

MD 計算による血小板細胞膜蛋白とリガンド結合の立体構造および結合の力学特性の解明(loss of function 型変異体に関して)

後藤信一

慶應義塾大学 医学部 循環器内科

1. はじめに

血小板は、生体において損傷血管に接着し、出血を防止する重要な細胞である。^{1,4} その一方で、この血小板の止血作用が誤作動すると血管が詰まり、心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な病気(血栓症)の原因になってしまう。血小板の血管損傷部位への接着において、初期には、血小板膜糖タンパク Glycoprotein (GP)Ib α とリガンドタンパク von Willebrand 因子 (VWF) との接着が重要である。⁵ このタンパク質の接着は、血小板の活性化を惹起するトリガーの1つでもある。⁶ 血栓止血システムを支える非常に重要な分子の1つである。

一般に、遺伝子の突然変異によりタンパク質のアミノ酸が変化することによって、その機能が変化することがある。GPIbについては、生物学的実験により、GPIb α 233位のアミノ酸変異で血小板の接着特性が大きく変化することが知られている。G233Vはgain of function, G233Aはequal function, G233Dはloss of functionとして知られる⁷。これらの変異により、タンパク質1分子のレベルで結合構造や結合力がどのように変化するかを解明できれば、この分子の結合力を決定している機構を明らかにできる可能性があると考え、本研究を開始した。

タンパク質の3次元構造を解明する方法にはX線結晶構造解析や核磁気共鳴等がある。⁸⁻¹¹ しかし、これらの技術はサンプル調整や実施に非常に大きな労力とコストを要する。複数の変異体を対象に施行するには向いていない。分子動力学(MD)計算は、対象分子を構成する全原子の運動方程式を解くことで、その構造や機能を明らかにする技術である。適切な力場を使用することで、この技術はタンパク質の構造・機能解析に使用できる。実際に筆者の研究室では、MD計算を用いて野生型のGPIb α とVWFの結合構造および結合力を計算し、分子間力顕微鏡や光ピンセットで測定した結合力と矛盾しない結果を得ている。¹² MD計算はX線結晶構造解析や核磁気共鳴による立体構造の同定法に比して、安価に施行できるだけでなく、ダイナミックな構造変化やエネルギーも計算できるという利点がある。本研究では、この手法を、1アミノ酸変異を有するGPIb α に応用し、アミノ酸変異により結合構造や結合エネルギーがどのように変化するかを解明することを目的とした。

2. 方法

本研究では、Nano Scale Molecular Dynamics (NAMD)を用いて、Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM)-22力場を使用し、分子動力学計算を行うことによって、VWFと結合するGPIb α のN末端側、GPIb α に結合するVWF A1ドメインの動的結合構造および両分子の重心間距離が離れた場合の構造変化、結合エネルギーを計算した。計算は東京大学情報基盤センターのOakforest-PACS (Xeon phi7250 68 core)を用いて行った。計算ステップは2

fs とした.

モデルの初期構造は, 当研究室で以前に計算した野生型の GPIb α と VWF の安定結合構造をもとに作成した. この構造にアミノ酸変異(機能消失型変異である G233D 変異)を Visual Molecular Dynamics version 1.9.3 の mutate residue plugin を使用して導入し, transferable intermolecular potential (TIP3P) でモデル化した水分子中における安定結合構造を計算した. 初期構造にアミノ酸変異を導入せず, 水分子を除去して変異体と同じ条件で水中に配置してから計算した野生型の構造を比較対象とした.

初期構造から 1000 ピコ秒のシミュレーションを施行し, root mean square distance (RMSD) にて計算の収束を確認した. RMSD は 10 ピコ秒ごとに計算した. 野生型と G233D 変異体の両者において, 計算が収束し安定構造が得られた(図 1).

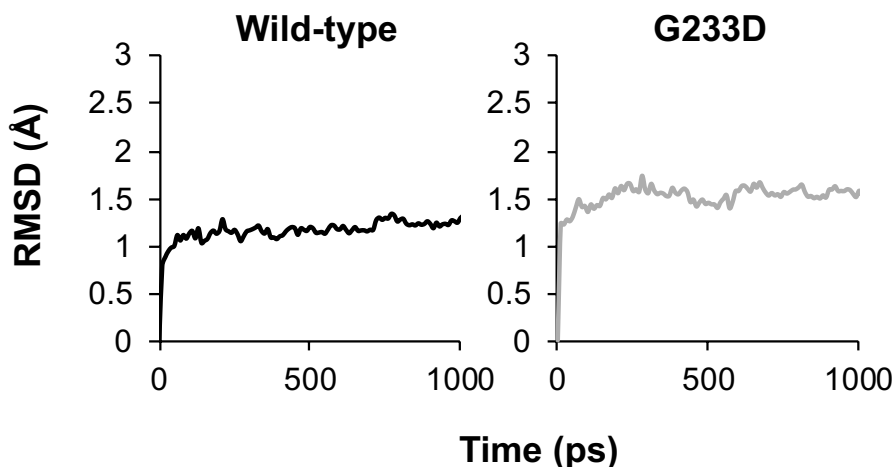


図 1: 初期構造から 1000 ピコ秒の root mean square distance (RMSD) の変化

野生型(左)と G233V(右)の GPIb α と VWF における RMSD の変化(Goto et al, Thrombosis Research, Modified 2019, Modified.). 時間経過とともに RMSD の変動が小さくなり, 計算が収束したことを確認できた.

結合エネルギーの計算は, GPIb α と VWF の中心間距離に拘束条件を設定し, 中心間距離 25-65 Å まで 0.5 Å ごとに拘束条件下での安定構造を計算し, potential of mean force (PMF)を weighted histogram analysis method (WHAM)を使用して計算することで行った. 中心間距離 65 Å を乖離しているとみなし結合エネルギーは最も安定している中心間距離における PMF と中心間距離 65 Å の時の PMF の差として計算した.

3. 結果

G233D 変異を有する GPIb α と VWF の安定結合構造は野生型の GPIb α と VWF の安定結合構造と比して大きな差を認めなかった(図 2). 機能消失型変異である G233D 変異もタンパク質の構造は保たれており, 破壊的な変異ではないことが示唆された.

しかし, 拘束条件を設定した結合構造においては, 中心間距離 40Å 周辺で野生型と比して, VWF との接着に大きな違いを認め, 野生型では接着している β -finger 領域が G233D 変異

では乖離していることが示唆された(図 3)。また, PMF のプロットでは, G233D では野生型に比して結合エネルギーが約 20%低く, 結合が乖離しやすいことが示唆された(図 4)。これは, G233D は機能消失型変異であるとした生物学的実験と矛盾しない結果であった。

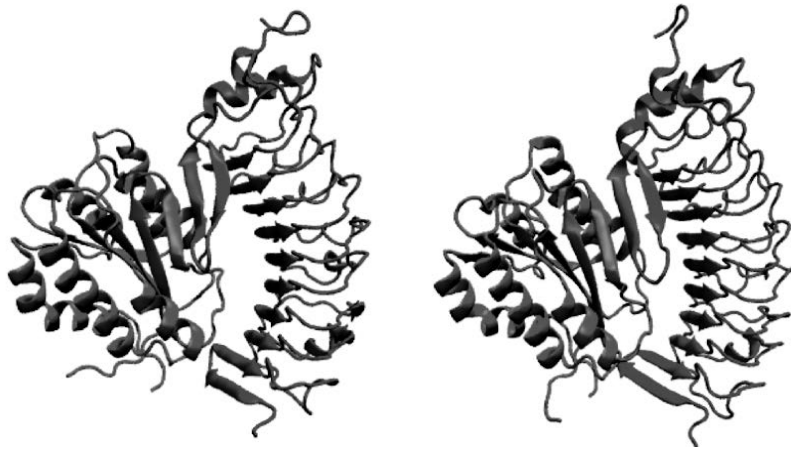


図 2: 安定結合構造の比較

野生型(左)と G233V(右)の GPIIb α と VWF の安定結合構造(Goto et al, Thrombosis Research, Modified 2019, Modified.). 大きな差異を認めなかった。

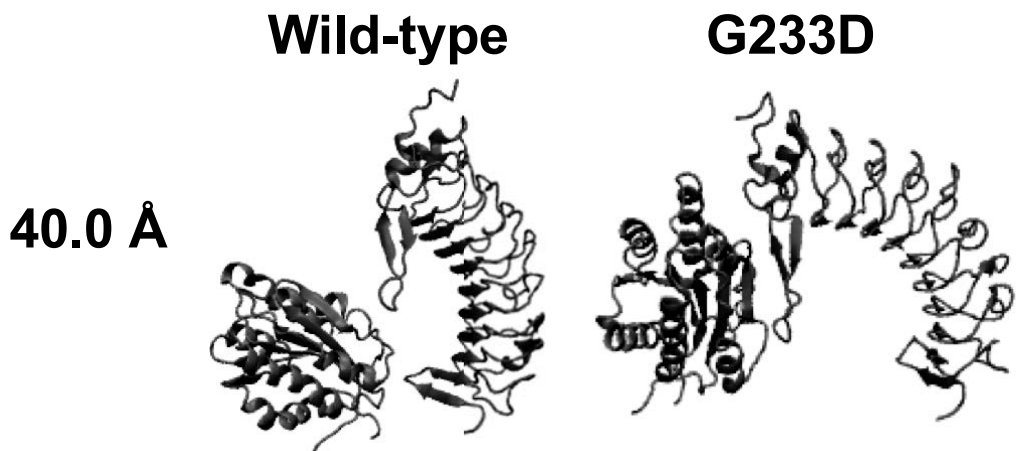


図 3: 中心間距離 40Å における構造の比較。

野生型(左)と G233V(右)の GPIIb α と VWF の中心間距離 40Å における構造の比較(Goto et al, Thrombosis

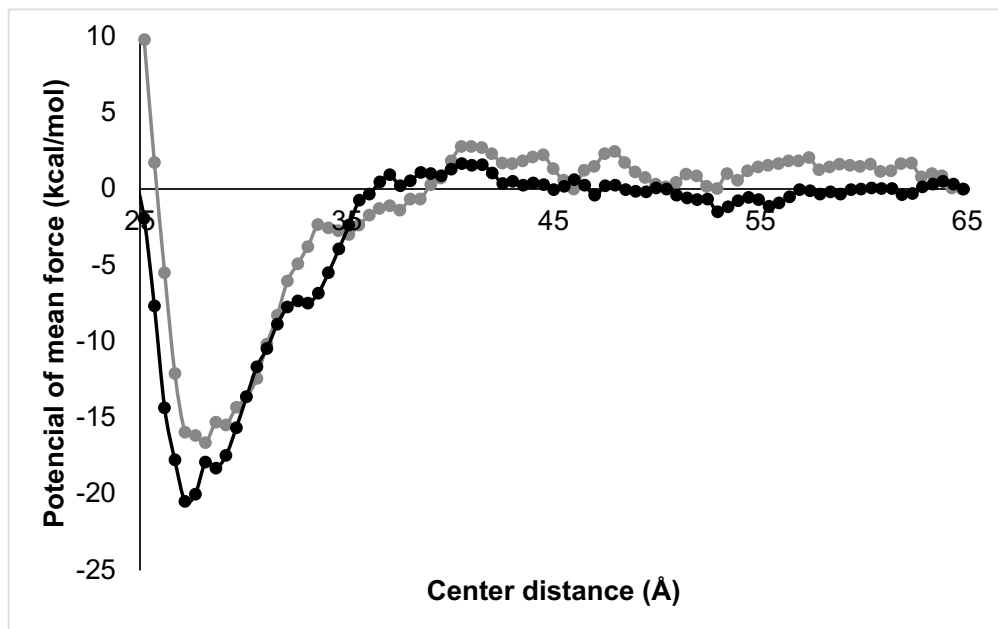


図 4: 結合エネルギーの比較

野生型(黒)とG233V(オレンジ)のGPIIb α とVWFの各中心間距離におけるPMF(Goto et al, Thrombosis Research, Modified 2019, Modified.). G233D変異を有するGPIIb α はVWFとの結合エネルギーのピークが20%程度低値であることが予測された.

4. 考察

ヒトゲノムプロジェクトでヒトの全ゲノム配列が解明され、その後のシーケンシング技術の進歩により、最近では患者個別の遺伝子配列やそれにより生じるタンパク質のアミノ酸変異を明らかにすることが容易になった。しかし、アミノ酸の変異から、タンパク質の立体構造や機能の変化を予測する手法は確立されていない。我々はMD計算を用いることにより、G233D変異を有するGPIIb α とVWFの結合エネルギーを計算し、生物学的実験と矛盾がないことを示した。この手法を様々なタンパク質の様々な変異に適用し、生物学的実験により検証することができれば、MD計算によりアミノ酸変異からタンパク質の機能変化を予測する手法を実現できる可能性がある。これにより、患者個別の遺伝子変異からの個別化医療実現や、新たな治療法の開発につながる可能性もある。

5. 結論

CHARMM力場を使用したMD計算を適用することにより、G233D変異を有するGPIIb α とVWFの安定結合構造及び結合エネルギー予測することができた。生物学的実験と矛盾しない結果が得られた。本研究の成果はThrombosis Research誌に発表済みである。¹³

参 考 文 献

1. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*. 2002;8:1227-34.
2. Goto S. Understanding the mechanism and prevention of arterial occlusive thrombus formation by anti-platelet agents. *Current medicinal chemistry Cardiovascular and hematological agents*. 2004;2:149-56.
3. Sibbing D, Angiolillo DJ and Huber K. Antithrombotic therapy for acute coronary syndrome: Past, present and future. *Thrombosis and haemostasis*. 2017;117:1240-1248.
4. McManus DD and Freedman JE. MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology*. 2015;12:711-7.
5. Goto S, Hasebe T and Takagi S. Platelets: Small in Size But Essential in the Regulation of Vascular Homeostasis - Translation From Basic Science to Clinical Medicine. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2015;79:1871-81.
6. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI and Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88:1568-1573.
7. Matsubara Y, Murata M, Sugita K and Ikeda Y. Identification of a novel point mutation in platelet glycoprotein Ibalpha, Gly to Ser at residue 233, in a Japanese family with platelet-type von Willebrand disease. *J Thromb Haemost*. 2003;1:2198-205.
8. Blenner MA, Dong X and Springer TA. Structural basis of regulation of von Willebrand factor binding to glycoprotein Ib. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289:5565-79.
9. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ and Gros P. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science (New York, NY)*. 2002;297:1176-9.
10. Campbell JC, Tischer A, Machha V, Moon-Tasson L, Sankaran B, Kim C and Auton M. Data on the purification and crystallization of the loss-of-function von Willebrand disease variant (p.Gly1324Ser) of the von Willebrand factor A1 domain. *Data in brief*. 2016;7:1700-1706.
11. Knott HM, Berndt MC, Kralicek AV, O'Donoghue SI and King GF. Determination of the solution structure of a platelet-adhesion peptide of von Willebrand factor. *Biochemistry*. 1992;31:11152-8.
12. 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.
13. Goto S, Oka H, Ayabe K, Yabushita H, Nakayama M, Hasebe T, Yokota H, Takagi S, Sano M, Tomita A and Goto S. Prediction of binding characteristics between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib α ; with various mutations by molecular dynamic simulation. *Thrombosis Research*.