

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22616002  
 研究課題名（和文）アクチンフィラメントの分子構造ダイナミクス解析によるメカノセンサー機構の解明  
 研究課題名（英文）Molecular dynamics study on actin filament structure for revealing actin filament mechanosensing  
 研究代表者  
 井上 康博（INOUE YASUHIRO）  
 京都大学・再生医科学研究所・准教授  
 研究者番号：80442929

研究成果の概要（和文）：アクチンフィラメントには、細胞に作用する力を受け持つ役割だけではなく、力そのものを感知するメカノセンサー機構が存在する。これまで、メカノセンサー機構の分子実体は不明であった。本研究で行った分子動力学シミュレーションにより、アクチンフィラメントには、張力を受け持つ繊維軸方向の変形を抑えながら、ねじれ変化やゆらぎ変化によって張力の存在を周りの分子に提示する見事な機構が備わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Actin filament is responsible not only for mechanical properties of the cell but also mechanosensing of forces in the cell. However, molecular mechanism of the actin mechanosensing remains elusive. In this study, we performed molecular dynamics simulations of the actin filament, and clarified that the actin filament can display its mechanical condition to its surroundings by changing twist angle and fluctuations while sustaining mechanical organization of the filament with little longitudinal deformation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
平成24年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：アクチンフィラメント、メカノバイオロジー、メカノセンサー、分子動力学シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

微小スケールの力計測技術や顕微鏡観察技術の発展に伴い、組織レベル、細胞レベル、生体分子レベルのそれぞれにおいて、生命活動に力が本質的なシグナルとして働いていることを示唆する膨大な知見が蓄積されてきている。しかし、組織や細胞に作用する力学刺激がいかんして細胞内を伝播し、生化学的なシグナルに変換され、機能的な細胞応答に至るのかについては未だ解明されておらず、「メカノバイオロジー」の中心的課題と

言える。これらを理解する鍵は、細胞の構造的基盤であるアクチン細胞骨格系にある。

## 2. 研究の目的

アクチンフィラメントには、アクチン脱重合因子コフィリンの結合そのものが、フィラメントに作用する張力によって調節されるメカノセンサーとしての機能が存在する。メカノセンサーの作動機構は、力学的場における熱ゆらぎスケールの分子構造ダイナミクスに関連すると考えられる。本研究課題では、アクチンフィラメントおよびコフィリンの

全原子を考慮した分子動力学シミュレーションを行い、張力作用下の力学的場における分子構造ダイナミクスを検討することにより、アクチンフィラメントのメカノセンサー作動機構について、その分子的メカニズムの解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

アクチンフィラメントの分子構造の熱ゆらぎを考慮し、メカノセンサーの作動機構を解明するには、時間・空間分解能共に、原子レベルのスケールで解析する必要がある。そこで、本研究では、分子動力学法(Molecular Dynamics: MD)を導入し、計算機シミュレーションによる検討を行うことにより、目的の達成を図った(図1)。

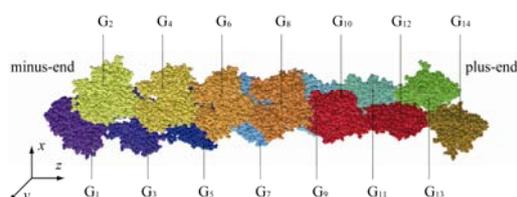


図1 アクチンフィラメント全原子モデル

### 4. 研究成果

#### (1) アクチンフィラメントの構造動態

アクチンフィラメントの全原子モデルを用い、熱平衡状態におけるアクチンフィラメントの分子構造ゆらぎを評価した。その結果、アクチンフィラメントは、ナノ秒の時間スケールにおいて、様々な準安定構造を経巡ることがわかった(図2)。特に、フィラメントの捻り方向のゆらぎは、詳細な時間・空間スケールに迫るほど、離散的な角度変化となることが観察された。さらに伸長方向と捻り方向のゆらぎがカップリングしていることが明らかとなった。

#### (2) フィラメント構造変化によるメカノセンシング

張力作用下のアクチンフィラメントの立体構造の解析を分子動力学シミュレーションにより行った。その結果、張力作用により、アクチンフィラメントには、2重らせん構造に起因したねじりが生じることが明らかとなった。さらに、そのねじれ変形の方法は、アクチン脱重合因子コフィリンの結合によるねじれ方向とは逆向きに生じることがわかった(図3)。また、張力作用下の熱ゆらぎによるねじれ方向の振動振幅は非作用下のそれに比して減少することが確認された。加えて、アクチンサブユニット間のフィラメント軸方向の伸び変形は、非常に小さいことがわかった。これらのことから、アクチンフィラメントには、細胞の機械的な強度を保ちな

がら、張力負荷をねじれ変化によって提示する機構が備わっていることが期待された。

以上により、アクチンとアクチン修飾タンパク質との間の相互作用およびその集積した結果である結合・解離のキネティクスに対して、力が直接的な影響を及ぼす機構として、アクチンフィラメントの立体構造やその準安定構造状態の出現頻度を変化させることによる可能性が示唆された。これは、アクチンフィラメントのメカノセンサー作動機構の分子実体に迫る重要な知見である。

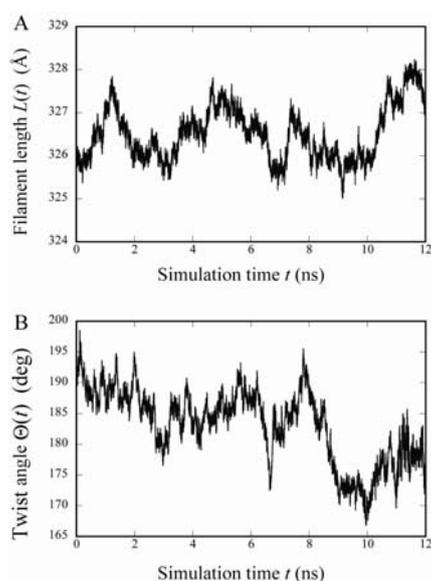


図2 アクチンフィラメントの構造ゆらぎ:  
(A)長さ変化、(B)ねじれ変化(雑誌論文(1)より引用)。

	Cofilin	No external force	Tensile force
Lateral view			
Tensile strain	0%	0%	0.2%
Axial view			
Twist angle (degree)	-162	+5	-165
			-2

図3 張力による構造変化とコフィリン結合による構造変化(雑誌論文(2)より引用)。

#### (3) 張力感受アミノ酸残基の特定

アミノ酸残基群の立体構造を特徴付ける指標として任意の2つのアミノ酸残基間の距離に着目し、張力負荷によって、平均距離およびゆらぎの大きさが変化するアミノ酸残基を抽出した。このとき、およそ14万通りのアミノ酸残基の組み合わせを網羅解析するため、張力感受的なアミノ酸残基を効率よく抽出するための手法検討を行い、情報統計学におけるカルバック・ライブラーダイ

パーゼンスをを用いることで、張力負荷によって敏感に立体構造変化するアミノ酸残基群を抽出することに成功した。

抽出したドメインには、アクチンとの相互作用が張力感受的であることが実験的に示唆される様々なタンパク質との結合ドメインが含まれていた。よって、抽出したドメインは張力感受ドメインであることが強く示唆された。アクチンフィラメントには、フィラメントレベルの張力負荷によって、アミノ酸残基レベルに一樣な立体構造変化が生じるのではなく、一部のドメイン構造とそのゆらぎが敏感に変化できる仕組があることがわかった。このようなドメインを結合対象とするアクチン関連タンパク質では、アクチンとの相互作用が張力感受的になることが期待されることから、アクチンフィラメントのメカノセンサー機構の分子実体は張力感受ドメインにあることが強く示唆された。

#### (4) 展望

本課題では、メカノセンシングの分子実体について、今後、実験との連携による確証を得るための展開に繋がる重要な知見が得られた。特に、特定された張力感受ドメインをターゲットとする分子内 FRET を設計することにより、実験的にアクチンの張力感受を可視化し、蛍光輝度の変化から細胞内の張力状態を定量的に可視化する技術の創出が期待される。現在、本課題成果をきっかけに、FRET 設計の専門家を新たな共同研究者として得ることができ、張力感受を可視化する FRET 設計を協力して進めている。さらに、本課題で開発した数理的・計算科学的手法は、メカノセンシング機構を解明することのできる手法として、国内外に大きな注目を集めており、アクチンだけでなく、別のタンパク質におけるメカノセンシング機構の解明を目指す新しい共同研究を始めるに至っている。このように、細胞のメカノセンシングを担うあらゆるタンパク質における構造動態を明らかにし、知見を蓄積することで、細胞の有するメカノセンシング機構の分子実体を統一的に理解する新しい学問領域の開拓を目指している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Quantitative analysis of extension-torsion coupling of actin filaments, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420, 2012, 710-713. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.048

(2) Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Masaki Hojo, Masahiro Sokabe, Taiji Adachi, Effect of

tensile force on the mechanical behavior of actin filament, *Journal of Biomechanics*, 44, 2011, 1776-1781. 査読有

DOI: 10.1016/j.jbiomech.2011.04.012

(3) Mian Long, Masaaki Sato, Chwee Teck Lim, Jianhua Wu, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, Advances in Experiments and Modeling in Micro- and Nano-Biomechanics: A Mini Review, *Cellular and Molecular Bioengineering*, 4, 2011, 327-339. 査読有

DOI: 10.1007/s12195-011-0183-x

(4) Shinji Matsushita, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, Masaki Hojo, Masahiro Sokabe, Evaluation of Extensional and Torsional Stiffness of Single Actin Filaments by Molecular Dynamics Analysis, *Journal of Biomechanics*, 43, 2010, 3162-3167. 査読有

DOI: 10.1016/j.jbiomech.2010.07.022

〔学会発表〕(計 20 件)

国際会議

① Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Energetic analysis of cofilin binding to actin filament using molecular, Conference on Computational Physics 2012, 2012.10.14-18.

② Yasuhiro Inoue, Shinji Matsushita, Taiji Adachi, Molecular Dynamics Simulation of Actin Filament, KSME-JSME Joint Symposium on CM & CAE 2012 (Kanazawa), 2012.09.12. 招待講演

③ Taiji Adachi, Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Mechanical Behavior of Actin Filaments under Tension: A Molecular Dynamics Simulation Study, 10th International Symposium on Biomechanics and Biomedical Engineering, Berlin, Germany, 2012.4.11-14. 招待講演

④ Yoshiaki Kondo, Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Molecular Dynamics Simulation Study of Mechanical Behavior of Actin Subunits in the Actin Filament, International Symposium on Cellular Mechanobiology, 2012.3.16.

⑤ Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Cofilactin Filament Model for Molecular Dynamics Simulation, International Symposium on Cellular Mechanobiology, 2012.3.16.

⑥ Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Molecular Dynamics Analysis of Coupling Behaviors between Extension and Torsion of Actin Filaments, 56th Annual Meeting of Biophysical Society, San Diego, United States of America. 2012.2. 25-29.

- ⑦ Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Masahiro Sokabe, Taiji Adachi, Effect of Tension on the Stiffness of Actin Filaments. International Symposium on Mechanobiology, Shanghai, China, 2011.11.4-8.
- ⑧ Shinji Matsushita, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, Masaki Hojo, Quantitative Evaluation of Mechanical Behaviour of Actin Filament under Different Mechanical Conditions, 6th World Congress on Biomechanics, Singapore, 2010.8.1-6.
- ⑨ Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Masaki Hojo, "Theoretical Study on Mechanochemical Modulation of Binding between Actin and its Accessory Proteins: A Thermodynamic Perspective", 6th World Congress on Biomechanics -Cytoskeletal Mechanics Symposium-, Singapore Suntec Convention Center, 2010.8.1-6. 招待講演

国内会議

- ⑩ 近藤 由章, 井上 康博, 安達 泰治, "分子動力学法を用いたアクチンフィラメントの張力感受に関わるアミノ酸残基群の力学的挙動の検討", 第25回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 pp.155-156, 2013.1.9-11.
- ⑪ 近藤 由章, 井上 康博, 安達 泰治, "張力作用によるアクチンフィラメント内アクチン修飾タンパク質結合残基群の立体構造変化の分子動力学シミュレーション", 第4回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集 pp. 251-252, 2012.10.22-24.
- ⑫ Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Molecular dynamics model of cofilactin filament, 第50回日本生物物理学会年会(名古屋), 2012.9.22-24.
- ⑬ 藤井 徹矢, 井上 康博, 安達 泰治, 分子動力学法によるコフィリン修飾アクチンフィラメントの平衡化シミュレーション, 日本機械学会第23回バイオフロンティア講演会講演論文集, pp. 95-96, 2012.10.5-6.
- ⑭ 近藤 由章, 松下 慎二, 井上 康博, 安達 泰治, 分子動力学法を用いたアクチンフィラメント内サブユニットの力学的挙動の検討, 日本機械学会 2012 年度年次大会(金沢), 2012.9.10-12.
- ⑮ 松下慎二, 井上 康博, 安達 泰治, アクチンサブユニット間の非線形力学特性の評価, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012.1.7-8.
- ⑯ Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Masahiro Sokabe, Taiji Adachi, Extension-torsion Coupling Behavior of

Single Actin Filament. 第49回日本生物物理学会年会(姫路), 2011.9.16-18.

- ⑰ 松下慎二, 井上康博, 曾我部正博, 安達泰治, アクチンフィラメントの引張-ねじり連成挙動の評価. 日本機械学会 2011 年度年次大会, 2011.9.12-15.
- ⑱ 松下慎二, 井上康博, 安達泰治, 張力作用下におけるアクチンフィラメントの分子構造ゆらぎと力学特性. 次世代スーパーコンピュータプロジェクト「次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発」シンポジウム: 第3回バイオスーパーコンピューティングシンポジウム(神戸), 2011.2.21-22.
- ⑲ 松下慎二, 安達泰治, 井上康博, 北條正樹, 曾我部正博, 張力作用下におけるアクチンフィラメントの分子間相互作用解析, 日本機械学会第23回計算力学講演会 CD-ROM 講演論文集, pp. 2001.1-2001.2, 2010.9.23-25.
- ⑳ 松下慎二, 井上康博, 北條正樹, 曾我部正博, 安達泰治, 分子動力学法を用いたアクチンフィラメントの引張・ねじれ剛性評価, 日本機械学会 2010 年度年次大会講演論文集(6), pp.75-76, 2010.9.5-8.

〔図書〕(計1件)

(1) 曾我部 正博 編, 化学同人, メカノバイオロジー, 第24章計算科学的メカノバイオロジー (井上康博, 安達泰治), 印刷中

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/1S2qY>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 康博 (INOUE YASUHIRO)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号: 80442929

(2) 研究分担者

北條 正樹 (HOJO MASAKI)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号: 70252492

安達 泰治 (ADACHI TAIJI)

京都大学・再生医科学研究所・教授

(H22→H23: 連携研究者, 最先端・次世代開発支援プログラムに専任のため)

研究者番号: 40243323

西川 雅章

京都大学・工学研究科・准教授

(H22→H23 研究分担者)

研究者番号: 60612085