

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18370067  
 研究課題名（和文） 優性変異アクチンを用いたアクチンフィラメントの機能解明  
 研究課題名（英文） Functional analyses of actin filaments using dominant negative mutant actins.  
 研究代表者  
 上田 太郎 (Uyeda Taro)  
 独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・部門付き  
 研究者番号：90356551

## 研究成果の概要：

アクチンミオシン系の力発生において、アクチンフィラメントは線路として機能する一方、その協同的構造変化も何らかの重要な機能を果たすと考えられている。一般に協同的構造変化の機能の解明には、優性変異の解析が有力な研究手段となる。そこで An and Mogami (1996) が同定した 10 個の優性変異アクチンについて、われわれ独自のアクチン発現系を用いて 6 変異の精製に成功し機能解析を行った。その結果、4 変異は重合に、2 変異は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な協同的スイッチ機構に異常があることを発見した。さらにグリシンスキヤニング法（後述）により、新たに 5 個の優性変異アクチンを同定した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2007 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：アクチン、ミオシン、協同的構造変化、優性変異

## 1. 研究開始当初の背景

アクチン・ミオシン系による力発生は、ミオシンがアクチンフィラメントと結合し、ミオシンのレバーアーム領域が角度変化することで力が発生するという「レバーアーム説」が有力である。この説によれば、アクチンフィラメントの機能はミオシンと結合してリン酸の解離を促進するとともに、それに引きつ

づくパワーstrookの足場を提供するだけであり、単なる受動的な構造要素にすぎないという考え方も成り立つ。しかし、ある種の化学修飾アクチンフィラメントは、ミオシンと結合してそのリン酸解離を促進できるにもかかわらず、全く運動活性をもたない (Honda *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998) ので、アクチンフィラメントには、単なる受動的構造を超えた機能があることは明らかである。さらに別の

化学的改変アクチンは、正常なアクチンと共重合するとフィラメント全体の運動能を失わせるという(Schwytter *et al.*, 1990; Prochniewicz *et al.*, 1993)。これらの修飾アクチンは、同一フィラメント中に存在する正常アクチンの機能も阻害してしまうことから、フィラメント内の複数のサブユニットが協調して構造変化することが力発生に重要であることを示唆している。また ATP 存在下でミオシンが結合すると、アクチンフィラメントの構造が変化して柔らかくなること (Fujime and Ishiwata, 1971; Yanagda *et al.*, 1984)や、ミオシン1分子の結合が複数のアクチンサブユニットの構造を変化させることも示されている (*e.g.*, Oosawa *et al.*, 1972)。さらに、アクチンフィラメントが複数の構造状態をとり得ることは、電子顕微鏡観察により実証されている(Galkin *et al.*, 2001)。したがって、ミオシンとアクチンフィラメントの相互作用は、ミオシンのリン酸解離を促進し力発生の足場を提供するだけでなく、力発生に不可欠な未知の現象を引き起こすと考えられ、この現象はアクチンフィラメントのサブユニット間の協調的な構造変化を紹介するものである可能性が高い。しかしそうした構造変化の実体や具体的機能は全く未解明であった。

## 2. 研究の目的

こうした現象の分子機構を解明することは、アクチン・ミオシン相互作用の重要な未解明部分に光をあてるうえで大きな意義があるのみならず、レバーアーム説を超える新たな力発生機構の提唱につながる可能性もあり、運動タンパク質の研究における最重要なフロンティアの一つであると考えられる。そこで本研究課題では、分子遺伝学的手法により生成した変異組換えアクチンを様々な手法を用いて多角的に解析し、アクチンフィラメントの構造変化と、力発生におけるその動的機能を解明することを目的とする。

アクチンの機能解明のためには、アクチンそのものに人為的な改変を加えてその効果を検証するというアプローチが必須である。蛋白質の人為的改変法としては、低分子化合物によるアミノ酸側鎖の修飾や架橋、あるいは酵素によるペプチド結合の限定的な切断などの化学的方法と、遺伝子工学的な改変法が用いられている。このうちアクチンの化学的改変に関しては上述のようにいくつかの先行研究があり、アクチンの動的な機能を示唆する重要な成果が得られている。しかし化学的改変法には改変できる部位に大きな制約があるため、重要な現象を発見し、その詳細な分子機構を追求する手法としては不十分であり、遺伝子工学的なアプローチが待たれていた。

しかし、組換え変異アクチンの精製には技術的な困難があった。というのは、アクチン

は大腸菌内ではフォールドできず、一方、真核細胞から発現・精製する際に内在性のアクチンと区別するために His や FLAG タグを融合すると、融合蛋白質が凝集しやすくなってしまうため、機能的な組換えアクチンを十分回収することが困難である。これに対して Joel ら(2004)は、昆虫細胞でタグのない骨格筋アクチンを過剰発現し、機能のあるものを精製することに成功した。しかしこの系では、翻訳後修飾が正常か未確認であり、内在性のアクチンの混入を防ぐ手段がないという問題がある。また、アクチンフィラメントが転写や翻訳にも関与するという報告があることを考えると、強い細胞毒性をもつ変異アクチンを発現できるかも未知である。一方私は、本研究課題の応募を念頭に効率的なアクチン発現系の開発に取り組み、安価に大量培養が可能な細胞性粘菌において、外来アクチン遺伝子を非重合条件で発現させ、内在性アクチンから単離・精製することに成功した。そこで、この組換え変異アクチン発現系を利用して、アクチン・ミオシン相互作用におけるアクチンの役割と、アクチンサブユニット間の協調的な構造変化の機能解析を行うことを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) An and Mogami (1996)は、増殖には必須ではないショウジョウバエの間接飛翔筋アクチンを利用して、多数の変異アクチンアليلを同定した。この研究で同定された変異アクチンの中には、フィラメントの重合を阻害することなく飛翔能を優性に阻害する(正常アクチンと共重合して飛翔能を阻害する)ものもある。これらは、共重合した野生型アクチンサブユニットの機能も阻害してしまうことから、複数のサブユニットが関与するフィラメントの協同的な構造変化を妨害してフィラメント全体の運動機能を障害している可能性が高く、特に興味深い。しかしショウジョウバエの間接飛翔筋から、生化学的解析に必要な量の変異アクチンを単離精製することは現実的ではない。そこで本研究課題では、それらの変異アクチンを上述の新規組換えアクチン発現系を用いて発現・精製し、その詳細な *in vitro* 機能解析および構造解析を行う。

解析手法としては、ATPase 活性測定や *in vitro* 運動アッセイのほか、すでに報告されているアクチンフィラメントの協同的な構造変化の有無を観測し、運動機能の有無と協同的な構造変化の有無を関連づける。また、研究分担者は最近、急速凍結レプリカ試料の高分解能電子顕微鏡像に対して画像解析を施すことにより、個々の蛋白質分子の形状やドメイン構造を決定する手法を確立した。そこで、野生型アクチンフィラメントや変異アクチ

ンフィラメントをミオシンと相互作用させ、運動機能の有無と関連する構造的な差異、とくに協同的構造変化の差異についての検出を試みる。以上の解析を通じて、運動機能に必要なアクチンフィラメントの協同的構造変化の基盤的知見を確立することを目指す。

なお、骨格筋のアクチンフィラメントはトロポニン・トロポミオシンを結合しており、サブ  $\mu M$  の  $Ca^{2+}$  存在下で協同的な構造変化を起こし、収縮が開始される。したがって最上らが単離した優性の変異アクチンの一部は、こうした協同的  $Ca^{2+}$  スイッチ系に障害がある可能性もある。そこで、*in vitro* 運動アッセイにおいて正常に運動する優性変異アクチンについては、トロポニン・トロポミオシン系の存在下で  $Ca^{2+}$  スイッチの異常についても検討する。

(2) 一方 An and Mogami のスクリーニングは飽和していないので、すべての重要残基が同定されているとは考えにくい。そこで本研究課題では、新しい優性変異アクチンの探索もあわせて行う。ただしわれわれの実験系でアクチン機能に関する遺伝学的選択を行うことはできないので、部位特異的な変異法とランダム変異法の中間的な手法をとる。すなわち、蛋白質の構造変化や柔軟性にはグリシン残基が重要であることを考慮し、アクチン中に存在する 29 個のグリシン残基を個別に部位特異的置換変異させた変異シリーズを作成（グリンスキャニングとよぶ）し、これらを発現・精製して、フィラメント重合を阻害せずに運動機能を優性に阻害するものを *in vitro* で選択する。こうしてえられた新規優性変異アクチンは、ミオシンによる力発生に必要な構造変化に障害があるものである可能性が高いので、これらについても上記と同様に詳細な *in vitro* 構造・機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) われわれの新規組換えアクチン発現系を用いて、An and Mogami がショウジョウバエの間接飛翔筋を用いて同定した 10 個の強い優性変異アクチンのうち、6 変異アクチンの精製に成功し、それらの生化学的解析を行った。以下にその結果を要約する。

① G63D. この変異アクチンは、すべての条件下(ファロイジン存在下も含む)でほとんど重合しなかった。しかしピレン標識野生型アクチンとゲルゾリン存在下の重合速度の測定から、G63D アクチンは、それ自身では重合できないものの、共存する野生型アクチンの重合速度等に影響を与えることが明らかとなったので、これがハエ筋肉における優性阻害の原因であろうと推察した。

② G156D, G156S, G268D. これらの 3 変異アクチンは、温度感受性の重合を示した。とくに 37 度で重合条件においた標品を電子顕微

鏡観察したところ、フィラメントではなく多量のアグリゲーションが見られ、正常はフィラメントと絡まったアグリゲーションの像も得られたので、重合条件におけるこうした変性物の生成が、優性阻害の原因になっているのではないかと推測した。

③ R95C. この変異アクチンの重合能は正常で、またローダミンファロイジンラベル後、ウサギ骨格筋 HMM による *in vitro* 運動アッセイを行ったところ、正常な運動能を示した。しかし骨格筋トロポニン・トロポミオシン存在下で運動の  $Ca^{2+}$  感受性を調べたところ、50%活性化に必要な pCa が野生型アクチンより 0.33 低濃度側にずれていた。ショウジョウバエの筋肉中と同じように 3 倍量の野生型アクチン存在下でも 0.2 程度の pCa 低下が見られたので、これが優性阻害の原因であろうと推測した。1:3 共重合フィラメントにおける pCa の低下は、 $Ca^{2+}$  スイッチにおける協同的構造変化の重要性を示している。

④ E226K. この変異アクチンも正常な重合能と運動能を示したが、トロポニン・トロポミオシン存在下で運動では、R95C とは逆に高濃度の  $Ca^{2+}$  存在下でも全く運動しなくなっていた。また 1:3 共重合フィラメントにおいては、pCa の増加が見られ、これが優性阻害の原因であろうと推測した。

⑤ G301D, G302D, Q353@, W356@ (@: stop codon). これらは、われわれの新規組換えアクチン発現系を用いても全く発現が見られず、したがって精製・解析ができなかった。mRNA のレベルは正常だったので、翻訳後の問題、たとえばフォールディング異常や何らかの理由による過剰な分解などが原因として考えられる。

以上のように、精製できた 6 変異アクチンについて、それぞれ優性阻害の原因となりそうな機能欠陥を見出すことができた。この結果については、現在論文投稿準備中である。

しかし期待に反して、トロポニン・トロポミオシン非存在下で、アクチンフィラメントの協同的構造変化の重要性を示す成果を得ることができなかった。ただし、精製できなかった 4 変異の中にその点で興味深いものが含まれている可能性は残されている。特にアクチンの C 末端付近は、フィラメント中で隣接するアクチンサブユニットと相互作用することが知られており、その意味では、Q353@と W356@には期待がもてる。そこでこれら 4 変異の発現精製と解析については、今後も他の発現系を用いて再挑戦したいと考えている。

(2) 一方で、An and Mogami の遺伝学的スクリーニングは全く飽和していないと考えられるので、新たな優性阻害型変異アクチンの同定・解析にも着手した。全くランダムな変異ライブラリーから優性阻害型の変異を効

率よくスクリーニングする手法を案出することができなかつたので、協同的構造変化にはグリシン残基が重要であろうと推測し、グリシン残基に標的を絞った網羅的スクリーニング(グリシンスキャニングと命名)を行うこととした。具体的には、アクチン中で保存された 29 個のグリシン残基を個別にあるいは適宜クラスター化してバリニンに置換した変異アクチン遺伝子シリーズを作成し、これらを個別に、栄養要求性を選択マーカーとして酵母菌に導入した。現在までに 25 個のグリシンについて解析済みであるが、このうち増殖を顕著に阻害する変異アクチン遺伝子として、G13/15V, G36V, G74V, G146V, G156/158V の 5 個を同定した(ただし G156/G158 については、どちらか一方で優性阻害型になるのかどうかは未知)。

現在、これら優性阻害型アクチンを発現精製し、ショウジョウバエ由来のものと同様な解析を進めているところであるが、すでに G146V アクチンは、単体(トロポニン・トロポミオシン非存在下)で、骨格筋 HMM に対して顕著な運動阻害を示すことを発見している。しかしこの変異アクチンは、ミオシン V に対しては完全に正常な運動能を示し、ミオシンクラス特異的な運動阻害が認められた。これはミオシンのクラスによって主たる力発生機構が異なる可能性を示すもので、現在、速度論的解析を含めた実験を行っており、論文投稿の準備を進めている。G146V 以外の優性阻害型変異アクチンについても、順次精製と運動アッセイを行い、論文としてまとめる予定である。

#### 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 2 件)

1. Noguchi T. Q. P., N. Kanzaki, H. Ueno, K. Hirose, and T. Q. P. Uyeda (2007). A novel system for expressing toxic actin mutants in *Dictyostelium* and purification and characterization of a dominant lethal yeast actin mutant. *J. Biol. Chem.* **282**:27721-27727.
2. Tokuraku, K., R. Kurogi, R. Toya, and T. Q. P. Uyeda (2009). Novel mode of cooperative binding between myosin and Mg<sup>2+</sup>-actin filaments in the presence of low concentrations of ATP. *J. Mol. Biol.*, **386**:149-162.

[学会発表] (計 18 件)

1. 野口太郎、小森智貴、上野裕則、柳田敏雄、広瀬恵子、上田太郎。Mutation at Gly146 of actin causes class-specific motility defect of myosin. 生物物理学会第 46 回年会、2008

年 12 月 3 日、福岡。

2. 中嶋潤、野口太郎、上田太郎。Characterization of dominant lethal D11K and D11Q mutant actins. 生物物理学会第 46 回年会、2008 年 12 月 3 日、福岡。
3. E. Katayama, T. Kimori, M. Yamada, T. Eguchi, T. Sasaki, S. Maruta, N. Baba, and T. Uyeda. Revised behavior of myosin crossbridges during in vitro actin sliding. Biophysical Society 51<sup>st</sup> Annual Meeting, 2008.3.8. Baltimore, USA.
4. 上田太郎、神崎紀子。Purification and characterization of a dominant lethal yeast actin, using a novel expression system for toxic actin mutants. 日本生物物理学会第 45 回年会、2007 年 12 月 21 日、横浜。
5. 野口太郎、上田太郎。Glycine scanning mutational analysis of *Dictyostelium* actin. 日本生物物理学会第 45 回年会、2007 年 12 月 21 日、横浜。
6. 片山栄作、木森義隆、上田太郎。Further characterization of the configuration of actin-attached myosin-crossbridges during in vitro sliding. 日本生物物理学会第 45 回年会、2007 年 12 月 21 日、横浜。
7. 和沢鉄一、シディック、宮崎崇、片山栄作、上田太郎、鈴木誠。Interaction of myosin with the filaments of acto-S1 chimera protein. 日本生物物理学会第 45 回年会、2007 年 12 月 21 日、横浜。
8. T. Noguchi, H. Ueno, K. Hirose, and T. Uyeda. A novel expression system for dominant negative mutant actins. 5<sup>th</sup> East Asian Biophysics Symposium and 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. 2006.11.16, Okinawa, Japan.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 毒性の強い組換えタンパク質の効率的発現法。上田太郎、野口太郎、神崎紀子。特願 2006-223042。H18.8.18
2. タンパク質の発現方法。上田太郎、野口太郎。特願 2006-268914。H18.9.29。

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 太郎

産業技術総合研究所・セルエンジニアリング  
研究部門・部門付き

(2)研究分担者

片山栄作

東京大学・医科学研究所・教授

(3)研究協力者

野口太郎(筑波大学大学院・博士課程)