

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570163

研究課題名（和文） ディクチオ型粘菌の細胞分化阻害を用いたアクチン機能変異体のハイスループット分離

研究課題名（英文） High-through put isolation of functional mutants of actin using Dictyostelium expression system

研究代表者

若林 健之 (WAKABAYASHI TAKEYUKI)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号：90011717

研究成果の概要（和文）：アクチンは通常我真核細胞に最も多く含まれ、その重合は、神経細胞樹状突起の形成、がん細胞浸潤や白血球の細胞移動、分化の際の細胞運動に必須である。ディクチオ型粘菌に変異型アクチンを発現させると野生型アクチンも発現しているのに、細胞分化異常が生じ、アクチンの機能的変異を検出できた。チロシン143の変異により重合能やミオシンのATPase活性化に変化が出た。この変異アクチンに関しては結晶解析を行った。

研究成果の概要（英文）： Actin filaments are found in all eukaryotic cells and are essential for many of their movements including cell migration and cell division. We found that the cell behavior of Dictyostelium cells changed, when the vector for the expression of mutant actin was incorporated. Using this phenomenon, functional mutants of actin were isolated efficiently. It was found that the tyrosine-143 of actin is important for actin assembly and the activation of myosin ATPase. The crystal structures of such mutants were determined.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：アクチン、ミオシン、細胞分化、収縮タンパク質、機能的変異株、細胞性粘菌、X線結晶解析、ATPase

1. 研究開始当初の背景

(1) アクチン重合・脱重合とミオシンとの相互作用の生物機能への意義

アクチンは、筋肉以外の真核細胞では、最も大量に存在しているタンパク質である。筋肉細胞でも、ATPase 活性をもつミオシンに次いで大量に含まれている。筋肉細胞以外の通常の細胞では、アクチンは重合・脱重合を動的に繰り返しており、全体の約50%はモノマー状態にある。アクチンの重合反応は、神経細胞の樹状突起の形成、がん細胞の浸潤や白血球の食作用の際の細胞移動、発生・分化のための細胞運動に必須である。最近では、記憶を司る海馬細胞に於いて、入力電気信号の数秒後にスパイン構造の樹状突起側のシナプス直下で急速なアクチン重合が起こり、第一次の記憶形成へのアクチン重合の寄与が注目されている。

このように筋肉以外では、動的重合・脱重合とその制御の機構は細胞生物学のきわめてホットな研究対象となっており、100種を超えるアクチン結合タンパク質がその制御に関わると考えられている。

筋肉ではアクチンはトロポミオシンとともに細いフィラメントの構成要素であり、ミオシンと相互作用し筋収縮をもたらしている。ミオシンと相互作用できないアクチン変異体は須藤らのパイオニアワークがあり、主にアスパラギン酸、グルタミン酸を変異させ、ミオシンとの相互作用能のないアクチン変異体が得られている。

ミオシンのアクチン結合部位はミオシンのX線結晶化の成功に伴い、構造からの予測が可能となり、またミオシン頭部のディクチオ型粘菌や昆虫細胞での大量発現の成功の結果、変異ミオシンの作成が可能となり、ミオシン側の相互作用部位も同定出来るようになった。またディクチオ型粘菌では、ミオシンII(通常のミ

オシン)の遺伝子をノックアウトすることが可能であり、そのような細胞株は、ペトリディッシュ上では細胞分裂できるが、懸濁培養では核分裂はできるが細胞分裂はできず、多核細胞となる。また飢餓状態で誘導される一連の細胞分化の過程、すなわちcAMPの放出、ケモタクシスに基づく細胞ストリーミング、細胞集合によるマウンド形成、マウンド上での乳頭突起の形成などの形態形成を経る多細胞生物的な細胞分化の結果としての胞子形成などが阻害される。この性質を利用して、多くのミオシンII変異体が同定されてきた。このようなミオシン変異株の同定法をアクチンに適用するのは無理であろうと考えられてきた。それは、ディクチオ型粘菌には約10個のアクチン遺伝子があり、それらをすべてノックアウトすることは難しいからである。私達はこの困難を解決することに役立つ現象を見いだした。

(2) アクチン重合の構造的基盤の研究のための要素技術としての変異体探索

アクチンはモノマー状態(G-actin)では、結晶化が可能である。1990年にウサギ・アクチンと DNase I との複合体の結晶構造がハイデルベルググループにより解かれた。申請者らは変異導入が可能なディクチオ型粘菌のアクチンとゲルゾリン S1 との複合体の結晶構造を野生型と二つの変異体のアクチンについて明らかにした。野生型に関しては分解能が初めて2Åに達し、リガンドである ATP とアクチンの関係の詳細を初めて明らかにすることが出来た(Matsuura ら(JMB, 296, 579-595, 2000))。すなわち、ATP のアデニン環のすべての窒素原子はアクチンのアミノ酸残基と水素結合で結ばれていた。(Kabsch ら(Nature, 347, 37-44, 2000)の解析ではアデニン環はアクチンタンパク質の疎水的環境のヌクレオ

チド結合部位に疎水結合で結合していると想定されてきた。)その後、数十におよぶア G-actin 結晶構造が明らかにされたが、重合したフィラメント状態(F-actin)では、アクチンフィラメント特有の Flexibility のために結晶は得られておらず、これまで配向フィラメントの X 線ファイバー・ダイアグラムからのモデリングや(Holmes ら(Nature,347, 44-49, 1990)、Oda ら(Nature, 457, 441-445, 2009))、フィラメントの電子顕微鏡像からの三次元再構成法による像(分解能20 Å程度、Narita ら)しか得られておらず、原子レベルでのアクチン重合の構造的基盤は得られていない。F-actin の結晶化は困難であるが、アクチンオリゴマーの結晶化の可能性はある。それには、プラス方向に重合できない変異アクチン(b変異体)とマイナス方向に重合できない変異アクチン(p変異体)を作成し、重合させて作成出来ることが期待されるテトラマー(アクチンは2重螺旋を形成するので、b変異体2分子、p変異体2分子からなる)なら結晶化出来るであろう。

そのためには、他種類のp変異体とb変異体を見つける必要があり、今回のハイスループット機能変異体探索法は貢献出来るものと考えられる。すでに野口ら(JBC,282,27721-27727, 2007)はp変異体を報告しているので、b変異体の検出に重点を置きたい。

2. 研究の目的

(1) 機能が変化したアクチン変異体のハイスループット分離 アクチンの重合反応の部位から、離れた領域にあるアミノ酸を変異させたアクチンタンパク質を分離精製し吟味したところ、意外なことに In vitro での重合能が顕著に低下していた。また、重合促進剤であるファロイジンを加えるとフィラメント(F-actin)になるが、この変異 F-actin はミオシンの ATPase を活性

化する能力も落ちていた。更に予想外の性質があることも分かった。この変異アクチンを発現させるプラスミドを導入した粘菌細胞は、あたかもミオシン II の遺伝子がノックアウトされかのような表現型を示した。すなわち、飢餓状態で誘発される一連の細胞分化の過程が、マウンド乳頭形成のステップで止まってしまう。この細胞内には、ホスト細胞のアクチン遺伝子によって発現された野生型アクチンが発現プラスミドによる変異型アクチンとほぼ等量存在していることが SDS-PAGE によって分かっている(変異型アクチンはタグが付いており、SDS-PAGE 的分子量が大きいので、区別できる)。従って、このアクチン変異体による細胞分化過程の阻害は遺伝学的には Dominant Negative と呼ばれている現象であり、野生型アクチンがあるのに変異型アクチンの存在によって、正常な細胞分化過程が阻害されており、アクチン遺伝子に関してはこれまであまり知られてこなかった。

この検定法は、細胞数も10cmペトリディッシュに生やした程度で十分であり、時間的にも飢餓状態が始まって24時間後の細胞群のストリーミングの様子も異常であるので、アクチンの機能的変異株をきわめて迅速に検出出来る。これまで、変異株を確立したのち、ほぼ一週間かけて大量培養し、さらに一週間かけて精製して、やっと In vitro での重合能検定、ミオシン ATPase 測定を行ってきたので、10倍以上の高速化であり、イノベーションともいえよう。

この方法をもちいて様々なアクチンの機能変異体をハイスループットで探索したい。(2)アクチンフィラメントの高分解能構造解析 F-actin の結晶化は困難であるが、アクチンオリゴマーの結晶化の可能性はある。それには、プラス方向に重合できない変異アクチン(b変

異体)とマイナス方向に重合できない変異アクチン(p変異体)を作成し、重合させて作成出来ることが期待されるテトラマー(アクチンは2重らせんを形成するので、b変異体2分子、p変異体2分子からなる)なら結晶化出来るであろう。そのためには、他種類のp変異体とb変異体を見つける必要があり、今回のハイスループット機能変異体探索法は貢献出来るものとする。すでに野口らはp変異体を報告している(JBC,282,27721-27727, 2007)、はp変異体を報告している、b変異体の検出に重点を置く予定であったが、私達はクライオ電子顕微鏡像から、約5Åの分解能(基準: Fourier Shell Correlation = 0.143)でアクチンフィラメントの構造を決定することに成功し、分子動力学を援用してF-アクチンの原子モデルを構築することに成功し、いくつかの α -ヘリックスや大きい側鎖の直接的可視化が実現した(Murakami et al., Cell 2010)。そこでオリゴマーの結晶化よりも、機能的変異体をサーチする方向に主力を置いた。

3. 研究の方法

(1) 飢餓誘発性の細胞分化の異常の検定法の確立 異常がもっとも早期に検出出来るのは、24時間後での細胞ストリーミングである。その後、さらに追跡するとマウンド形成、マウンド上の乳頭突起形成、移動体形成、胞子形成などがあり、これら後期の細胞分化と早期のストリーミングの間の相関などを調べる。

(2) 重合に関与すると予想される部位に変異を入れた変異株の細胞分化異常による検定

アクチンの重合部位に関しては、申請者が解いた粘菌アクチンの原子構造に基づいて推測でき、実際に変異を入れて細胞分化異常による検定を行う。野口らが開発したアクチン発現プラスミドを用いた。

(3) 変異株からの変異アクチンを精製 細胞分化異常を示した株から変異アクチンを精製する。重合変異株が必ず細胞分化異常をもたらすとは限らないので、細胞分化が正常であるものも念のために精製する。

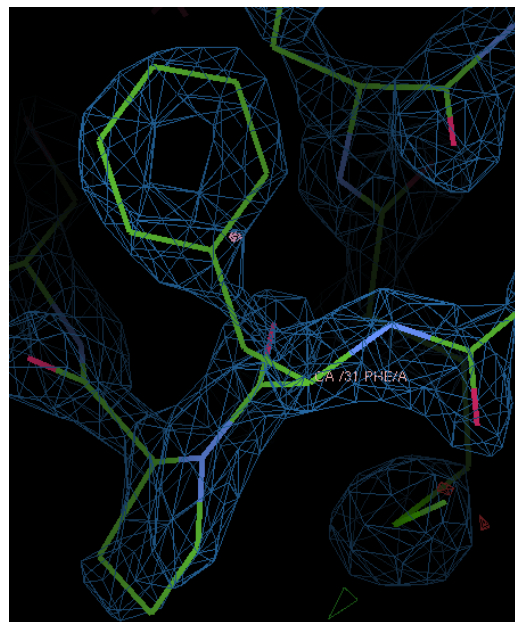
(4) 変異アクチンの重合能の超遠心解析 精製した変異アクチンは、これまでの大量培養で得られるタンパク質の収量の10%程度で重合能を検定できる。

(4) ミオシン ATPase の活性化能のアクセス リン酸結合タンパク質を用いたマイクロ測定を行う。精製した変異アクチンで数十回の測定が可能であった。

4. 研究成果

(1) アクチンは重合すると構造変化し、分子前面の疎水性クレフトが開くが

(Murakami et al., 2010)、疎水性クレフトの入り口にある Tyr143 が溶媒により露出するようになる。また Tyr143 自身のミオシンとの相互作用については不詳であるが、その周辺はミオシンとの結合に関与している。このことから Tyr143 は重合とミオシンとの相互作用に関係があると考えられ、この残基に変異を導入したアクチンを



[変異アクチンの高分解能 X 線結晶解析]

発現させ、その影響を調べていた。重合したアクチンにミオシンが結合すると、ATPが加水分解され無機リン酸 (Pi) が放出される。この過程へのアクチンの寄与を調べるため、アクチンとミオシン (heavy meromyosin) の共存下で放出された無機リン酸を測定し、ATP加水分解速度を求めた。結果として、Tyr143をイソロイシンに変異させたアクチンでは、ミオシンのATPase活性化がほぼ消失することが確認された。

アクチン重合は、Tyr143をフェニルアラニンに変異させると減少する。phalloidin重合実験では、Tyr143Phe, Tyr143Ile共に重合した量が増加したことから、変異アクチンでもフィラメント形成はファロイジンで野生型とほぼ同等に生じている。そこで、無機リン酸の放出が少なくなることは、重合が悪いためではなくアクチンとミオシンの相互作用自身が変わるためであると結論できた。

ミオシンATPaseの活性化や重合能の変化から、Tyr143への変異導入は、アクチンの両方の機能を変化させるものであることが示すことが出来たので、更に酵素学的キネティクスのデータを解析した。その結果、Tyr143をトリプトファンに変異した場合、Vmaxは変化しないが、Kmが減少し、変異アクチンはミオシンとの弱い結合が数倍強くなっていることが分かった。これはTyr143が実際にミオシンとの相互作用に関与しており、特にミオシンATPaseサイクルでの重要なステップであるMyosin・ADP・Pi複合体からのリン酸放出の過程を促進するための弱い相互作用と呼ばれる結合様式に関与していることを示すものとして注目される。

変異アクチンの結晶作成、X線回折データ収集を行い、現在、高分解能での結晶解析が進行中である（前ページの付図は~2.0 Åの分解能を達成していることを示すフェニルアラニン側鎖の近傍の電子密度マップ）。

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 4件)

①H. Minoda, T. Okabe, Y. Inayoshi, T. Minakata, Y. Miyauchi, M. Tanokura, E. Katayama, T. Wakabayashi, T. Akimoto, *H. Sugi (2011). Electron microscopic evidence for the myosin head lever arm mechanism in hydrated myosin filaments using the gas environmental chamber. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **405**, 651-656. 査読有り

②若林健之、村上健次:アクチンのフィラメント構造と重合機構---重合によるATPase活性化のメカニズム--- 生物物理 51(6), 256-259 (2011) 査読有り

③K. Murakami, T. Yasunaga, T. Q. P. Noguchi, Y. Gomibuchi, K. X. Ngo, T. Q. P. Uyeda, & T. Wakabayashi (2010): Structural Basis for Actin Assembly, Activation of ATP Hydrolysis, and Delayed Phosphate Release. *Cell*, **143**, Issue 2, 275-287. 査読有り

④T. Q. P. Noguchi, Y. Gomibuchi, K. Murakami, H. Ueno, K. Hirose, T. Wakabayashi, & 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 査読有り

[学会発表] (計 5件)

①五味渕由貴、上田太郎、若林健之、Changes of biochemical properties of Dictyostelium actin induced by mutation of tyrosine-143 日本生物物理学会(2012.9.12-14, Nagoya)

②T. Wakabayashi and K. Murakami: Changes of biochemical properties of Dictyostelium actin induced by mutation of tyrosine-143 (2012.9.12-14): Interaction between the Components of Actin-containing Filaments.

(Oral Presentation, First Kyushu Annual Meeting of Biophysics Society of Japan, Iizuka, Dec. 4, 2011)

③若林健之、村上健次、五味渕由貴、安永卓生、上田太郎、野口太郎:蛋白質科学会年会ワークショップ〔大阪、Jun. 7, 2011〕

④ K. Murakami, T. Yasunaga, T. Q. P. Noguchi, Y. Gomibuchi, K. Ngo, T. Q. P. Uyeda, and T. Wakabayashi: Structural Basis of Actin Polymerization, ATPase activation and Delayed Phosphate Release. (Oral Presentation The 48th Biophysics Society of Japan Annual meeting, Sendai, Sept. 20, 2010)

⑤ K. Murakami, T. Yasunaga, T. Q. P. Noguchi, T. Q. P. Uyeda & T. Wakabayashi: How actin assembly triggers activation of ATP hydrolysis. *Symposium on motor functions* (Alpbach, Austria, March, 2010)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 健之 (WAKABAYASHI TAKEYUKI)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号：90011717

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：