

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 22 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570200

研究課題名(和文) Fアクチン形成機構の研究

研究課題名(英文) Formation of actin nuclei for polymerization

研究代表者

小田 俊郎 (ODA, Toshiro)

兵庫県立大学・生命理学研究科・研究員

研究者番号：20321739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞には、アクチンが重合・脱重合を繰り返し、それがセミマクロな細胞全体の運動に統合される現象が観察される。この統合に重要な役割を果たしているのが、アクチン結合蛋白質で、特に、重合核形成促進因子は必須である。重合核形成促進因子が、アクチンの自発的重合過程をどのように改変しているかを調べるために、時分割X線小角散乱法で核形成過程を追跡した。その結果、アクチン二量体から四量体に進む過程に大きなエネルギー障壁があり、四量体が核であることが分かった。重合核形成促進因子は、この反応を回避して重合を促進していると思われる。

研究成果の概要(英文)：Actin nucleators generate new actin filaments at proper place and timing in eukaryotic cell. The nucleators are crucial for the cell motility driven by a cycle of polymerization - depolymerization of actin. Arp2/3 complex and formin are famous as a nucleator, and a new type of nucleators has been discovered recently. However, the mechanism for generation of new filament remains elusive. To address the mechanism, it should be important to compare the nucleation of actin alone with the nucleation by nucleator, but the nucleation of actin alone also remains elusive. We studied the nucleation of actin alone by the use of the time resolved X-ray small angle scattering. We found that the step from dimer to tetramer has the largest energetic barrier in the whole polymerization of actin, and that the nucleus is a tetramer. Nucleators appear to evade the step of actin by each strategy.

研究分野：生物物理

キーワード：アクチン 時分割X線小角散乱 核形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞で観察される運動は、モーター蛋白質が関与するものと重合性蛋白質が重合-解離を繰り返し運動を駆動するものに分けられる。後者には、原核生物にも観察される普遍的な運動系で、真核細胞では、アクチン分子の重合-脱重合サイクルによって駆動される仮足運動等がある。この運動では、アクチン結合蛋白質によって、アクチンの重合-脱重合という分子レベルの運動が、細胞全体の変形運動に統合されている。しかし、その詳細は分かっていない。その解明を目指して、アクチンとアクチン結合蛋白質との相互作用の研究が細胞生物学や生化学分野で盛んに行われている。

(2) アクチンが仮足運動を引き起こす際、アクチンはフィラメント(以下Fアクチンと呼ぶ)を形成し、さらに、複数のフィラメントがメッシュ状やバンドル状に高次構造を形成する。この高次構造体は常に崩壊と生成を繰り返し、仮足の押し出し運動などを担う。高次構造体の形成には、必要な時や必要な場所にFアクチンを生み出すことが必要である。この機能を担うものが、重合の基点となる重合核形成因子であり、その重要性は広く認識されている。

(3) 以前から、重合核形成因子として、Arp2/3 複合体やフォルミンが知られていた。2000年以降、スパイアー、コルドン-ブルー、ポップエルなど、新しいタイプの重合核形成因子が発見されている。しかし、これらの重合核形成因子の重合促進メカニズムはよく分かっていない。

2. 研究の目的

以下の4点を研究の目的とした。

(1) 我々は、アクチン単独の重合核形成過程と重合核形成因子の作用とを比較して、重合核形成因子の特徴を明らかにする戦略をとることにした。そのために、アクチン単独の系で、「重合核形成がどのように起こるか」を知ること。

(2) アクチンの重合が核形成と伸長の二段階からなることはよく知られている(核形成-伸長モデル; Kasai & Oosawa)。しかし、核がどのように形成されるかについてはコンセンサスが得られていない。1980年代までは、計算量の削減のために、アクチン単量体と核との平衡を仮定して、核ありきの解析が行われた。2000年ごろから、計算機シミュレーションによる核形成過程の研究や平衡近似を使わない解析も行われた。しかし、結果は必ずしも一致していない。そのような状況に、最終的な結論をだすこと。

(3) さらに、アクチン単独の系を解析することにより、種々の重合核形成促進因子が持つ共通の戦略を見つけること。

(4) Fアクチン不安定化因子がフィラメントに及ぼす構造変化と重合核の不安定性に共通の構造基盤があるか検討すること。

3. 研究の方法

ニワトリのささみから調製した乾燥筋肉よりアクチンを抽出し精製した。低イオン強度溶液(Gバッファーと呼ぶ)にアクチン分子を分散させ、アクチン単量体溶液(以下Gアクチンと呼ぶ)を用意した。まず、X線小角散乱法を用いて、Gアクチンの分散状況を調べた。次に、この溶液に中性塩を添加してアクチンフィラメントを形成させ、その散乱パターン等を計測した。さらに、ストップフロー混合装置を用いて中性塩溶液とGアクチン溶液とを混合して重合を開始させ、時分割X線小角散乱法を用いて重合過程を追跡した。得られた時分割データを、特異値解析や赤池情報量規準を用いて解析し、重合に係わる中間体の個数を推定した。その結果をもとに、時分割データを、重合反応モデルを用いて解析した。X線小角散乱測定はSPring-8のX線小角散乱用理研ビームラインBL45で行った。検出器にはフォトンカウント型であるPILATUSを用いた。この使用は散乱データの信頼性を高めた。

4. 研究成果

(1) 低イオン強度溶液中のアクチン分子

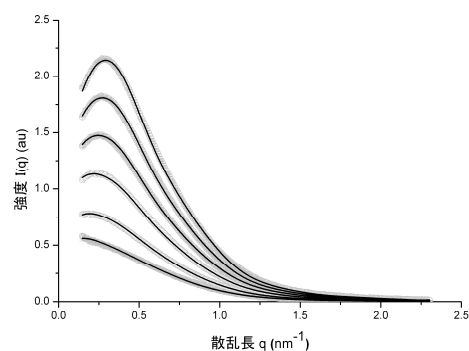


図1

図1にGアクチン溶液から得られたX線小角散乱曲線を示す。横軸は散乱ベクトル長 q で縦軸は散乱強度 $I(q)$ で、下から順に0.98, 1.47, 2.21, 2.94, 3.68 and 4.41 mg/mlで測定された散乱曲線である。この散乱曲線の特徴は、散乱ベクトル長 q が短い領域で散乱強度の低下を示したことである。この散乱強度の低下はアクチン濃度が高いほど顕著に観察された。この特徴は液体からの散乱曲線にも現れるもので、粒子間の干渉効果に起因すると考えられる。したがって、濃度を0に外挿してやれば、実質的に干渉効果が消せると考えられる。このようにして得られた散乱

曲線からギニエプロット(挿入図)を作成して分子量を見積もったところ、41.4kDa となった。これはアクチンの組成から考えられる値より僅かに小さいが、G アクチンが単量体で存在することを示唆している。各濃度の散乱曲線からギニエプロットを用いて $q=0$ に外挿された散乱強度 $I(0)$ を求め、第 2 ビリアル係数を見積もると正になるので、アクチン分子間に斥力が働いていることが分かった。さらに、アクチン分子同士が接近できる最小距離を干渉ピークの濃度依存性から見積もると 10.6 nm となった。アクチンを 3nm の球とすると、アクチン分子の表面間は約 5nm まで接近できることになる。これは、アクチン溶液のイオン強度から計算されるデバイ半径に匹敵する。したがって、アクチン分子まわりのイオン雰囲気同士が接触し、アクチン間の反発力が発生したと解釈できる。まとめると、G アクチンは低イオン強度溶液で調製されるため、表面電荷に遠因した反発力が分子間に働き、単量体状態で分散している。

(2) 中性塩を混合直後のアクチン分子

本研究では、G アクチン溶液と中性塩溶液を混合して重合を開始させる。まず、中性塩を混合した直後のアクチンの状態を調べた。G アクチン溶液と 200mM KCl 溶液を等量混合させると、G アクチン溶液の特徴である、散乱ベクトル長が短い領域で観察される散乱強度の低下が消失した。この消失は速く、0.01 秒ごとの測定では中間体を観測することはできなかった。また、時折、散乱ベクトル長が短い領域で散乱曲線が上向きに曲がる傾向も見られた。ギニエプロットの直線領域から見積もられる慣性半径は 24.3 nm で、G アクチン溶液から得られたもの(24.1 nm)とほぼ一致した。また、この直線領域から外挿した $I(0)$ は、G アクチン溶液と G バッファとを混合して得られた $I(0)$ とほぼ一致した。 $I(0)$ は観測された粒子の分子量に比例する。このことから、中性塩混合直後、速やかにアクチン分子間に働く反発力は消失し、アクチン分子は単量体で溶液内に分散していると考えられる。

(3) F アクチン形成までの重合過程

図 2 は F アクチンの形成過程を追跡した散乱曲線である。この実験条件では約 20 秒で散乱曲線の変化は見られなくなった。変化しなくなった散乱曲線は 1.05 nm^{-1} に谷と $q = 1.13 \text{ nm}^{-1}$ から $q = 1.36 \text{ nm}^{-1}$ にかけての山を持ち、F アクチンの特徴と一致している。つまり、中性塩混合後 20 秒で F アクチン形成はほぼ終了したことになる。この重合に伴う散乱曲線の変化の特徴は $q = 0.647 \text{ nm}^{-1}$ で交差していること、つまり、等散乱点を持つことである。この散乱曲線を並べた行列を作り、特異値解析を行った。意味ある大きさの特異値が 3 つ見つかり、この重合過程には少なくとも 3 つの成分が係わっていることを分か

った。これは、G アクチンと F アクチン以外に、反応中間体が存在することを示唆する。

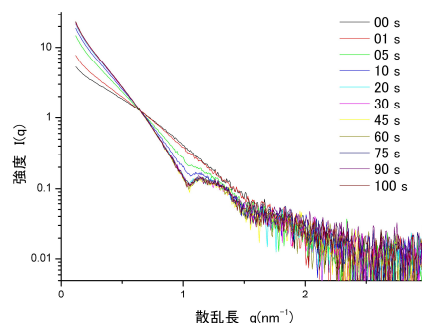


図 2

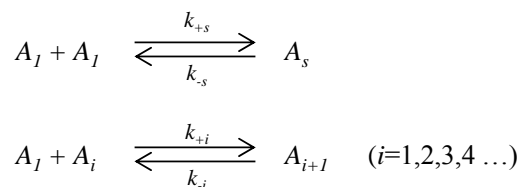
(4) 重合初期過程

アクチン重合体からの散乱強度は、構成する各アクチン分子からの散乱項とアクチン分子間の干渉項に分けて表すことができる。前項はアクチン分子 1 個当たりで見れば不変であり、干渉項は重合体で変化する。G アクチンと F アクチンの散乱曲線が交差する点では、F アクチンに含まれるアクチン分子がある周期性を持ち、その干渉効果によって、干渉項がゼロになる必要がある。その交点で中間体の散乱曲線も交差するので(前述)、F アクチンと反応中間体は同じ周期性を持ち、干渉項がゼロになる必要がある。つまり、反応中間体として、F アクチン様にアクチン分子が並んでいる重合体、つまり、らせん状重合体を考えれば十分である。

低温にして重合反応を遅くし、重合初期過程の散乱曲線を時分割測定した。得られた散乱曲線を、G アクチン、2 種類の二量体、三量体から七量体、F アクチンから、可能な組み合わせを作りでフィットして、赤池情報量基準を計算した($2^9 - 1 = 511$)。この赤池情報量基準は、データを記述するために必要最低限の組み合わせを求める方法である。この解析から、重合初期では 2 量体と G アクチン、重合が進むと G アクチンと F アクチンで散乱曲線を記述できることが分かった。

(6) アクチンの重合モデル

以下のようなアクチン重合の反応モデルを用いて重合初期過程の散乱曲線シリーズを解析した。このモデルでは行き止まりの 2 量体 (A_2) と F アクチンまで進む二量体 (A_2)、2 種類の二量体が散乱曲線に寄与しているモデルである。



時分割散乱曲線にフィットすることにより速度定数を求めた。G アクチン濃度を $30 \mu\text{M}$ で一

定とみなし、G アクチンを基準として各反応中間体の見かけの自由エネルギー (g_i) を計算した。三量体のエネルギーレベルは一意に決まらず、取りうる範囲として評価できるだけであったが、四量体のレベルはそれに依存せず決定できた。得られたエネルギーダイアグラムの一例を下に示す。四量体のエネルギーレベルが最も高く、四量体で核形成から伸長に変わることを示している。

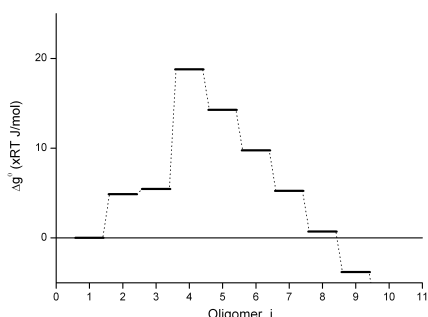
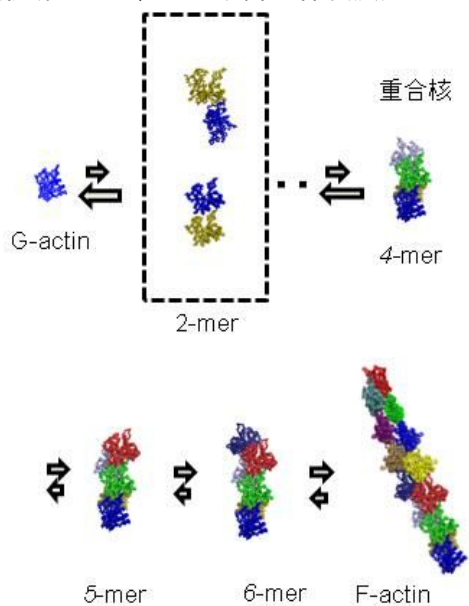


図 3

(7) 重合の反応機構

中性塩の混合により、アクチン分子が衝突できるようになり、二量体を形成する。これまでの研究によれば、この二量体は多様であり、F アクチンに伸長する二量体もあるが、行き止まりになる二量体もある。二量体から四量体に行く過程に、大きなエネルギー障壁があり、四量体を形成しても二量体に戻ってしまう。偶然、五量体まで伸長すると、伸長が主になる。二量体から四量体を形成する過程が核形成であり、それ以降が伸長反応である。



伸長
図 4

(8) 重合核形成促進因子

得られた結果は、ただ集合したアクチン 3 量

体から、新しいアクチン分子を F アクチン様に受け入れることができる端を形成するために、大きなエネルギーが必要であると解釈できるであろう。核形成促進因子は、そのような端を二つの方策で形成すると思われる。因子がアクチンを二分子結合して複合体を形成し、G アクチンをリクルートしてらせんに対応した端を作る。Apr2/3 複合体やフォルミンの重合核形成促進過程を検討する際、アクチンと形成する複合体の端を丹念に観察することが必要であろう。

(9) まとめ

ここで述べたアクチンの重合核形成スキームは、核形成促進因子の研究のベースとなるであろう。さらに、個別に行われてきた核形成促進因子を総合的に俯瞰することにも役立つであろう。

<引用文献>

F. Oosawa & M. Kasai (1962) A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J. Mol. Biol.* 4, 10-21

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. M. Iwasa, T. Aihara, K. Maeda, A. Narita, Y. Maéda, and T. Oda (2012) Role of the actin ala-108-pro-112 loop in actin polymerization and ATPase activities. *J Biol Chem* 287, 52: 43270- 43276 DOI : 10.1074/jbc.M112.392019 査読あり

2. T. Aihara, and T. Oda (2013) Cooperative and Non-cooperative conformational changes of F-actin induced by cofilin. *BBRC* 435: 229-233 DOI:10.1016/j.bbrc.2013.04.976 査読あり

[学会発表](計 6 件)

1. T.Oda (2013) Formation of F-actin. The 1st Awaji International Workshop on Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Application 淡路夢舞台(淡路、兵庫) 2013年 6月 17日

2. T. Oda (2013) Nucleation of actin polymerization detected by the small angle X-ray scattering. A "Koki" symposium to Honor Emeritus Professor Katsuzo Wakabayashi 千里阪急ホテル(豊中、大阪) 2013年 6月 1日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田俊郎 (ODA, Toshiro)
兵庫県立大学理学部生命理学科 研究員
研究者番号：20321739

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

相原朋樹 (AIHARA, tomoki)
理化学研究所放射光科学総合研究センター
研究員
(現) GE Healthcare Japan Corporation
HyClone Cell Culture
研究者番号：70455327

(4) 研究協力者

若林克三 (WAKABAYASHI, Katsuzo)
大阪大学 名誉教授