

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02410

研究課題名(和文) クライオ電子顕微鏡法と少数構造生物学によるアクチン線維動態の構造的理解

研究課題名(英文) Understanding dynamics of the actin filament using cryoEM and structural determination from a small number of images

研究代表者

成田 哲博(Narita, Akihiro)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30360613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン分子と1:1で結合する蛋白質や、アクチン線維そのものの高分解能構造解析はすすんでいるが、アクチン線維と異なる対称性を持つアクチン線維結合タンパク質については、解析が進んでいなかった。本研究では、そのような対象の1つであるアクチン線維端を従来の3倍の分解能(8 Å)で成功。現在論文執筆中である。また、負染色像と走査透過型電子顕微鏡法を組み合わせることで、少ない像から線維の性質を解析することができるようになり、それをういて3つの論文を発表した。加えて、走査透過型電子顕微鏡を用いた構造解析法についても、現在論文執筆中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析はめざましい発展を遂げたが、線維端やローカルな構造変化など、像の数を集めるのが難しい対象に対しては構造解析が進んでいない。この研究は、そのような難しい対象を構造解析のターゲットに取り込む研究であり、アクチン線維端について成功を収めた。また、少数の像から構造情報を取り出す技術を発展させることに成功、いくつかの論文を発表した。従来の高分解能構造解析とは異なる方向から、構造生物学の領域を広げることにも貢献できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：High-resolution structural analysis of proteins that bind to actin molecules 1:1 and actin filaments themselves has progressed, but analysis of actin fiber-binding proteins that have symmetry different from that of actin filaments remained to be done. In this study, we succeeded in one such target, the actin filament end, at 8 angstroms, three times higher than conventional one. In addition, by combining negatively stained images and scanning transmission electron microscopy, it became possible to analyze the properties of filaments from a small number of images, and three papers were published using this.

研究分野：生物物理

キーワード：電子顕微鏡 アクチン線維 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アクチン線維は細胞を動かし、細胞を繋ぎ、細胞の形をつくる。その多様な役割を果たすために、アクチン線維は様々な結合蛋白質によってその形成、分解のタイミング、線維間結合による超構造の様態などが厳密に制御されている。アクチン線維に対し、アクチン分子と 1:1 で結合する蛋白質や、アクチン線維そのものの高分解能構造解析はすすんでいるが、フィラメント端や、コフィリンクラスター境界、アクチン線維上のトロポニン-トロポミオシンなど、アクチン線維と異なる対称性を持つアクチン線維結合タンパク質については、解析が進んでいなかった。

2. 研究の目的

アクチン線維のらせん対称成と異なる対称性を持つアクチン線維結合タンパク質や、アクチン線維端について、比較的少ない像から構造解析を行う手法を確立する。とくに、現在主流として使われている画像解析プログラムである、relion や cryosparc では解析が難しいものを対象にする。

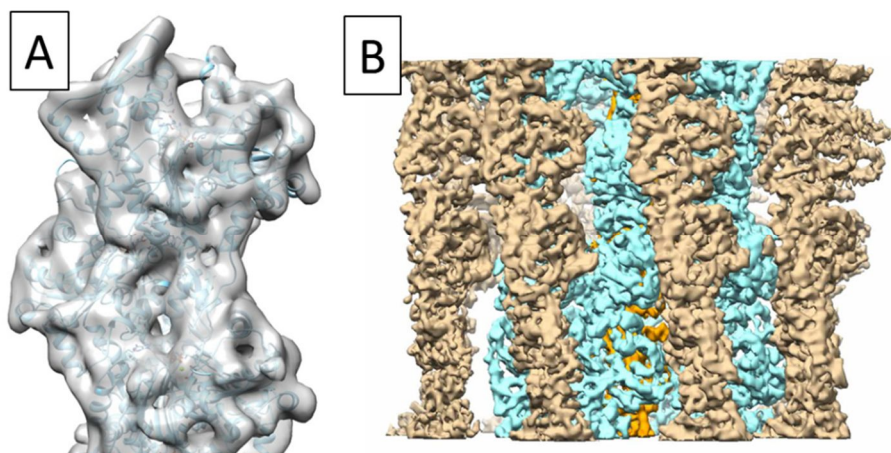
3. 研究の方法

まず、像の歪みが少ない走査透過型電子顕微鏡と負染色像を組み合わせ、少数の像から構造解析を行い、それをモデルにクライオ電子顕微鏡構造解析を行う。この際、独自の画像解析技術と、現在の標準としてクライオ電子顕微鏡法において使われている relion を組み合わせる。

4. 研究成果

Relion と独自の画像解析技術を組み合わせることで、アクチン線維端の構造解析を従来の 3 倍の分解能(8 Å) で成功。新たに得られた結晶構造と組み合わせ、現在論文執筆中である(図 A)。また、負染色像と走査透過型電子顕微鏡法を組み合わせることで、少ない像から線維の性質を解析することができるようになり、対称性が非常に複雑な線維構造に対して、初期構造を得るのに使用するなど(図 B, Koh et al., 2019)、3 つの論文で使われている[1-3]。加えて、走査透過型電子顕微鏡を用いた構造解析法についても、現在論文執筆中である。

また、この技術を使いフランス、シンガポール、フィンランドとの共同研究を開始、シンガポールのグループとは論文執筆中、フィンランドのグループとの共同研究は、残念



ながらコロナの関係で中途半端になってしまったが、Abris Bendes の博士論文として発表された。

[1] Koh F, Narita A, Lee LJ, Tanaka K, Tan YZ, Dandey VP, et al. The structure of a 15-stranded actin-like filament from *Clostridium botulinum*. *Nature communications*. 2019;10:2856.

[2] Narita A. ADF/cofilin regulation from a structural viewpoint. *Journal of muscle research and cell motility*. 2020;41:141-51.

[3] Matsuzaki M, Fujiwara I, Kashima S, Matsumoto T, Oda T, Hayashi M, et al. D-Loop Mutation G42A/G46A Decreases Actin Dynamics. *Biomolecules*. 2020;10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuzaki Mizuki, Fujiwara Ikuko, Kashima Sae, Matsumoto Tomoharu, Oda Toshiro, Hayashi Masahito, Maeda Kayo, Takiguchi Kingo, Ma?da Yuichiro, Narita Akihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 D-Loop Mutation G42A/G46A Decreases Actin Dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 736 ~ 736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050736	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 -

1. 著者名 Narita Akihiro	4. 巻 41
2. 論文標題 ADF/cofilin regulation from a structural viewpoint	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility	6. 最初と最後の頁 141 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-019-09546-6	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 Koh Fujiet, Narita Akihiro, Lee Lin Jie, Tanaka Kotaro, Tan Yong Zi, Dandey Venkata P., Popp David, Robinson Robert C.	4. 巻 10
2. 論文標題 The structure of a 15-stranded actin-like filament from Clostridium botulinum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10779-9	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 7件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Azuma J., Nagakubo Y., Tamba Y., Sato H., Sunaoshi T., Tamochi R., Ose Y., Uuskura J., Narita A., Matsumoto T., Usukura E., Osumi M.:
2. 発表標題 Development of cryo-electron microscope for simultaneous STEM, SEM imaging
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 アクチン線維構造解析と新しい電子顕微鏡法
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 アクチン線維および関連タンパク質のクライオ電子顕微鏡法による高分解能構造解析
3. 学会等名 岐阜構造生物学・医学・論理的創薬シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 アクチン線維および関連タンパク質の高分解能構造解析
3. 学会等名 構造生物学研究会 大阪大学（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 High resolution structural analysis of the actin filaments and actin related proteins
3. 学会等名 "Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen Preparation Techniques"（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 Structural and functional comparison between action filament and ParM filaments
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 アクチン線維構造と運動マシナリー
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成田哲博
2. 発表標題 細胞運動のしくみ解明に挑戦する構造生物学 ～アクチン線維の精密解析～
3. 学会等名 未来に挑戦する構造生物科学（招待講演）
4. 発表年 2020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

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			
フランス	Institut Curie			
シンガポール	A*STAR	National University of Singapore		
フィンランド	University of OULU			