

自己評価報告書

平成23年 5月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20227008

研究課題名(和文)

アクチンフィラメントの構造と動態：特にカルシウム調節のメカニズムの解明

研究課題名(英文)

Structure and dynamics of actin filament complex:
mechanism of calcium regulation of muscle contraction

研究代表者

前田 雄一郎 (MAEDA YUICHIRO)

名古屋大学・理学研究科・教授 研究者番号：10321811

研究分野： 構造生理学、生物物理学

科研費の分科・細目： 生物物理学、構造生物化学

キーワード： 蛋白質の構造・動態・機能、NMR、X線結晶解析、高分解能電子顕微鏡解析

1. 研究計画の概要

アクチンは筋収縮とその調節を担う。また重合・脱重合に駆動されるトレッドミリングの分子運動を介して多くの細胞機能を担う。本研究では、構造および構造動態を、細胞内・複合体レベル・分子内の3階層で解明し、それを基礎にアクチンとその結合蛋白質の離合・集散のメカニズムを解明する。それによって蛋白質分子の相互作用一般の理解を深めることを目標とする。

アクチン研究では構造解明は遅れていた。アクチン重合体は線維状の重合体を形成するため結晶を形成せず、X線結晶構造解析を使えない。細くて柔らかいため電子顕微鏡画像解析にも困難がある。また適当な発現系もなかった。私たちは長年かけて、本研究開始時までには新規方法を開発して上記技術的困難を基本的には解決していた。本研究ではそれら方法を活用して、メカニズムの解明をめざしている。

2. 研究の進捗状況

(1)すでに私たちはトロポニンの結晶構造を解明している(2003, *Nature*)。本研究でトロポミオシン⁴とアクチン重合体³(次項)の高分解能構造を解明した。これにより、筋肉「細いフィラメント」複合体を構成するすべての蛋白質の構造を解明した。これら単体の構造は今後解明する複合体の構造を解釈する上で欠かせない。

(2)アクチンは単量体の結晶構造は既知であるが重合体の構造は未知であった。私たちはアクチン重合体の高濃度・高配向ゾルを調製しそのX線繊維回折強度を基に独自の構造解析法を開発することによって重合体の高分解能構造を解明した³。本研究では、アクチン重合には大き

な形態変化(G型からF型)が伴うことを初めて発見した。この変形はアクチン重合体の生理機能を理解する上で極めて重要である。F型は不安定であり一分子ではこの状態に存在できないが、重合体内での分子間結合のため存在できるようになる。F型の分子には歪みのエネルギーが貯まっており、そのために崩壊(脱重合)しやすい。また結合が局所的に破綻するとアクチン重合体が柔らかくなる。

(3)F型のアクチンは内部エネルギーが高いが、このエネルギーはATP加水分解に由来するのではなく、アクチン重合そのものに由来する⁵。ATP加水分解はむしろ変形の結果起きる。すなわち物理的変形が化学反応を引き起こす。

(4)アクチン重合体P端の構造を初めて解明した¹。これには独自に開発したクライオ電子顕微鏡写真の画像解析法を適用した。先端のアクチン分子が傾くため次の分子との間に新規のループ・ループ結合が形成される。この結合はP端でのアクチン分子の重合・脱重合反応のkinetic barrierとなり、反応速度はB端に比して双方向とも一桁遅くなる。これこそトレッドミリングがB端方向に走行する理由である。蛋白質相互作用によって駆動される一方向運動系にはアクチン・ミオシン、微小管・キネシンなど数多くあるが、本研究は運動方向決定のメカニズムを解明した最初である。

(5)CP(キャッピング蛋白質)はアクチン重合体のB端に結合して、B端での重合と脱重合を阻害する。CPはトレッドミリングに必須の蛋白質の一つである。本研究では、CPとその調節蛋白質との複合体の結晶構造複数を解明した²。CARMILペプチドはCPに結合し、CPをアクチン重合体B端から解離させる。CARMILペプチドはCPをアロステリックに調節するが、それは従

来から知られた形態変化を介したタイプではなく、CPを「硬くする」ことによってB端から解離させる。このことは、アクチンB端側の「硬さ」もCP/B端結合の強さに大きく影響することを意味する。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

理由: カルシウム調節のメカニズム理解の基礎となる研究でも(1)(2)の大きな成果があった。これらは国際的にも高く評価され、いくつかの国際的研究集会で招待講演を行った。他方トレッドミリングのメカニズム解明の研究は、予想外に大きく展開した((2)~(5)他の成果)。

これらの成果は蛋白質相互作用という現代の自然認識の1つの最前線で、新しい概念を提起している点で重要である。

4. 今後の研究の推進方策

アクチンの理解を深めることは、一般細胞でのトレッドミリングのメカニズムと、筋でのアクチンフィラメントの作動原理理解とを共に利する。

(1)(複合体構造) 筋肉「細いフィラメント」=アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体全体の構造を解明する。

(2)(複合体構造) アクチン・トレッドミリングの核形成促進因子である Arp2/3 が「最初の」アクチン分子をF型に変形する過程を解明する。そのために N-WASP +Arp2/3+アクチンの結晶構造を解明する。

(3)(複合体構造) 本研究からアクチン分子の分子間結合は主に分子の表面ループ同士の結合であることがわかった。この種の相互作用は各分子の位置の揺れに追従できる「しなやかさ」があろう。よって脱重合のためには複数のループ・ループ間結合を同時に解除する必要がある。脱重合促進因子であるコフィリンはこれをどのようなメカニズムで遂行するかを解明するため、コフィリンが結合したアクチン重合体の構造を得る。

(4)(分子内構造動態) 本研究からCPが硬くなるとアクチン重合体への結合が弱くなると推察された。これを証明するために、実際にCPの「柔らかさ」を計測する。SAIL-TyrとSAIL-Pheを使って芳香環の回転を計測し、CARMILペプチドの結合の影響を調べる。また、この手法を応用し、トロポニンの構造動態を測定する。

(5)(細胞内) 細胞内の膜の直下からアクチンがどのように重合されるかを理解するために、膜・アクチン重合体接合部の構造を解明する。生きた細胞に「パッと壊してパッと洗う」処理をした試料、ないしは適当な試験管内再構成系に電子線トモグラフィ法を適用する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件) *査読有

1. Narita, A., Oda, T., and Maeda, Y. (2011) Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end, *EMBO J.**
2. Takeda, S., Minakata, S., Koike, R., Kawahata, I., Narita, A., Kitazawa, M., Ota, M., Yamakuni, T., Maeda, Y., and Nitani, Y. (2010) Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation--steric and allosteric inhibition, *PLoS Biol* 8, e1000416.*
3. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y., and Narita, A. (2009) The nature of the globular- to fibrous-actin transition, *Nature* 457, 441-445.*
4. Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Wakabayashi, K., Nitani, Y., and Maeda, Y. (2008) Two-crystal structures of tropomyosin C-terminal fragment 176-273: exposure of the hydrophobic core to the solvent destabilizes the tropomyosin molecule, *Biophys J* 95, 710-719.*
5. Iwasa, M., Maeda, K., Narita, A., Maeda, Y., and Oda, T. (2008) Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle alpha-actin mutants, *J Biol Chem* 283, 21045-21053.*

[学会発表] (国際 23 件、国内 17 件)

以下、主な国際学会の招待講演:

1. Narita A "Single particle analysis for actin filaments and other cytoskeletal filaments."顕微鏡学会アジア若手シンポジウム 名古屋国際会議場 2011.5.23
2. Maéda Y, et al "High resolution structure and basic properties of F-actin" International Union of Physiological Sciences (IUPS), Kyoto, International Conference Hall. 29 July, 2009,
3. Maéda Y, "Towards understanding the basic properties of F-actin" Biochemical Interactions: from molecules to Function" April 23, 2009, Velen (Münsterland), Germany
4. Maéda Y. "The Nature of G-to F-actin translation" Gordon Research Conferences on "Muscle and molecular motors" New London NH., USA July 2, 2008,

[図書] (計 1 件)

前田雄一郎、小田俊郎「細胞運動のメカニズム」現代生物科学入門3、構造機能生物学、第2章(47-109)、岩波書店、2011年

[その他]

2008 文部科学大臣表彰・若手科学者賞(成田)

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