

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770179  
 研究課題名（和文） 低温電子顕微鏡によるアクチン繊維-ミオシン II 頭部複合体の高分解能構造解析  
 研究課題名（英文） Structural analysis of myosin II subfragment 1 decorated actin filament by CryoEM  
 研究代表者  
 藤井 高志 (FUJII TAKASHI)  
 独立行政法人理化学研究所・細胞動態計測研究グループ・基礎科学特別研究員  
 研究者番号：10582611

## 研究成果の概要（和文）：

筋収縮ではアクチン繊維とミオシンの結合が重要な役割を果たすが、結合状態の高分解能構造が得られていなかった。アクトミオシンの力発生のメカニズムの完全解明を行うためには、この複合体の構造を原子レベルの分解能で解明することが必須である。低温電子顕微鏡法によりミオシン II サブフラグメント I とアクチン繊維複合体の構造解析を 7Å 分解能で行った。その相互作用様式や結合時に起きる両分子の構造変化の詳細が明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

To understand the mechanism of muscle contraction, it is necessary to reveal how myosin binds to actin. Despite tons of biochemical information, the detail structure of actin-myosin complex remains unknown. We have obtained 7Å resolution density map of actin-myosin II S1 rigor complex by CryoEM. The density map clearly resolves all the secondary structures, such as  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -structures and loops, having made unambiguous modeling and refinement possible. The structure suggests that myosin undergoes a drastic conformational change upon strongly binding to the actin filament and that a myosin binds to two actin monomers. The high resolution structure gave us a relative three dimensional arrangement between actin and myosin, suggesting that the mutations caused myopathic illness is highly related to the residues forming the actin-myosin interface.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：低温電子顕微鏡法, アクチン, ミオシン, 筋肉

## 1. 研究開始当初の背景

筋収縮ではアクチン繊維とミオシンの結合

が重要な役割を果たすが、結合状態の高分解能構造が得られていないため、その相互作用

様式や結合時に起きる両分子の構造変化については殆どわかっていなかった。アクトミオシンの力発生のメカニズムの完全解明を行うためには、この複合体の構造を原子レベルで解明することが必須であると考えた。

ミオシンの構造については、1990年に単量体ミオシン II 頭部フラグメント S1 の構造が X 線結晶解析法によって解明され、それ以後も筋細胞以外で働いているミオシン V やミオシン VI などの頭部フラグメントの結晶構造が解析されてきた。しかしながら、肝心のアクチン繊維とミオシン頭部複合体の高分解能構造は明らかになっていない。Holmes らは低温電子顕微鏡法を用い、アクチン繊維とミオシン II 頭部の ATP 非結合状態(rigor 状態)の構造を解明したが、分解能は 13Å 分解能にとどまっていた。また、ミオシン V やミオシン VI との複合体についても同様の解析結果が発表されているが、いずれも分解能は 20Å 程度であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はアクチン繊維・ミオシン II 複合体の高分解能構造解析、および分子動力学法を用いたフィッティングにより、高精度の複合体モデルを得ることである。αヘリックスやβシートなどの二次構造を鮮明に識別することにより、X 線結晶構造をフレキシブルにフィッティングすることができ、高精度の原子モデルを構築することができる。

筋収縮時、ミオシン II は ATP 加水分解反応エネルギーを利用して、アクチン繊維と相互作用し滑り運動を生み出す。ミオシン II は重鎖と 2 種類の軽鎖からなる細長いタンパク質複合体である。重鎖はオタマジャクシのような形の N 末端側の頭部と C 末端側に伸びる繊維状の尾部に分けられる。ATP 結合部位

およびモータードメインは頭部にある。またヌクレオチド結合状態の違いによりミオシン頭部のアクチン繊維への結合状態が大きく異なり、Apo 状態では強く、ADP 状態では弱く結合し、その結合定数は約 10 倍異なる。この結合状態の違いは、ヌクレオチド結合状態にカップルしたミオシン頭部の構造の違いを反映していると考えられる。また、ミオシン頭部とアクチン繊維の 3 次元相対配置も重要で、例えば、遺伝性の肥大型心筋症の原因となるミオシン II 頭部の点変異残基 Arg405 は、アクチンとの結合部位近傍にあると考えられている。このように、医学的にも重要なミオシンの残基がアクチンとの相互作用にどのように関わっているのかを明らかにするためには、高い分解能で複合体の立体構造を決定する必要がある。

## 3. 研究の方法

ウサギ骨格筋由来のミオシン II 頭部フラグメントを用い、ATP・ADP 加水分解酵素である Apyrase を用いて、ATP 枯渇状態にし、ミオシン II 頭部ドメインをアクチン繊維にフルデコレーションする。実際にはフルデコレーションは大変困難で、温度やグリッドの親水性状態など非常に細やかな調整が必要であり、最適な状態を見つけることは困難を極めた。最終的には、様々な工夫により、8 割のアクチン繊維にフルデコレーションする方法を見つけた。一枚の写真に入る繊維の数を画像切り出しが最適に行えるようにフルデコレーションになる条件の検討、氷包埋の条件検討（氷の厚さ）、およびサンプルの最適濃度の検討を行った。これらは、質の高い電子顕微鏡像を得ることに重要であり、最終到達分解能に強く影響する。

#### 4. 研究成果

アクチン繊維・ミオシン II 頭部複合体を低温電顕単粒子解析法で約 7 Å 分解能で解析した。アクチン・ミオシン間の 3 次元立体配置が明らかになった。これにより相互作用様式が高い水準で明らかになった。アクチン・ミオシン間の結合様式は、疎水性パッチ間の結合をとりまくように静電相互作用が存在しており、親水性の静電相互作用をきっかけとして、疎水性相互作用により強力に結合すると考えられる。

また、ミオシンのダイナミックな構造変化が明らかになった。結合状態構造をシミュレートしていると考えられていた X 線結晶構造とその構造はおおまかには合っていたが、アクチン繊維との結合をしていない X 線結晶構造はよりコンパクトな構造をしており、CryoEM 構造はよりドメイン間の距離があり、その空隙は大きなものであった。これは X 線結晶構造がアクチンと結合したのではなく、結晶の影響を大きく受けているためと考えられる。また、ミオシン II サブフラグメントの尾部の電子顕微鏡密度は二股に分かれており、2 状態を取り得ることが示唆している。これはヌクレオチド状態が Apo 状態にもかかわらず、レバーアームがブラウン運動により準安定状態の 2 状態を行き来していることを示している。同じ Apo 状態にも関わらず、レバーアームの角度が異なる 2 種類の結晶構造が知られており、これが単なる結晶によるアーチファクトではないことが示唆される。また、この共存する 2 つの準安定状態は、熱運動がミオシンの力発生に大きな役割を担っていることを示唆している。

ミオシンの結合によりアクチンの構造は全体としてはほとんど変化していなかった。しかし、アクチン・ミオシン複合体では負に荷電したアクチン N 端の密度が見えなくな

っており、ミオシンの正に荷電した loop2 と結合することにより構造の安定性を失ったと考えられる。まず、ミオシンは loop2 を投げ縄のように使いアクチンの N 端と結合しとりつき、アクチン繊維状で ATP の加水分解に伴う構造変化が誘起され（ちょうどアクチンの構造を鋳型につかうようにして）強結合になる。このアクチン結合面でのミオシンの構造変化に付随してミオシンレバーアームの大きな動きが生み出されると考えられる。

#### 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 Gayathri P, **Fujii T**, Møller-Jensen J, van den Ent F, Namba K & Löwe J (2012). A bipolar spindle of antiparallel ParM filaments drives bacterial plasmid segregation *Science* 338, 1334-1337. (査読有)

② **Fujii T**, Cheung M, Blanco A, Kato T, Blocker A & Namba K (2012). Structure of a type III secretion needle at 7-Å resolution provides insights into its assembly and signaling mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109(12), 4461-4466. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

##### ① 藤井高志

「低温電子顕微鏡によるらせん複合体の高分解能構造解析」

第 50 回日本生物物理学会 シンポジウム  
『若手オーガナイズシンポジウム：生命科学の新しい地平を切り開く若手研究者たち』  
シンポジスト兼オーガナイザー

(2012.9.23) 名古屋大学

##### ② Takashi Fujii

Title: High resolution structural analysis of the actin - myosin rigor complex by CryoEM  
Gordon Research Conference Three Dimensional Electron Microscopy  
Les Diablerets, Switzerland May 27 - June 1, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 高志 (FUJII TAKASHI)  
独立行政法人理化学研究所・細胞動態計測研  
究グループ・基礎科学特別研究員  
研究者番号：10582611

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし