

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14708

研究課題名（和文）F型アクチン結晶構造から解き明かすアクチン重合・ATP加水分解・繊維切断機構

研究課題名（英文）Mechanisms of actin polymerization, ATP hydrolysis, and filament severing revealed by F-form crystal structures

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：繊維状に配置したアクチン四分子がゲルゾリンファミリータンパク質の一種であるフラグミンの全長タンパク質二分子によって固定された複合体の結晶構造を、2.3オングストローム分解能で決定した。AMPPNP、ADP-Pi、ADPが結合した繊維型コンフォメーションアクチン一分子とフラグミンのN末端側ドメインとの複合体結晶構造を1.2オングストローム分解能で決定した。これらのF型アクチン構造からアクチン繊維形成、ATP加水分解機構を原子分解能で議論することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチンは不定長に重合するタンパク質であるため、これまで繊維状態での結晶構造は報告されていなかった。今回アクチン切断因子であるフラグミンとの共結晶化という方法によって、世界初のアクチン繊維構造の解明に成功した。本研究の成果は真核細胞中に最も大量に存在するタンパク質であるアクチンの機能を理解する上で極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：The crystal structure of four actin subunits in complex with fragmin, a gelsolin superfamily protein, was solved at 2.3 Å resolution. In addition, the crystal structures of single actin molecule in complex with a fragmin N-terminal domain, adopting the filamentous conformation, were determined at 1.2 Å resolution. These F-form actin structures have made it possible to discuss the mechanism of actin polymerization and ATP hydrolysis at atomic resolution.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクチン X線結晶構造解析 フラグミン ゲルゾリンスーパーファミリー ATP加水分解 繊維切断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アクチンは、ほとんどの真核細胞で最も多く発現している細胞骨格タンパク質であり、様々な生命現象へ関与している。単量体アクチン (G アクチン) は、集合し繊維状の F アクチンを形成することで機能するため、F アクチンの重合機構を原子構造レベルで説明することは、非常に重要である。アクチンは ATPase であり、結合 ATP は重合にともなって加水分解され、分解産物の Pi が放出されることで、ADP-F アクチンとなる。この Pi 放出によって繊維構造が不安定化し、脱重合しやすくなる。アクチンは ATP 結合クレフトをはさむ 2 つの大きなドメインからなる。G アクチンでは両ドメインが約 20 度ねじれたコンフォメーションをとっているが、重合時にドメイン間で回転運動が起こり、ねじれの少ない平板化した F 型アクチン構造をとる (Oda, Nature, 2009)。近年の電子顕微鏡技術の発展によって、3.6Å 分解能の ADP-F アクチン構造が明らかとなった (von der Ecken, Nature, 2016)。

2. 研究の目的

しかし、重合に伴う ATP 加水分解機構や、なぜ ADP 繊維は ATP 繊維よりも不安定で脱重合しやすいのか、といったアクチンの基本的な特性の理解には至っていない。このためには、F 型アクチンの構造を、異なるヌクレオチド状態で、なおかつリガンド位置を確定できる原子分解能で決定することが必須である。水分子を含む高分解能構造を決定するための唯一の手法は、X 線結晶構造解析である。これまで多くの研究者が F 型アクチンの結晶化に取り組んできたが、アクチンは重合性タンパク質であることから、結晶化には不適な試料であり、これまで PDB に登録されている 100 以上のアクチン結晶構造は全て G 型である。F 型アクチン結晶構造を得るためには、複数のアクチン分子を厳密に繊維状に配置させる補助因子が必要である。フラグミンはゲルゾリンファミリータンパク質の一員であり、Ca²⁺によって活性化され、アクチン繊維を切断する活性を持つ。我々は、真正粘菌タンパク質に含まれるゲルゾリンファミリータンパク質の一種であるフラグミンが、アクチンオリゴマー安定化テンプレートとして機能することを見出した。

3. 研究の方法

実験は基本的に名古屋大学理学研究科附属構造生物学研究センターにておこなった。X 線結晶構造解析法によって目的タンパク質複合体の原子分解能構造を決定した。アクチンはニワトリ骨格筋より調整したアセトンパウダーから定法により得た。フラグミン (全長、または F1 ドメイン) は大腸菌を用いて、発現・精製した。アクチン、およびフラグミンを目的に応じたモル比で混合し、複合体をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製した。市販の結晶化スクリーニングキットを用いて、結晶化条件を探索した。結晶の評価は、超高輝度 X 線発生装置 FR-E 用いて行い、あいちシンクロトロン光研究センタービームライン BL2S1 にて X 線回折データを収集した。既知のアクチン、またはゲルゾリンの構造を用いて、分子置換法で構造を決定した。

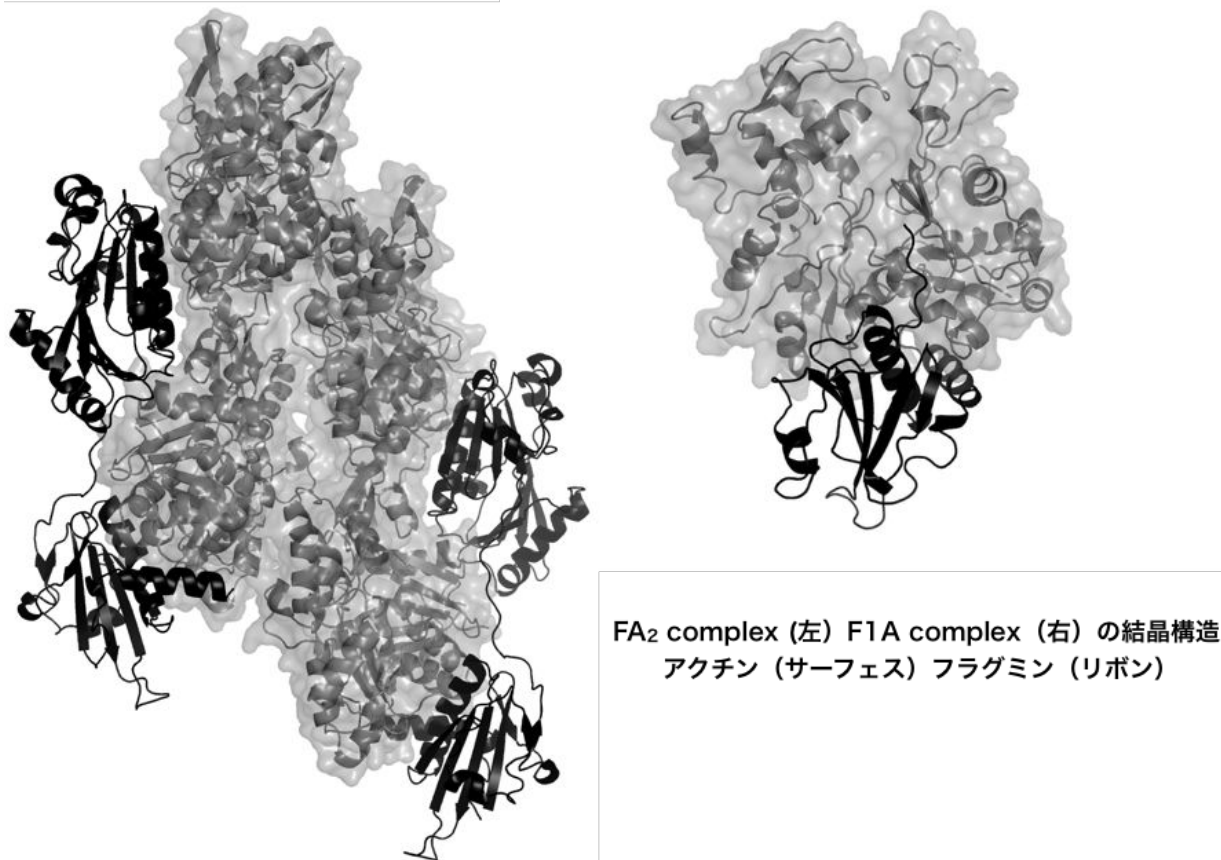
4. 研究成果

フラグミンは 3 つのドメイン (N 末端側から F1, F2, F3 と呼ぶ) が繋がったマルチドメインタンパク質であり、カルシウム存在化において、1 分子の全長フラグミンはアクチン 2 分子と強固に結合する (この複合体を FA₂ complex と呼ぶ)。本研究において、FA₂ complex の結晶化に成功し、その構造を 2.3 オングストローム分解能で決定した。FA₂ complex 中で、アクチン 2 分子は繊維内の縦 2 分子と同様に配置しており、フラグミンはそれを固定するように結合していた。このうち、重合・脱重合が活発に起こる B 端に位置するアクチン分子のコンフォメーションは F 型であった。さらにこの結晶は非対称単位内に 2 つの FA₂ complex を含んでおり、それぞれの“アクチン縦ダイマー”はアクチン繊維の二本のストランドの様に接触していた。このアクチン 4 分子からなる繊維様原子構造によって、側鎖レベルでの繊維構造が明らかとなり、重合メカニズムについての詳細な議論が可能となった。また、ミオシンなどのアクチン結合タンパク質の作用機序研究にも重要な情報を与えるものである。

FA₂ complex の結晶構造からは、1. 分解能が不十分であること、2. ATP 結合カチオンは高加水分解能を示す Mg²⁺ではなく Ca²⁺であること、などの理由から ATP 加水分解について踏み込んだ議論をすることができなかった。しかし、思わぬところから、ブレイクスルーがもたらされた。フラグミンの N 末端ドメイン (F1 ドメイン) とアクチン 1 分子の複合体 (F1A complex) 結晶構造を決定したところ、驚くべきことに複合体中のアクチンのコンフォメーションは F 型であった。ファミリータンパク質であるゲルゾリンの相同ドメインを用いた場合、このようなコンフォメーション変化は観察されないことから、これはフラグミンに特有の現象である。この F1A complex の形成には Ca²⁺を必要としないこと、また FA₂ complex と比べて分子量が小さい (250 kDa vs 60 kDa) ことも助けとなり、Mg²⁺結合型 F 型アクチン結晶構造を、異なるヌクレオチド (AMPPNP, ADP-Pi, ADP) 結合状態で、なおかつ高分解能 (1.2 オングストローム) で決定することに成功した。これらの F 型アクチン構造からアクチン繊維形成、ATP 加水分解機構を原子分解能で議論することが可能となった。この結果をまとめた論文を、現在投稿準備中である。

またフラグミンのC末端側2ドメイン(F2-F3)にカルシウムが結合した活性型状態の結晶構造を、1.9 オングストローム分解能で決定することに成功した。このF2-F3構造は、これまでゲルゾリンファミリータンパク質で知られていなかった新たなカルシウム結合部位を含み、その活性調節機構の解明に重要な寄与を与えるものであった(論文投稿中)。

さらにアクチン、およびその結合タンパク質の構造・機能に関する研究を行い、その成果を計4報の学術論文をして発表した(全て査読有)。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Toshiro Oda, Shuichi Takeda, Akihiro Narita, Yuichiro Maéda
“Polymorphism of actin molecules”
J Mol Biol, accepted, (2019) 査読あり
2. Ikuko Fujiwara, Shuichi Takeda, Toshiro Oda, Akihiro Narita, Hajime Honda, and Yuichiro Maéda
“Polymerization and depolymerization of actin with nucleotide states at filament ends”
Biophys Rev, **10**, 1513-1519 (2018) 査読有
3. Kotaro Tanaka, Shuichi Takeda, Kaoru Mitsuoka, Toshiro Oda, Chieko Kimura-Sakiyama, Yuichiro Maéda, Akihiro Narita
“Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly”
Nat Commun, **9**, 1860 (2018) 査読有
4. Ryotaro Koike, Shuichi Takeda, Yuichiro Maéda, Motonori Ota
“Comprehensive analysis of motions in molecular dynamics trajectories of the actin capping protein and its inhibitor complexes”
Proteins, **84**, 948-956 (2016) 査読有

[学会発表](計 13 件)

1. 武田修一、成田哲博、小田俊郎、小池亮太郎、森次圭、太田元規、兼松佑典、藤原郁子、田中康太郎、永江峰幸、渡邊信久、前田雄一郎
“BL2S1 を利用した X 線結晶構造解析から明らかとなったアクチン重合・ATP 加水分解機構”
第 8 回名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム 2019 年
2. Shuichi Takeda, Akihiro Narita, Toshiro Oda, Nobuhisa Watanabe, Takayuki Nagae, Motonori Ota, Ryotaro Koike, Kei Moritsugu, Yusuke Kanematsu, Ikuko Fujiwara, Kotaro Tanaka, Yuichiro Maéda
“Atomic resolution structures of F-form actin: mutual switching between G/F transition and ATPase”
The 47th European muscle conference 2018
3. Shuichi Takeda, Akihiro Narita, Toshiro Oda, Nobuhisa Watanabe, Y, Takayuki Nagae, Motonori Ota, Ryotaro Koike, Kei Moritsugu, Yusuke Kanematsu, Ikuko Fujiwara, Kotaro Tanaka, Yuichiro Maéda
“The structure of F-form actin at atomic resolutions: mutual switching between polymorphic transition and ATPase”
Myofilament conference 2018
4. Shuichi Takeda, Akihiro Narita, Toshiro Oda, Kotaro Tanaka, Ryotaro Koike, Motonori Ota, Ikuko Fujiwara, Nobuhisa Watanabe, Yuichiro Maéda
“F-form crystal structures: Mechanisms of actin assembly and F-actin ATPase”
The 62th Annual Meeting of Biophysical Society 2018
5. 武田修一、成田哲博、小田俊郎、田中康太郎、小池亮太郎、太田元規、藤原郁子、永江峰幸、渡邊信久、前田雄一郎
“高分解能 X 線結晶構造から明らかとなったアクチン重合・ATP 加水分解機構”
第 7 回名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム 2018 年
6. 武田修一、成田哲博、小田俊郎、田中康太郎、小池亮太郎、太田元規、藤原郁子、渡邊信久、前田雄一郎
“高分解能 X 線結晶構造から明らかとなったアクチン重合・ATP 加水分解機構”
平成 29 年度日本結晶学会年会 2017 年
7. 武田修一、成田哲博、小田俊郎、田中康太郎、小池亮太郎、太田元規、藤原郁子、渡邊信久、前田雄一郎
“ATPase mechanism and dynamic assembly of actin revealed by the F-form crystal structures; F 型結晶構造から明らかとなったアクチン重合と ATP 加水分解機構”
第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年
8. 武田修一、成田哲博、小田俊郎、田中康太郎、渡邊信久、前田雄一郎
“F 型アクチンの結晶構造”
平成 28 年度日本生物物理学会中部支部講演会 2017 年
9. 武田修一、成田哲博、小田俊郎、田中康太郎、渡邊信久、前田雄一郎
“F 型アクチンの結晶構造”
第 6 回名古屋大学シンクロトロン光研究センターシンポジウム 2017 年
10. 武田修一、前田雄一郎
“F 型アクチンの結晶構造とアクチン集合メカニズム”
2017 年 生体運動研究合同班会議 2017 年
11. Shuichi Takeda, Akihiro Narita, Kotaro Tanaka, Toshiro Oda, Nobuhisa Watanabe, Yuichiro Maéda
“Crystal Structure of the “F-form” Actin in Complex with Fragmin”
Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage 2016
12. Shuichi Takeda, Akihiro Narita, Toshiro Oda, Kotaro Tanaka, Yuichiro Maéda
“Crystal Structure of Actin 4-mer in Complex with 2 Fragmin Molecules and the Mechanism of Actin Filament Assembly”
Gordon Research Conference, Muscle & Molecular Motors 2016

13. Shuichi Takeda, Kotaro Tanaka, Yuichiro Maéda
“Crystal structure of FA2 demonstrates filamentous actin structure”
Alpbach meeting; Myosin, muscle and many motors 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。