

世界初！細胞内の線維を切るハサミの機構を解明

この度、名古屋大学大学院理学研究科の 成田 哲博 准教授らの研究グループは、大阪大学、東海学院大学、豊田理化学研究所との共同研究で、細胞内で最もメジャーな線維であるアクチン線維を切断、分解する機構をクライオ電子顕微鏡法^{注1)}による構造解析によって解明することに世界で初めて成功しました。アクチンは動物細胞内で最も量の多いタンパク質とも言われ、集まってアクチン線維を作ります。アクチン線維は細胞の中で、細胞を動かし、細胞同士を繋ぎ、細胞の形を作り、物質の取込、排出にも関わるなど、非常に多様で重要な役割を果たしています。当然、これらの機能は、神経回路形成、癌の転移、傷の再生など、より高次な機能にも直結しています。アクチンと結合するタンパク質であるコフィリンとそのファミリーは、ほぼ全ての真核生物（動植物、カビ、酵母など細胞核を持つ生き物）で、このアクチン線維の切断、分解において最も重要な役割を果たしています。本研究においては、コフィリンとアクチン線維が結合した状態の三次元構造をクライオ電子顕微鏡法により、マグネシウムイオン1つが直接観察できる3.8Å分解能で解明し、この三次元構造を基にアクチン線維がどのように切断、分解されているか、詳細なモデルの構築に成功しました。これは、アクチンが関係する広範な生命現象の理解を進めるために必要不可欠な情報です。この研究成果は、平成30年5月10日付（日本時間18時）米国科学雑誌 Nature Communications オンライン版に掲載されました。

この研究は、JST さきがけ、日本学術振興会科学研究費助成事業、日本学術振興会特別研究員制度、武田科学振興財団、先端バイオイメージングプラットフォーム及びナノテクノロジープラットフォームの支援のもとで行われたものです。

【ポイント】

- ◆多くの細胞内で最も主要な線維であるアクチン線維の切断、分解を行う機構を解明
- ◆クライオ電子顕微鏡による構造解析で、マグネシウム原子が直接観察できる 3.8 Å 分解能
- ◆コフィリン結合によるアクチン分子の変形が、線維の切断、分解をもたらす

【研究背景と内容】

アクチンは動物、植物、菌類から酵母まで、全ての真核生物の全ての細胞に存在する。アクチンは大きさ 5 nm 程度の球状タンパク質で、集合して直径 8 nm 程度の線維を作る。多くの細胞の中でアクチンは多量に存在し、細胞を動かし、細胞同士を繋ぎ、細胞の形を作り、細胞分裂、物質の取込など非常に多様で重要な役割を果たしている (図 1)。これらの機能は細胞にとって基本的なもので、当然ながら、神経回路形成、癌の転移、傷の再生など、より高次の機能にも直結している。アクチン線維がこのような多様な役割を果たすためには、必要なときに細胞内の必要な場所でアクチン線維が形成され、必要なくなれば分解されなくてはならない。コフィリンとそのファミリーは、ほぼ全ての真核生物で、このアクチン線維の切断、分解において最も重要な役割を果たしている。

このコフィリンによるアクチン線維の切断、分解機構を理解

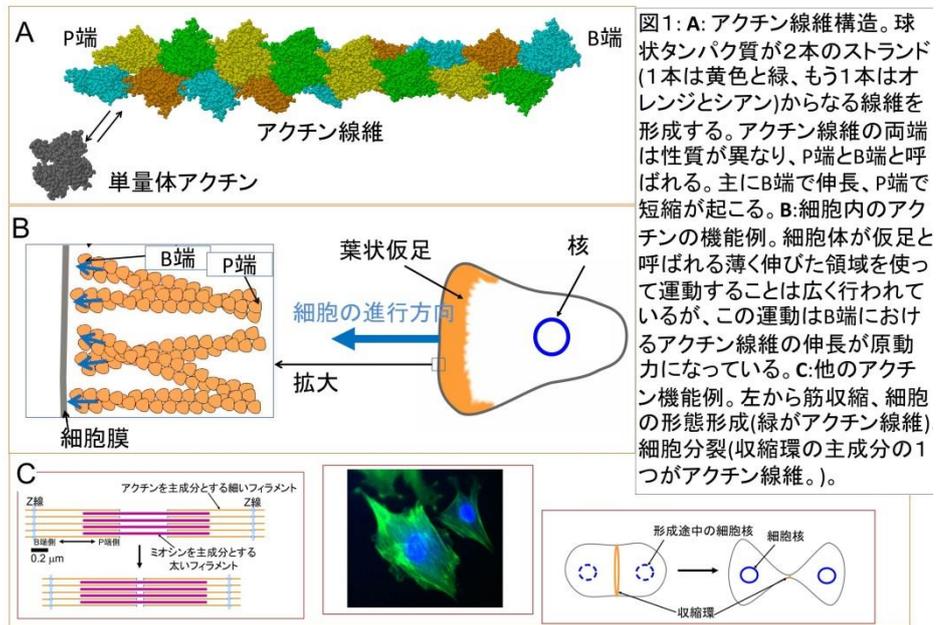


図1: A: アクチン線維構造。球状タンパク質が2本のストランド(1本は黄色と緑、もう1本はオレンジとシアン)からなる線維を形成する。アクチン線維の両端は性質が異なり、P端とB端と呼ばれる。主にB端で伸長、P端で短縮が起こる。B: 細胞内のアクチンの機能例。細胞体が仮足と呼ばれる薄く伸びた領域を使って運動することは広く行われているが、この運動はB端におけるアクチン線維の伸長が原動力になっている。C: 他のアクチン機能例。左から筋収縮、細胞の形態形成(緑がアクチン線維)細胞分裂(収縮環の主成分の1つがアクチン線維。)

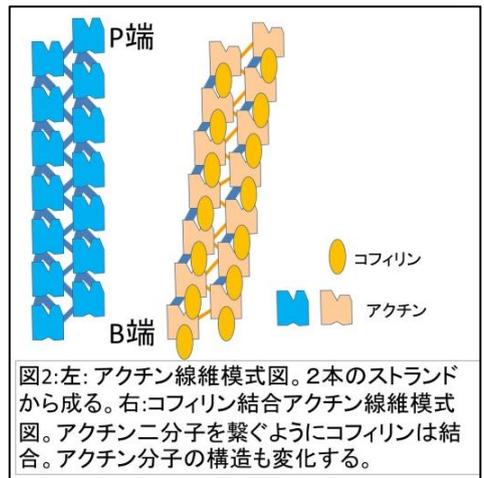


図2: 左: アクチン線維模式図。2本のストランドから成る。右: コフィリン結合アクチン線維模式図。アクチン二分子を繋ぐようにコフィリンは結合。アクチン分子の構造も変化する。

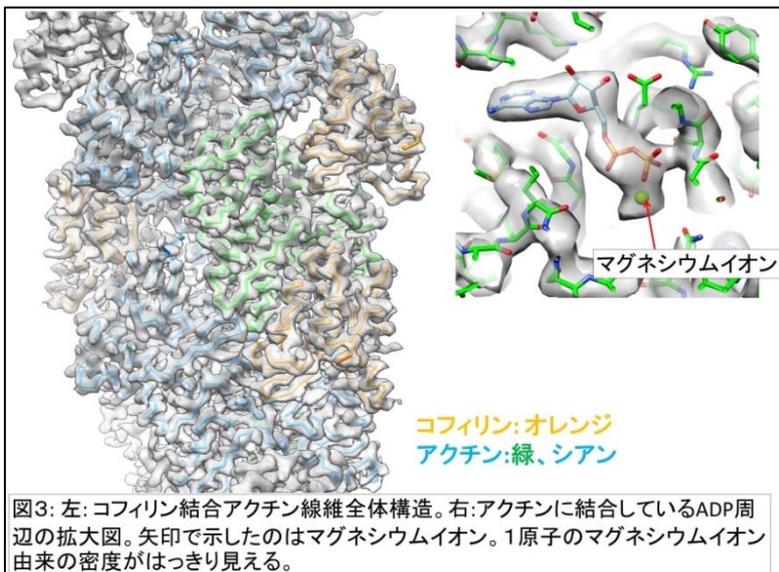


図3: 左: コフィリン結合アクチン線維全体構造。右: アクチンに結合しているADP周辺の拡大図。矢印で示したのはマグネシウムイオン。1原子のマグネシウムイオン由来の密度がはっきり見える。

するために、私たちはコフィリンをアクチンに結合させ、その構造をクライオ電子顕微鏡法と単粒子解析法^{注2)}によって解析した。コフィリンが多量にある場合、コフィリンはアクチン線維に対して、アクチン分子1分子に1分子の割合で結合し、安定な結合構造を作る。コフィリンは2つのアクチン分子を繋ぐように結合し、アクチン分子の構造を変形させる(図2)ことまではわかっていたが、構造の分解能が足りず、

アクチン線維の切断、分解機構のモデルの構築はできていなかった。

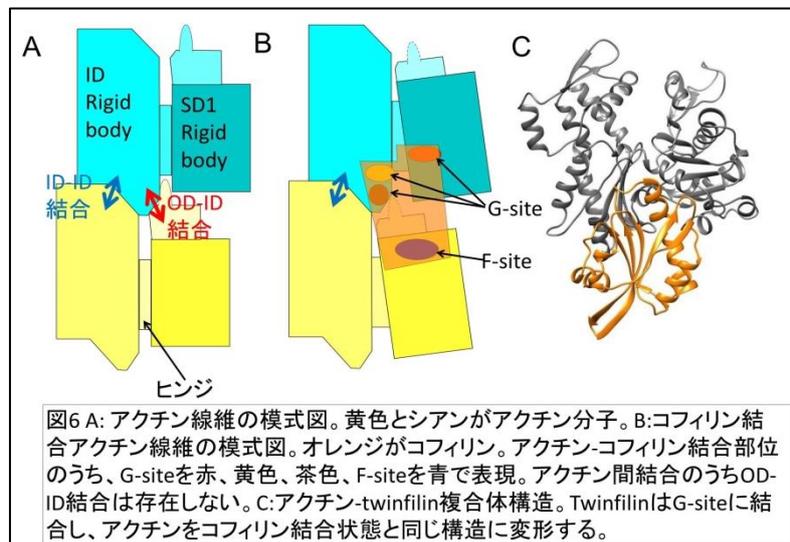
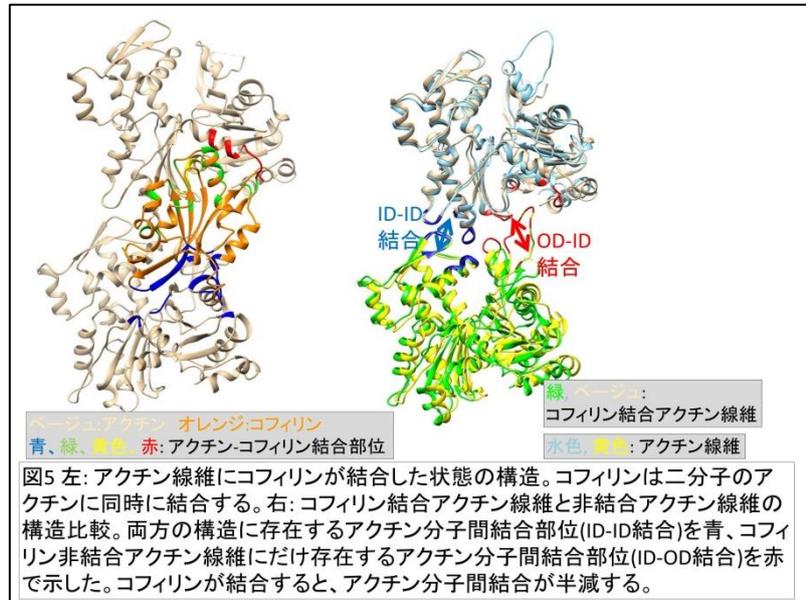
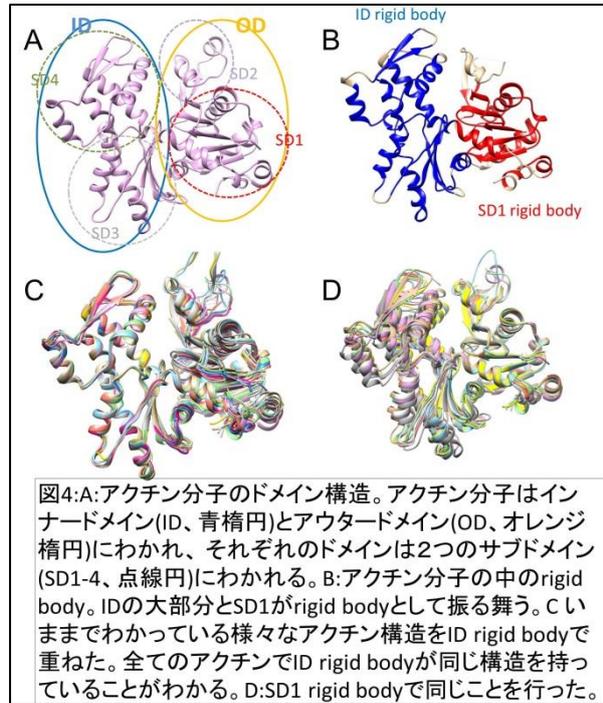
試料の条件検討には名古屋大学未来材料システム研究所の電子顕微鏡 (FEI 社 Polara) を用い、最終データ収集には大阪大学超高压電子顕微鏡センターの電子顕微鏡 (FEI 社 Titan Krios) を用いた。1111 枚の電子顕微鏡写真から 86388 個の像を解析、マグネシウム原子が直接観察できる 3.8 Å 分解能で構造決定を行った (図 3)。

このことによって、

1: コフィリン結合アクチン分子構造と他の知られている分子構造を比べることで、アクチン分子は 2 つの堅い大きな固まり (rigid body) を持ち、アクチン分子の構造変化は、この 2 つの固まりの相互位置関係で記述できることがわかった (図 4)。

アクチン分子の構造は、インナードメイン (ID) とアウトードメイン (OD) の 2 つの領域に分かれ、それぞれのドメインは 2 つのサブドメイン (計 4 つ。SD1-4) に分かれる (図 4A)。ID の大部分と SD1 が rigid body としてふるまう (図 4B)。2 つの rigid body に同時に結合することで、アクチン結合タンパク質はアクチンの形をコントロールできる可能性が高い。

2: コフィリンは P 端側のアクチン分子に対しては両方の rigid body に結合し (この結合部位を G-site と名付けた)、B 端側のアクチン分子に対しては片方の rigid body にしか結合しない (この結合部位を F-site と名付けた) (図 6B)。
3: コフィリン結合アクチン分子構造は、コフィリンと似たタンパク質 twinfilin とアクチン分子が結合したときのアクチン分子構造とよく似ていること (図 6C)。Twinfilin



は G-site だけに結合する。

4: 1-3 から、コフィリンは、G-site へ結合することで P 端側アクチン分子を変形させることができると考えられる。

5: アクチン線維内の線維軸方向の結合の半分が、コフィリンが結合すると失われる(図 5)。

コフィリンは、その重要性から長年にわたり多くの研究者が研究してきた。以上 1~5 から、今まで知られていたコフィリンの性質の大半を説明できる。たとえば、コフィリンは 1 分子線維に結合すると、その隣に別のコフィリン分子が結合しやすい性質(協同的結合性)があり、アクチン線維の上に連続した結合領域(クラスター)をつくる。コフィリンによるアクチン線維の切断は、このクラスターの P 端側の端で起こることが知られている(図 7、赤矢印が切断箇所)。ここではどのようにしてクラスターの P 端側の端で切断が起こるのかを説明する。

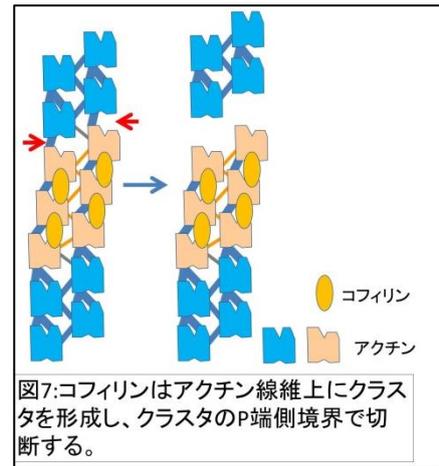


図7:コフィリンはアクチン線維上にクラスターを形成し、クラスターのP端側境界で切断する。

アクチン分子に 0-3 まで番号をつける(図 8A)。アクチン 1-2 間にコフィリンが結合すると、アクチン 1 と 2 が変形する。これにより、アクチン 2-3 間の結合が大幅に弱くなり(図 8B)、ここで切断が起こる。一方、アクチン 1-2 間については、コフィリンが分子間の橋渡しをしているので、切れない。アクチン 0-1 間の結合については変化がない。なぜなら、アクチン 0-1 間の結合はアクチン 1 の ID とアクチン 0 分子の結合であり、ID そのものが rigid body であるため、アクチン 1 が変形しても ID は変形せず、結合に変化を生じないのである。そのため、B 端側でも切断は起きない。

他にも 1: 協同的結合がどのようにおこるか、2: コフィリンは古いアクチン線維に選択的に結合し分解するが、どのようにして古いアクチン線維を認識しているか、3: コフィリンはアクチン線維端からのアクチン分子の解離(脱重合)も促進するが、その機構はどうなっているかなど、多くのことを説明することができた。

【成果の意義】

アクチン線維の動態は非常に広い範囲の生命現象に関わっている。たとえば、筋肉の収縮はアクチン線維とミオシン(アクチンとは別のタンパク質)の相互作用によって起こるし、神経細胞が結合相手を探すために突起を伸ばすときに、その先端を前に進めているのはアクチン線維の伸長である。ガン細胞が転移のために動き回るときは、その主な動力も、アクチン線維の伸長とアクチン-ミオシンの相互作用である。体の中で細胞同士が接着するときも、多くの場合は細胞接着タンパク質が細胞内のアクチン線維のネットワークと細胞の外を繋いでいる。このように非常に多様な役割を果たすアクチン線維であるが、細胞内のアクチン分子の数は有限であるので、必要なときに必要な場所で線維を構築し、必要なくなれば線維を分解する必要がある。その分解のかなりの部分は、コフィリンとそのファミリーが担っている。このコフィリンによる線維切断、分解機構

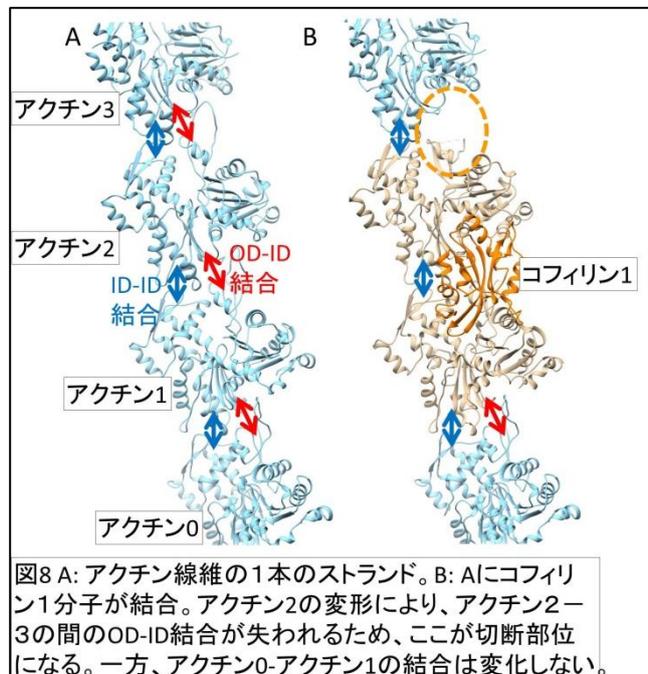


図8 A: アクチン線維の1本のストランド。B: AIにコフィリン1分子が結合。アクチン2の変形により、アクチン2-3の間のOD-ID結合が失われるため、ここが切断部位になる。一方、アクチン0-アクチン1の結合は変化しない。

のように非常に多様な役割を果たすアクチン線維であるが、細胞内のアクチン分子の数は有限であるので、必要なときに必要な場所で線維を構築し、必要なくなれば線維を分解する必要がある。その分解のかなりの部分は、コフィリンとそのファミリーが担っている。このコフィリンによる線維切断、分解機構

の解明は、アクチンに関わる広い範囲の生命現象全ての理解のベースになるものである。

【用語説明】

注1)クライオ電子顕微鏡法: 試料を液体エタン等で急速凍結して電子顕微鏡で観察する手法

注2)単粒子解析法: 溶液中に分散したタンパク質複合体などの電子顕微鏡写真を大量に集めてコンピュータで解析し、三次元構造を得る手法。クライオ電子顕微鏡法との組み合わせで高分解能の三次元構造を得ることができ、クライオ電子顕微鏡法と併せて昨年ノーベル賞の対象となった。

注3)1 nm, 1 Å: 長さの単位。1 nm は 10^{-9} m。1 Å はその 1/10。原子の大きさが 1 Å のオーダー。

【論文情報】

雑誌名: Nature Communications

論文タイトル: Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly

著者名: Kotaro Tanaka, Shuichi Takeda, Kaoru Mitsuoka, Toshiro Oda, Chieko Kimura-Sakiyama,
Yuichiro Maéda and Akihiro Narita

DOI: [10.1038/s41467-018-04290-w](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04290-w)