

課題名 (タイトル) :

血小板凝集のマルチスケール解析

利用者氏名 : ○塩崎 聖治

所属 : 情報基盤センター 技術開発ユニット

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

心筋梗塞や脳梗塞等の血栓症の原因となる血栓は血液中の血小板、赤血球、フィブリン等で構成されている。動脈中では、血管内での血小板血栓の形成が血液の凝固系を活性化し、血栓の形成が進行する。血小板血栓の形成初期過程は、血小板の血管壁への吸着であり、これを血小板一次凝集と言う。この一次凝集は血小板表面に存在する膜糖タンパク GPIb α (glycoprotein Ib α)と血管内皮細胞が損傷し、コラーゲンが曝露している部分に存在している vWF (von Willebrand Factor)の A1 domain と呼ばれる部位との結合によって為される。2~4 μ m の円盤形をしている血小板表面には 1 万 5 千から 2 万個程度の GPIb α が存在しており、血管内壁との吸着面では複数の GPIb α -vWF 結合が形成、切断を繰り返している。本研究ではこの血小板一次凝集について、GPIb α -vWF 相互作用のタンパク質スケールから、血小板一次凝集の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を念頭に置き、血小板/血管壁吸着モデルの構築を行っている。我々はこれまで GPIb α -vWF 結合をバネで近似したモデルを用いた解析を行ってきており、現在、よりタンパク質の力学特性に近いエントロピー弾性モデルを用いた解析、及び分子動力学法を用いて結合のモデル化を試みている。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

血小板/血管壁接触面について、Fig. 1 に示した相互作用モデルを考えた。GPIb α は血小板細胞膜上を拡散しているとし、vWF は血管壁に固定されており、vWF と結合を形成している GPIb α については、拡散せず、膜上を移動しないとす。また、vWF 近くの GPIb α は k_r

の rate で vWF との結合を形成し、GPIb α -vWF 結合は k_r の rate で切断されるとした。この k_r について分子動力学法を用いたモデル化を行っている。

GPIb α , vWF の結合部である、GPIb α の N 末端と vWF の A1 domain 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。GPIb α -vWF 複合体の初期分子構造については X 線構造解析で得られた構造(Dumas, J.J., *J. Bio. Chem.*, Vol. 279, No. 22, pp. 23327-23334, 2004)に水素原子を付加し、水和を行って構築した。分子動力学シミュレーションは NAMD を用いて実行し、力場は CHARMm を用い、タイムステップは 2fs, カットオフは 12Å とした。計算領域は 83 Å×95 Å×105 Å とし、周期境界条件を適用した。温度は Langevin 法によって 310K に制御した。

分子スケールのシミュレーションは、タンパク質結合の形成速度及び切断速度としてモデル化され、細胞、血流といった、より大きなスケールのシミュレーションへと繋げることが可能となる。外力 F が加わっている条件下での GPIb α -vWF 間結合の切断速度 k_r は、活性化エネルギー E , ボルツマン定数 k_B , 温度 T , 定数 σ , v を用いて、下記のタンパク質間結合の寿命、及び切断速度に関する Bell のモデル(Bell, G.I., *Science*, Vol. 200, No. 618, pp. 618-627, 1978)で表現することができる。なお、 k_r^0 は外力 0 の条件下での切断速度である。

$$k_r = k_r^0 \exp(\sigma F / k_B T)$$

$$k_r^0 = v \exp(-E / k_B T)$$

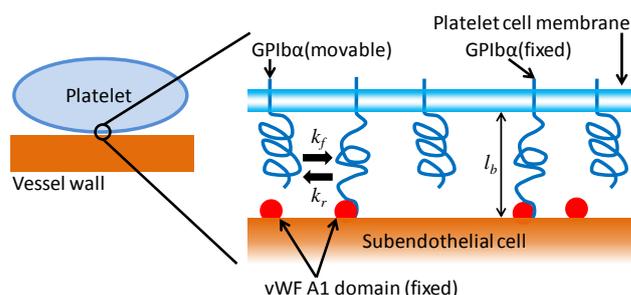


Fig. 1 Schematic illustration of platelet/vessel wall interface.

3. 結果

Fig.2 に示した初期構造を基準とした RMSD (Root Mean Square Deviation) から、250ps 程度で構造が平衡となったことが分かる。得られた分子構造を Fig.3 に示す。vWF A1 domain は 6 つの α -helix 及び 6 つの β -strand で構成されており、GPIb α は 1 つの α -helix 及び 14 個の β -strand で構成されている。

現在、アンブレラサンプリング法によって GPIb α と vWF の重心間距離に対する PMF の計算を行っており、GPIb α -vWF 結合の切断速度についてモデル化を行っていく予定である。

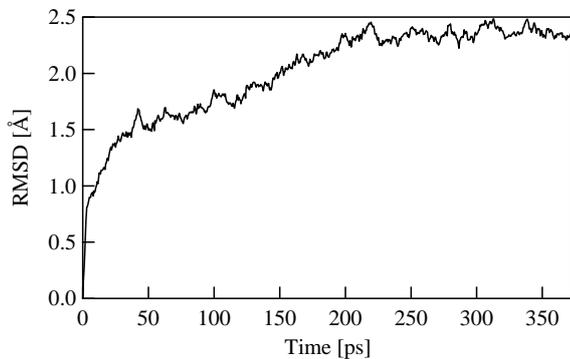


Fig.2 RMSD of the atoms which constitute the proteins using the starting structure as reference.

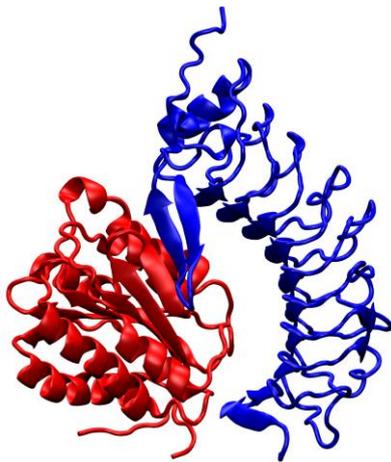


Fig.3 Structure of the complex of vWF A1 domain and GPIb α N-terminal.

4. まとめ

血小板一次凝集について分子動力学による解析を行った。X線構造解析の結果で得られた GPIb α -vWF 複合体の構造から平衡な構造を求めた。

5. 今後の計画・展望

現在、得られた平衡構造からアンブレラサンプリング法を用いて、WHAM (Weighted Histogram Analysis Method) によって GPIb α N-terminal と vWF A1 domain の重心間距離に対する PMF (Potential of Mean Force) の計算を行っている。今後、得られた PMF を用いて、結合の切断速度のモデル化を行い、光ピンセットや AFM を用いた GPIb α と vWF の一対の結合に関する引っ張り実験の結果と比較し、構築したモデルの妥当性を検討する予定である。

平成 25 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, 後藤信哉, "数値シミュレーションを用いた血小板凝集の解析", 日本機械学会 2013 年度年次大会, 2013 年 9 月, 岡山.