

令和 5 年 7 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12217

研究課題名(和文)アクチンフィラメントの伸長制御蛋白質によるアロステリックな結合解離機構の研究

研究課題名(英文) Mechanism of allosteric dissociation by regulator proteins of actin filament elongation

研究代表者

小池 亮太郎 (Koike, Ryotaro)

名古屋大学・情報学研究科・助教

研究者番号：20381577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンフィラメントの伸長は多数の蛋白質によって制御されている。アクチンキャッピング蛋白質(CP)はフィラメントの端に結合しその伸長を止めるが、CARMIL蛋白質はCPと結合し、フィラメントから引きはがすことができる(結合解離)。この結合解離にはCPの分子運動(揺らぎ)の変化が鍵となると考えられている。本研究では、分子シミュレーションや弾性ネットワークモデルを用い、CARMILの結合がCPの揺らぎに与える影響を網羅的に調査した。これにより、CARMILのどの部位がCPの運動を大きく変えるのかを明らかにした。また、運動を変える部位が持つ特徴的な結合パターンも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチンフィラメントの伸長は細胞の変形や運動という普遍的な生命現象に直結している。フィラメントを制御する蛋白質の研究は、細胞の変形・運動といったマクロな現象が、分子レベルでどのように実現されているのかを理解するために欠かせない。制御蛋白質の働きには揺らぎが関わっている。蛋白質間の結合と揺らぎがどのように関係するか、分子シミュレーションや弾性ネットワークモデルを使って網羅的に解析し、結合と揺らぎの関係を明らかにした。結合と揺らぎに関する知見は、フィラメントの伸長を制御する蛋白質の働きをコントロールするための基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Actin filament elongation is regulated by a number of proteins. Actin capping protein (CP) binds to the end of filament and inhibits their elongation, whereas CARMIL protein binds to CP and can dissociate it from filament. Structural flexibility of CP is expected to be the key to this dissociation. In this study, using molecular dynamics simulation and elastic network model, we comprehensively investigated the effect of binding of CARMIL on the flexibility of CP. As a result, we clarified which part of CARMIL significantly changes the flexibility of CP. We also clarified the characteristics binding patterns of the parts that change the flexibility.

研究分野：構造バイオインフォマティクス

キーワード：動的構造 分子シミュレーション アクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アクチンは細胞内に大量に存在し、螺旋状に重合してフィラメントを形成する。アクチンフィラメントは細胞骨格を形成し、細胞の形状と密接に関連する。フィラメントの両端ではアクチンの重合と脱重合が行われており、フィラメントは伸び縮みする。生物において普遍的な現象である細胞の変形や運動は、フィラメントの伸縮が深くかかわっている。

アクチンフィラメントの伸縮は多数の蛋白質によって制御されている。キャッピング蛋白質（以下 CP と呼ぶ）は伸長制御の要となる蛋白質で、フィラメントの末端に結合しさらなる伸長を妨げる。この働きをキャッピングと呼ぶ。CP に結合する蛋白質「CARMIL」はキャッピングを阻害し、結果としてフィラメントの伸長を促す。CARMIL によるキャッピング阻害には2つのやり方がある。1つは、フィラメントに結合する前の CP に作用し、CP がフィラメントに結合するのを妨げる（結合遮断）。もう1つは、フィラメントに結合した CP に作用し、フィラメントから CP を剥がす（結合解離）。この結合解離は CARMIL に特有の阻害機構で、フィラメントのきめ細かい伸長制御を可能にする。

CARMIL による結合解離のメカニズムは立体構造解析により大きく進展した。X線結晶構造解析により、CP/CARMIL 複合体の高解像度の立体構造が、電子顕微鏡による解析から CP/アクチンフィラメント複合体の低解像度の立体構造が決定された。この2つの構造を突き合わせることで、「CARMIL と CP の結合部位」が「フィラメントと CP の結合部位」から離れていることが分かった。つまり、CARMIL による結合解離は、離れた場所に影響を及ぼすアロステリック効果によって実現される。この他に、CARMIL の結合は CP の立体構造を大きく変えないこと、CP のある運動（ツイスト運動と呼ばれる）を抑制しうることも示された。これは、CARMIL の結合が立体構造よりも動的構造に影響を及ぼすことを強く示唆した。

2. 研究の目的

アクチンフィラメントの伸長に関わる CARMIL の結合と CP の動的構造の関係を明らかにすることを本研究の目的とする。CP の動的構造は、分子シミュレーションから得られるデータを独自に開発したツール MotionTree で解析することで調査する。得られた CP の動的構造の情報を元に結合解離のメカニズムの推定を試みる。また、弾性ネットワークモデルを用いて、CARMIL の結合と CP のツイスト運動の関係も調査する。

3. 研究の方法

CARMIL が CP を引き剥がす結合解離の過程を、分子動力学法を用いてシミュレートする。シミュレーションには、アクチンフィラメントと CP の複合体に CARMIL が結合した過渡的複合体の構造を用意する必要がある。しかし、フィラメントと CP の複合体構造の分解能は低く、側鎖も含めた詳細なシミュレーションには適さない。そこで、フィラメントの代わりに V-1 蛋白質を用いる。V-1 は CP 結合蛋白質で、フィラメントの代替品として優れている。CARMIL の結合により CP/V-1 複合体は解離する。V-1 と CP の結合部位はフィラメントと CP の結合部位と重なる。CP と V-1 の結合解離もアロステリック効果による。さらに、CP と V-1 の複合体構造は高分解能で決定されている。これらの理由から、本研究ではアクチンフィラメントの代わりに V-1 を用いて分子シミュレーションを行う。

シミュレーションから得られたデータは、これまでに開発してきたツールである Motion Tree を用いて解析する。シミュレーションでは決まった時間間隔おきに、過渡的複合体の構造データ（スナップショット）を出力する。シミュレーションから得られるデータはこのスナップショットの集まりである。Motion Tree は各スナップショットを比較することで運動部位を特定できる。全スナップショットを網羅的に比較することで CP のどの部位がどの程度運動したかの統計をとる。

CARMIL のどの部位が CP のツイスト運動に影響するかも調査する。CP/CARMIL の結晶

構造を基に、CARMIL の様々な部分構造と CP とのモデル構造を作成する。弾性ネットワークモデルを用いて CP と部分構造の複合体形成時の CP の動的構造を調べ、ツイスト運動が見られるかどうかを調べる。これにより、ツイスト運動を変化させるのに必要な CARMIL の部分構造を特定する。また、本研究期間中にアクチン制御蛋白質の1つである Twinfilin の末端部分 (TW-tail) が CP と結合している構造を明らかにした。CP/TW-tail に対しても、同様に弾性ネットワークモデルを用いた網羅的な解析を行う。

4. 研究成果

(1) 結合解離における CP の動的構造の変化

CARMIL による CP と V-1 の結合解離過程の再現を分子動力学法で試みた。まず、CP/V-1 複合体構造を元に、CARMIL が仮想的に結合した過渡的複合体のモデル構造を作成した (図1)。このモデル構造を初期構造にシミュレーションを行う。ベースとなる構造が CP/V-1 複合体であるため、シミュレーションは CP と V-1 の解離の方向へ向かわず、CP/V-1 複合体がそのまま安定する可能性も高い。そこで、20本のシミュレーションを行い、最も解離の方向へ進んでいる1本を特定した。このシミュレーションデータを調べたところ、CP と V-1 が解離するまでには到っていないが、CP が CARMIL 結合時の構造へと移行している様子が確認できた (図2)。このシミュレーションデータを解析することで解離に至るまでの CP の動的構造の様子を調べることができる。

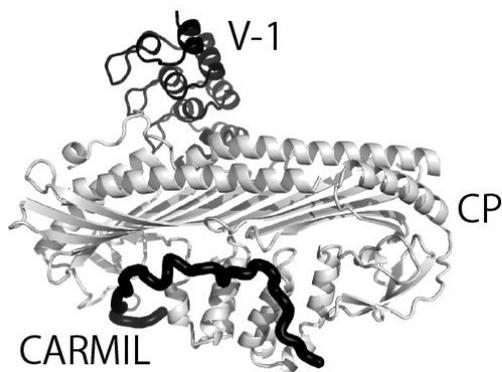


図1 CP/V-1/CARMIL の過渡的複合体のモデル構造

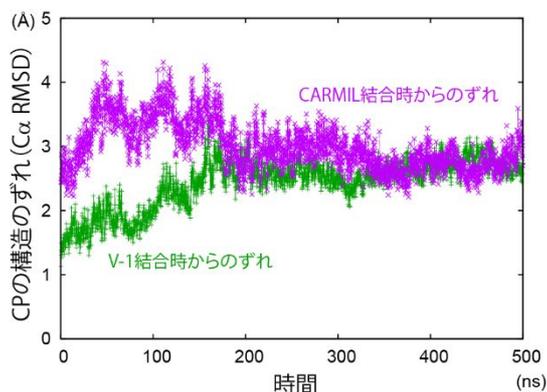
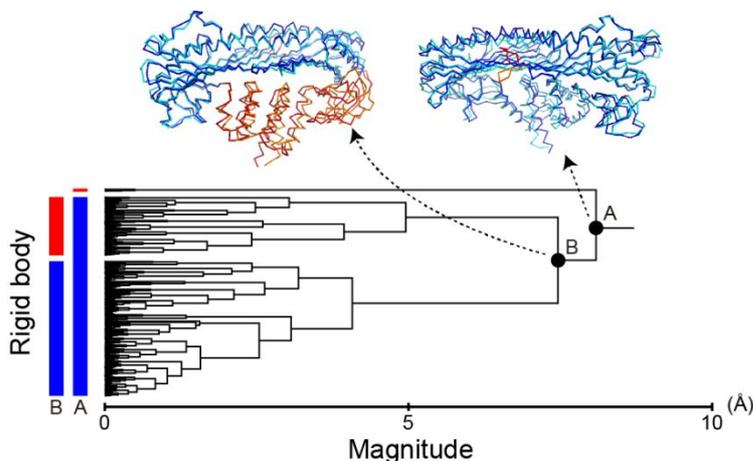


図2 分子シミュレーションの時間発展の様子

CP の動的構造の調査には Motion Tree を用いる。シミュレーションから得られるスナップショットを Motion Tree で比較することで、顕著な運動が起こっている部位を特定できる。ある2つのスナップショットを比較した例を図3に示す。顕著な運動は Effective Node (EN; 図の黒丸 A と B) として特定される。この例では、V-1 結合ループの隣りにあるループ (隣接ループ) の運動と、ストークと呼ばれる部分を含んだ部位の運動が特定された。この



隣接ループの隣りにあるループ (隣接ループ) の運動と、ストークと呼ばれる部分を含んだ部位の運動が特定された。この

図3 ある2つのスナップショット間の運動

隣接ループ (EN の A) とストークを含む部位 (EN の B) の構造が赤からオレンジのものへと大きく変化している。

Motion Tree を，シミュレーションから得られた全てのスナップショットのペアに適用する．300 万以上のスナップショットペアを比較し，シミュレーション中で見られる運動を網羅的に調査した．

ここでは，CP の動的構造が時間とともにどのように変化していくのかに着目した．100ns ごとにシミュレーションを 5 つの区間に区切り，区間内のスナップショットを比較した結果だけを取り出し，区間ごとに CP のどの部位が運動していたかを調べた．区間ごとに運動が検出される頻度を調べたところ，区間によって頻度が大きく異なる部位が 2 つ特定できた．1 つはストークを含む部位（図 3 の B の部位）であった．この部位の運動が検出された頻度を図 4（緑線）に示す．最初の 200ns では運動が良く見られるが，徐々にあまり見られなくなる．この部位は CARMIL との結合サイトを含む．そのため，CARMIL と CP の結合により，この部位の運動が徐々に抑えられることは十分ありうる．隣接ループ（図 3 の A の部位）でも運動の頻度の大きな変化が見られた（図 4 の赤線）．最初の 200ns まではほとんど運動が見られなかったが，200ns 以降ではこの部位の運動が多く見られるようになる．このループは CP と V-1 だけで複合体を形成している際にはほとんど運動が見られない．他方，CP と CARMIL だけで複合体を形成している際には，このループの運動が良く見られる．このことは，時間とともにこのループの運動を抑える V-1 の影響が薄れ，運動を促す CARMIL の影響が強まることを示唆する．また，CP と V-1 の結合ループの運動頻度も調べた（図 4 の青線）．最初の 400ns まではほとんど運動が見られなかったが，その後やや運動が見られた．これらのことから，V-1 と直接コンタクトしておらず比較的動きやすい隣接ループの運動をまず変化させた後，V-1 と直接コンタクトしている結合ループの運動を変化させることで実現する，という結合解離モデルを推定した．

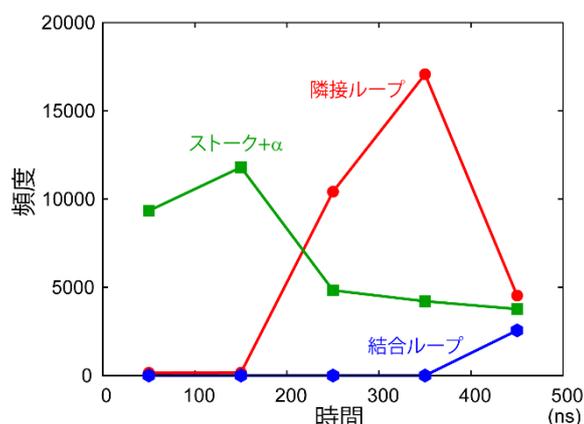


図 4 各部位の運動が見られた頻度の時間変化

(2) CARMIL の結合と CP の動的構造の関係

アクチンフィラメントの伸長を制御する TW-tail と CP の複合体構造を初めて解明することができた（図 5）．これにより，TW-tail は CARMIL と同じような位置で CP と結合するにも関わらず，CARMIL とは異なり CP と V-1 の結合を阻害しないことを明らかにした．新たに得られた CP/TW-tail の構造を利用し，TW-tail が CP の動的構造に与える影響を調べた．また，CARMIL が CP の動的構造に与える影響と比較し，影響が異なる場合 CARMIL と TW-tail の何が違いを生むのかも調べた．

CP/TW-tail 複合体，あるいは CP/CARMIL 複合体の結晶構造をベースに，TW-tail や CARMIL の様々な部位と CP からなるモデル複合体構造を作成する．作成したモデル構造で CP の動的構造がどうなっているか，ツイスト運動に絞って調べる．ベースとなる結晶構造は PDB (Protein Data Bank) から収集し，約 600 個の CP/TW-tail のモデル構造と，約 1000 個の CP/CARMIL のモデル構造を作成した．大量のモデル構造を調べるために，弾性ネットワークモデルを用いた．CP/CARMIL 複合体のモデル構造の中にはツイスト運動が大きく変化するものもあるが，CP/TW-tail 複合体ではツイスト運動が大きく変化することは無かった（図 6）．CP と V-1 の結合を阻害しない TW-tail が CP の動的構造を大きく変えないことは，CARMIL が CP の動的構造を変えることで CP と V-1 の結合を妨げるという阻害モデルと矛盾しない．CP/TW-tail の複合体構造という新たなデータに基づき検証を行ったが，依然として CP の動的構造を介した結合阻害モデルに破綻が無いことを示せた．

前述したように，CP/CARMIL 複合体のモデル構造の中にはツイスト運動が大きく変化

するものがあることを突き止めた。これらのモデル構造を調べたところ、CARMIL 中の CP 結合部位の中でも、CP-L ドメインと CP-S ドメインの境界上に位置する部分構造であることが分かった。ツイスト運動は CP-L ドメインと CP-S ドメインの間に見られる運動である。そのため、この境界上の部位が2つのドメインと強く相互作用することでツイスト運動を変えるものと考えている。他方、TW-tail では CP-L ドメインと CP-S ドメインの両方と強く相互作用する部位は無かった。このことも、ツイスト運動を大きく変えるには2つのドメインとの相互作用が重要であることを示唆する。新たに得られた CP/TW-Tail 複合体の構造データを利用し、CP の動的構造による結合阻害モデルの妥当性を示した。また、CP の動的構造を変えるのに重要な CARMIL の部位を特定し、その理由も相互作用の観点から明らかにした。これらの成果は論文 (Koike & Ota 2023) としてまとめ公表した。

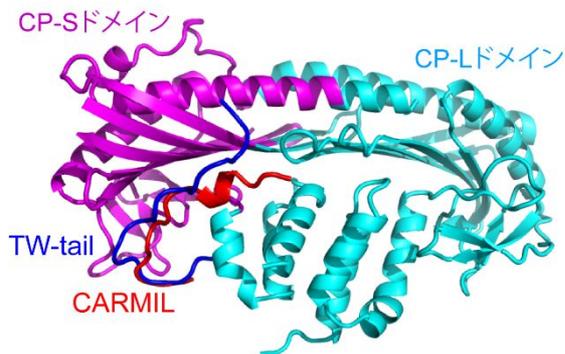


図5 CP/TW-tail 複合体と CARMIL の重ね合わせ構造
TW-tail と CP の結合部位が CARMIL と CP の結合部位はよく重なる。

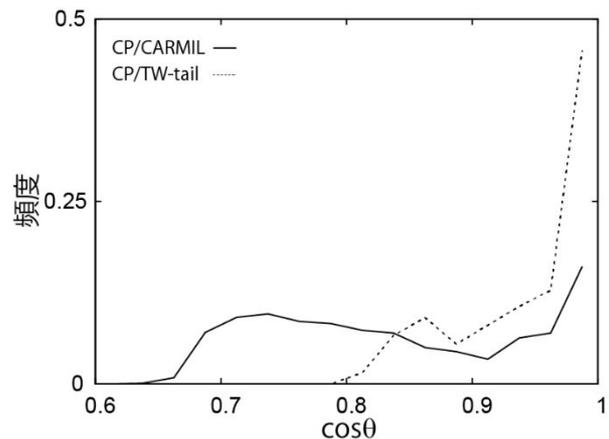


図6 CARMIL と TW-tail の CP の動的構造に与える影響

CARMIL や TW-tail が結合したときの CP の運動を $\cos\theta$ で評価した。ツイスト運動が保持されているほど、 $\cos\theta$ は 1 に近くなる。Koike & Ota 2023 (DOI: 10.1002/prot.26560) より引用し、改変。
© Wiley 2023

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ryotaro Koike, Motonori Ota	4. 巻 -
2. 論文標題 Elastic network model reveals distinct flexibilities of capping proteins bound to CARMIL and twinfilin tail	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.26560	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, Koike Ryotaro, Fujiwara Ikuko, Narita Akihiro, Miyata Makoto, Ota Motonori, Maeda Yuichiro	4. 巻 433
2. 論文標題 Structural Insights into the Regulation of Actin Capping Protein by Twinfilin C-terminal Tail	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 166891 ~ 166891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2021.166891	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 Shuichi Takeda, Ryotaro Koike, Takayuki Nagae, Ikuko Fujiwara, Akihiro Narita, Yuichiro Maeda, Motonori Ota	4. 巻 77
2. 論文標題 Crystal structure of human V-1 in the apo form	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallogr F Struct Biol Commun	6. 最初と最後の頁 13-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X20016829	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 Koike Ryotaro, Amano Mutsuki, Kaibuchi Kozo, Ota Motonori	4. 巻 29
2. 論文標題 Protein kinases phosphorylate long disordered regions in intrinsically disordered proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 564 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3789	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 Koike Ryotaro, Ota Motonori	4. 巻 16
2. 論文標題 All Atom Motion Tree detects side chain-related motions and their coupling with domain motion in proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 280 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.16.0_280	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 Kanematsu Yusuke, Narita Akihiro, Oda Toshiro, Koike Ryotaro, Ota Motonori, Takano Yu, Moritsugu Kei, Fujiwara Ikuko, Tanaka Kotaro, Komatsu Hideyuki, Nagae Takayuki, Watanabe Nobuhisa, Iwasa Mitsusada, Maeda Yuichiro, Takeda Shuichi	4. 巻 119
2. 論文標題 Structures and mechanisms of actin ATP hydrolysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2122641119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2122641119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小池亮太郎, 森次圭, 太田元規
2. 発表標題 異なる機能状態にあるアクチンの構造ゆらぎとその相関関係
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryotaro Koike, Motonori Ota
2. 発表標題 Elastic network model analysis shows distinct flexibilities of capping protein bound to CARMIL or twinfilin
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryotaro Koike, Motonori Ota
2. 発表標題 Structural flexibility of actin in molecular dynamics simulation
3. 学会等名 環太平洋国際化学会議2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryotaro Koike, Motonori Ota
2. 発表標題 Structural flexibility of actin studied by molecular dynamics simulation
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小池亮太郎, 太田元規
2. 発表標題 全原子Motion Treeとドメイン運動に伴う側鎖の運動
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葉山雄揮, 小池亮太郎, 太田元規
2. 発表標題 タンパク質-タンパク質間相互作用の有向ネットワークが示す細胞内情報伝達
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryotaro Koike, Motonori Ota
2. 発表標題 Full-atom Motion Tree detects side-chain motions and their coupling with domain motions
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryotaro Koike, Motonori Ota
2. 発表標題 Structural flexibility of actin monomer in molecular dynamics simulation
3. 学会等名 11th Toyota Riken International Workshop, Actin Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ANBO Hiroto, SAKUMA Koya, KADO Yumiko, SAKAMOTO Shigetaka, HOSODA Kazuo, SHIKAMA Noriko, DAIYASU Hiromi, TAKAGI Daisuke, YAMAGUCHI Atsuko, HATANAKA Hideki, KOIKE Ryotaro, HIROAKI Hidekazu, FUKUCHI Satoshi, OTA Motonori
2. 発表標題 天然変性タンパク質データベース：IDEAL
3. 学会等名 トーゴの日シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryotaro Koike
2. 発表標題 Structural changes of ATPase complexes in the PDB
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Koike Ryotaro, Ota Motonori	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 224
3. 書名 Protein Structural Changes Based on Structural Comparison (Chapter 8 of eBook "Practical Guide to Life Science Databases" edited by Imad Abugessaisa, Takeya Kasukawa)	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------