

令和元年5月13日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19669

研究課題名(和文)スーパーコンピューターによる「分子レバレッジ」仮説の検証

研究課題名(英文) Proposal of Molecular Leverage Hypothesis with Molecular Dynamic Calculation

研究代表者

後藤 信哉 (GOTO, Shinya)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50225653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞機能は環境に応じて変化する。各種細胞膜蛋白質の細胞外ドメインが細胞に特異的な生理機能を担う。血小板ではGPIIb/IIIaの細胞外ドメインの高次構造変化が細胞活性化後に起こる。活性化型構造のGPIIb/IIIaはフィブリンノーゲンなどのリガンドに結合し、血小板凝集、血栓の成長に寄与する。活性化に伴う血小板細胞内の環境変化はカルシウムイオン濃度上昇など大きくない。小さな細胞内環境変化が細胞外ドメインの大きな構造変化を惹起する力学メカニズムとして「分子レバレッジ仮説」を提案し、妥当性を分子動力学計算により検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板細胞は刺激に応じて活性化する。非活性化血小板は凝集し、活性化血小板は凝集する。血小板凝集は血小板膜糖蛋白GPIIb/IIIaの活性化構造変化に依存する。活性化とともに血小板細胞内のカルシウムイオン濃度は上昇する。GPIIb/IIIaの細胞内ドメインにはTalinなどの接着斑蛋白が結合する。細胞内ドメインの構造も細胞活性化により変化すると想定されるが細胞内ドメインは短いので、構造変化は大きくない。この小さな細胞内ドメインの構造変化が、細胞外ドメインの大きな構造変化と血小板細胞の性質変化を惹起するメカニズムは未知である。このメカニズムとして分子レバレッジ仮説を提案し、妥当性を検証する。

研究成果の概要(英文)：Platelet activated upon various stimulation. Intra-cellular calcium ion slightly increased upon activation. But, in general, change in intra-cellular environment is not huge. The mechanism transmitting small change in intra-cellular domain of various membrane proteins on the substantial structural changes in extra-cellular domain is unknown. We are proposing "molecular leverage hypothesis" to explain the enlargement of small changes to the larger one by high performance super computers.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血小板 膜糖蛋白 分子動力学 高性能コンピューター 血栓 心筋梗塞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、循環器内科の専門医として、有病率の高い循環器病としての心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患の制圧を目指す研究を進めてきた。心筋梗塞を惹起する冠動脈血栓の形成に必須の役割を演じる血小板細胞の生理機能の解明を目指す生物学的研究を継続した（*Goto S, et al. Circulation 1992, Goto S, et al. J Biol Chem, 1995, Goto S, et al. J Clin Invest 1998, Goto S, et al. Circulation 2002, Goto S, et al. J Am Coll Cardiol 2006* など）。生物学的研究により仮説の検証は可能であるが、生命現象の本質を解明し、現象を説明可能な理論の樹立は困難と考えた。生物学的研究成果に理論性を持たせるためにスーパーコンピューターを用いたシミュレーション研究を開始した。止血、血栓形成に特化した機能を有する血小板細胞の生理機能のコンピューター上への再現を目指したシミュレーター開発研究を開始した。

コンピューター上に数式化して生命現象を再現するためには、生物学的現象を物理、化学の諸原則からの再構成する必要がある。コンピューターは高性能化し、100万程度の現象を統合的に理解することを可能とした。実証的生物学的研究により、血流条件下の血小板細胞の血管壁損傷部位への接着には血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa と von Willebrand 因子（VWF）の相互作用が必須の役割を演じることを確認していた（*Goto S, et al. J Clin Invest 1998*）。血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa と運動方程式を解くことにより予測する QM/MM 計算を始めた。GPIIb/IIIa と VWF を構成する原子および周囲の水分子の運動を解くことにより、両分子の動的結合構造、結合エネルギー、結合力の予測計算には成功した（*Shiozaki S, et al. J Atheroscler Thromb, 2016*）。

血小板細胞が活性化すると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、細胞内環境が変化する。血小板膜糖蛋白の中でも GPIIb/IIIa は細胞活性化と同時に細胞外ドメインの構造が大きく変化することを知られる。細胞内環境のわずかな変化が細胞外ドメインの大きな構造変化を惹起するメカニズムとして「分子レバレッジ仮説」を考案した。GPIIb/IIIa の細胞外ドメインに複数のエネルギー的安定構造が存在することを示せば、細胞内ドメインの構造のわずかな変化が細胞外ドメインの大きな構造変化を惹起するメカニズムの解明につながると考えた。活性型 GPIIb/IIIa と非活性型 GPIIb/IIIa のエネルギー障壁が低いことを示し、細胞膜を介した「てこ」による細胞外ドメイン構造変化の構成論的を目指した。

## 2. 研究の目的

### (1) 外部環境変化時の細胞機能変化の基本メカニズムとしての「分子レバレッジ仮説」の設定と検証

本研究は挑戦的研究（萌芽）として、生命現象の本質の解明を目指すための挑戦的仮説として「分子レバレッジ仮説」を設定する。さらに、「分子レバレッジ仮説」の妥当性の検証のために、GPIIb/IIIa の細胞外ドメインのエネルギー的安定構造が複数存在することを示して仮説の妥当性検証を行う。さらに、研究の将来の発展を目指す。具体的には以下の2つの研究目的の達成を目指す。

#### ① 「分子レバレッジ仮説」の設定

血小板細胞活性化時の細胞機能変化として、1) 細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、2) 血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa の高次構造変化、はすでに確認されていた。細胞内環境の変化とともに GPIIb/IIIa の細胞内ドメインに Talin, Kinlin などの蛋白質が結合することも知られていた。しかし、細胞内ドメインの変化と細胞外ドメイン構造の大きな変化の関連を説明する理論は確立されていない。そこで、細胞内ドメインのわずかな構造変化が細胞外ドメインの大きな構造変化をもたらす力学的メカニズムとして「分子レバレッジ仮説」を提案する。本仮説では、細胞膜を貫通する GPIIb/IIIa の分子全体を力学的な「てこ」と仮定し、仮に細胞膜貫通ドメインを「支点」、細胞内ドメインを「力点」、細胞外ドメインを「作用点」とする。血小板細胞活性化時に「支点」である細胞内ドメインには Talin などが結合し、GPIIb と GPIIIa の細胞内ドメインの座標が変位する。細胞膜貫通ドメインが、細胞内ドメインの構造変化を拡大させ、「作用点」である細胞外ドメインが大きな構造変化を惹起するモデルにおいて「分子レバレッジ仮説」を設定する。

#### ② 「分子レバレッジ仮説」の妥当性検証

スーパーコンピューターと分子動力学計算の手法により「分子レバレッジ仮説」の妥当性検証を行う。「力点」である細胞内ドメインは蛋白質濃度が稠密な細胞内に存在する。Talin などが結合しても構造の変化は数十オングストローム程度と想定される。しかし、X線結晶構造解析にて解明された GPIIb/IIIa 細胞外ドメインの非活性型から活性型への変位は数百オングストロームにおよぶ。細胞内ドメインの構造変化が細胞外ドメインの膜貫通部位に作用する力は大きくなると想定される。また、GPIIb/IIIa の活性化構造変化によるエネルギー消費はわずかである。小さなエネルギーと小さな構造変化が大きな構造変化を起こすためには、細胞外ドメインに複数のエネルギー的安定構造が存在し、かつ複数の安定構造間の構造変化のためのエネルギー障壁が低い必要がある。そこで、本研究では分子動力学計算により GPIIb/IIIa の細胞外ドメインの立

体構造の熱揺らぎを再現する。リガンドが結合した活性型構造から計算を開始して、非活性型構造に向けた構造変化が熱揺らぎの中で起こるか否かを検証する。

## (2) 「分子レバレッジ仮説」 普遍化に向けた基盤整備

(1)の研究目的を到達したら、GPIIb/IIIa の細胞内ドメイン・細胞膜貫通ドメイン・細胞外ドメインを連成した GPIIb/IIIa モデルを作成する。生物学的に妥当なモデルを作成するために公開された X 線結晶構造解析、NMR など GPIIb/IIIa に関する生化学研究成果をまとめてモデルを作成する。

## 3. 研究の方法

### (1) ハードウェアとソフトウェアの準備

①ハードウェアの整備：分子動力学計算には高性能コンピューターを用いた大規模計算が必須である。血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa と VWF の結合構造計算には学外コンピューターとして理化学研究所の「京」、「HOKUSAI」などを用いた。国家プロジェクトとして整備されたスーパーコンピューターを使用しなくても対象とする原子数が数十万程度の蛋白質の動的構造解析のための大規模計算は可能となった。本研究開始前に、学内には 4 ノードのスーパーコンピューターを保有していた。本研究資金により高速計算可能な Xeon Phi™ を搭載した 4 ノードのラックマウントサーバーPC3000-XKL2Quad 48GB を購入した。コンピューターの機能を維持するために、個室空調可能なコンピューター室およびハードウェアの専門家の常駐可能な体制を構築し研究推進のためのハードウェアを整備した。

②ソフトウェアと力場：GPIIb/IIIa の細胞外ドメインを構成する原子、周囲の水分子の運動方程式を解くための力場として Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics (CHARMM)-36 を用いた。CHARMM-36 はリン酸化アミノ酸にも最適化された力場を提供する。コンピューター上にて CHARMM 力場に基づいた分子動力学計算を行うために NAnoscale Molecular Dynamics (NAMD)をコンパイルして使用した。

### (2) 初期構造と分子動力学計算

①GPIIb/IIIa の細胞外ドメインを計算の標的とした。GPIIb/IIIa の構造は、血小板細胞活性化時の活性型構造、非活性化時の非活性型構造などの X 線結晶構造解析の結果が既に公表されている。活性型構造にて、リガンドとしてのフィブリノーゲン $\gamma$ 鎖ドデカペプチドと結合した構造を初期構造とした。

②GPIIb/IIIa の場合、計算を  $10^5$  ステップ以上継続しても 3 次元構造の大きな変化は起こらなかった。GPIIb/IIIa では活性型構造自体がエネルギー的に不安定である可能性がある。37 度の条件にて全ての原子・水分子の座標と速度を  $10^5$  ステップ以上計算し、構造変化の有無を予測計算する。GPIIb/IIIa の場合には計算を継続しても構造は安定していたが、GPIIb/IIIa では熱揺らぎにより活性型から非活性型に向けた構造変化が起こるとの仮説を検証する。

## 4. 研究成果

### (1). 計算環境の確立

Xeon Phi™ を搭載した 4 ノードのラックマウントサーバーPC3000-XKL2Quad 48GB を購入し、既存の 4 ノードを合わせて 8 ノードの高速計算環境を構築した。CHARMM-36 力場を解くためのソフトウェアとして NAnoscale Molecular Dynamics (NAMD)を、自らの研究環境にてコンパイルすることに成功した。GPIIb/IIIa と von Willebrand 因子の結合構造を解いたように、GPIIb/IIIa を構成する全ての原子および水分子について、力 (force: F) = 質量 (mass: M) x 加速度 (acceleration: A) の運動方程式を  $x \cdot 2 \times 10^{-15}$  秒ごとに解く環境を確立させた。

### (2)GPIIb/IIIa の初期構造と熱揺らぎ

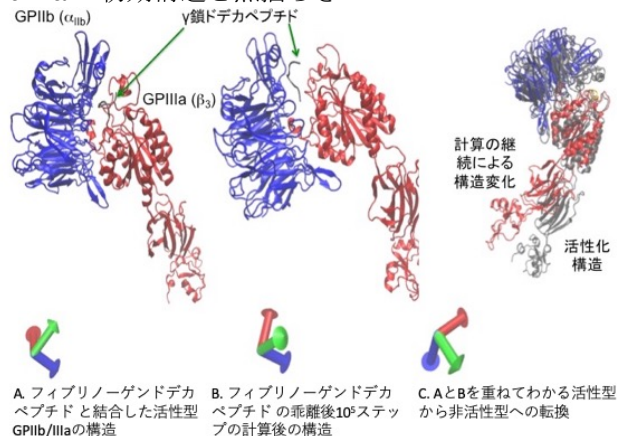


図1. 分子動力学計算によるGPIIb/IIIa細胞外ドメインの3次元構造予測

図 1 左に本研究により算出した GPIIb/IIIa の細胞外ドメインの活性型に、フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖ドデカペプチドが結合した構造を示す。GPIIb/IIIa の構造の熱揺らぎは GPIIb/IIIa よりも大きかった。

### (3)活性型構造から非活性型構造への転換

図 1 中央 (B)のように、熱揺らぎとともに

GPIIb/IIIa 細胞外ドメインは安定せず、大きな 3 次元構造変化を起こした。2x10<sup>-15</sup> 秒ごとに 10<sup>5</sup> ステップ、GPIIb/IIIa の細胞外ドメインを構成する全ての原子と水分子の座標および速度を計算した結果を図 1 中央に示す。活性型では引き伸ばされていた GPIIb/IIIa が分子の中央部分から屈曲し、非活性型構造に向けて変化することが示唆された。

GPIIb/IIIa に結合していたフィブリノーゲン  $\gamma$  鎖ドデカペプチド は構造が非活性型に向かうとともに外れた。

図 1 右 (C) に A と B の構造を重ねて示す。リガンドが外れたのちには GPIIb/IIIa は非活性型構造に向けて熱揺らぎをしながら構造変化することが示された。構造変化は膜貫通部位を不変として変化するというよりも、細胞外ドメインの中心付近の座標が不変で折り畳むように見えた。

細胞内ドメイン・細胞膜貫通ドメイン・細胞外ドメインを連成した GPIIb/IIIa 分子モデルによる「分子レバレッジ仮説」の普遍化の際に細胞膜貫通部位を「支点」とするよりも、細胞外ドメイン中央部に「支点」があると想定してモデルを作成する方向性もあることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Ayabe K, Goto S, Oka H, Yabushita H, Nakayama M, Tomita A, Hasebe T, Yokota H, Takagi S, and Goto S. Potential Different Impact of Inhibition of Thrombin Function and Thrombin Generation Rate for the Growth of Thrombi Formed at Site of Endothelial Injury under Blood Flow Condition. *Thromb Res*, in press (2019) ・ 査読あり
- ② Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, Chan D, Cohen DJ, Giannitsis E, Gibson CM, Goto S, Katus HA, Kerneis M, Kimura T, Kunadian V, Pinto DS, Shiomi H, Spertus JA, Steg PG and Mehran R. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Prim*, in press (2019) ・ 査読あり
- ③ Goto S, Kimura M, Katsumata Y, Goto S, Kamatani T, Ichihara G, Ko S, Sasaki J, Fukuda K, and Sano M. Artificial Intelligence to Predict Needs for Urgent Revascularization from 12-Leads Electrocardiography in Emergency Patients. *PlosOne*, doi.org/10.1371/journal.pone.0210103, (2019) ・ 査読あり
- ④ Goto S, and Goto S. Automated interpretation of echocardiography with AI: What's next? *Circulation*, 2019;139:1646–1647 ・ 査読あり
- ⑤ Yabushita H and Goto S. Validation of DAPT score in East Asia. *Circulation*, 137:563–566, 2018 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.0317858 (2018) ・ 査読あり
- ⑥ Goto S and Goto S. Does Computer Simulation Help Facilitate Personalized Precision Medicine for the Use of Warfarin? *Circ Cardiovasc Genet*. 10: pii: e001969. (doi: 10.1161/CIRCGENETICS.117.001969) (2018). ・ 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① Goto S, Kimura M, Katsumata Y, Goto S, Kamatani T, Ichihara G, Ko S, Sasaki J, Fukuda K, and Sano M. Artificial Intelligence to Predict Needs for Urgent Revascularization from 12-Leads Electrocardiography in Emergency Patients. 第 88 回日本循環器学会, Young Investigator Award (優秀賞), 2019.
- ② Goto S. Heterogeneity of the Use of Antiplatelet Agents on the Globe, Panel Discussion at ACC.19 (New Orleans, USA), 2019
- ③ Goto S. Biologically Validated Model of Platelet Adhesion under Blood Flow Conditions-Computer Simulation of Platelet Adhesion-, Symposium at Joint Meeting of ESCM-ISH-ISH

(国際バイオレオロジー学会), 2018

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：予後予測システム、予後予測プログラム作成装置、予後予測装置、予後予測方法及び予後予測プログラム

発明者：後藤信哉・後藤信一

権利者：学校法人東海大学・後藤信哉・後藤信一

種類：特許

番号：特願 2019-038948

出願年：2019 年

国内外の別： 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/web/taisya.html>

<http://ims.med.u-tokai.ac.jp/profile%20goto.html>

<https://www.ndph.ox.ac.uk/team/shinya-goto>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡 秀樹

ローマ字氏名：OKA, Hideki

研究協力者氏名：後藤信一

ローマ字氏名：GOTO, Shinichi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。