分子構造解析による骨コラーゲン原線維の形成・分解時の
形態・機能評価*仲 町 英 治^{*1}, 宮 本 靖 幸^{*2}Characterization of Formation and Resolution Processes of Bone Collagen
Microfibril by Molecular Structure Analysis

Eiji NAKAMACHI and Yasuyuki MIYAMOTO

The static and dynamic molecular structure analyses of the collagen microfibril were carried out by using the molecular mechanics(MM) and molecular dynamics(MD) simulation code, AMBER, which has been developed by Kollman et al. In this study, the characterization of collagen microfibril was performed by studying the difference between the formation process collagen (bonding model) and resolution process collagen (off-bonding model). The collagen microfibril was modeled by assembling collagen monomers, named Smith-Collagen. The formation and resolution mechanism is studied by MM and MD analyses in cases of peptide bonding and off-bonding between GLY 226 PRO 227 (Atom 1622 Atom 1623) of collagen molecule. The molecular mechanics analysis demonstrates that bonding model might be more stable as a whole and more active locally than off-bonding model. Further, the isothermal compressibility of off-bonding model is lower than bonding one. It means that the resolution of collagen molecule, which corresponds to the off-bonding, cause the higher rigidity and lose the activation ability. The molecular dynamics analysis reveals that the bonding model has the higher possibility of large scale structure change, especially at the binding part - the terminates between collagen units-. The microscale evaluations of static and dynamic micromechanical properties shows the stable and high dynamical function of the native bone structure.

Key Words: Bone, Collagen, Cross-link, Formation, Resolution, Molecular Mechanics, Molecular Dynamics, Potential Energy, R. M. S Fluctuation, Isothermal Compressibility

1. 緒 言

生体保持組織である骨は、主に有機質であるコラーゲンと無機質ハイドロキシアパタイトで構成される複合材料である。コラーゲンは生体中に含まれるタンパク質の約30%を占める主要な生体構成分子であり⁽¹⁾、ハイドロキシアパタイトは歯などの硬組織を構成する主要なミネラル材料である⁽²⁾⁽³⁾。ゆえに、骨は硬さと柔らかさの両方を兼ね備えた高機能材料といえる。また、骨は常にリモデリングを繰り返し、損傷時には自己修復する機能も有している。このリモデリングによる骨形成・分解メカニズムを実験的手法によって解明しようとする試みが数多く見受けられる⁽²⁾。しかし、細胞・分子レベルの計算科学の手法を用いた解析的研究は少ないと考える。そこで骨組織の基本要素としてのコラーゲン-アパタイト複合系に着目し、リモデリング過程におけるその形態・力学特性を分子力学・分子動力学を用いた3次元分子構造解析により検討することは、骨の機能発現メカニズム解明のために重要であると考え、従って本論文では骨コラーゲンの基本単位であるコラーゲン微小原線維を取り上

げ解析対象とする。この線維の分子構造は約 3000 個のアミノ酸残基で構成されるコラーゲン分子が5本集まって形成されており、骨としての機能発現の基本単位となる。しかし、コラーゲン分子のアミノ酸配列および3次元座標は実験解析により部分的に解明されているものの完全には決定されていない。そこで本研究では PDB(プロテインデータバンク)に登録されているスミスコラーゲン⁽⁴⁾を分子モデルとして用いた。本論文ではこのモデルにおいてコラーゲン分子間にコラーゲン原線維形成時に酵素で作用される架橋結合を設定したモデルと、分解時にコラーゲナーゼの働きによって主鎖の1つが切断されたモデルをそれぞれ形成・分解過程のコラーゲンに対応させた。両モデルに対して分子力学・分子動力学を用いた分子構造解析を行うことで構造・機能特性を求めた。これらの解析結果を比較検討することで骨形成・分解時における形態・機能変化に関する知見を得ることを目的とする。

2. 分子力学解析⁽⁵⁾

2-1 分子力学計算におけるポテンシャルの算出と極小化 分子力学計算には Kollman らによって開発された AMBER を採用した⁽⁶⁾⁽⁷⁾。コラーゲンの立体構造

* 原稿受付 1997年7月9日。

^{*1} 正員、大阪工業大学(〒535 8585 大阪市旭区大宮 5 16 1)。^{*2} 学生員、大阪工業大学大学院。

はPDBの3次元座標データにより与えられることから分子系を構成する各分子のポテンシャルエネルギー V を算定することができる。ここでは直交座標系を用いた計算法を採用しており、ポテンシャルエネルギーは結合長 r と結合角 θ 、二面角 ϕ および非共有結合原子間距離 r_{ij} をそれぞれ用いて表わされる。全ポテンシャルエネルギー V は経験的に次のようなエネルギー項の和の形で表される。

$$V = V_r + V_\theta + V_\phi + V_{cl} + V_{vdW} + V_{hb} \quad (1)$$

これらポテンシャルの表現式の詳細は文献[8],[10]および[11]を参照されたい。

生体中においてコラーゲンはそのアミノ酸配列に基づいて固有の3次元分子構造を保持しており、その構造はコラーゲンの構造安定性や機能に関与している。コラーゲンの安定配座においては全ポテンシャルエネルギー関数 $V(\mathbf{x})$ の極小化とはコラーゲンの構造を表す座標の列ベクトルを $\mathbf{x}$ としたとき

$$\mathbf{x}^{k+1} = \mathbf{x}^k + \alpha \mathbf{d}^k \quad (2)$$

$$\nabla V(\mathbf{x})|_{\mathbf{x}=\mathbf{x}^*} = 0 \quad (3)$$

となる収束点列を求めることである。 α は正の微小なスカラー量であり、 $\mathbf{d}$ はある試行点から極小点 $\mathbf{x}^*$ へ向かうベクトルである。本解析では $\mathbf{d}$ に極小化の当初は最急降下法、その後は極小点に達するまで共役勾配法を採用する。これにより得られるエネルギー極小構造は大域的な極小解の保証は無いが、X線結晶回折を基に決定した初期構造⁽¹²⁾に比べポテンシャルエネルギー値が十分低いことからここでは最小解の近傍に収束しているものと考えた。

2.2 基準振動解析法 基準振動解析法はポテンシャルエネルギー V の極小点近傍での小さな分子内振動を対象とする。分子内振動の自由度 n に対応した座標をベクトル表示で $\mathbf{q}$ とすると、エネルギー極小点 $\mathbf{q}^0$ の近傍でのポテンシャルエネルギー V と運動エネルギー E は次式で近似できる。

$$V(\mathbf{q}) = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N F_{ij} (\mathbf{q}_i - \mathbf{q}_i^0) (\mathbf{q}_j - \mathbf{q}_j^0) \quad (4)$$

$$\left. \begin{aligned} E &= \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N H_{ij} \dot{\mathbf{q}}_i \dot{\mathbf{q}}_j \\ H_{ij} &= \sum_{l=1}^N m_l \frac{\partial \mathbf{r}_l}{\partial \mathbf{q}_i} \cdot \frac{\partial \mathbf{r}_l}{\partial \mathbf{q}_j} \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

ここで i, j はタンパク質構成原子を表し、 F_{ij} はエネルギー極小構造におけるポテンシャルエネルギーの2次の導関数、 N は原子数、 m_l は各原子の質量、 $\mathbf{r}_l$ は各原子の位置ベクトルを表す。

運動方程式は、Lagrangeの方程式を用いることにより

$$\sum_{j=1}^N H_{ij} \ddot{\mathbf{q}}_j + \sum_{j=1}^N F_{ij} (\mathbf{q}_j - \mathbf{q}_j^0) = 0 \quad (6)$$

となる。

式(6)の一般解 $\mathbf{q}_j$ は調和振動子の線形重ね合せ、つまり個々の原子運動とタンパク質分子内の全ての原子が示す集団運動に対応した基準振動 Q_k の和で示される。

$$\mathbf{q}_j = \mathbf{q}_j^0 + \sum_{k=1}^N A_{jk} Q_k \quad (7)$$

$$Q_k = \alpha_k \cos(\omega_k t + \delta_k) \quad (8)$$

この固有振動数 ω_k と重ね合せの係数 A_{jk} を算出し、式(7)に代入することでタンパク質の分子内振動を示す原子の運動が完全にシミュレートされることになる。原子運動のゆらぎの振幅の時間に関する二乗平均(r.m.s.fluctuation)は次式で示される。

$$\sqrt{\langle (\Delta \mathbf{q}_j)^2 \rangle} = \sqrt{\sum_{k=1}^N A_{jk}^2 \frac{k_B T}{\omega_k^2}} \quad (9)$$

ここで k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度である。

また、体積圧縮率 β_T は次のように求められる。

$$\langle (\Delta V)^2 \rangle = k_B \beta_T V T \quad (10)$$

ここで ΔV は体積ゆらぎ、 V はタンパク質の体積である。

2.3 分子動力学解析法 タンパク質の構造が静的に固定されたものではなく、動的にゆらいでいることは多くの実験データから解明されている。それらタンパク質の動的なゆらぎは原子間に働く相互作用下での分子動力学計算によって得られる。

ここで原子 i を質点 m_i とし、その位置ベクトルを $\mathbf{r}_i$ とするとNewtonの方程式は

$$\ddot{\mathbf{r}} = \frac{1}{m_i} \mathbf{F}_i \quad (11)$$

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_i V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_n) \quad (12)$$

となる。ここで $\ddot{\mathbf{r}}$ は原子 i の加速度であり、 $\mathbf{F}_i$ は原子 i に働く他の原子からの力である。

式(11)の解析解を得ることは通常不可能なため、数値解析が必要となる。本解析では数値解法としてVerletの方法の変形であるLeapfrog法を採用する。この手法は位置 $\mathbf{r}_i(t)$ の時間さざみ h の半分の時間で速度 $\mathbf{v}_i$ が計算されており、次式で示される。

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{1}{2} \left\{ \mathbf{v}_i \left(t + \frac{h}{2} \right) + \mathbf{v}_i \left(t - \frac{h}{2} \right) \right\} \quad (13)$$

Leapfrog法に関する詳細は文献[10]を参照されたい。

3. 分子構造解析結果および考察

3.1 配座エネルギー極小構造の比較 本論文で採用したスミスコラーゲンは1968年にSmithによって提案されNatureに掲載された⁽⁴⁾。さらにその3次元座標は1991年にChenらによってPDBに登録された⁽¹²⁾。このモデルはコラーゲンの特徴的アミノ酸配列であるGLY(グリシン)-X-YにおいてXおよびYにPRO(プロリン)を配置した理論モデルで、この配列を12回繰り返した36残基からなるポリペプチド鎖の3重らせん構造3(GLY-PRO-PRO)₁₂をしている。分子1本は108残基のアミノ酸で構成された、長さ10.2nm、直径1.5nmの細長いタンパク質である。コラーゲン微小原繊維モデルは分子5本が5角形状に配置されてできており、直径は約4.1nmとなる。また分子力学計算においての総自由度およびポテンシャル

エネルギーに用いられる経験的パラメータの数を軽減し、計算効率を向上するために原子団 CH_n を単一の原子として扱うユナイテッドアトム法を採用し、総原子数を 3420 とした。PDB には微小原線維モデル(登録名:4CLG)が登録されており、その 3 次元座標データの構造の中央部(長さ約 50nm, 270 残基, 1940 原子)を抽出したバルク構造を基本単位とした。その 3 次元構造を図 1 に示す。コラーゲンとハイドロキシアパタイトの複合材である骨単位の破骨・造骨の再構築過程は、酵素によるコラーゲン線維のペプチド結合(主鎖)の裂断・形成によって誘起されると考える。そこで、この主鎖切断モデルと切断されていない正常モデルに関する分子力学解析を行い、骨コラーゲン形成と関連する構造特性・運動機能の評価を行うことにする。ここで 5 本のコラーゲン分子の隣接部に図 2 に示すシッフ塩基型架橋(ジヒドロキシリジノールロイシン)を 10 箇所設定することにより各線維分子間を結合した⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。この初期配置構造を図 3 に示す。この構造を正常モデル(bonding model)として今後の解析に用いる。また、コラーゲンがコラーゲナーゼによって分解されるとき、コラーゲン分子のアミノ酸配列の主鎖 Y-GLY 間が切断されることが報告されている⁽¹⁾。そこで架橋結合を与えた状態で主鎖を 1 本切断した構造を作成し、主鎖切断モデル(offbonding model)とした。これらのモデルに対し分子力学計算を行い、極小構造を求めた。それらの配座エネルギー極小構造を図 4 に、主鎖切断部近傍を拡大したものを図 5 にそれぞれ示す。配座エネルギー極小化計算においては非共有結合のカットオフを 0.9nm とし、誘電率は距離 r に比例するとし、全ての原子を無拘束とした。極小点探索ではエネルギー勾配の二乗平均が 0.01 になったところを極小点と定め、最初の 1000 ステップは最急降下法を用いて極小化を行った。図 4 に示す正常モデルと主鎖切断モデルの比較から、切断部近傍以外の大きな構造的相違は見られず、切断の影響は局部に限定されることが分かった。図 5 から切断部近傍では原子の集合度

が疎になり、コラーゲン分子相互の結合度が減少することが分かった。また、主鎖切断によってその近傍のペプチド鎖の相互配置に大きな相違が生じていることが示された。

3.2 極小構造におけるエネルギー分布の比較 つぎに正常コラーゲン線維モデルと主鎖切断モデルの配座エネルギー極小構造におけるエネルギー分布について比較検討を行う。図 6 および図 7 に両モデルのアミノ酸残基ごとの全ポテンシャルエネルギーの分布を示す。図中では、縦軸に平行な点線により 1 分子(54 残基, 388 原子)ごとの領域に区切って示した。また、架橋部の残基(図 2 に示すヒドロキシリジンおよびヒドロキシアリジン残基)は黒色で、それ以外の残基は灰色で示す。両モデルにおいて正のエネルギーを示す残基が存在する。この残基におい

Fig.2 Intermolecular cross-links

Fig.1 3-D structure of Smith-collagen microfibril structure obtained from PDB

Fig.3 Cross-link and off-bonding positions in 3-D structure of collagen microfibril

Fig.4 Conformation energy minimum structure of collagen models
(Left:bonding model, Right:off-bonding model)

Fig.5 Off-bonding position described in enlarged 3-D molecular structure
(Left: bonding model, Right:off-bonding model)

ては結合ポテンシャルとファンデルワールスポテンシャルが非常に大きく、無理にパッキング(充填)された不安定状態にあると推測される。全体のエネルギー分布の形態およびエネルギーピーク値の周期性は両モデルともほぼ一致しているが、その値には相違が見られる。切断部近傍での正のエネルギー値が減少しており、無理なパッキングが切断によって解放されていることが分かる。両モデルのポテンシャルエネルギーの総和を表1に示す。表1には架橋をさせていない状態の場合で同様の計算を行った場合のエネルギー値を併せて示している。これより、架橋を与えることによる総エネルギーの変化はほとんどないことが分かった。しかし、主鎖を切ることで総エネルギー値が増加することが分かる。つまり、局所的には切断によってエネルギー値は減少するが(切断部近傍)、全体としては増加することを示している。

3.3 ゆらぎ分布と体積圧縮率の比較 ここでは基準振動解析によって得られた極小構造近傍での各原子のゆらぎの二乗平均を求めた。コラーゲン原線維モデルの原子のゆらぎに関する分布を図8および図9に示す。ゆらぎは極小状態における各原子の振動の振幅を表し、

Fig.6 Potential energy of bonding model

Fig.7 Potential energy of off-bonding model

Table.1 Total potential energy of collagen models

collagen model	total potential energy
non cross-link model	$-1006.1788 \times 10^{-23} \text{ J}$
bonding model	$-1003.3126 \times 10^{-23} \text{ J}$
off-bonding model	$-975.1830 \times 10^{-23} \text{ J}$

運動機能発現の一指標である。つまり、ゆらぎが大きい場合はエネルギー変動が大きく、そのエネルギー準位の変化が電荷の変動をもたらす、つまりその部位の運動機能が高いことを示唆することになると考えられる⁽¹⁶⁾。図8においてゆらぎの大きい箇所が架橋部位(図中の黒棒線)周辺に見られるが、主鎖切断モデルの結果を示す図9では切断部を与えた1分子内のゆらぎのみが高くなり、逆に隣接する分子を含めた全体のゆらぎの振幅が減少してピークが見られなくなった。これはタンパク分解酵素であるコラーゲナーゼが主鎖を切ることによりコラーゲン分子の運動機能が損なわれるに関連すると考える。また、表2に体積圧縮率の値を示す。これから主鎖を切断することによって圧縮率の値が小さくなる、つまり分子全体の剛性が高くなっていることが分かった。

3.4 分子動力計算による構造変化の比較 遠距離ポテンシャルの影響が現れる分子動力学計算において、境界条件として両端の主鎖原子のみ固定した場合と

Fig.8 R.m.s fluctuation of bonding model

Fig.9 R.m.s fluctuation of off-bonding model

Table.2 Isothermal compressibility of collagen model

collagen model	isothermal compressibility
bonding model	$21.88 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{N}$
off-bonding model	$18.56 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{N}$

全原子を無拘束にした場合を採用した。1ns 間での両モデルの運動を画像出力し、その時間変化を検討した。実際の分子系では周期境界が成立しており、ここで採用した2つの境界条件下での計算結果を上下界とする運動を示すものとする。正常モデルの構造変化を図10および図11に、主鎖切断モデルの場合を図12および図13に示す。図中では、主鎖を切断したコラーゲンペプチド鎖(残基番号217~270)を黒色で示し、左から順に初期構造(0ns)、0.25ns、0.5ns、0.75ns、1ns 経過後の分子構造を示す。また、図12および図13の主鎖切断モデルにおいて切断部位を円で囲んだ。これらを比較すると正常モデルでは、両端が固定されることによって分子の動きは制限され、架橋結合部位近傍が活発に運動しているのが確認された。両端自由の場合は時間の経過と共に構造が大きく変化していることが分かった。つまり、分子全体が活性化しており、原子レベルのゆらぎが全体に波及しているものとする。また主鎖切断モデルの場合は、固定境界で

は切断部位における原子の活発なゆらぎ運動が見られたが、全体的な構造変化には至らなかった。また自由境界の場合においても同様に大きな構造変化には至らなかった。これは図9の基準振動解析結果にあるように主鎖切断によってゆらぎ、つまり運動機能が損なわれた結果と一致する。このことから主鎖切断は骨コラーゲン原線維を不活性化させるに関連していると考えられる。

4. 結 言

本研究では、架橋および主鎖の切断というコラーゲン分子の形成および分解のプロセスにおける典型的な構造を選択して分子構造解析を行った。その結果、主鎖切断によって切断近傍のポテンシャルエネルギーが解放され、局所的な構造変化が生じるものの全体としては大きな構造変化は見られないことが分かった。しかし、基準振動解析および分子動力学解析により、主鎖切断された骨コラーゲン原線維は切断部近傍のゆらぎは活発になるものの分子全体が硬くなり運動機能が低くなることが示された。コラーゲン分子の分解を誘起すると考えられる主鎖切断が、分子の不活性化に関連していることが本解析によって確かめられたといえる。

また、本研究は平成8年度文部省研究費補助金(基盤研究(B):No.08555029)の支援を受けたものであり、ここに感謝の意を表する。

文 献

- (1) 藤本, コラーゲン, (1994), 9, 77, 共立出版.
- (2) 須田, 小澤, 高橋, 骨の科学, (1985), 110, 医歯薬出版.
- (3) Rey, C., Miquel, J.L., Facchini, L., Legland, A.D., Glimcher, M.J., *Bone*, **15** (1995), 183.
- (4) Smith, J.W., *Nature*, **219** (1968), 157.
- (5) 江口, タンパク質工学の物理・化学的基礎, (1991), 第5章, 第6章, 共立出版.
- (6) Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S., Weiner, S.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **106** (1984), 765.
- (7) Weiner, S.J., Kollman, P.A., Nguyen, D.T., Case, D.A., *Journal of Computational Chemistry*, **7** (1986), 230.
- (8) 岩本・仲町, 機論, **60A**-580 (1994), 2915.
- (9) 岩本・仲町, 機論, **61A**-582 (1995), 487.
- (10) 下津・仲町, 機論, **63C**-611 (1997), 2413.
- (11) 山田・仲町, 機論, **63C**-611 (1997), 2402.
- (12) Chen, J.M., Kung, C.E., Fearheller, S.H., And Brown, E.M., *Journal of Protein Chemistry*, **10** (1991), 535.
- (13) Otsubo, K., Katz, E.P., Mechanic, G.L., Yamauchi, M., *Biochemistry*, **31** (1992), 396.
- (14) Bailey, A.J., Light, N.D., Atkins, E.D.T., *Nature*, **288** (1980), 408.
- (15) 久保木, 水野, 田崎, 滝田, 日本骨代謝学会雑誌, **6** (1988), 11.
- (16) 折井, 蛋白質 核酸 酵素, **39** (1994), 1552.

Fig.10 MD results of bonding model for 1.0ns (fixed boundary conditions at edges)

Fig.11 MD results of bonding model for 1.0ns (free boundary conditions at edges)

Fig.12 MD results of off-bonding model for 1.0ns (fixed boundary conditions at edges)
(off-bonding position surrounded with the circle) Fig.13 MD results of off-bonding model for 1.0ns (free boundary conditions at edges)
(off-bonding position surrounded with the circle)