

課題名 (タイトル) :

MD 計算を用いた GP1b の mutant とリガンドの結合構造解明

利用者氏名 : 後藤 信一

理研での所属研究室名 : 情報基盤センター計算工学応用開発ユニット

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

血小板細胞接着の初期に必須の役割を演じる血小板膜糖蛋白 GPIb α とリガンド蛋白 von Willebrand 因子 (VWF) の接着構造は MD 計算により再現された。また、同様の方法を用いて G233A, アミノ酸の変異を有する GPIb α と VWF の構造も明らかにした。本研究では重臣間距離を変化させ G233V (gain of function), G233A (equal function), G233D (loss of function) の各種 mutant につき、結合安定構造および結合エネルギーの計算をめざした。

2. 具体的な利用内容、計算方法

NAMD を用いて CHARMM 力場で、G233A, G233V, G233D の各種変異を有する GPIb α と VWF の A1 ドメインの結合構造計算を行った。方法は既に論文発表済みである (Shiozaki S, et al. J Atheroscler Thromb, 2016)。計算は 4 つの GPU (TESLA K20) を用いて CUDA に対応する NAMD を用いて行った。安定構造の計算は 10000000 step (20 ps) 行った。その後中心間距離を 21-65 Å まで 0.5 Å ずつ変化させるように拘束条件を設定し、それぞれの中心間距離でエネルギーが安定化するまで計算を行った。その結果を Weighted Histogram Analysis Method (WHAM) を用いて解析し potential of mean force (PMF) を計算した。

3. 結果

水中で 310K において、G233V, G233D, G233A 変異を有する GPIb α と VWF では RMSD が飽和する安定構造が存在することを示した。また、その安定結合構造を予測計算した。この 3 変異体と VWF の結合安定構造は WT のものと比較して大きな差は認められなかった。Potential of Mean force (PMF) のプロットは G233D と wild-type で大きな差異を認めなかった。G233V の PMF は 2 峰性のピークを認め、リガンドと乖離しにくい gain of

function のフェノタイプを説明する可能性のある結果が得られた。しかし、全ての GPIb 変異体と VWF の結合エネルギーの曲線は微細な差異はあれど wild-type, G233A, G233V, G233D において共通しており、タンパク質構造および結合エネルギーの微細な差が、生体における出血傾向という大きな表現型につながっていることが示唆された。

4. まとめ

分子動力的計算により、点突然変異を有する GPIb α タンパク質と VWF の A1 ドメイン間の結合構造計算を行い、点突然変異を有する蛋白にも安定構造が存在することを G233V, G233A, G233D 変異体において示した。さらに、水中における安定構造を予測計算した。G233V, G233D 変異体はヒトにおける表現型は出血性疾患として知られる。しかし、両分子の安定結合構造および結合エネルギーは wild-type と比較してわずかであることが明らかとなった。

5. 今後の計画・展望

当初の予想に反して、今回計算された G233V, G233D, G233A における平均の結合エネルギーには大きな差異を認めなかった。しかし、タンパク質は熱運動で揺らいでおり、今回の結果はあくまでも平均の結果である。GPIb と VWF は生体中では確率的に様々な構造を取り、相互作用していることが予想される。出血傾向の表現系を示す、変異体では、平均の構造には差異がなくても、ゆらぎの中で乖離しやすい構造や乖離しにくい構造を取りやすい可能性もある。今後は揺らぎも含めて結合エネルギーを検討していく方針である。

平成 29 年度 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの口頭発表】

1. Goto S, Tamura N, Ayabe K, Goto S. In-silico シミュレーションを用いた点突然変異を有する血小板膜タンパク GP1b α と VWF A1 ドメインの動的結合構造および結合エネルギーの解明, 第 39 回日本血栓止血学会, 2017/6/9, 名古屋国際会議場
2. Goto S, Tamura N, Ayabe K, Goto S. A Method for “Precision” Prediction of Platelet Adhesion at Site of Endothelial Injury under Blood Flow Conditions. ESC congress 2017, 2017/8/27, FIRA granvia Barcelona