

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24117008

研究課題名(和文)アメーバ運動を統御するアクチン構造多型マシナリー

研究課題名(英文)Actin structural polymorphism machinery that orchestrates amoeba motility

研究代表者

上田 太郎(Uyeda, Taro)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：90356551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 67,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)コフィリン結合によるアクチンフィラメント(AF)の構造変化がコフィリンの結合していない領域まで伝播し、それによってさらなるコフィリン結合が誘導されコフィリンクラスターが成長することを示した。(2)ATP存在下のミオシンS1とAFの過渡的な結合が、AFに協同的な構造変化をおこし、コフィリンと結合できなくなることを示した。これらの結果により、複数のアクチン結合タンパク質の結合が、AFの協同的構造変化を介して増強し合ったり阻害しあうメカニズムを実証した。(3)細胞内のAFも構造多型性をもつことを確認し、上記の*in vitro*の実験結果が生理的な意味を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1) It had been shown that cofilin binds cooperatively to actin filaments (AFs) forming clusters, and that the helix of AF in the cluster is supertwisted. We demonstrated that the conformational changes in AF are propagated to the neighboring bare zone on the pointed end side of the cluster, which leads to unidirectional growth of cofilin clusters along AFs. (2) In contrast, we found that transient interactions of AFs with S1 in the presence of ATP induce a different, untwisting conformational changes to AFs, which strongly inhibit cofilin binding. Thus, we showed that the two actin binding proteins (ABPs) induce different cooperative conformational changes to AFs, leading to enhancement or inhibition of ABP binding. Based on the results of those *in vitro* experiments, we proposed that cooperative conformational changes of AFs play major roles in specifying the functions of AF *in vivo*. (3) Consistent with this hypothesis, we demonstrated that AFs in cells are polymorphic.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクチン ミオシン コフィリン 構造多型性 アロステリー 細胞運動 FRET 高速原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

細胞内のアクチンフィラメントは、相互作用している多様なタンパク質の差異によってそれぞれ異なる重要な機能を果たしている。たとえばアメーバ状細胞前部のアクチンフィラメントは Arp2/3 依存的に重合し仮足を前方に押し出し、コフィリンにより脱重合する。一方後部ではミオシン II と結合し、後端の収縮を駆動する (図 1)。アクチンはまた、基質接着や膜胞輸送、遺伝子の転写制御などにも関与する。それでは、細胞内の個々のアクチンフィラメントは、どのようにして適切なアクチン結合タンパク質と選択的かつ安定に相互作用し、機能発現するのだろうか？これについては、細胞局所的な生化学的シグナリング (Rho の活性化や Ca^{2+} の上昇など) による制御が知られているケースもあるが、そうした説明が難しい状況も多く、アクチンフィラメントの機能分化メカニズムの全体像は未解明である。

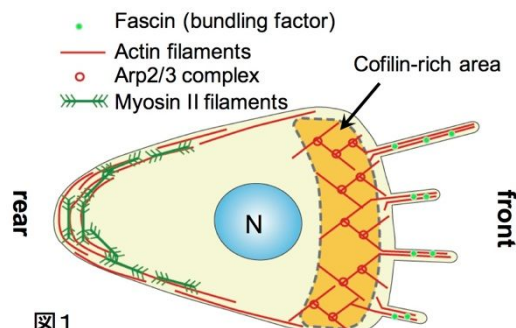


図 1

一方近年の構造解析の進歩により、アクチンフィラメントの構造には多型性があり、単一の構造を想定すべきではないと提唱されている (Galkin *et al.*, 2010)。これに関連してわれわれは、アクチンフィラメントと微量の HMM (ミオシン II の可溶性断片) あるいはコフィリンを *in vitro* で混合すると、HMM あるいはコフィリンが結合したフィラメントと全く結合しないフィラメントが共存することを見いだしていた (図 2A, B)。この現

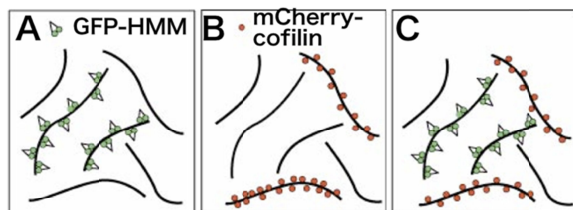


図 2. (A) GFP-HMM と大過剰のアクチンフィラメントを微量 ATP 存在下で結合させると、HMM がまばらに結合したフィラメントとほとんど結合していないフィラメントが共存する (協同的結合)。 (B) コフィリンも同様な協同的結合を示す。 (C) HMM とコフィリン、アクチンフィラメントが共存する場合は、HMM とコフィリンはそれぞれ別のアクチンフィラメントと協同的に結合する (排他的な協同的結合)。

象は、アクチンフィラメントには HMM またはコフィリンに対する親和性が異なる (少なくとも) 二つの構造があり、かつ同一フィラメントは長距離にわたって同じ構造をとりやすい (協同的構造多型) ことを示唆している。さらにわれわれは、HMM とコフィリンおよびアクチンフィラメントが共存すると、HMM とコフィリンはそれぞれ相互排他的にアクチンフィラメントと協同的に結合することを

見出した (図 2C)。種々の状況証拠から、これはアクチン分子上の結合部位の競合に起因するものとは考えにくいので、HMM に対する親和性が高いフィラメントはコフィリンに対する親和性が低く、逆にコフィリンに対する親和性が高いフィラメントは HMM に対する親和性が低いことが示唆された。またこうした排他的な協同的結合が起きるプロセスとしては、たとえば HMM 分子がアクチンフィラメントに結合すると、結合されたアクチンサブユニットの構造変化が近傍のサブユニットに伝播し、その結果 HMM への親和性が高まるためさらに HMM が結合し、ドミノ倒しの様にフィラメント全長にわたってミオシン II 結合型の構造となり、コフィリン結合が排除されたのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景から代表者らは、細胞内の場所によってアクチンフィラメントの構造が異なっており、そのことが、コフィリン、ミオシン II を初めとする種々のアクチン結合タンパク質が異なった細胞内局在を示し、アクチンフィラメントが機能分化する一因ではないかと考えた (図 3)。本研究は、この仮説を検証することを目的とする。

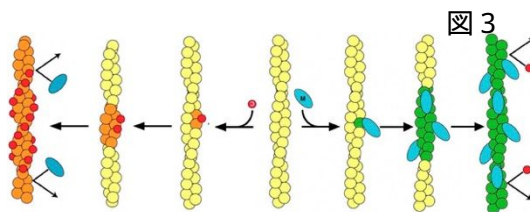


図 3

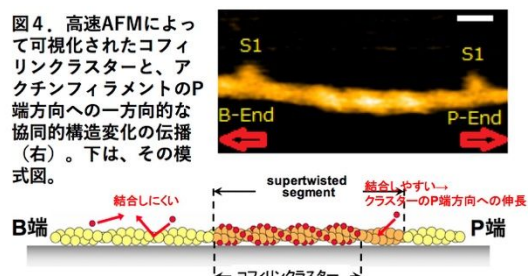
3. 研究の方法

主として、以下の 3 つの方法を用いた。
 (1) 全反射顕微鏡 (TIRF) および高速原子間力顕微鏡 (AFM) により、アクチン結合タンパク質とアクチンフィラメントの結合の様子を直接観察する。これら二つの顕微鏡観察法は、ともにビデオレート程度の時間分解能をもつが、TIRF は、広い視野において、複数のアクチン結合タンパク質を明確に区別して観察できる長所をもつ一方、蛍光標識が必要であること、空間分解能が低いことが欠点である。これに対して高速 AFM は、非標識のタンパク質の挙動を高い空間分解能 (数 nm) で観察できるが、視野が狭く、大きさの似たアクチン結合タンパク質を判別しにくいという欠点をもつ。そこで、両者のこうした長所短所を補い合った研究を展開した。
 (2) 生化学的手法。様々な標準的な生化学的実験に加え、われわれ独自の actin-S1 融合タンパク質や、cofilin-actin 融合タンパク質を最大限に活用した、アクチンフィラメントとの共沈実験などを行った。
 (3) 蛍光標識タンパク質の細胞内観察。分子内 FRET を組み込んだアクチン分子を細胞内に導入して FRET 強度の分布を観察したり、光活性化 GFP を融合したアクチン結合ドメインの細胞内挙動を観察し、細胞内でのアクチンフィラメントの構造多型性の探索を行っ

た。

4. 研究成果

(1) コフィリンはアクチンフィラメントと協同的に結合してクラスターを形成し、コフィリンクラスター内のフィラメントのらせんピッチを短縮させるが、高速 AFM 観察の結果、らせんピッチの短縮が、コフィリンクラスターの P 端側に隣接する、コフィリンの結合していない領域まで伝播すること（協同的構造変化の一方向的な伝播）、さらに、コフィリンが結合していないらせんピッチの縮んだ領域に新しいコフィリン分子が結合し、それによってコフィリンクラスターが P 端方向に一方向的に成長することを示した。これにより、アクチンフィラメントの協同的構造変化を介してコフィリンがアクチンフィラメントと協同的に結合することが明らかになった（図 4、論文）。



(2) TIRF 顕微鏡観察及び高速 AFM 観察により、ATP 存在下の S1 によってアクチンフィラメントは協同的に構造変化し、コフィリンと結合できなくなることを示した。ATP 存在下のミオシン S1 はアクチンフィラメントと過渡的にしか結合しないので、このコフィリンの結合阻害は、アクチン分子上の結合部位の競合の結果ではあり得ず、アクチンフィラメントの協同的構造変化を介するものであると結論した。他方、共沈実験などから、コフィリンのアクチンフィラメント結合も、アクチンフィラメントの協同的構造変化を介して S1 結合を阻害することが示された（論文）。

ATP 存在下の S1 との相互作用によるアクチンフィラメントは協同的に構造変化の実体については、高速 AFM 観察により 8% 程度のらせんピッチの伸長を伴うことを見出した。ATP γ S や ADP 存在下では、そうしたらせんピッチの伸長は起きなかったため、いわゆる cycling ミオシンヘッドのみがアクチンフィラメントの構造変化を誘起できることが示された。またトロポミオシン・トロポニン (TmTn) 存在下でも、cycling S1 によるらせんピッチの伸長は起きなくなったが、コフィリン結合は TmTn 非存在下と同様に阻害された。これらの結果から、cycling S1 によるアクチンフィラメントの構造変化の本質は、らせんピッチの変化ではなく、らせんピッチの伸長は付随的な現象だと考えられた（論文準備中）。

本研究では、S1 とコフィリンの結合に的を絞った解析を行った。しかし細胞内で相互排他的な局在を示したり、逆に類似の局在を示すアクチン結合タンパク質のペアが多数知られており、そうしたアクチン結合タンパク

質同士の正負の相互作用に、アクチンフィラメントの協同的構造変化が関与する可能性が示唆された。

(3) 分子内 FRET を仕込んだアクチンを調製し、動物培養細胞に導入して蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、細胞の異なる場所のアクチンは、異なる FRET 強度、すなわち異なる分子構造をもつことが明らかになった。特に細胞を外力で刺激すると、刺激された部位のアクチンの構造が変化することも示された（論文準備中）。

極性をもって運動中の細胞性粘菌アメーバでは、フィラミンは細胞後部に多く局在する。そこでフィラミンのアクチン結合ドメインを光活性化 GFP と融合して粘菌アメーバで発現し、細胞中央部で光活性化したところ、拡散で説明しなければならぬ高速で細胞後部に移動し、アクチンフィラメントと結合することが明らかになった。この結果は、細胞後部とその他の部位のアクチンフィラメントには何らかの差異があり、フィラミンのアクチン結合ドメインは、細胞後部のアクチンフィラメントと特異的に結合することが示され（論文）、細胞内アクチンフィラメントに構造多型性があるというわれわれの仮説が支持された。

(4) ミオシンによる力発生は、ミオシンモータードメイン内のレバーアームが角度変化することにより変位が生ずるといわれる「レバーアーム説」が有力である。しかしレバーアーム説を支持する強い証拠は、遅く processive な運動をするミオシン V を用いて得られたものがほとんどであり、速く non-processive なミオシン II については明確な証拠は得られていない。

本研究においてわれわれは、ミオシン II によるアクチンフィラメントの *in vitro* 運動がアクチンの G146V 変異によって強く阻害されるが、ミオシン V の運動は全く阻害されないこと（論文）、および、ある種のアクチン結合タンパク質のアクチン結合ドメインがミオシン II の運動を強く阻害するが、ミオシン V の運動は全く阻害しないこと（論文準備中）等を発見した。G146V 変異は、アクチン分子の構造変化に影響を与えると推測されるので、これらの結果は、ミオシン II と V では運動メカニズムが異なっており、高速で non-processive なミオシン II の運動においては、アクチンフィラメントの構造変化が重要な働きをすることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 23 件)

Shibata K, Nagasaki A, Adachi H, Uyeda, TQP. Actin binding domain of filamin distinguishes posterior from anterior actin filaments in migrating Dictyostelium cells. *Biophys. Physicobiol.*, 13:321-331 (2016) 査読あり

DOI: 10.2142/biophysico.13.0_321

Ngo KX, Umeki N, Kijima ST, Kodera N, Ueno H, Furutani-Umezumi N, Nakajima J, Noguchi TQP, Nagasaki A, Tokuraku K, Uyeda TQP. Allosteric regulation by cooperative conformational changes of actin filaments drives mutually exclusive binding with cofilin and myosin. *Sci Reports*, 6:35449 (2016) 査読あり

DOI: 10.1038/srep35449

Umeki N, Hirose K and Uyeda TQP. Cofilin-induced cooperative conformational changes of actin subunits revealed using cofilin-actin fusion protein. *Sci Reports*, 6:20406 (2015) 査読あり

DOI: 10.1038/srep20406

Kijima ST, Hirose K, Kong SG, Wada M and Uyeda TQP. Distinct biochemical properties of Arabidopsis thaliana actin isoforms. *Plant Cell Physiol* 57:46-56 (2015) 査読あり

DOI: 10.1093/pcp/pcv176

Plaza GR, Uyeda TQP, Mirzaei Z and Simmons CA. Study of the influence of actin-binding proteins using linear analyses of cell deformability. *Soft Matter*, 11:5435-5446 (2015) 査読あり

DOI: 10.1039/c5sm00125k

Noguchi TQP, Morimatsu M, Iwane AH, Yanagida T and Uyeda TQP. The Role of Structural Dynamics of Actin in Class-Specific Myosin Motility. *PLoS One*, 10:e0126262 (2015) 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0126262

Ngo KX, Kodera N, Katayama E, Ando T and Uyeda TQP. Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *eLife*, 2015 4:e04806 (2015) 査読あり

DOI: 10.7554/eLife.04806

Gomibuchi Y, Uyeda TQP and Wakabayashi T. Bulkiness or aromatic nature of tyrosine-143 of actin is important for the weak binding between F-actin and myosin-ADP-phosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 441:844-848 (2013) 査読あり

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.144

Noguchi TQP, Komori T, Umeki N, Demizu N, Ito K, Iwane AH, Tokuraku K,

Yanagida T and Uyeda TQP. G146V mutation at the hinge region of actin reveals a myosin class-specific requirement of actin conformations for motility. *J Biol Chem* 287:24339-24345 (2012) 査読あり

DOI:10.1074/jbc.M111.321752

Umeki N, Nakajima J, Noguchi TQP, Tokuraku K, Nagasaki A, Ito K, Hirose K, Uyeda TQP. Rapid nucleotide exchange renders Asp11 mutant actins resistant to depolymerizing activity of cofilin, leading to dominant toxicity in vivo. *J Biol Chem* 288:1739-49, (2012) 査読あり

DOI:10.1074/jbc.M112.404657

Plaza G and Uyeda TQP. Contraction velocity of the actomyosin cytoskeleton in the absence of cell membrane. *Soft Matter* 9:4390-4400 (2013) 査読あり

DOI: 10.1039/c3sm27867k

他 12 件

〔学会発表〕(計 7 3 件)

Adachi K, Oiwa K, Yoshida M, Uyeda T, and Kinoshita K Jr. Timing of Pi release in the rotary motor thermophilic F1. Biophysical Society 61st Annual Meeting, New Orleans (USA), 2017.2.

Ngo KX, Kodera N, Ando T. and Uyeda T. High speed AFM demonstration of cooperative structural changes in actin filaments induced by myosin S1 and physiological implications. 日本生物物理学会第 54 回年会、つくば国際会議場 (茨城県つくば市) 2016.11.

Hirakawa, R, Ueno H, Kodera N, Ando T, Uyeda TQP, and Tokuraku K. Real time observation of cooperative binding between myosin and F-actin by fluorescence and high-speed atomic force microscopy. 日本生物物理学会第 54 回年会、つくば国際会議場 (茨城県つくば市) 2016.11.

長崎晃、貴嶋紗久、湯本天嗣、金賢徹、今泉美玖、中村史、上田太郎。GFP アクチン融合タンパク質における GFP 導入位置によるアクチンフィラメント形成への影響。第 39 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016.11.

他 69 件

〔図書〕(計 1 件)

Uyeda TQP, Role of dynamic and cooperative

conformational changes in actin filaments. *In* Muscle Contraction and Cell Motility, pp.415-444 (Sugi H, Ed). Pan Stanford Publishing, Singapore (2016)

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 太郎 (UYEDA, Taro)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：90356551

(2) 研究分担者

徳樂 清孝 (TOKURAKU, Kiyotaka)
室蘭工業大学・工学研究科・准教授
研究者番号：00332106

(3) 研究分担者

長崎 晃 (NAGASAKI, Akira)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研
究部門・主任研究員
研究者番号：30392640

(4) 研究分担者

野口太郎 (NOGUCHI, Taro)
都城工業高等専門学校・物質工学科・講師
研究者番号：90615866

(5) 連携研究者

片山栄作 (KATAYAMA, Eisaku)
大阪市立大学・理学部・特任教授
研究者番号：50111505

(6) 連携研究者

若林健之 (WAKABAYASHI, Takeyuki)

帝京大学・理工学部・教授
研究者番号：90011717

(7) 連携研究者

高野光則 (TAKAN0, Mitsunori)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：40313168

(8) 連携研究者

五味淵由貴 (GOMIBUCHI, Yuki)
帝京大学・理工学部・博士研究員
研究者番号：10740219

(9) 研究協力者

ンゴー・スアン・キエン (Ngo, Xuan Kien)

(10) 研究協力者

柴田桂太朗 (SHIBATA, Keitaro)

(11) 研究協力者

足立健吾 (ADACHI, Kengo)