

## 論文の内容の要旨

論文題目「分子動力学シミュレーションを用いた血小板膜蛋白質 Glycoprotein Ib $\alpha$  の 233 位変異体と von Willebrand Factor の結合構造解析」

学位申請者 中山 正光

キーワード：血小板、膜蛋白質、VWF、GPIb $\alpha$ 、分子動力学シミュレーション

【背景】血管壁が傷害すると、血小板が傷害部に接着し止血を担う。血流下では血管壁損傷部位への血小板接着は膜蛋白質 Glycoprotein (GP) Ib $\alpha$  と血漿蛋白質である von Willebrand factor (VWF) の相互作用による。血小板型 von Willebrand 病（血小板 VWD）は、GPIb $\alpha$  の機能異常によって、血栓が正常に形成されない先天性出血性疾患である。臨床および生物学的実験により血小板型 VWD の原因の一つとして GPIb $\alpha$  の 233 位の複数の変異体が解明されている。変異体として、G233A（同等の機能：equal function）、G233V（機能獲得：gain of function）、G233D（機能損失：loss of function）が知られる。G233 位の一つのアミノ酸変異により GPIb $\alpha$  の VWF との結合特性が大きく変化する。各種アミノ酸変異体と VWF の結合構造、結合エネルギーを解析することで、GPIb $\alpha$ -VWF の結合を規定する物理的因子の解明を目指す。先行研究では、loss of function の G233D を持つ GPIb $\alpha$  の VWF からの解離エネルギーが Wild-type と比較して 4.32 kcal/mol 低いことが報告された。しかし、VWF と GPIb $\alpha$  変異体との salt bridge、非共有結合エネルギーなどの物理的パラメーターと生物学的機能の関連性については未知である。

【目的】G233 位の各種アミノ酸変異 GPIb $\alpha$  と VWF の結合の物理的特性を、分子動力学シミュレーションを用いて解明する。

【方法】先行研究にて妥当性が検証されている血小板 GPIb $\alpha$  (HIS<sup>1</sup>-PRO<sup>265</sup>) の N 末端ドメインと VWF (ASP<sup>1269</sup>-PRO<sup>1466</sup>) の A1 ドメインを両分子の結合構造の計算対象とする。過去研究のモデルと同様に、GPIb $\alpha$  と VWF の重心間距離を 27.3 Å に設定した。初期構造における GPIb $\alpha$  のアミノ酸 G233 (Wild-type) をそれぞれアラニン (G233A)、アスパラギン酸 (G233D)、バリン (G233V) に置換し、VWF との初期結合構造とした。各 GPIb $\alpha$  と VWF を構成する分子の周囲 10 Å にモデル化した水分子を配置した。原子、水分子の位置座標と速度ベクトルを 2.0 フェムト秒ごとに算出した。VWF-GPIb $\alpha$  を構成する原子の位置座標、VWF-GPIb $\alpha$  結合構造のスナップショットなどの結果の可視化には Visual Molecular Dynamics (VMD) を使用した。水分子を除く蛋白質を構成する原子の位置座標の平均二乗偏差 (RMSD) を 10 ピコ秒ごとに計算し、構造収束の指標とした。蛋白質間の相互作用を

エネルギー的に解析するため、GPIIb $\alpha$ を構成するアミノ酸とVWFの非共有結合エネルギーを算出した。G233のアミノ酸変異がGPIIb $\alpha$ とVWFの結合におよぼす影響を定量化するために、GPIIb $\alpha$ とVWFの間に形成されるSalt bridgeの形成確率を算出した。統計解析にStudent t-testを用いた。5%を有意水準とした。

**【結果】** Wild-typeと3つの変異体における、水分子を除いたGPIIb $\alpha$ とVWFを構成する原子のRMSDは計算開始から600ピコ秒以内にすべての条件で3Å以下に収束した。Wild-typeのGPIIb $\alpha$ とVWFとの間に発生する非共有結合エネルギーは $-1096.7 \pm 137.6$  kcal/molであった。G233A、G233V変異体GPIIb $\alpha$ とVWFとの間に生じた非共有結合エネルギーはそれぞれ $-929.8 \pm 88.5$  kcal/mol、 $-989.9 \pm 94.0$  kcal/molと、Wild-typeのGPIIb $\alpha$ とVWFの間に生じる非共有結合エネルギーよりも15.3%、9.7%低かった ( $p < 0.05$ )。G233D変異体GPIIb $\alpha$ では、VWFの間に生じる非共有結合エネルギーは $-865.0 \pm 139.1$  kcal/molであった。G233D変異体GPIIb $\alpha$ とVWFの間に生じる非共有結合は、Wild-typeのGPIIb $\alpha$ とVWFの間に生じる非共有結合エネルギーより21.1%低かった ( $p < 0.05$ )。Wild-typeのGPIIb $\alpha$ とVWFの結合では、6組のsalt bridge (D63-R571、D83-K569、D106-K569、K237-D570、E14-R611、E128-K608)が、計算時間内の50%以上で形成された。VWFとWild-typeのGPIIb $\alpha$ の結合と3つのG233変異体の結合では、各アミノ酸のセット間でsalt bridgeを形成する時間の分布が異なっていた。G233A変異体GPIIb $\alpha$ とVWF、G233V変異体GPIIb $\alpha$ とVWF、G233D変異体GPIIb $\alpha$ とVWFで計算時間の50%以上の割合で形成されたsalt bridgeの数はそれぞれ6、5、4であった。

**【考察】** G233D変異体GPIIb $\alpha$  (loss of function)では、Wild-type、G233A (equivalent function)、G233V (gain of function)に比べてsalt bridge形成数が少なく、VWF結合における非共有結合エネルギーが低かった。G233D変異体GPIIb $\alpha$ とVWFの結合エネルギーは両分子の接着を安定させる閾値に達していないことが示唆された。蛋白質結合の物理的特性と生物学的表現型との定量的な関係は解明されていない。分子動力学シミュレーションの計算結果は、VWFとGPIIb $\alpha$ の結合機能を、物理的指標により理解する一助になることが示唆される。

**【結論】** 本研究では、血流下の血小板接着において重要なGPIIb $\alpha$ とVWFの相互作用メカニズムの解明を目指して、VWFと結合特性の異なるGPIIb $\alpha$ の各種G233変異体とVWFの結合エネルギー解析を行った。Loss of functionのG233Dについては、Wild-typeに比べsalt bridgeの計算時間内における形成率が33.3%低く、非共有結合エネルギーが21.1%小さかった。G233V変異によるgain of functionのメカニズムについてはさらに詳細な検討が必要である。