434 引張荷重下におけるアクチンフィラメント構造の分子動力学解析

Molecular Dynamics Analysis on Actin Filament Structure Under Tensile Force

○学 松田 亮 (京都大・院) 正 安達 泰治 (京都大・工) 井上 康博 (理研)
曾我部 正博 (名古屋大・医) 正 北條 正樹 (京都大・工)

Ryo MATSUDA, Taiji ADACHI, and Masaki HOJO, Dept. Mech. Eng. & Sci. Kyoto University, Kyoto

Yasuhiro INOUE, VCAD System Research Program, RIKEN

Masahiro SOKABE, Dept. Physiol., Nagoya University, Nagoya

Key Words: Cell Biomechanics, Actin Filament, Steered Molecular Dynamics, Tensile Force, Cofilin

1. 緒言

細胞骨格の一種であるアクチン細胞骨格は、力学的強度の付与、細胞形態の維持、細胞運動などの基本的な細胞機能を担っている。さらに、細胞が力学的刺激を感知する際、同構造が、その感知機構の構成要素としての役割を果たしていると考えられており、特に、アクチン細胞骨格の動的な再構築の重要性が示唆されている。このようなアクチンの再構築は、生化学的因子に加えて、力学的因子によっても調整されている可能性が指摘されている^[1]。例えば、アクチン細胞骨格の動的安定性に対する張力の影響を調べるため、骨芽細胞のアクチン細胞骨格に存在する張力を選択的に解放する実験が行われた^[2]。その結果、張力の解放により、同構造の脱重合が促されることが示された。しかしながら、力学的因子がアクチンの重合・脱重合を調整する機構については、切断関連タンパク質の影響が示唆されるものの未だ明らかではない。

そこで、本研究では、同構造に対する力学的刺激の影響を解明する第一歩として、アクチンモノマー14個から構成された二重らせんの分子構造からなるアクチンフィラメントに着目した。ここでは、分子動力学法を用いて、アクチンフィラメントに引張りひずみ1%を与え、両端固定し平衡化させ、引張りひずみの影響による同構造二重らせんの振れの変化を評価した。

2. シミュレーション手法

本研究では、汎用分子動力学計算ソフト、NAMD2.5 (イリノイ大学)を使用した。

2.1 アクチンフィラメントの分子構造 シミュレーションに用いたアクチンフィラメントの分子構造は、Protein Data Bank (PDB)に登録されている1MVWデータを用いた。同構造は、X線結晶構造解析により得られたものであり、ウサギの骨格筋のアクチン分子とミオシン分子から構成されている。同構造から、Fiシミュレーションに用いるアクチンフィラント(G-アクチン14個)を取り出した。このアクチンフィラメントのZ軸方向長さは

414.5 Åである。Fig.2に示すように、各G-アクチンは、372個のアミノ酸残基を有している。

まず、細胞質中における分子構造を再現するため、アクチンフィラメント周囲の直方体領域 (X軸方向108 Å, Y軸方向109 Å, Z軸方向470 Å) に水分子を配置したモデルを作成した。次に、境界条件を全方向周期境界とし、環境温度を310 Kで等温制御した。時間2 nsの系の平衡化計算を行い、引張で用いる初期構造を得た。ここで、時間刻み幅は、2 [fs/step]とした。

2.2 引張手法 引張りひずみが、アクチンフィラメントの構造変化に与える影響を検討するため、二重らせん構造の一端 (Fig.1左端) のアクチン二分子 (G_1, G_2) のC α 原子を固定し、他端 (Fig.1右端) のアクチン二分子 (G_{13}, G_{14}) のC α 原子に引張荷重を負荷した。引張方向は、アクチンフィラメント構造の中心軸 (Z軸) に平行とし、C α 原子一個につき、一定の引張荷重 $f = 5$ pNを与えた。ここで、時間刻み幅 $\Delta t = 2.0$ [fs/step]とし、アクチンフィラメント長さに対して引張りひずみ1% (Z軸方向のアクチンフィラメント伸び4.14 Å) を与えるまで引張荷重を負荷した。その後、左端のアクチン二分子 (G_1, G_2) のサブドメインD $_1, D_3$ (Fig.2)、および右端のアクチン二分子のサブドメインD $_2, D_4$ (Fig.2) のC α 原子をそれぞれ固定して、平衡化計算を行った。境界条件、環境温度、および時間刻み幅は前節と同様の条件を用いた。

2.3 アクチン分子間の振れ角 引張りひずみの作用に対して、アクチンフィラメント構造の変化を考察する上で、隣り合うアクチン分子の成す振れ角に着目した。アクチン分子 $G_i (i = 1 \sim 14)$ 内のサブドメインD $_k (k = 1 \sim 4)$ の重心位置を $\bar{x}_k$ として、4本の法線ベクトル $n_k (l = 1 \sim 4)$ を3点 $\bar{x}_k (k \neq l)$ から作られる平面に対して直交するベクトルとする。これら法線ベクトル n_k の和をアクチン分子 G_i 平面に対する単位法線ベクトル n_i とし、 n_i をXY平面に射影した単位ベクトルを n_{i-XY} とし、隣り合うアクチン分子間の振れ角 θ_{ij} を、

$$\theta_{ij} = \arccos(n_{i-XY} \cdot n_{j-XY}), \quad (j = i+1, i=1 \sim 13)$$

と定義した。

Fig.2: Subdomains of an actin monomer. D $_1$ includes residues 1-32, 70-144, 338-372, D $_2$ includes residue 33-69, D $_3$ includes residue 145-180, 270-337, and D $_4$ includes residue 181-269.

Fig.3: Rotation angle θ_{ij} between G-actin i and j .

Fig.1: Actin filament model consisting of 14 actin monomers

3. シミュレーション結果と考察

3.1 引張シミュレーション 初期構造に対して引張荷重 $f = 5 \times 372 = 1860$ pN を負荷した場合のアクチンフィラメントの伸びの時間変化を Fig.4 に示す。同図に示すように、時刻 $t = 197$ ps において、アクチンフィラメントの伸びが長さの 1% (4.14 Å) となった。このときのアクチンフィラメント構造を用いて、両端固定の平衡化シミュレーションを行った場合のアクチンフィラメント構造の各時刻における RMSD 値を Fig.5 に示す。Fig.5 に示すように、 $t = 1400$ ps 以降では、RMSD 値がほぼ一定値となることから、平衡に達したと考えられる。

Fig.4: Change in elongation of actin filament during application of tensile force $f = 1860$ pN

Fig.5: Change in RMSD for actin filament structure during equilibration in condition that both ends of actin filament are fixed.

3.2 引張ひずみ 1% におけるアクチン分子の振れ角 引張ひずみを負荷していないアクチンフィラメント構造と引張ひずみ 1% を負荷した同構造のアクチン分子間の平均振れ角 $\bar{\theta}_{ij}$ を比較した。ただし、前者の構造は、平衡化シミュレーションの 1.6~2.0 ns 間、後者の構造は、同構造の両端固定のシミュレーションを開始してから 1.6 ns~2.0 ns 間の 0.5 ps 毎のデータ数 800 を用いた。これらのデータから得られたアクチン分子 $G_5 \sim G_{10}$ における平均の振れ角 $\bar{\theta}_{ij}$ と標準偏差を Table 1 に示す。ただし、変形を拘束したアクチン分子 G_1, G_2, G_{13}, G_{14} とそれらに接するアクチン分子 G_3, G_4, G_{11}, G_{12} を含む振れ角 $\bar{\theta}_{ij}$ は除いた。これらの結果から、アクチンフィラメント構造の中央部に位置するアクチン分子 $G_6 \sim G_9$ 、および $G_8 \sim G_9$ において、引張ひずみを負荷することにより、平均の振れ角 $\bar{\theta}_{ij}$ が増加していることがわかる。Fig.6 は、これらの結果を X-Y 平面に Z 軸を中心に極座標表示した図を、Fig.6 に示す。張力が作用すると、振れ角が増加することが予想されることから、アクチン分子 $G_6 \sim G_9$ は張力を受けていると考えられる。また、これらの張力が作用しているアクチン分子間の振れ角 $\bar{\theta}_{ij}$ に対して、区間幅 0.1 degree のヒストグラムを作成し、最小二乗法を用いて正規分布に近似した。一例として、アクチン分子 $G_6 \sim G_7$ の場合を Fig.7 に示す。張力の作用により、振れ角 $\bar{\theta}_{67}$ の標準偏差が小さくなり、正規分布のピークが鋭くなる傾向にあることがわかった。

本計算結果より、細胞内で作用している張力を開放するとアク

Table 1. Mean rotation angle $\bar{\theta}_{ij}$ [degree] between adjacent G-actins and standard deviation of normal distribution function.

Actin number $i-j$	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10
Equilibrium					
angle $\bar{\theta}_{ij-EQ}$ [degree]	156.35	162.58	162.16	165.90	168.14
S. D.	1.06	1.12	0.57	1.28	0.66
Tensile strain					
angle $\bar{\theta}_{ij-TE}$ [degree]	157.66	166.93	167.98	168.30	166.89
S. D.	0.57	0.57	0.49	0.68	0.75
$\bar{\theta}_{ij-TE} - \bar{\theta}_{ij-EQ}$	1.31	4.35	5.82	2.40	-1.25

チン細胞骨格が脱重合して消失する機構を考察する。アクチン細胞骨格の切断において、力学的因子と生化学的因子による相互作用が指摘されており、特に生化学的因子として、アクチン切断タンパク質のコフィリンが存在する。コフィリンは、アクチンフィラメントに結合することで、アクチン分子間の振れ角 θ を 5° 小さくし、二重らせん構造を振ることでアクチン分子間を切断することが推測されている^[9]。本研究において、力学的因子である引張ひずみを負荷することで、アクチン分子間の振れ角 θ の揺らぎは小さくなり、構造体として振れにくくなるため、コフィリンがアクチンフィラメントに結合しにくくなる、あるいは、結合してもコフィリンによる振れが起りにくくなる可能性が示唆された。

4. 結 言

本研究では、引張ひずみ 1% を負荷したアクチンフィラメント構造と引張ひずみを負荷していないアクチンフィラメント構造のアクチン分子間の振れ角 $\bar{\theta}_{ij}$ を比較した。その結果、アクチンフィラメント構造の中央部に位置するアクチン分子の振れ角 $\bar{\theta}_{ij}$ は、引張を負荷することで、揺らぎが小さくなり、構造体として振れにくくなることがわかった。この結果から、細胞内で作用している張力を解放したアクチン細胞骨格の脱重合の機構において、張力による力学的因子が、切断タンパク質であるコフィリンの作用を阻害する可能性が示唆された。

本研究は、一部 JST-CREST、および文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「マイクロ・ナノバイオメカニクスの開拓」の援助を得た。記して、謝意を表する。

5. 参考文献

- [1] Neidlinger-Wike, C. et al., *J. Orthop. Res.*, **19**, (2001), 286-293.
- [2] Sato, K. et al., *The 16th Bioengineering Conference, JSME*, **03-38**, (2004), 9-10.
- [3] Bamburg, J. R. et al., *Trends in Cell Biology*, **9**, (1999), 364-370.

Fig.6: Comparison of angle θ_{ij} of actin 6-9 under tensile force with that of actin 6-9 during equilibration.

Fig.7: Normal distribution functions of rotation angle θ_{67} between G-actin 6 and 7 under tensile strain and under equilibration.