

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21106

研究課題名(和文)細胞伸張制御におけるアクチン重合調節タンパク質CPの役割

研究課題名(英文)Roles of CP for actin polymerization to regulate cell protrusions

研究代表者

藤原 郁子 (Fujiwara, Ikuko)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10742075

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):細胞膜を協働的に押すため、多数のアクチン線維の重合は厳密に調節されている。本研究では、アクチン線維の速重合端(B端)に30分も強力に結合・キャップするCapping Protein (CP)の解離を速めるCARMILに着目した。この2つのタンパク質がアクチン重合速度を調節する動作機構を理解すべく、CP上のD44を遺伝子改変したところCAH3との結合が50倍弱まった。変異体では、アクチン線維に既に結合・キャップしているCPを解離させる時間が長かったことから、D44とCARMILの結合は、素早いUncappingに関与しており、CARMILによるCPの分子制御メカニズムの一端が明らかになった。

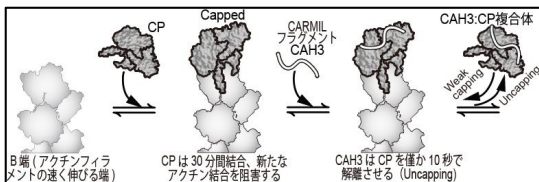
研究成果の概要(英文): Actin polymerization is essential for cell motility, and some proteins bind to the fast growing end of actin filaments (B-end) and regulate actin elongation rate. This project has focused on Capping Protein (CP) and its regulator CARMIL, which domain called CAH3 is crucial for CP binding. To understand the molecular regulatory mechanism of CARMIL to CP, a point mutation of D44 of CP (beta)-subunit was used, which is important for CARMIL binding. Pyrene assay showed that CP(beta)D44N has a strong capping activity as same as CP wild type (CPwt). Both pull down and ITC assays showed that CP(beta)D44N has ~50 fold weaker bind affinity to CAH3 than CPwt. The CAH3 driven uncapping and the capping activity of the complex of CP(beta)D44N: CAH3 were monitored by TIRF microscope. Current result suggests that the insufficient binding of CP to CAH3 due to lacking D44 of CP (beta)-subunit causes the long duration time for uncapping.

研究分野：生物物理

キーワード：アクチン 細胞運動 細胞骨格 アクチン制御メカニズム

1. 研究開始当初の背景

CP (Capping Protein)は、アクチンフィラメントの一端を塞ぐように結合することで、更なるアクチンが結合してフィラメントが伸張されることを阻害するタンパク質である (Fig.1)。この機能は、強固な細胞骨格の土台として必須の「多数の短いアクチンフィラメントの形成」に必要である。CPは *in vitro* ではアクチンフィラメントに強く結合し 30分間も解離しないが、細胞内においてはわずか1秒間で解離する (Miyoshi et al., 2006)。この解離時間の不一致は、細胞内に CP の解離を促進する制御機構があることを示唆する。事実、*in vitro* で CP 結合タンパク質 CARMIL (Capping protein, Arp2/3 and Myosin-I Linker) のフラグメント CAH3 を添加するとアクチンフィラメントの伸張が回復された (Yang et al., 2005, Uruno et al., 2006)。申請者は1分子蛍光観察から GFP-CP の解離が 200 倍 (30 分から 10 秒) も促進される Uncapping を直視し (Fujiwara et al., 2010)、更に、CARMIL を結合した CP は弱いながらもまだアクチンフィラメントをキャップする機能 (Weak Capping) を保持していることを明らかにしてきた (Fujiwara et al., PNAS, 2014)。しかし、CAH3 ドメインの結合がどのように CP の解離を速めているか、その分子動作機構は未解明である。



2. 研究の目的

CARMIL の CP 結合部位 CAH3 の約 1/3 にあたる 32 残基に似たアミノ酸配列を含むタンパク質 3 つ (CD2AP, C1N85, CKIP-1) が、CARMIL ファミリーとして同定された。これらはエンドサイトーシス・細胞接着や免疫細胞のシグナル伝達後の形態変化に関与するため、CP が仲介するアクチン細胞骨格の新たな制御機構の存在が注目されている。現在まで、遺伝子改変した CARMIL ファミリーのフラグメントを用いて、結合定数の強弱と構造変化の調査・シミュレーションが行われた (Hernandez-Valladares M, et al., 2010, Takeda et al., 2010, Lukman et al., 2012)。しかし、アクチンからの解離を速める分子機構を 1 分子レベルで検証した研究をはじめ、アクチン伸張の制御に直接関与する「Uncapping・Weak capping」の機構との相関、また CP との結合を安定化させるための CARMIL 上の第 2 の結合部位を含めたダイナミクスは、今だ解明されていない。そこで本研究の目的として、遺伝子改変した CP (Capping

Protein) と CP の制御タンパク質 CARMIL (Capping protein, Arp2/3 and Myosin-I Linker) を用い、CARMIL が CP を制御する際に各結合部位が果たす役割を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

遺伝子変異体を用い、蛍光分光器による溶液実験、電気泳動法による Pull-down assay と熱量測定 ITC (Isothermal Titration Calorimetry) を用いた Kd 測定、TIRF による 1 分子観察・Kinetics 解析を行う。これらの実験により、CARMIL による CP 制御に関する各結合部位の持つ役割を明らかにする。CP の β サブユニット上の D44 は CARMIL 結合に極めて重要だという報告がされている (Takeda et al., 2010)。本研究では、このアミノ酸を改変して CARMIL の制御機構の変化を TIRF による顕微直視と Kinetics 解析から明らかにする。また、CARMIL の CP 結合部位 CAH3 を始め、CARMIL ファミリーの類似部位を精製すると共に変異体も作成し、それぞれのアミノ酸特異的結合が、CP をアクチンから素早く解離させるメカニズムを明らかにしていく。現在、これらの変異体を作成し、CP と CARMIL の各アミノ酸特異的結合の変化が Uncapping・Weakcapping 機能に弱める粗データを得ている。このデータを更に信頼のあるものとし、CARMIL によって CP が受ける制御メカニズムを明らかにするため以下 3 つの実験を行う。

各種変異体を用いた結合解離定数を決定するため、ITC を用いて熱量変化を計測、結合解離定数を見積もる。

別手法によって結合解離定数を確認するため、ビーズ上に固定した CARMIL に濃度を変えて CP を結合させる Pull-down アッセイを行う。これは複数の異なる実験を行うことで、自身の値をより確かなものとするために行う。特に Biacore (SPR) や類似の実験ではデータを見落とすことがあるため、本研究のように複数のアッセイにより結果を照合・確認は非常に重要である。

遺伝子改変した CP、または CARMIL がどれだけ素早く Uncapping を引き起こし、アクチン重合を回復できるのかというアクチン重合における影響を理解するために、溶液系実験と TIRF による 1 分子顕微観察を行う。

以上の実験方法によって総合的に解析し、CARMIL が CP をアクチンフィラメントから解離させる機構を明らかにしていく。

4. 研究成果

まず CARMIL の結合に重要な部位を占める CP 上のアミノ酸に注目してアスパラギン酸 (D) からアスパラギン (N) に変えた変異体を作成した。大腸菌を用いて精製した CP 変異体 (以下 CP(β)D44N と記す) が、アクチン線維の速い重合端 (B 端) にどれだけ強く結合するかを調べた。Pyrene で蛍光染色した actin が重合することによって Pyrene の蛍光強度が増加する時間経過を計測し、アクチン重合量を測定する溶液実験を行った。Pyrene-actin の重合速度と量は、添加する CP の量が増えると共に減少した。この重合カーブから CP がキャップして重合阻害しているアクチン線維の量を見積もったところ、CP(β)D44N は野生型 CP と同様に非常に強くアクチン線維の B 端に結合していることが分かった ($K_d=0.12\text{nM}$)。このことは、D44 がアクチン結合とは無関係であることを示し、以下に示していく CAH3 によるアロステリックな制御機構においてのみ重要であることを意味する。

次に、CP(β)D44N と CAH3 ドメインとの結合能を確認するため、GST-ビーズ上に固定した CARMIL の CAH3 ドメインに CP(β)D44N を加えた。低速遠心によって、ビーズを沈殿部位、ビーズに結合しなかった CP(β)D44N を上清に分け、SDS-PAGE によって定量した。CP(β)D44N を加えるほど、沈殿部に現れる CP(β)D44N が増えた。この濃度勾配から得られた CP(β)D44N の CAH3 に対する結合解離定数は 57nM と見積もられ、野生型 CP に比べて約 50 倍も結合能が低下していることが示された。更に別の手法として熱量測定 (ITC) によって CP(β)D44N と CAH3 の結合能を調べた。その結果、今回得られた結合解離定数と同じく CP(β)D44N は CAH3 に $K_d\sim 50\text{nM}$ で結合することが示された。なお、本研究において SPR を用いて結合解離定数を測定したが、以前に報告された以前の報告同様に CP(β)D44N は CAH3 と殆ど結合しない ($K_d=7\mu\text{M}$) と見積もられたため (Takeda et al., 2010)。特に結合解離定数などを求める際には複数の実験手法により値を見積もる必要がある事を示す良い例が示された。

次に再び Pyrene-actin を用いて、CP(β)D44N で既にキャップされたアクチン線維 B 端からの重合が、CAH3 が添加されて CP(β)D44N が外れて再開する過程を計測する実験を行った。結果、高濃度の CAH3 を入れねばアクチン重合は再開しないことが分かったものの、本実験はデータにばらつきが多く、まとまった計測データを得るために時間を要した。

更に CP(β)D44N と CAH3 を混ぜて複合体 (CP(β)D44N:CAH3 complex) を作成しておき、その複合体が重合に与える影響を調べた。CP(β)D44N:CAH3 complex の添加量が増えるに

つれ、Pyrene-actin の蛍光増加量が少なくなったことから、CP(β)D44N:CAH3 complex はアクチン線維の B 端に結合し、重合を阻害することが示された。

次に TIRF 顕微鏡を用いて、1 本のアクチン線維の B 端での CP(β)D44N の振る舞いを直接観察した。CAH3 添加後、CP(β)D44N でキャップされたアクチン線維の B 端からアクチン重合が再開する過程をリアルタイムで直視出来た。またこの Uncapping 過程は CAH3 濃度に依存したが、野生型 CP に比べて高濃度の CAH3 が要された。見積もられた Half Maximal concentration は 203nM で、野生型 CP の 47nM (Fujiwara et al., 2010) と比べて約 5 倍も Uncapping 活性が落ちていることが示された。これは CP の β サブユニット上にある D44 が Uncapping における分子動作機構に重要な役割を果たすことを示している。次に CP(β)D44N:CAH3 complex を添加した状態でアクチン線維の重合過程を TIRF で直視した。アクチン線維の伸長速度は CP(β)D44N:CAH3 complex 濃度が増加するにつれて減速した。各伸長過程を詳しく見たところ、時々アクチン線維の伸長が停止しており、その停止間隔は約 200 秒であった。これは CP(β)D44N:CAH3 complex がアクチン線維の B 端に結合している間隔であると考えられる。野生型 CP ではこの感覚が ~ 10 秒であったため、CAH3 が CP の D44 に結合できないと、Uncapping に要する時間が 20 倍も伸びることが分かり、分子動作機構の理解に大きく貢献するデータが得られた。なお、この遅い Uncapping を定量したところ CP(β)D44N:CAH3 complex のアクチン線維の B 端への結合解離定数は 5.5nM であった。野生型 CP:CAH3 complex の 38nM と比較することにより、D44 を阻害すると、CAH3 は CP のアクチン線維キャップ機能を十分に弱めることが出来ないことが示された。

以上、複数の結果から、CP のアクチン線維キャップ機能をアロステリックに制御する分子動作機構において、D44 は

アクチン線維の結合には関与しない。
CARMIL の CAH3 部位の結合を 50 倍弱める。
上記で示された弱い結合は、CP のアクチン線維キャップ機能の制御も同様に弱める。

D44 における CAH3 の作用は、Uncapping に要する時間制御であることが示唆される。

細胞運動や生体分子モーターの制御機構という生きものの動きを理解する研究分野において、タンパク質同士の結合が、どの制御プロセスに関与するかを示した点で、本研究のインパクトは大きい。

次に、本研究で使用された CP のキャップ機能を使い、アクチン重合を阻害する生理活性物質 Latrunculin-A の機能も調べた。Latrunculin-A はアクチン線維の両端に結合

し、アクチン線維の脱重合を促進することがTIRFで直視された。その端からの脱重合を確認すべく、野生型CPでアクチン線維のB端をキャップしたところ、Latrunculin-Aはアクチン線維のB端からの脱重合が停止した。この、本研究の延長実験により、アクチン重合に作用する生理活性物質の作用機構も明らかになった。

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 1 件)

- 1) “Keeping the focus on biophysics and actin filaments in Nagoya: a report of the 2016 “Now in Actin” symposium”
Cytoskeleton, 12, 450-464 (2017)
Fujiwara, I. and Narita, A.

[学会・研究会紀要](計 2 件)

- 1) “タンパク質の創発する集合知”, 第3回 市民共創研究会 pp34-38、名古屋工業大学、2017年12月
藤原郁子
- 2) 名古屋大学博士課程リーディングプログラム(IGER) 国際シンポジウム “Now in Actin Study”

[学会発表](計 7 件)

- 1) “Regulation of actin bundles by using LOV-fused fascin”, Optogenetics Research Society Japan, Sendai, Japan 10/2017 (Poster Presentation)
Fujiwara, I., Iwatani, M., Tsunoda, S., Kandori, H.
- 2) “Severing regulation of gelsolin superfamily on single and bundled actin filaments”, International Symposium, Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity, Nagoya, Japan 09/2017 (Poster Presentation)
Fujiwara, I., Fan, R., Takeda, S., Maeda, Y., Narita, A.

- 3) “Polymerization and regulatory functions determined by single actin filaments observation”, Integrative Graduate Education and Research Program, International Symposium, Nagoya, Japan 12/2016 (Oral presentation)
Fujiwara, I., Remmert, K., Vavylonis, D., Hammer, J.H., Pollard, T.D.
- 4) “アクチン束化機構解明を目指した光制御法利用の試み”, 生物物理学会東海支部、名古屋大学、2017年3月、(ポスター発表) 藤田智雄、藤原郁子、角田聡、神取秀樹.
- 5) “アクチン骨格阻害剤 LatrunculinA はアクチンを脱重合させ、重合を阻害する”, 第42回生体エネルギー研究会、名古屋工業大学、2016年12月、(ポスター発表) 藤原郁子、Thomas D. Pollard.
- 6) “アクチン重合阻害試薬「ラトランキュリン-A」はアクチンモノマーだけでなくフィラメントにも結合してアクチン脱重合を促進する”, 第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、2016年11月、(ポスター発表) 藤原郁子、Thomas D. Pollard.
- 7) “CP(D44N)変異体を用いた CARMIL 制御機構の解明”, 第53回生物物理学会、金沢大学、2015年10月、(口頭発表) 藤原郁子、John Hammer III.

[その他](計 1 件)

アウトリーチ活動(異分野交流としての研究会参加)

- 3) “タンパク質の創発する集合知”, 第3回 市民共創研究会、名古屋工業大学、2017年12月、**藤原郁子**

6. 研究組織

- (1)研究代表者
藤原 郁子 (Fujiwara Ikuko)
名古屋工業大学・工学研究科・助教
研究者番号: 10742075
- (2)研究分担者
なし

(3)連携研究者

Hammer John (HAMMER John)
National Institutes of Health (NIH) ・
National Heart, Lung and Blood Institute
(NHLBI) ・主任
研究者番号：なし

(4)研究協力者

Pollard Thomas (POLLARD Thomas)
Yale University, USA ・ Department of
Molecular Cellular and Developmental
Biology ・教授
研究者番号：なし

Courtemanche Naomi (COURTEMANCHE Naomi)
University of Minnesota, USA ・ Department
of Genetics, Cell Biology and
Development ・独立助教
研究者番号：なし

神取 秀樹 (KANDORI Hideki)
名古屋工業大学 ・工学研究科 ・教授
研究者番号：70202033

角田 聡 (TSUNODA Satoshi)
名古屋工業大学 ・工学研究科 ・特任准教授
さきがけ研究者
研究者番号：10158983

前田 雄一郎 (MAEDA Yuichiro)
名古屋大学 ・理学研究科 ・特任教授
研究者番号：10321811

武田 修一 (TAKEDA Shuichi)
名古屋大学 ・理学研究科 ・研究員
研究者番号：50509081

小田 俊郎 (ODA Toshiro)
名古屋大学 ・理学研究科 ・教授
研究者番号：20321739