

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：33705

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07373

研究課題名(和文) ゲルゾリン様タンパク質によるアクチン繊維切断機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism for severing of F-actin by gelsolin-like protein

研究代表者

小田 俊郎(Oda, Toshiro)

東海学院大学・健康福祉学部・教授(移行)

研究者番号：20321739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンは、単量体と線維状重合体の2状態を転移しながら、多様な基本的な生命機能を担っている。本研究では、このアクチンがどのように機能するか、例えば、線維切断や線維同士の結合を構造レベルで解明するために、アクチン分子がとり得る構造空間を明らかにし、その空間に4つの代表的なコンフォメーション(G型、F型、C型、O型)が存在すること、そのコンフォメーション間の転移を議論した。また、線維状重合体を切断して制御するフラグミンの構造を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質は構造を変化させながら機能している。そのため、蛋白質の機能プロセスを理解するためには構造転移を解明する必要がある。この考えをアクチンに適用してアクチンの構造空間を定義した。この空間は研究者がアクチンの構造転移を議論する際の共通基盤となる。また、本研究で得られたゲルゾリン・ファミリーに属するフラグミンに対する知見は、ゲルゾリンの基礎研究やその医療応用に貢献することが期待される。ゲルゾリンは医学の見た場合非常に重要な蛋白質で、例えばその欠乏が敗血症を引き起こす。

研究成果の概要(英文)：Actin plays an important role in various cell functions by converting between monomeric and filamentous states. In this study, in order to understand how actin functions, we defined the conformational space for available structure of actin and showed existing of four clusters within the space (G-form, F-form, C-form and O-form). In addition, we revealed transitions between four cluster structures. We also studied the structure of fragmin, which regulates actin function.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクチン フラグミン 構造空間

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) フラグミンは粘菌に存在するアクチン結合蛋白質でアクチン線維を切断するゲルゾリン・ファミリーに属する。ゲルゾリンが6個のドメイン(G1-G6)を持つのに対してフラグミンは3個のドメイン(F1-F3)しか持たないが、このF1-F3は切断能を持つゲルゾリンのN末端側ドメインG1-G3に相当するので、ゲルゾリンによる線維切断の最小モデル系と見なすことができる。ゲルゾリンは医療においても重要であり、血中ではアクチンの Scavenger として働く。例えば、全身炎症病態における血中ゲルゾリンの欠乏は血中アクチン線維量の増加をもたらす敗血症となる。ゲルゾリンのアクチン線維切断やアクチン単量体隔離の分子メカニズムの解明は創薬など医療応用面でも重要であり、そのモデル系であるフラグミンの構造機能連関に関心が集まっている。

(2) フラグミンの線維切断を考察するためには、アクチンの線維形成や線維崩壊に関する知識が必要である。アクチン分子は線維内でF型コンフォメーション(後に述べる)、単量体でG型コンフォメーションとして存在するので、線維形成や線維崩壊をF型とG型の構造状態転移と考えることができる。この線維形成や線維崩壊は細胞運動など細胞のダイナミクスを駆動するもので、細胞を理解するために必須である。

アクチンの構造状態転移を研究するためには、まず、アクチンがとり得る構造(コンフォメーション)の全容を知る必要がある。アクチンの分子構造はX線結晶構造解析やX線繊維回折法、電子顕微鏡法により解明され、現在、200個以上の原子座標セット、少なくとも4種類のコンフォメーションが報告されている。殆どの結晶構造でアクチンは同一のG型コンフォメーションをしており、単量体に相当する構造と考えられている。一方、線維内ではヌクレオチドを挟む2個の大きなドメインが回転したF型コンフォメーションをしている。さらに、コフィリンを結合したアクチン線維内で最近発見されたC型コンフォメーション、ヌクレオチド結合クレフトが開いたO型コンフォメーションなども知られている。また、局所構造の多様性、例えば、ヌクレオチド種に依存したセンサー・ループの構造も報告されている。現在も、アクチン結合蛋白質との複合体新規構造が報告されており(例えば、CAP1-actin complex)、アクチンの新規コンフォメーションが発見されるかもしれない。

### 2. 研究の目的

(1) 蛋白質は構造状態転移を繰り返しながら機能する。構造状態転移の情報は蛋白質の機能を解明するために必須であり、そのためには、その蛋白質がとり得る構造空間を規定して、安定あるいは準安定構造(コンフォメーション)を同定することが重要である。研究の目的は、アクチンの構造空間を規定すること、安定・準安定構造を同定すること、安定・準安定構造間の転移に関して情報を得ることで、アクチンの構造機能連関を議論する基盤を確立することである。

(2) 先に述べたように、フラグミン F1-F3 はゲルゾリン G1-G3 に相当するが、線維切断に関して相違点もある。フラグミン F1-F3 は Ca 濃度に依存して切断するが、ゲルゾリン G1-G3 は Ca を必要としない。研究の目的はこの Ca 依存性の相違を蛋白質構造から解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) アクチン構造分類

1990年以來 Protein Data Bank に登録されているアクチンの原子座標(260個)に対してドメインの相対関係を表すパラメータ(、)を計算し、統計ソフトウェア RStudio(R 3.4.3; Boston, MA, USA)のライブラリー cluster を用いて階層的クラスタリングを行った。クラスタリングには(、)空間で定義されるユークリッド距離の2乗と群平均法を用いた。クラスタの安定性解析には Dynamic Tree Cut を用いた。

同定されたクラスタ間の転移しやすさを明らかにするために、分子ダイナミクス・シミュレーション・パッケージ GROMACS2016.4(GPU version)を用いて各クラスタに属したアクチン分子に MD シミュレーションを行った。蛋白質やヌクレオチドなどに対する力場は CHARMM27/CMAP all-atom force field、水には TIP3P water model を用いた。蛋白質に K イオンと Cl イオン(100mM)と水分子を加え平衡化した後、温度 300K、圧力 1atm の条件で 500nsec のシミュレーションを行い、解析には時間領域 200-500nsec の軌跡を用いた。

#### (2) フラグミンの Ca 依存性解析と構造解析

アクチンとの共沈実験は、アクチン溶液とフラグミン溶液を混合し 20 分室温にて反応させた後、45 分間の超遠心(100,000rpm)により沈殿させ、沈殿を SDS-PAGE により解析した。

フラグミン F2-F3 と F3、ゲルゾリン G2-G3 は Ca 存在下と Ca/Mg 存在下でシッピングドロップ蒸気拡散法にて結晶化した。結晶からの回折データの取得はいちシンクロトロンセンターのビームライン BL2S1 において波長 1.12Å、温度 90K で行った。データの処理には XDS を用い、分子置換法には Molrep、モデリングには Coot と Phenix を用いた。

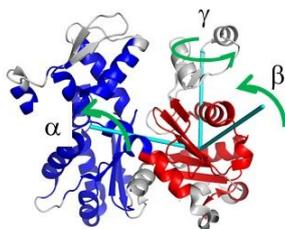
#### 4. 研究成果

##### (1) アクチン・コア構造の同定

8個(PDB code: 1J6Z, 4PKH, 3DAW, 5JLF, フラグミン-アクチン複合体, 2PAV, 4PL7, 5YU8)のアクチン分子の原子座標を重ね合わせRMSDを計算し、炭素のRMSDが0.7以下で、分解能が3.5以上の結晶構造127個すべてで位置が同定された残基をコアと定義した。アクチンは外側ドメイン(OD)と内側ドメインから成るが、ODコアは7-31、70-71、76-108、115-137、338-347、355-364、一方、IDコアは147-166、171-194、205-229、237-238、251-322、327-337となった。このドメイン・コアはアクチン分子(PDB code: 1WUA)のMDシミュレーションの軌跡(200-500nsec)から計算したMotion Tree解析により支持された。

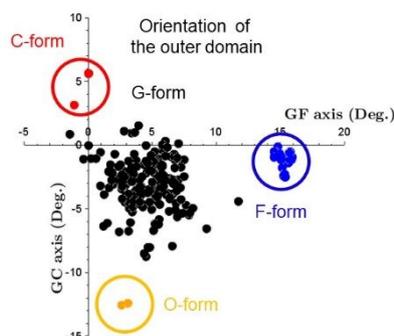
##### (2) アクチン全体構造を表すパラメータ

アクチンは2つのドメインから成る分子で、分子の全体構造はドメインの相対的配置(、)によって表した。相対的配置(、)は以下のような手順で決定した。テストされる構造のIDコアを参照構造(1J6Z)に平行移動と回転により重ね合わせた。移動された構造のODコアの重心を平衡移動により参照構造に平行移動により重ねた。さらにODコアをその重心の周りに回転して重ね合わせた。回転行列から3つの回転角(、)を決定した。その角度は参照構造のY軸、X軸、Z軸の周りに順次回転したときのものとした。



##### (3) アクチン全体構造の分類

アクチンの原子座標260個から計算されたドメインの相対的配置(、)を階層的クラスタリングすると、安定な4つのクラスタに分割された。また、構造空間でみると、この4つのクラスタは十分大きなギャップにより分割されていた。したがって、構造空間でアクチンの構造を見た場合、4つのグループに分割するのが妥当であることが示された。この4つのクラスタがF型、G型、C型、O型に対応する。G型は分布全体の中央部に一番大きな領域を占めた。原点(1j6z)からF型へのベクトルとC型へのベクトルは直交しており、この2方向がX軸(GF軸)とY軸(GC軸)となるように回転(回転行列: (0.7021 0.6371 0.3179; 0.7119 0.6358 0.2979; 0.0123 0.4356 0.9000))し、XY平面に投影すると下図のようになる。この2次元平面で十分に4つのクラスタを分離することができる。GF軸はpropeller状の構造変化をGC軸はscissors状の構造変化に対応する。



##### (4) アクチン結合蛋白質・ヌクレオチドなどがアクチン全体構造に与える影響

プロフィリン、DNase、ゲルゾリンG1などのアクチン結合蛋白質が結合するとドメインの相対的配置は影響を受け、G型クラスタの中でサブクラスタを形成した。例えば、プロフィリンの結合はscissors状の構造変化を引き起こしてヌクレオチド結合クレフトを開かせる傾向がある。一方、ゲルゾリンG1とRPELアクチン結合ドメイン、WH2アクチン結合ドメインの結合したアクチンのドメインの相対的配置は重なった。また、結合したヌクレオチド種やD-loopの形状はドメインの相対的配置に影響を示さなかった。

##### (5) G型からF型へ構造転移など

4つのクラスタの構造安定性やクラスタ間の転移しやすさを検討するために、MDシミュレーションを行い、その軌跡をアクチンの構造空間にプロットした。G型に属したアクチン分子からMDシミュレーション(6本)を開始した場合、C型やF型クラスタの領域には到達せず、基本的にはG型クラスタ領域に留まっているが、O型クラスタに接近するもの(2本)もあった。C型が

ら開始した場合(2本)、速やかにG型に到達した。これはC型コンフォメーションがコフィリンの結合によって生み出され、このコンフォメーション自体は不安定であることを示唆する。F型から開始した場合(4本)、F型のクラスタ内を遷移しているもの(2本)とG型へ到達したもの(2本)が見られた。これらの結果はF型コンフォメーションが準安定で、F型からG型へは行きやすいがG型からF型へは行きにくいことを示す。つまり、重合には構造変化を介助する何らかのものが必要であることを示唆する。

#### (6) G型とF型の局所構造の違い

G型アクチンとF型アクチンの局所構造にも違いがある。顕著なものはWループである。Wループの構造空間を定義して分布をみると、アクチン線維内のもの(FW型)とそれ以外(nonFW型)に分けられる。アクチン線維内のF型アクチン(FW)を取り出し単独でMDシミュレーションを行うと全体構造はF型だが、WループはnonFW型に速やかに移行し、FW型は単独では不安定であった。Wループは重合によりnonFW型からFW型に構造変化する。

#### (7) フラグミンのアクチン線維へのCa依存的結合

フラグミン F2-F3 あるはゲルゾリン G2-G3 とアクチン線維との共沈実験をCa存在下と非存在下で行った。フラグミン F2-F3 はCa依存的にアクチン線維と共沈するが、ゲルゾリン G2-G3 はCaに依存せずアクチン線維と共沈した。フラグミン F1-F3 とゲルゾリン G1-G3 の線維切断能に関するCa依存性の違いをアクチン線維との結合により説明できることを示唆する。

#### (8) フラグミン特有なCa結合サイト(PDB code: 6kwz, 6ljc, 6ljd, 6lje, 6ljf)

フラグミン F2-F3 には3つのCa結合サイトが観察された。F2とF3ドメイン内に各1個、さらにF2のヘリックスとF3のヘリックスの間に1個のCaが結合していた。前者はゲルゾリンでも観察されているが、後者はフラグミン特異的なサイトである。このドメイン間の結合サイトのCa結合がF2-F3の強くパックされたドメインの位置関係を安定化させると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oda Toshiro, Takeda Shuichi, Narita Akihiro, Maeda Yuichiro	4. 巻 431
2. 論文標題 Structural Polymorphism of Actin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3217 ~ 3228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2019.05.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Shuichi, Fujiwara Ikuko, Sugimoto Yasunobu, Oda Toshiro, Narita Akihiro, Maeda Yuichiro	4. 巻 41
2. 論文標題 Novel inter-domain Ca <sup>2+</sup> -binding site in the gelsolin superfamily protein fragmin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility	6. 最初と最後の頁 153 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-019-09571-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Ikuko, Takeda Shuichi, Oda Toshiro, Honda Hajime, Narita Akihiro, Maeda Yuichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Polymerization and depolymerization of actin with nucleotide states at filament ends	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 1513 ~ 1519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-018-0483-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Ikuko, Zweifel Mark E., Courtemanche Naomi, Pollard Thomas D.	4. 巻 28
2. 論文標題 Latrunculin A Accelerates Actin Filament Depolymerization in Addition to Sequestering Actin Monomers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3183 ~ 3192.e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2018.07.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計25件(うち招待講演 3件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Toshiro Oda
2. 発表標題 Polymorphism of actin molecule and its function
3. 学会等名 The 11th Toyota Riken International Workshop"Actin Filament: beyond the atomic resolution structures" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuichi Takeda
2. 発表標題 Crystal structures of F-form actin reveal mechanisms of dynamic assembly and ATP hydrolysis
3. 学会等名 The 11th Toyota Riken International Workshop"Actin Filament: beyond the atomic resolution structures" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujiwara, I., Takahashi, D., Sasajima, Y., Kiyama, H., Arakawa, A., Kato, K., Miyata, T., Kakizawa, S., Namba, K. and Miyata, M.
2. 発表標題 "Bacterial actin homolog, MreBs and fibril are essential for the swimming motility of Spiroplasma eriocheiris",
3. 学会等名 The 11th Toyota Riken International Workshop"Actin Filament: beyond the atomic resolution structures" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuichi Takeda, Akihiro Narita, Toshiro Oda, Nobuhisa Watanabe, Takayuki Nagae, Motonori Ota, Ryotaro Koike, Kei Moritsugu, Yusuke Kanematsu, Ikuko Fujiwara, Kotaro Tanaka, Yuichiro Maeda
2. 発表標題 Atomic resolution structures of F form actin: mutual switching between G/F transition and ATPase
3. 学会等名 The 47th European muscle conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Polymorphism of actin molecules
2. 発表標題 Toshiro Oda, Shuichi Takeda Akihiro Narita, Yuichiro Maeda
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuko Fujiwara, Miki Iwatani, Yumeka Yamauchi, Tatsuya Iwata, Shuichi Takeda, Toshiro Oda, Tomoharu Matsumoto, Akihiro Narita, Satoshi Tsunoda, Hideki Kandori
2. 発表標題 Regulation of actin bundles by using LOV-fused fascin
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujiwara, I., Fan, R., Takeda, S., Maeda, Y., Narita, A
2. 発表標題 Severing regulation of gelsolin superfamily on single and bundled actin filaments
3. 学会等名 International Symposium, Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity, Nagoya, Japan 09/2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 平成29年度日本結晶学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤原 郁子  (Fujiwara Ikuko)  (10742075)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教   (13903)	
研究 分担者	武田 修一  (Takeda Shuichi)  (50509081)	名古屋大学・理学研究科・研究員   (13901)	