

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 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370061

研究課題名（和文）アクチンフィラメントの構造多型と機能分化

研究課題名（英文）Structural polymorphism and functional differentiation of actin filaments

研究代表者

上田 太郎（UYEDA TARO）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・部門付

研究者番号：90356551

研究成果の概要（和文）：われわれは、アクチンフィラメントが様々な異なった原子構造をとることにより異なったアクチン結合タンパク質と相互作用し、異なった機能を果たすことができるという仮説の検証を試みた。その結果、張力によりらせんピッチが伸びたアクチンフィラメントはミオシン II と相互作用しやすいこと、および、ミオシン II とコフィリンという異なるアクチン結合タンパク質をアクチンフィラメントと共存させると、結合部位が競合しないにもかかわらず、両者はそれぞれ相互排他的にアクチンフィラメントと結合することを見出した。これらはいずれも上記仮説を支持する結果である。

研究成果の概要（英文）：The goal of this project is to understand how different actin filaments within a cell perform different functions. We found that stretched actin filaments with a longer helical pitch have higher affinity for myosin II. We also found that myosin II and cofilin, two major actin binding proteins, bound to actin filaments in a mutually exclusive manner, even though the two proteins do not compete for a binding site on actin. These results support our hypothesis that actin filaments of different atomic structures have different affinities for different actin binding proteins, leading to functional differentiation within cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：アクチンフィラメント、ミオシン、コフィリン、協同的結合、張力、メカノセンサー、細胞極性

1. 研究開始当初の背景

アクチンは真核細胞でもっとも高度に保存されたタンパク質の一つであり、その重合体であるアクチンフィラメントは、細胞運動

や細胞内物質輸送等のさまざまな現象で非常に重要な機能を果たしている。たとえば、運動中の細胞性粘菌アメーバでは、前部において Arp2/3 依存性の樹状アクチンフィラメ

ントの伸張が仮足の先端を前方に押しだし、一方、後部ではメッシュ状のアクチンフィラメントがミオシン II と相互作用して後端の収縮と基質からの脱着を駆動する (図 1)。

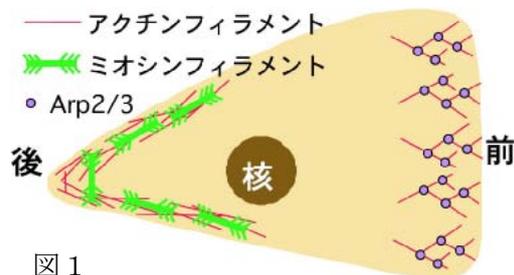


図 1

このように、細胞内にはアクチンフィラメントを主成分とする多様な細胞骨格系が共存し、それぞれ特異的な機能を果たしている。それでは、こうしたアクチンフィラメントの機能分化はどのように達成されるのだろうか。

一般には、相互作用するタンパク質の差異がアクチンフィラメントの機能の差異の原因と考えられている。たとえば細胞前部のアクチンフィラメントは Arp2/3 依存的に樹状構造を形成し、 α アクチニンにより架橋され、コフィリンにより脱重合する。一方後部のアクチンメッシュワークには、ミオシン II フィラメントの他、フィラミンなどのアクチン結合タンパク質が結合している。したがってこれらアクチン結合タンパク質がアクチンフィラメントの機能を規定していると考えるのは自然である。それでは議論をさらに一歩進めて、こうしたアクチン結合タンパク質の差異は何に起因するのだろうか。細胞前部のアクチンフィラメントは樹状であり、後部ではメッシュワーク状であるから、アクチン結合タンパク質はそうしたフィラメントの高次構造を認識している可能性がある。しかし α アクチニンとフィラミンのアクチン結合ドメインだけでもそれぞれ細胞の前後に局在するので、たとえば棒状の 2 量体である α アクチニンが、樹状構造と特に親和性が高いといった説明は成り立たない (Washington and Knecht, 2008)。あるいは、細胞の前後を規定する別の因子、たとえば PIP_3 や活性化 rho タンパク質が個別のアクチン結合タンパク質を制御している可能性もあり、活性化 $\text{cdc42} \rightarrow \text{WASP} \rightarrow \text{Arp2/3}$ のようにそうした反応経路が実証されているケースもある。しかしミオシン II のようにそうした反応経路が見つからないアクチン結合タンパク質も多く、アクチンフィラメントの機能分化メカニズムの全体像は未解明である。

一方われわれは、精製アクチンフィラメントと微量の HMM (ミオシン II の可溶性断片) を ATP 存在下、*in vitro* で混合すると、HMM が疎に結合したフィラメントと全く結合しないフィラメントが共存することを見いだした (図 2 A, B: Tokuraku et al., 2009)。

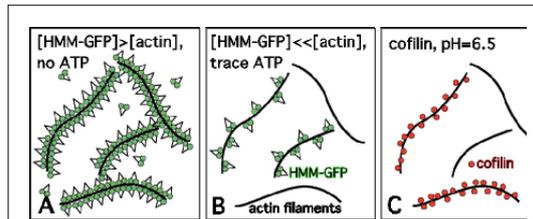


図 2. ATP 存在下、HMM はアクチンフィラメントに協同的に結合する (B)。このときの結合密度は、full decoration (A) の数分の一程度である。コフィリンとアクチンフィラメントの結合も同様に協同的で、結合したフィラメントと結合していないフィラメントが共存する (C)。

この結果は、アクチンフィラメントには HMM に対する親和性が異なる (少なくとも) 二つの構造があることを示唆している。一方コフィリンとアクチンの結合も協同的であり (図 2 C: Galkin et al., 2001)、コフィリン結合がアクチンミオシン相互作用を阻害することも知られている (Nishida et al., 1984)。これらの事実は一つの魅力的な仮説を提示する。すなわち、細胞前部に特徴的なアクチン結合タンパク質であるコフィリンや α アクチニン (以後、これらを「前型アクチン結合タンパク質」とよぶ) と、細胞後部に特徴的なアクチン結合タンパク質であるミオシン II やフィラミン (「後型アクチン結合タンパク質」とよぶ) の一部は、それぞれアクチンフィラメントの構造を「前型」と「後型」に変換し (樹状や網目状、バンドル状などフィラメント同士の関係性の変化ではなく、サブユニット内の原子座標の変化を伴うような構造変化)、そうした構造変化がさらに前型あるいは後型アクチン結合タンパク質との親和性を増すというポジティブフィードバックを介して前後の極性を安定化するのではないかという仮説である (仮説 1: 特定のアクチン結合タンパク質がアクチンフィラメントと最初に結合するきっかけとしては、前述のような別因子による制御や確率的な揺らぎが想定されるが、それはこの仮説の範囲外とする)。実際、電子顕微鏡観察などによりアクチンフィラメントには構造多型があることが確立しており (Egelman and Orlova, 1995)、特にコフィリンの結合はフィラメントのピッチを短くすること (McGough et al., 1999)、ミオシン II 結合

が標識アクチンフィラメントの蛍光を消光すること (Kouyama and Mihashi, 1981) など知られている。

この仮説は、細胞前後における機械的環境の差異と関連づけることも可能である。細胞前部では、アクチンフィラメントの重合が仮足前端を押し出すため、それぞれのフィラメントには圧縮力がかかっている。これに対して細胞後部ではアクチンミオシン系が収縮するため、各々のフィラメントには張力がかかっていると推測される。一方、極性を失って運動を停止した魚のケラトサイトの一部に物理的変形を加えると、変形部位にミオシン II が集積して後部となり、一方向性運動を開始する (Verkhovskiy et al., 1999)。また細胞性粘菌の表層を微小なアスピレータで吸いこむと、その部位にミオシン II が集積し局所的に収縮してアスピレータから這い出すこと (Merkel et al., 2000) も知られている。特に後者の現象においては、祐村恵彦・山口大学教授 (研究協力者) が張力センサーの実体に関する予備的な探索を行い、Gd 感受性の stretch-activated チャネルやミオシン II 自体のモーター活性はミオシン II の集積に不必要であることを示した (祐村、私信)。その結果、アクチンフィラメント自身が張力センサーではないかという可能性が示唆された。この仮説に基づく、外力により引っ張られたアクチンフィラメントは、前型アクチン結合タンパク質との親和性が下がる一方、ミオシン II などの後型アクチン結合タンパク質との親和性が高い状態となり、ミオシン II 結合による内在性の張力発生がさらに高張力状態へ導いて前後軸が確立されるという考え方 (仮説 2) につながる。名大の曾我部らはアクチンフィラメントに張力を加えるとコフィリンで切断されにくくなると報告しており (早川ら、生物物理学会年第 43 回年会、2005)、これは仮説 2 を強く支持する結果である。

2. 研究の目的

そこで本研究は、関連する以下の二つの点を明らかにすることを目的とする。

(1) 異なる構造のアクチンフィラメントはそれぞれ異なるアクチン結合タンパク質と結合しやすく、その結果、細胞内で異なる機能を果たすようになる

(2) 張力負荷がアクチンフィラメントのらせんピッチを伸ばすことが知られているので、そうした力学的刺激によるアクチンフィラメントの構造変化が、相互作用タンパク質を変化させるか否かについても検討を行う。

3. 研究の方法

上記の二つの目的に合わせて、三つの実験を行った。

(1) ミオシン II のモータードメイン (既出の HMM は二量体のモータードメインで、単頭のもは S1 とよぶ) とコフィリンという細胞内局在が異なる代表的なアクチン結合タンパク質を選び、これら二つのタンパク質とアクチンフィラメントが共存するときに、それぞれがどのようにアクチンフィラメントと結合するかを評価する。具体的には以下の二つの方法をとる。

① 蛍光顕微鏡法: 緑色蛍光タンパク質 GFP で標識した HMM と、赤色蛍光タンパク質 mCherry で標識したコフィリンを調製する。これらを単独で過剰のアクチンフィラメントと混合すると、それぞれのアクチン結合タンパク質が結合したフィラメントと、ほとんど結合していないフィラメントが共存する (図 2: 協同的結合) ことが知られており、これは、それぞれのアクチン結合タンパク質がアクチンフィラメントに特徴的な構造変化を引き起こし、その結果、より多くの同種アクチン結合タンパク質が結合するためだと解釈されている。そこで、GFP-HMM と mCherry-cofilin が共存したときに、二つの蛍光タンパク質がそれぞれ異なるアクチンフィラメントに結合するか (排他的協同性)、同じフィラメントに結合するか (協同的な協同性)、あるいはそれぞれ独立に協同的に結合するかを蛍光顕微鏡で観察する。

② 共沈法: S1 とコフィリンは、相互排他的にアクチンフィラメントと結合すると予想されるが、これが単なる結合部位の競合に起因するのでは意味がない。そこで、われわれ独自の acto-S1 融合タンパク質 (Yokoyama et al., 2002) と正常アクチンの共重合フィラメントを調製し、フィラメント中の正常アクチンと S1 やコフィリンの結合が共重合によりどのように変化するかを超遠心共沈法によりアッセイする。逆に、cofilin-actin 融合タンパク質を新たに作製し、これと正常アクチンとの共重合フィラメントを調製して、この正常アクチンと S1 およびコフィリンとの親和性も共沈法で検討する。これにより、S1 またはコフィリンが結合したアクチンサブユニットが、同じフィラメント中の周辺のサブユニットの構造を変化させ、それによって S1 やコフィリンに対する親和性が変化したかどうかを評価することができる。

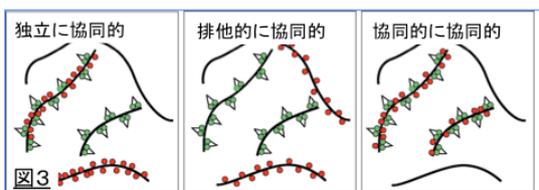
(2) ミオシン II がアクチンフィラメントと結合すると張力が発生する。また S1 の結合は、張力負荷と同様、アクチンフィラメントのらせんピッチを伸ばすことが知られており、張力負荷されたアクチンフィラメントは

ミオシン II との親和性が強くなると予想される。そこで本研究当初は、*in vitro* でアクチンフィラメントに張力を負荷し、それによって S1 の結合が増加することを直接可視化する予定であったが、諸般の事情によりこの実験は困難となった。そこで、細胞内で張力が負荷されていると予想されるアクチンフィラメントと圧縮力が負荷されていると予想されるアクチンフィラメントに着目し、発現した GFP-S1 がそれぞれのアクチンフィラメントとどの程度結合するかを観察することにした。ただ野生型の S1 は ATP 存在下ではほとんどアクチンフィラメントと結合しないので、これまでに蓄積した変異 S1 からアクチンフィラメントに対する親和性の強いものを選び、これと GFP の融合タンパク質（すなわち、アクチンフィラメントのミオシン II 親和性プローブ）を発現させて観察することとした。

4. 研究成果

(1) アクチン結合タンパク質によるアクチンフィラメントの構造変化と、それによるアクチン結合タンパク質の親和性変化。

① 0.1 μM ATP 存在下で GFP-HMM と mCherry-cofilin を過剰のアクチンフィラメントと混合したところ、GFP 蛍光により染められるフィラメントと、mCherry により染められるフィラメントが共存し、両者がともに結合した黄色いフィラメントはほとんど観察されなかった。この結果は、HMM とコフィリンがアクチンに対して相互排他的に協同的結合したことを強く示唆するものである（図 3）。ただしこの実験ではアクチンフィ

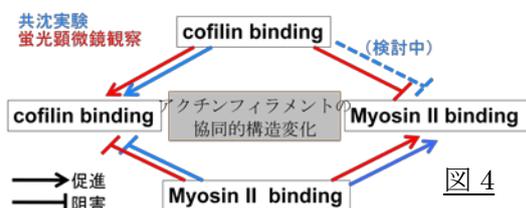


ラメント全体が可視化されていないので、HMM もコフィリンも結合していない非常に多数のフィラメントがあった可能性が排除できず、相互排他的であると断言するには至っていない。この問題を解決するため、3 色の蛍光を同時に高感度で観察する蛍光顕微鏡を用意し、アクチンフィラメント全体も同時に可視化する準備を進めている。

② 上記の実験は、HMM とコフィリンの相互排他的な協同的結合を強く示唆するが、両者がアクチン上の結合部位を競合する可能性を排除できない。そこで、acto-S1 融合タンパク質または cofilin-actin 融合タンパク質を正常アクチンと共重合させ、共重合フィラメント中の正常アクチンと HMM またはコフィリンの結合量を測定することとした。

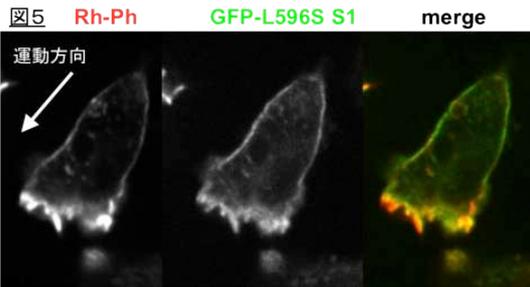
まず、acto-S1 融合タンパク質と正常アクチンを 1 : 3 で共重合させたフィラメントと正常アクチンフィラメントを調製し、それぞれに HMM またはコフィリンを加えて超遠心した（HMM との共沈は、0.2 mM ATP, 1 mM ADP 存在下で行った）。その結果、HMM は正常アクチンフィラメントとはほとんど共沈しなかったが、共重合フィラメントとは効率よく共沈した。逆に、コフィリンは正常アクチンフィラメントと共沈したが、共重合フィラメントとはほとんど共沈しなかった。

次に、cofilin-actin 融合タンパク質と正常アクチンを 1 : 3 で共重合させたフィラメントと正常アクチンフィラメントを調製し、それぞれをコフィリンと混合して超遠心したところ、コフィリンは、正常アクチンフィラメントより共重合フィラメントと効率よく共沈した。

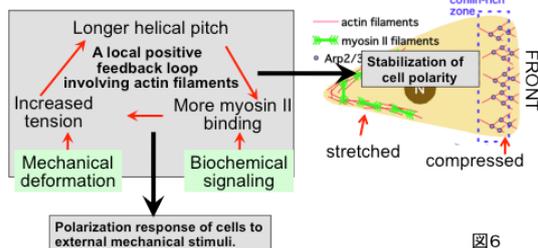


以上のように、共沈実験、蛍光顕微鏡観察ともに、HMM とコフィリンが相互排他的にアクチンフィラメントと協同的に結合することを示唆した（図 4）。今後はさらに詳細を詰め（アクチンフィラメントも可視化しながら蛍光顕微鏡観察を行うとともに、cofilin-actin 融合タンパク質と正常アクチンの共重合フィラメントが HMM と結合しにくくなるか否かについての実験を行う）、論文発表を行う予定である。また本研究ではミオシンとコフィリンに着目して解析を行ったが、その他の重要なアクチン結合タンパク質についても解析を広げていきたい。

(2) L596S 変異 (Uyeda et al., 2002) S1 は、ATP 存在下でもアクチンフィラメントとよく結合するので、細胞内で S1 と結合しやすいアクチンフィラメントを可視化するために、GFP-L596S S1 融合タンパク質を細胞性粘菌細胞で発現した。運動中の粘菌アメーバ細胞には、前側の仮足内で Arp2/3 に依存して重合するアクチンフィラメントと、横から後部の表層にミオシン II と相互作用し張力を発生するアクチンフィラメントがある。そこで、運動中の細胞を固定し、アクチンフィラメントを rhodamine-phalloidin で染色して、rhodamine 蛍光と GFP 蛍光との強度比較を行ったところ、横から後部の表層アクチンフィラメントは、rhodamine 蛍光強度に比して相対的に GFP 蛍光が強いことが判明した（図 5）。仮足内のアクチンフィラメントは圧縮力を受けており、一方、横から後部にかけての表



層アクチンフィラメントは張力を受けているので、この結果は、張力を受けたアクチンフィラメントは S1 と結合しやすくなることを示唆している。また分裂中の細胞を同様に観察したところ、分裂溝の収縮環のアクチンフィラメントは S1 を結合しやすくなっていた。収縮環中のアクチンフィラメントも、強い張力を受けていると考えられている。先行研究により、張力が負荷されたアクチンフィラメントはらせんピッチが伸びること、および S1 結合もらせんピッチを伸ばすことが知られているので、これらの結果は、細胞内で張力のかかったアクチンフィラメントはらせんピッチが伸びるような構造変化を起こし、S1 と結合しやすくなることを示唆している。本研究では、アクチンフィラメントのミオシンモーターに対する親和性のプローブとして変異 S1 を使ったが、実際の細胞内で結合するのはミオシン II のフィラメントであり、ミオシン II のフィラメント結合はさらなる張力の増加を引き起こす。したがって、らせんピッチの伸び→ミオシン II 結合増加→張力の増加→らせんピッチの伸びというポジティブフィードバックが形成され、これにより細胞内局所の収縮性が安定化され、ひいては細胞の前後極性が安定化されるのではないかと考えられる。また、極性のない細胞の一部を力学的に刺激すると、その部分が後となって運動を始めるという現象が知られているが、このような細胞の力学感受性にも上記ポジティブフィードバック系が関与する可能性がある (図 6)。



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 20 件)

①Noguchi, T. Q. P., T. Komori, N. Umeki, N. Demizu, K. Ito, A. Hikikoshi-Iwane, K. Tokuraku, T. Yanagida and T. Q. P.

Uyeda (2012). G146V mutation at the hinge region of actin reveals a myosin class-specific requirement of actin conformations for motility. *J. Biol. Chem.*, in press.

<http://www.jbc.org/content/early/2012/05/27/jbc.M111.321752.long> 査読有

②Matsushima, K., K. Tokuraku, M. R. Hasan, and S. Kotani (2012). Microtubule-associated protein 4 binds to actin filaments and modulates their properties. *J. Biochem.* 151:99-108. DOI: 10.1093/jb/mvr119 査読有

③Uyeda, T. Q. P., Y. Iwate, N. Umeki, A. Nagasaki, and S. Yumura (2011). Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain. *PLoS One*, 6:e26200. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0026200> 査読有

④Kimori, Y., E. Katayama, N. Morone, and T. Kodama (2011). Fractal dimension analysis and mathematical morphology of structural changes in actin filaments imaged by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 176:1-8. DOI: 10.1016/j.jsb.2011.07.007 査読有

⑤Murakami, K., T. Yasunaga, T. Q. P. Noguchi, Y. Gomibuchi, K. X. Ngo, T. Q. P. Uyeda, and T. Wakabayashi (2010). Structural Basis for Actin Assembly, Activation of ATP Hydrolysis, and Delayed Phosphate Release. *Cell*, 143:275-287. DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.034 査読有

⑥Iwai, S., and T. Q. P. Uyeda (2010). Myosin-actin Interaction in *Dictyostelium* Cells Revealed by GFP-based Strain Sensor and Validated Linear Spectral Unmixing. *Cytometry A*, 77:743-750. DOI: 10.1002/cyto.a.20900 査読有

⑦Noguchi, T. Q. P., R. Toya, H. Ueno, K. Tokuraku, and T. Q. P. Uyeda (2010). Screening of novel dominant negative mutant actins using glycine targeted scanning identified G146V actin that cooperatively inhibits cofilin binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396:1006-1011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.047 査読有

⑧Noguchi, T. Q. P., Y. Gomibuchi, K. Murakami, H. Ueno, K. Hirose, T. Wakabayashi, and T. Q. P. Uyeda (2010). Dominant negative mutant actins identified in flightless *Drosophila* can be classified into three classes, including perturbation of the tropomyosin-troponin system. *J. Biol. Chem.*, 285:4337-4347. DOI: 10.1074/jbc.M109.059881 査読有

⑨Xu, J., K. Tsutsumi, K. Tokuraku, K. A. Estes, S. Hisanaga, T. Ikezu (2010). Actin interaction and regulation of cyclin-dependent kinase 5/P35 complex

activity. *J. Neurochem.* 116: 192-204.
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06824.x
査読有

- ⑩Minoura, I., E. Katayama, K. Sekimoto, and E. Muto (2010). One-dimensional Brownian motion of charged nanoparticles along microtubules: a model system for weak binding interactions. *Biophys. J.* 98:1589-1597. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.12.4323 査読有
- ⑪Kanada, M., A. Nagasaki, and T. Q. P. Uyeda (2009). Stabilization of Anaphase Midzone Microtubules is Regulated by Rho during Cytokinesis in Human Fibrosarcoma Cells. *Exp. Cell Res.*, 315:2705-2714. DOI:10.1016/j.yexcr.2009.06.027 査読有

[学会発表] (計 33 件)

- ①Uyeda, T. Q. P., Y. Iwadate, N. Umeki, A. Nagasaki, S. Yumura. Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain. 日本生物物理学会第 49 回年会、2011. 9. 16、兵庫県、姫路工業大学。
- ②Kien, N. X., E. Katayama, S. Iwai, M. Suzuki, T. Q. P. Uyeda. Unidirectional conformational changes of actin filaments: possible implications in force generation by myosin. 日本生物物理学会第 49 回年会、2011. 9. 16、兵庫県、姫路工業大学。
- ③Kijima, S., T. Noguchi, T. Q. P. Uyeda, K. Tokuraku. Exclusive binding of myosin and cofilin to F-actin. 日本生物物理学会第 49 回年会、2011. 9. 16、兵庫県、姫路工業大学。
- ④Noguchi, T. M. Morimatsu, T. Komori, A. Iwane, T. Yanagida, T. Q. P. Uyeda. FRET analyses of WT and G146V actin filaments identify a conformational state necessary for myosin motility and cofilin binding. International Symposium "Actin, the cytoskeleton, and the nucleus" 2010.11.9, National Singapore University, Singapore.
- ⑤Uyeda, T. Q. P., Y. Iwadate, S. Yumura, A. Nagasaki. Stretched actin filaments in cells have a high affinity for Sl of myosin II. International Symposium "Actin, the cytoskeleton, and the nucleus" 2010.11.9, National Singapore University, Singapore.
- ⑥Nakajima, J., N. Umeki, T. Q. P. Uyeda. Cooperative binding of cofilin to actin filaments observed by fluorescence microscopy. 第48回日本生物物理学会年会、2010. 9. 20、仙台、東北大学。
- ⑦Demizu, N., T. Noguchi, T. Q. P. Uyeda, K. Tokuraku. The binding of heavy meromyosin to G146V actin mutant that cooperatively inhibits cofilin binding. 第48回日本生物物理学会年会、2010. 9. 20、仙台、東北大学。
- ⑧Noguchi, T. M. Morimatsu, T. Komori, K.

Ito, A. Iwane, T. Yanagida, T. Q. P. Uyeda. G146V mutant actin is defective in conformational changes, accompanied by impaired motility with skeletal myosin. Biophysical Society 54th Annual Meeting, 2010. 2. 21 San Francisco, USA.

- ⑨Uyeda, T. Q. P., S. Yumura, A. Nagasaki. Localization of myosin II to the cleavage furrow is driven by multiple mechanisms including direct recognition of specific subsets of actin filaments by the motor domain of myosin II. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009. 12. 9、横浜。
- ⑩J. Xu, K. Tokuraku, L-H Tsai, T. Ikezu. "Actin interaction and regulation of cyclin-dependent kinase 5/p35 complex activity. *Neuroscience 2009* Oct. 2009, Chicago, USA.

[その他]

ホームページ:

<http://staff.aist.go.jp/t-uyeda/HP/CEB8A6F4-E4BC-11DA-9287-000A95B8DB8E/A9D295CE-E035-11DC-A6FB-000A95B8DB8E.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 太郎 (UYEDA TARO)

独立行政法人・産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・部門付

研究者番号: 90356551

(2) 研究分担者

徳楽 清孝 (TOKURAKU KIYOTAKA)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 00332106

片山 栄作 (KATAYAMA EISAKU)

千葉大学・大学院工学研究科・研究員
研究者番号: 50111505