

課題名 (タイトル) :

Multiscale Analysis of Platelet Aggregation

利用者氏名 : 塩崎 聖治

所属 : 次世代計算科学研究開発プログラム
次世代生命体統合シミュレーション研究推進グループ
臓器全身スケール研究開発チーム

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

心筋梗塞、脳梗塞等の原因となる血栓形成の初期過程では、血液中に存在する血小板の血管内壁への凝集が起きる。血小板表面には膜糖タンパク GPIba (glycoprotein IBa) が 1 万 5 千から 2 万個存在している。この GPIba は血管内壁の損傷部位に吸着している vWF (von Willebrand Factor) と結合することによって血小板を血管壁へと吸着させる。この GPIba と vWF による血小板の吸着は一次凝集と呼ばれる可逆的なプロセスである。本課題ではこの血小板の一次凝集について分子論的アプローチによる解析から、血小板-血管壁吸着モデルを構築する。そして、臓器全身スケール研究開発チーム及び細胞スケール研究開発チームが中心となって開発を進めている血栓シミュレーターで行っている血流のシミュレーションへと繋ぐマルチスケールシミュレーションを行い、血栓症の診断や創薬への応用を試みる。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究では分子動力学法によるタンパク質スケールの計算及び、動的モンテカルロ法による細胞表面スケールの計算を行っている。

1 対の GPIba と vWF の相互作用について分子動力学法を用いた解析を行った。GPIba については N 末端の vWF 接着部を、vWF については A1 domain と呼ばれる部位の構造(図 1)を用いて計算を行った。計算には RICC で利用可能な分子動力学計算ソフトウェアである NAMD を使用し、CHARMm 力場を用いた。100×150×120Å の、水分子を含めて約 17 万原子の系を対象として、カットオフを 12Å、タイムステップを 2fs として計算を行った。Potential of Mean Force

(PMF)を求めるためにアンブレラサンプリングを用いた。反応座標は GPIba, vWF の重心間の距離とし、0.5Å 間隔で約 100 点、各点 1ns の計算を行った。

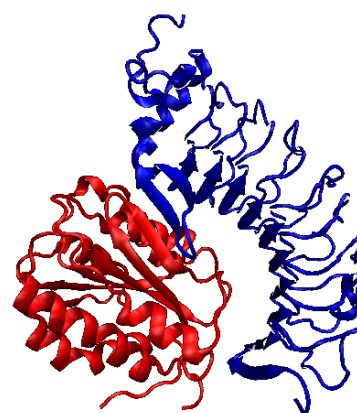


図 1 vWF A1 domain と GPIba N 末端

血小板表面に 2 次元格子モデルを構築し、GPIba の表面拡散、vWF との結合の形成、結合の解消の 3 種のイベントについて動的モンテカルロ法を用いて統計的に取り扱い、結合本数の時間発展を求めた。結合の形成、解消の rate, k_f , k_r には以下の式で表現される Dembo らのモデル (1988 年)を用いた。

$$k_f = k_f^0 \exp\left\{-k_{ts}(l-l_0)^2/(2k_b T)\right\}$$

$$k_r = k_r^0 \exp\left\{(k-k_{ts})(l-l_0)^2/(2k_b T)\right\}$$

ここで、各結合はバネ定数 k のバネで表現されると仮定し、各結合には $f = k(l-l_0)$ の力が働いているとした。また k_f^0 , k_r^0 , k_{ts} , l , l_0 , k_b , T はそれぞれ、釣合い位置での結合の形成、解消の rate, 遷移状態におけるバネ定数, 血小板-血管壁間の距離, 釣合い状態での距離, ボルツマン定数, 温度である。400×400nm の計算領域に 320 個の GPIba 及び 256 個の vWF を配置した。

3. 結果

分子動力学法の結果については、重心間距離が 20-70 Å の範囲での自由エネルギープロファイルを得ることができ、現在計算結果の検証を行っているところである。

動的モンテカルロ法の結果について、図 2 に血小板表面の GPIIb/IIIa の分布のスナップショットを、図 3 に血小板-血管壁間に働く力を示す。図 2 において青点は vWF と結合していない GPIIb/IIIa、赤点は結合している GPIIb/IIIa である。赤枠内は GPIIb/IIIa が局在している領域で、拡散速度を制御することによって、局在域での濃度を非局在域の 2 倍に制御することができた。図 3 については平衡定数 $K_{eq} = k^p/k_r^p$ をパラメータとして計算を行った。血小板-血管壁間の距離が大きくなるに従って、GPIIb/IIIa-vWF の 1 本 1 本の吸着力は大きくなるが、結合の数が減少していく。平衡定数を最も大きな値とした場合での最大の吸着力は約 750pN であることが分かった。

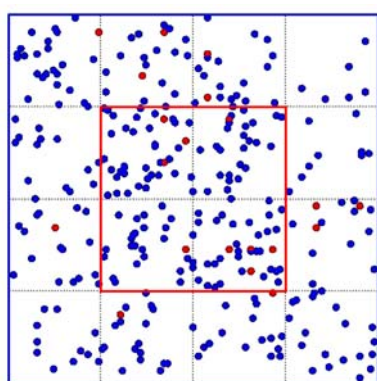


図 2 血小板表面の GPIIb/IIIa の分布

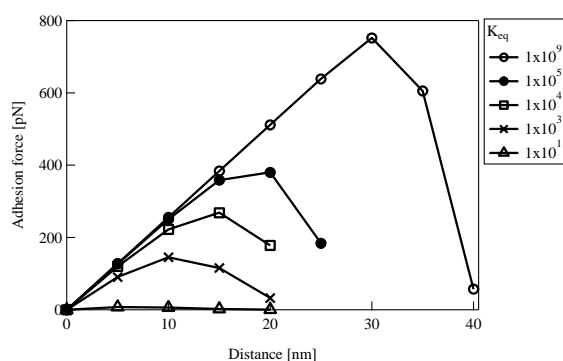


図 3 血小板の吸着力

4. まとめ

・ 分子動力学法を用いて血小板表面に存在する膜糖タンパク GPIIb/IIIa と血管内壁に存在するタン

パク質 vWF との間の相互作用についての解析を行った。アンブレラサンプリング法を用いて GPIIb/IIIa の N 末端と vWF の A1 ドメイン間相互作用の自由エネルギーに関する知見を得ることができた。

・ 血小板表面格子モデルを構築し、GPIIb/IIIa の挙動について動的モンテカルロ法を用いた解析を行うことによって、タンパク質スケールから血流スケールまでを繋ぐマルチスケールシミュレーションの枠組みを作成した。そして、血流スケールの計算の際に重要な情報となる、血小板と血管壁間の結合力を見積もることができた。

5. 今後の計画・展望

分子動力学法によるシミュレーションから得られた自由エネルギープロファイルを用いて GPIIb/IIIa-vWF 間の結合の lifetime をモデル化し、動的モンテカルロ法へと繋ぐマルチスケールシミュレーションを行う。

また、本年度開発した動的モンテカルロ法コードを用いることによって、GPIIb/IIIa の局在化等、血小板の吸着に大きな影響を与えている現象の解明、及び血流スケールで使用可能な血小板吸着モデルの開発が期待できる。

6. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況（どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか）や、継続して利用する際に行う具体的な内容

・ これまで利用した状況

本年度は NAMD を用いてアンブレラサンプリング法、Weighted Histogram Analysis Method を用いることで GPIIb/IIIa-vWF 結合の Potential of Mean Force の概要を把握することができた。また、動的モンテカルロ法を用いて血流スケールの計算の際に重要な情報となる、血小板と血管壁間の結合力を見積もることができた。

・ 継続して利用する際に行う具体的な内容

今後、引き続き NAMD を用いたアンブレラサンプリング法等による GPIIb/IIIa-vWF 結合の解析（より詳細な自由エネルギープロファイルの計算等）及び、動的モンテカルロ法による血小板表面

平成 22 年度 RICC 利用報告書

ー血管壁間のタンパク質結合数の解析(GPIIb α の局在化に関する知見等)を行い、血流スケールへ繋ぐマルチスケールシミュレーションを行う予定である。

平成 21 年度 RICC 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの口頭発表】

- ・ 塩崎聖治, 高木周, “分子動力学法による血小板-血管壁相互作用の解析”, 分子シミュレーション
討論会, 福井, 2010 年 11 月