

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770145

研究課題名（和文）

電子顕微鏡法によるアクチンフィラメント重合核形成機構の解明

研究課題名（英文）

An electron microscopic study of actin nucleation factors

研究代表者

成田 哲博（ NARITA AKIHIRO ）

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：30360613

研究成果の概要（和文）：

生物の細胞の動きの多くを司るアクチンフィラメントは、常に細胞内で形成と崩壊を繰り返している。その動態は多くの蛋白質によって厳密な制御を受けている。Arp2/3 複合体とフォルミンは、アクチン制御蛋白質であり、いつ、どこでアクチンフィラメントを形成開始するのかを決定する。私たちは、その形成開始機構を明らかにするために、電子顕微鏡と画像解析を用いた細胞内蛋白質構造解析手法をオーストリアのグループとともに開発、Arp2/3 複合体が細胞内のどこにあるのか、どのような形をしているのかを明らかにした。また、フォルミンについても、金粒子と電子顕微鏡を用いて、フォルミンがアクチンフィラメント端だけに結合し、側面に結合しないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The actin filament is responsible for a wide range of movement of the cell and dynamic through construction and destruction. Many proteins regulate the dynamics of the actin filament. Arp2/3 complex and formin are ones of the regulatory proteins and they start the construction of the actin filament in the cell. To understand mechanism of starting construction, we developed structural analysis procedures of the actin filament network in the cell with an Austrian group, which determined distribution and structure of Arp2/3 complex in the cell by using electron microscopy and image analysis. We also elucidated that formin binds only to the ends of the actin filament, not the side. Now we are analyzing data to conform the bound end to formin is the barbed end.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：生物物理

キーワード：アクチン、電子顕微鏡、電子線トモグラフィー、細胞骨格、画像解析、Arp2/3 複合体、フォルミン

1. 研究開始当初の背景
アクチンは、単量体結合蛋白質プロフィリン等による阻害のため、細胞内では自発的

なフィラメント形成開始を行えない。そのかわり、重合核形成因子(nucleator)とよばれる蛋白質がフィラメント形成をスタート

する。これはアクチンフィラメントがいつ、どこで形成開始するかを厳密に制御するために必要なシステムであり、すべてのアクチンの活動に関係する。重合核形成因子の中で特に重要なのが Arp2/3 複合体とフォルミンである。

Arp2/3 複合体は、すでに存在するアクチンフィラメント(親フィラメント)に結合し、そこから新たなアクチンフィラメントを伸ばし、アクチンフィラメントに分岐構造を作る。しかし、細胞内での Arp2/3 複合体の分布や、それが作るアクチンフィラメントの分岐構造については詳細な解析がなされていなかった。

フォルミンについては、B 端結合蛋白質で、アクチンフィラメント B 端の重合、脱重合にあわせて B 端にとどまり続ける特異的な性質(*processing capping*)を持つと言われていたが、フォルミンがアクチンフィラメント側面にも結合するという論文も出ている。その一方で、実際にフォルミンが B 端に結合している様子電子顕微鏡レベルで見た者はいなかった。

2. 研究の目的

以下の二つを主な目的とした。

(1) Arp2/3 複合体の細胞内アクチンフィラメント網における電子顕微鏡レベルでの局在決定と、それが作るアクチンフィラメント分岐構造の三次元構造解析

(2) フォルミンがアクチンフィラメントの B 端にだけ結合するのか、側面にも結合するのか電子顕微鏡法によって明らかにすること。

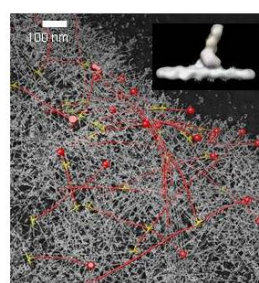
3. 研究の方法

研究目的(1)については、オーストリア Victor Small 研究室と共同で、負染色した細胞の電子線トモグラムの撮影、葉状仮足の部分を解析した。研究目的(2)については、京都大学のグループと共同研究で、ヒスタグ結合型金コロイドを formin に結合させ、負染色法で電子顕微鏡撮影、解析を行った。

4. 研究成果

研究目的(1)についてはめざましい進展があった(図)。界面活性剤で細胞膜を溶かし、染色剤と細胞質を入れ替えて電子線トモグラムを撮影することで、高いコントラストと像質を得ることができ、これを解析することで、抗体を用いずに、アクチンフィラメント網に結合している Arp2/3 複合体の葉状仮足の分布をその構造だけから明らかにした。Arp2/3 複合体の平均構造の決定も 2.9 nm 分解能で行うことができた。また、トモグラム内のアクチンフィラメント構造の解析から、細胞内のそれぞれのアクチンフィラメントのどちらの端が B 端であるのかも決定できた。

現在この手法を用いて、様々な細胞内のアクチンフィラメント網を解析しようとしている。研究目的(2)については、金コロイドの作成が原料の入手困難により大幅に遅れたのだが、最近ようやくフォルミンがアクチンフィラメント端にだけ結合し、側面に結合しないことが明らかになった。



葉状仮足内のアクチンフィラメント網解析。赤がアクチンフィラメントトレース。B端を球で示した。黄色がArp2/3複合体の位置。挿入図は、Arp2/3複合体の平均構造。ミオシンや抗体無しに、蛋白質の構造情報だけから細胞内アクチンフィラメント極性や結合蛋白質位置決定ができたのは初めてのことである。

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 5 件)

1. #*Popp, D., #Narita, A., Lee, L.J., Ghoshdastider, U., Xue, B., Srinivasan, R., Balasubramanian, MK., Tanaka, T., Robinson, RC. (2012) A novel actin-like filament structure from *Clostridium tetani* J. Biol. Chem., accepted (#は equally contributing authors) 査読あり
2. *Narita, A., Mueller, Jan., Vinzenz, M., Small, JV., Maeda, Y. (2012). Direct determination of actin polarity in the cell. J. Mol. Biol., doi:10.1016/j.jmb.2012.03.015 査読有り
3. Vinzenz, M., Nemathova, M., Schur, F., Mueller, J., Narita A., Urban, E., Winkler, C., Schmeiser, C., Koestler, SA., Rottner, K., Resch, GP., Meada, Y., *Small, JV. (2012). Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. J. Cell. Sci., doi:10.1242/jcs.107623 査読有り
4. *Narita A. (2011). Merits of the double-stranded form of the actin filament revealed by structures of the filament ends. Communicative and Integrative biology 4, 692-695 査読有り
5. *Narita A. (2011). Minimum requirements for the actin-like treadmilling motor system. BioArchitecture, 1, 205-208 査読有り

〔学会発表〕(計 19 件、うち招待講演 8 件)

1. 成田 哲博 Single particle analysis for actin filaments and other cytoskeletal filaments 2010 年顕微鏡学会(招待講演) アジア若手シンポジウム 2010/5/23 名古屋国際会議場
2. 成田 哲博 繊維状タンパク質複合体のための単粒子解析法 顕微鏡学会生体構造解析分科会(招待講演) 2010/12/27 湯沢ニューオータニホテル
3. 成田 哲博 大阪大学蛋白質研究所セミナー(招待講演) 2011/2/17 大阪大学蛋白質研究所
4. 成田 哲博 細胞骨格のための単粒子解析法”Single particle analysis for cytoskeletal proteins” 第 11 回日本蛋白質科学会年会(招待講演) 2011/6/7 桜井阪急ホテルパーク(吹田市)
5. Koike M., Narita A., Honma M., Maeda Y. Visualization of Vibrio Na⁺-driven flagellar motor structure embedded in cell membrane 第 49 回日本生物物理学会 2011/9/18 兵庫県立大学(姫路市)
6. Narita A., Muller J., Urban E., Vinzenz M., Small J V., Maeda Y. A structural analysis of actin cytoskeleton in the cell 第 49 回日本生物物理学会 2011/9/16 兵庫県立大学(姫路市)
7. Tanaka K., Kimura-Sakiyama C., Dai Shuheng., Maeda Y., Narita A. High-resolution structural determination of the cofilin-decorated actin filament by single-particle analysis of cryo-electron micrographs 第 49 回日本生物物理学会 2011/9/18 兵庫県立大学(姫路市)
8. Takeda S., Minakata S., Koike R., Kawahata I., Narita A., Kitazawa M., Ota M., Yamakuni T., Maeda Y., Nitani Y. Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation EMBO Lecture Course The 26th. European Cytoskeletal Forum Meeting “Actin-Based Motility” 2011/10/30 Hotel Palma (Stresa, - Lake Maggiore)
9. Tanaka K., Kimura-Sakiyama C., Dai Shuheng., Maeda Y., Narita A. High-Resolution structural determination of the cofilin-decorated actin filament by single-particle analysis of cryo-electron micrographs EMBO Lecture Course The 26th. European Cytoskeletal Forum Meeting “Actin-Based Motility” 2011/10/30 Hotel Palma (Stresa, - Lake Maggiore)
10. 成田 哲博 分子から細胞までをつなぐ繊維状蛋白質複合体構造解析第 2 回神経科学と構造生物学の融合(招待講演) 2011/11/22 岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)
11. Narita A. Structural analysis of the actin filament in vivo and in vitro Joint Seminar Centre for BioImaging Sciences - Structural biology division of Japan EM(招待講演) 2012/1/12 シンガポール国立大学(Singapore)
12. Koike M., Narita A., Homma M., Maeda Y. Structural analysis of Na⁺-driven flagellar motor embedded in the membrane of Vibrio alginolyticus by electron tomography Sensory Transduction in Microorganisms at Grordon Research Conference 2012/1 Ventura Beach Marriott (Ventura)
13. Narita A. Structural analysis of the actin filament network in the cell Direction of future in biological electron microscopy(招待講演) 2012/2/17 東京大学(文京区)
14. Iwasa M., Maeda K., Narita A., Aihara T., Maeda Y., Oda T. Actin Polymerization correlates with the flattening of actin molecule 56th Annual meeting Biophysical Society 2012/2/27 San Diego Convention Center(San Diego)
15. Narita A. Structural analysis of the actin filament in vitro and in vivo International Workshop “from Structure to Dynamics” for Our Understanding of Protein-Protein Interactions 2012/3/17 名古屋大学(名古屋市)
16. Minakata S., Koike M., Narita A., Maeda Y., Usukura J. Spatial structure of cytoskeleton associated with nuclear membrane International Workshop “from Structure to Dynamics” for Our Understanding of Protein-Protein Interactions 2012/3/16 名古屋大学(名古屋市)
17. Koike M., Minakata S. Narita A., Homma M., Usukura J., Maeda Y. Supramolecular structural analysis by STEM electron tomography International Workshop “from Structure to Dynamics” for Our Understanding of Protein-Protein Interactions 2012/3/16 名古屋大学(名古屋市)

18. Dai S., Narita A., Ito T., Akaoka K., Maeda Y. New method for identify the ABP binding sites on the actin filament International Workshop "from Structure to Dynamics" for Our Understanding of Protein-Protein Interactions 2012/3/16 名古屋大学(名古屋市)
19. 成田哲博分子と細胞をつなぐ線維状蛋白質構造解析第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演) 2012/3/28 山梨大学(甲府市)

[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

<http://str.bio.nagoya-u.ac.jp:8080/Plone>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田哲博 (NARITA AKIHIRO)

研究者番号 : 30360613