silico* 予測と原子間力顕微鏡検症

後藤信哉

東海大学医学部 内科学系 循環器内科学
東海大学大学院医学研究科 代謝疾患研究センター

【研究の背景】

現在の医学はランダム化比較試験の結果に基づき、平均的症例の標準治療の転換を継続する Evidence Based Medicine の体系に基づく。心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患の発症初期には、血管内皮損傷部位への血小板の集積が必須の役割を演じる¹⁾。血管壁損傷部位の血小板接着には多様性があり、個体差もある。しかし、個人差を説明する理論は確立されていない。

近年のコンピューターの高速化と情報工学技術の進歩により複雑な生命現象であってもコンピューターによる再現が可能となった²⁾。生物学的研究の蓄積により、壁ずり速度が高い血流環境における血小板細胞の血管壁損傷部位への接着は、血小板細胞上の膜糖蛋白 GPIb α 分子と von Willebrand 因子の接着に一義的に依存することを示した³⁾。本研究では、両分子の接着というナノメートルスケールの接着力からマイクロメートルスケールの血小板細胞接着機構の構成論的理解を目指す。

【目的】

血小板は、流体力による引き剥がし効果に抗して血管壁損傷部位に接着、凝集する。高ずり応力下の血小板接着、凝集は、膜糖蛋白(GP)Ib α と von Willebrand 因子(VWF)の相互作用に基づく。Wild type の両分子の結合は一時的で安定しない⁴⁾。そこで、安定接着する変異体(R1306Q VWF and M239V GPIba)を用いて両分子の結晶を作成し、両分子の 3 次元的結合構造が X 線構造にて明らかにされた⁵⁾。この X 線構造解析により得られた構造と Wild type の差異の有無は不明である。また、VWF は血漿蛋白として水分子存在下の構造が結晶構造と差異がある可能性を否定できない。われわれは分子動力学計算とスーパーコンピューターを用いて、GPIb α と VWF の水溶性結合構造の解明を目指す。両分子の重心間距離を変化させ、分子を構成する全原子による力場から両分子の結合力予測を行う。予測計算の妥当性を原子間力顕微鏡にて検証する。

【方 法】

1) GPIb α と VWF の水溶性結合構造予測

GPIb α 、VWF 両分子を構成するアミノ酸配列は遺伝子配列により規定される。GPIb α 、VWF ともに wild type を用いる。両分子を構成する全ての原子に対して、ニュートンの第二法則としての力(force: F)=質量(mass: M) × 加速度(acceleration: A)の方程式を解く。対象原子は 100 万弱であるため、100 万弱の連立方程式を解くために並列計算プログラム NAMD(Nanoscale Molecular Dyanamic)ソフトウェアを用いる。十分に離れた原子対に作用する力は万有引力の法則である。しかし、原子が近づくと電荷に基づくクーロン力を無視し得ない。また、ニュートン力学の適応範囲を超え、量子力学が支配原理となる。現在のスパコンといえども量子力学から分子構造を解く計算負荷に耐えられない。そこで、量子力学を簡便化してニュートン力学に取り込む Molecular Mechanics(MM)/Quantum Mechanics(QM)連成計算を行う。力場として CHARMM(Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)

-22 を用いる。計算場に水分子を取り込んで、エネルギー的安定構造を予測する。

2) GPIb α とVWFの接着力予測

CHARMMとNAMDを用いた計算により、エネルギー的安定構造を予測すると、その構造における両分子の重心間距離が明らかになる。両分子間の分子間距離を0.5Å毎に近づけ・引き離して、安定構造計算を行う。また、各構造の Potential of Mean Force(PFM)を算出する。分子間距離と PFM の関係を関数化する。エネルギーに相当する PFM を距離により微分することにより両分子の接着力を予測する。これらの予測計算にはスパコン「京」、東京大学の FX-10 および研究室内の 12 ノードスパコンを用いる。

3) GPIb α とVWFの接着力予測の妥当性の検証

実証的生物学的実験により、VWFに結合する血小板の結合動態を観察する。血小板細胞のサイズを2-5 μmと見積もると、血小板細胞が受ける流体力が予測できる。流体力と両分子接着の関係を定量化する。また、原子間力顕微鏡を用いて、VWFとGPIb α の結合力を実測し、予測計算の妥当性を検証する。

【結 果】

1) GPIb α とVWFの水溶性結合構造予測

水溶性状態において、GPIb α とVWFは重心間距離 27.3Åにおいて安定結合した。エネルギー的安定構造であっても両分子は、構成する全ての原子の相対的位置の変異(RMSD: root mean square deviation)2Å程度の範囲において構造揺らぎを呈した。構造揺らぎは GPIb α において VWF よりも大であった。

2) GPIb α とVWFの接着力予測

GPIb α とVWFの両分子間の分子間距離を0.5Å毎に近づけ・引き離して、安定構造計算を行った。各構造の有する Potential of Mean Force を算出した。Morse らによる方法を用いて、分子間距離と PFM の関係を関数化した。両分子の結合エネルギーを 40.9 kcal/mol と予測計算した。また分子間距離とエネルギーの関数を微分して、両分子間の結合力を 62.3 pN と予測計算した。

VWF、GPIb α 各分子内に各種変異を作成し、重心間距離 27Å 程度における安定構造予測計算を行った。変異体であっても、結合構造自体は大きく変化しなかった。

3) GPIb α とVWFの接着力予測の妥当性の検証

実証的生物学的実験により、VWF に結合する血小板の結合動態を、壁ずり速度 1,500 s⁻¹ の条件にて観察した。GPIb α とVWF のみに依存する接着を評価するために、プロスタグラジン E1 により血小板細胞の活性化を阻害した。また、GPIIb/IIIa の機能阻害抗体にて GPIIb/IIIa を介する接着を阻害した。血小板細胞のサイズを 2-5 μm と見積もると、血小板細胞が受ける流体力は 200 pN 程度となる。

VWF を基盤に塗布した。カンチレバーに VWF を塗布した。原子間力顕微鏡を用いてカンチレバーを基盤に接着させ、一定速度にて基盤から引き剥がした時のカンチレバーの撓みを経時的計測した。計測結果から、両分子の接着力を 54 pN および 107 pN であることを示した。

【考 察】

分子動力学と量子動力学を連成した QM/MM 計算法により、生物学的には安定した結合構造をとらない Wild type の血小板膜糖蛋白 Glycoprotein(GP)Iba の N 末端領域と、von Willebrand 因子の GPIba 結合部位である A1 ドメインの水分子存在下におけるエネルギー的最安定構造を予測した。過去に報告された安定構造をとり得る変異型の結合構造と著しい差異を認めなかった。エネルギー的最安定構造では、GP Iba と VWF の分子重心間距離は 27.3Å であった。変異型の血漿構造と大きな差異を認めなかった。重心間距離を 27.3Å に固定しても、両分子を構成する各原子の重心に対する相対的位置は常に揺らいでいた。重心間距離を *in silico* にて 0.5Å 每に引き離して、各々構造の有する Potential of Mean Force を算出した。距離と結合エネルギーの関係を微分して、両分子の結合力を 62.3 pN と予測した。実証実験では VWF に結合した血小板細胞は 200 pN 程度の流体力を受ける。流体力に抗する血小板細胞の接着を認めたので、接着した血小板は最低でも実態として 4 分子程度の GPIba と VWF 分子の結合が起こっている。原子間力顕微鏡によるカンチレバーの撓みから

の接着力予測の結果も QM/MM 計算法と著しい差異を認めなかつた。QM/MM 計算法を用いて、力学的見地から GPIba と VWF の接着動態予測を行つたことが本論文の新規性である。

QM/MM 計算法は生体を構成する高分子の構造機能連関の解明に役立つツールである。しかし、本法には理論的欠点がある。近年のコンピューターが高速化し、情報工学が進歩したと言つても、生体構成分子の構造を量子力学から解く能力はない。原子同士は無限遠に離れていても相互作用する可能性を否定できないが、計算の範囲は有限の範囲に定める必要がある。本研究では関心領域を $83 \times 95 \times 105 \text{ \AA}$ の領域に止めた。原子間の力場のデータベースとして CHARMM-22 を用いた⁶⁾。酵素などの生体構成分子の構造機能解析において CHARMM-22 の妥当性が示唆されているが、GPIba と VWF の結合力計算を行つた本研究の範囲までの有用性は確認されていない。

QM/MM 計算により予測した Wild type の GPIba と VWF の結合構造は、過去に報告された生物学的にも安定構造をとり得る 2 型 von Willebrand 病の GPIba と VWF 結合構造と大きな差異を認めなかつた^{2, 5)}。QM/MM 計算には理論的欠点があるが、過去に確立された方法である X 線構造解析の構造と類似の構造を予測したことから QM/MM 計算には妥当性があると考える。

GPIba と VWF 結合構造から、構造が有するエネルギーを算出した。両分子の重心間距離を 0.5 \AA 毎に引き剥がしてエネルギー的安定構造を算出し、構造が有する Potential of Mean Force を算出した。CHARMM-22 の力場のデータベースの妥当性の範囲において計測された PMF は正しい。重心間距離と PFM の関係をプロットした。両分子の結合エネルギーから結合力を算出するために、重心間距離と PFM の関係を Morse 法によりフィッティングした。フィッティングには誤差がある。単純な相関関係ではないため、誤差の範囲の推定は困難である。VWF と GPIba の結合力を 62.3 pN と予測したが、フィッティングの誤差のみでも $40\text{-}80 \text{ pN}$ までの誤差はあり得る。実証的生物学的実験にて、VWF と GPIba の結合力を原子間力顕微鏡により推定した。実証実験では GPIba は N 末端を用いたが VWF は A1 ドメインのみでなくマルチマーを含む全分子を用いた。 $50\text{-}100 \text{ pN}$ 程度との計測結果は、QM/MM 計算と近いが、両計測値ともに真の値は不明である。

血小板は高いずり速度場においてのみ GPIba と VWF の結合を介して接着すると生物学的には報告してきた。 $1,500 \text{ s}^{-1}$ の壁ずり速度の流れ場において直径 $2\text{-}5 \mu\text{m}$ の血小板細胞が受ける流体力は 200 pN 程度である。血小板細胞上には 1 万 5 千分子の GPIba 分子が存在するが⁴⁾、細胞接着に必要な分子対は数分子に過ぎない。

本研究によりマイクロメートルスケールの血小板細胞の流体下における接着という生物現象を QM/MM 計算により構成論的に説明できた。QM/MM 計算の理論的問題点の克服にはさらに高速のスパコンの開発が必須である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで、蛋白質相互作用を標的とする薬剤の開発には X 線結晶構造から予測した蛋白質高次構造が用いられた。生体蛋白は動的に揺らいで、蛋白質同士の相互作用が可能となる。X 線結晶構造解析では構造揺らぎの解析は不可能であった。われわれは蛋白を構成する原子から生体構成高分子の動的 3 次元構造予測に成功した。分子間距離を *in silico* にて引き剥がして安定構造を予測すれば、創薬標的の数は飛躍的に増加する。*In silico* 創薬の可能性を示した。

【参考・引用文献】

- 後藤信哉. 理屈がわかる抗凝固・抗血小板療法. 東京: 中外医学社; 2016.
- Shiozaki S, Takagi S and Goto S. Prediction of Molecular Interaction between Platelet Glycoprotein Ibalpha and von Willebrand Factor using Molecular Dynamics Simulations. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23:455-64.
- Goto S, Ikeda Y, Saldivar E and Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101:479-86.
- Goto S, Salomon DR, Ikeda Y and Ruggeri ZM. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:23352-61.
- Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ and Gros P. Structures of

- glycoprotein I α and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. 2002;297:1176-9.
6. Brooks BR, Brooks CL, 3rd, Mackerell AD, Jr., Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoscek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM and Karplus M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*. 2009;30:1545-614.