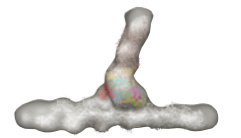


センターを中心に展開される研究



研究課題：線維状蛋白質複合体の電子顕微鏡による構造解析

研究成果:

概略:アクチンフィラメントは、真核細胞において、細胞骨格、接着、運動、分裂等様々な重要な役割を果たし、神経回路形成、癌細胞浸潤、花粉管伸長、細胞分化など様々な観点から盛んに研究されている。これらすべてに共通して、アクチンフィラメントは重合、脱重合を通じて常に形成と消滅を繰り返しており、この動態ゆえに内的、外的環境に応じたアクチンフィラメントネットワークを動的に形成する。このアクチンフィラメント動態を理解することは、ヒトも含めた真核生物において起こる非常に広い範囲の現象の理解に必要不可欠である。この動態はもちろん蛋白質の三次元構造によって説明されるべきものであるが、アクチンフィラメントはX線結晶解析やNMR法による構造決定が事実上不可能であるため、電子顕微鏡法による構造解析が最も有効な手段である。私たちは、精製蛋白質複合体の三次元構造解析と、電子線トモグラフィーによる細胞内線維網構造解析を通じて、アクチンフィラメントを中心とする線維状蛋白質複合体が織りなす多様な生命現象を理解する基盤を築きたいと考えている。以下主な研究成果の概要を述べる。

1. アクチンフィラメント端構造解析:

クライオ電子顕微鏡写真から、アクチンフィラメント端三次元構造を決定する手法を開発(論文6)。アクチン-CP (Capping Protein) 複合体の構造から(論文2, 29, 図1A)、CPがどうしてフィラメントB端にだけ結合し、他の場所や単量体に結合しないのか、どのようにB端におけるフィラメント重合、脱重合を停止するのかが明らかになった(図2左)。また、アクチンフィラメントP端構造の決定も行い、なぜフィラメントP端が重合、脱重合速度がB端に比べて遅いのかを説明するモデルを構築(論文19, 20, 図1B、図2右)することができた。この重合、脱重合速度差は、アクチンフィラメントの極性において最も重要な要素二つのうち一つ(もう一つはミオシンの力発生方向)であり、精製アクチンフィラメントにおいてなぜP端が脱重合端でB端が重合端であるのかを説明する(論文18, 20)。P端構造は播磨理研小田俊郎博士との共同研究である。

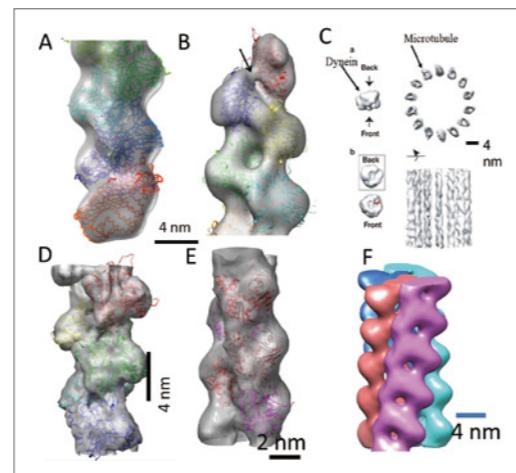


図1: 2006年以降決定された三次元構造。A:アクチン-CP複合体、B:アクチンフィラメントP端構造、C:ダイニン-微小管複合体、D:アクチンフィラメント構造、E:ParMフィラメント構造、F:破傷風菌細胞骨格構造

2. 金コロイドラベルによる、アクチンフィラメント結合蛋白質結合様式の決定:

アクチンフィラメント結合蛋白質の中には、フィラメント側面に結合するのか、P端に結合するのか、B端に結合するのかわからないものも多い。金コロイドをフィラメント結合蛋白質に結合させ、そのアクチンフィラメント上の結合位置を、電子顕微鏡と画像解析によって解析する手法を京都大学山本研究室と共同で開発した(論文22, 図3)。それを用いて、アクチン重合核形成因子として注目を集めていた蛋白質Spireが、多くの論文やreviewで書かれていたP端では無く、B端に結合することを明らかにした(論文21)。

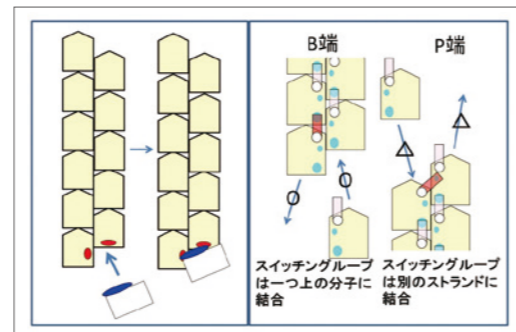


図2: 左:アクチン-CP複合体模式図。右:アクチンフィラメント端構造模式図。

3. 微小管-ダイニン複合体構造解析:

ダイニンは微小管に結合する代表的なモーター蛋白質であるが、大きすぎて微小管を構成するtubulin dimerと1:1に結合できない。ダイニン濃度を薄くし、微小管にダイニンを薄くランダムに結合した状態を作り、画像解析法を工夫(論文4,30)することでダイニンが微小管に結合している状態の構造を決定した(論文5, 図1C)。残念ながら結合部位であるストークは見えなかったが、ダイニンヘッドの構造は最近明らかになった結晶構造と良く一致する。テキサス大学吉川研究室(当時、現東京大学)との共同研究である。

4. バクテリア細胞骨格の構造解析:

バクテリアには、多くの種類のアクチンや微小管ホモログの線維状蛋白質複合体が存在する。その性質を理解し、アクチンや微小管との共通点、相違点を研究することにより、より広い視野からアクチンや微小管の理解を進めることができる。アクチンフィラメントと良く似ているが、らせんの向きが逆であるParMフィラメント構造(論文7, 図1E)、4本のストランドから構成される破傷風菌細胞骨格構造(論文27, 図1F)を明らかにし、フィラメントが作る様々なバンドル構造やシート構造の解析(論文11,12,15,16など)を行っている。シンガポールA*STARのRobert Robinson, David Popp との共同研究である。

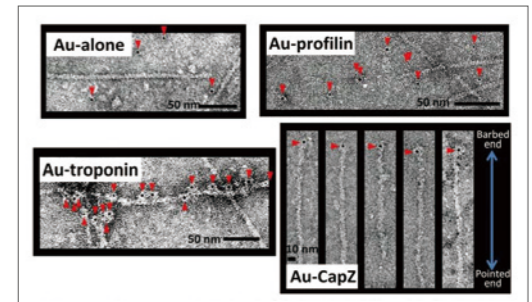


図3: アクチンフィラメント結合蛋白質の結合位置決定手法の開発。矢印が金コロイド。

5. 負染色細胞を用いた細胞内アクチンフィラメント構造解析:

細胞内アクチンフィラメント網の構造解析は、従来加圧凍結+凍結置換法やフリーゼエッチングレプリカ法などが行われてきたが、これらの方法では蛋白質構造そのものは壊れてしまう。近年クライオトモグラフィー法も進展してきているが、細胞質と蛋白質の密度差が非常に小さく、分子構造レベルの解析が困難である。そのなかで、オーストリア科学アカデミーのVictor Small研究室は、細胞を負染色して電子線トモグラフィーする技術を開発、細胞の薄い部分では従来にない像質の細胞内三次元構造を得ることに成功した。私たちはVictor Small研究室の依頼を受け、このデータから細胞内蛋白質構造を解析する手法を開発(論文24,31)、これを元に葉状仮足のアクチンフィラメント分岐構造平均化を含む葉状仮足の解析(論文23, 図4A, B)、Baculovirusが作るコメットテイルの構造とその生成メカニズム解明(論文28, 図4C)を行った。

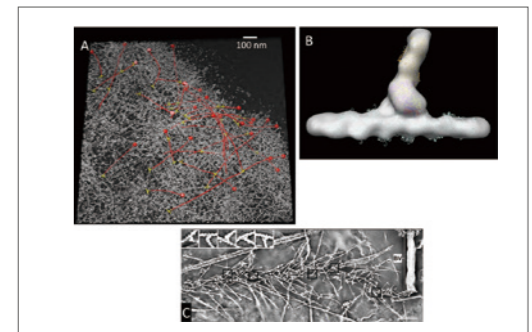


図4: 細胞内アクチンフィラメント構造解析。A:葉状仮足。赤はアクチンフィラメントのトレース。球がB端、黄色が分岐を示す。B:分岐構造の三次元平均構造。C:Baculovirusのコメットテイル構造。

得意とする考え方、手法:

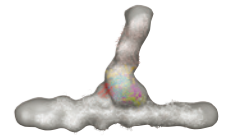
電子顕微鏡法とそれを利用した蛋白質構造解析。主に精製蛋白質を用いた負染色法、クライオ法による電子顕微鏡写真撮影とその解析による三次元構造決定を得意とする。また、最近では、他の研究グループとの共同で細胞の中の構造解析も始めており、そのために電子顕微鏡の開発も含めた様々な手法を模索している。

論文発表(2006年以降)

英文誌:

- Imai, H., Narita, A., Schroer, T. A. & Maeda, Y. (2006). Two-dimensional averaged images of the dynein complex revealed by single particle analysis. *J Mol Biol* **359**, 833-9.
- Narita, A., Takeda, S., Yamashita, A. & Maeda, Y. (2006). Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *Embo J* **25**, 5626-33.
- Popp, D., Yamamoto, A., Iwasa, M., Narita, A., Maeda, K. & Maeda, Y. (2007). Concerning the dynamic instability of actin homolog ParM. *Biochem Biophys Res Commun* **353**, 109-14.
- Narita, A., Mizuno, N., Kikkawa, M. & Maeda, Y. (2007). Molecular determination by electron microscopy of the Dynein-microtubule complex structure. *J Mol Biol* **372**, 1320-36.
- Mizuno, N., Narita, A., Kon, T., Sutoh, K. & Kikkawa, M. (2007). Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 20832-7.
- Narita, A. & Maeda, Y. (2007). Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure. *J Mol Biol* **365**, 480-501.
- Popp, D., Narita, A., Oda, T., Fujisawa, T., Matsuo, H., Nitani, Y., Iwasa, M., Maeda, K., Onishi, H. & Maeda, Y. (2008). Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *Embo J* **27**, 570-9.

センターを中心に展開される研究



8. Iwasa, M., Maeda, K., Narita, A., Maeda, Y. & Oda, T. (2008). Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle alpha-actin mutants. *J Biol Chem* **283**, 21045-53.
9. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y. & Narita, A. (2009). The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441-5.
10. Popp, D., Iwasa, M., Maeda, K., Narita, A., Oda, T. & Maeda, Y. (2009). Protofilament formation of ParM mutants. *J Mol Biol* **388**, 209-17.
11. Popp, D., Iwasa, M., Narita, A., Erickson, H. P. & Maeda, Y. (2009). FtsZ condensates: an in vitro electron microscopy study. *Biopolymers* **91**, 340-50.
12. Popp, D., Narita, A., Iwasa, M., Maeda, Y. & Robinson, R. C. (2010). Molecular mechanism of bundle formation by the bacterial actin ParM. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1598-603.
13. Popp, D., Narita, A., Ghoshdastider, U., Maeda, K., Maeda, Y., Oda, T., Fujisawa, T., Onishi, H., Ito, K. & Robinson, R. C. (2010). Polymeric structures and dynamic properties of the bacterial actin AlfA. *J Mol Biol* **397**, 1031-41.
14. Takeda, S., Minakata, S., Koike, R., Kawahata, I., Narita, A., Kitazawa, M., Ota, M., Yamakuni, T., Maeda, Y. & Nitani, Y. (2010). Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation—steric and allosteric inhibition. *PLoS Biol* **8**, e1000416.
15. Popp, D., Narita, A., Maeda, K., Fujisawa, T., Ghoshdastider, U., Iwasa, M., Maeda, Y. & Robinson, R. C. (2010). Filament structure, organization, and dynamics in MreB sheets. *J Biol Chem* **285**, 15858-65.
16. Popp, D., Iwasa, M., Erickson, H. P., Narita, A., Maeda, Y. & Robinson, R. C. (2010). Suprastructures and dynamic properties of Mycobacterium tuberculosis FtsZ. *J Biol Chem* **285**, 11281-9.
17. Popp, D., Xu, W., Narita, A., Brzoska, A. J., Skurray, R. A., Firth, N., Ghoshdastider, U., Maeda, Y., Robinson, R. C. & Schumacher, M. A. (2010). Structure and filament dynamics of the pSK41 actin-like ParM protein: implications for plasmid DNA segregation. *J Biol Chem* **285**, 10130-40.
18. Narita, A. (2011). Minimum requirements for the actin-like treadmilling motor system. *Bioarchitecture* **1**, 205-208.
19. Narita, A. (2011). Merits of the double-stranded form of the actin filament revealed by structures of the filament ends. *Commun Integr Biol* **4**, 692-5.
20. Narita, A., Oda, T. & Maeda, Y. (2011). Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. *EMBO J* **30**, 1230-7.
21. Ito, T., Narita, A., Hirayama, T., Taki, M., Iyoshi, S., Yamamoto, Y., Maeda, Y. & Oda, T. (2011). Human spire interacts with the barbed end of the actin filament. *J Mol Biol* **408**, 18-25.
22. Ito, T., Hirayama, T., Taki, M., Iyoshi, S., Dai, S., Takeda, S., Kimura-Sakiyama, C., Oda, T., Yamamoto, Y., Maeda, Y. & Narita, A. (2011). Electron microscopic visualization of the filament binding mode of actin-binding proteins. *J Mol Biol* **408**, 26-39.
23. Vinzenz, M., Nemethova, M., Schur, F., Mueller, J., Narita, A., Urban, E., Winkler, C., Schmeiser, C., Koestler, S. A., Rottner, K., Resch, G. P., Maeda, Y. & Small, J. V. (2012). Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. *J Cell Sci* **125**, 2775-85.
24. Narita, A., Mueller, J., Urban, E., Vinzenz, M., Small, J. V. & Maeda, Y. (2012). Direct determination of actin polarity in the cell. *J Mol Biol* **419**, 359-68.
25. Popp, D., Narita, A., Lee, L. J., Larsson, M. & Robinson, R. C. (2012). Microtubule-like properties of the bacterial actin homolog ParM-R1. *J Biol Chem* **287**, 37078-88.
26. Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, K., Narita, A., Maeda, Y. & Oda, T. (2012). Role of the actin ala-108-pro-112 loop in actin polymerization and ATPase activities. *J Biol Chem* **287**, 43270-6.
27. Popp, D., Narita, A., Lee, L. J., Ghoshdastider, U., Xue, B., Srinivasan, R., Balasubramanian, M. K., Tanaka, T. & Robinson, R. C. (2012). Novel actin-like filament structure from Clostridium tetani. *J Biol Chem* **287**, 21121-9.
28. Müller, J., Pfanzer, J., Winkler, C., LeClainche, C., Nemethova, M., Narita, A., Maeda, Y., Welch, M. D., Ohkawa, T., Carlier, MF, Resch, GP, Schmeiser, C. & Small, JC. (2013). Electron tomography and simulation of baculovirus actin comet tails support a tethered filament model of pathogen propulsion, *PLoS Biol* doi/10.1371/journal.pbio.1001765

和文誌:

29. 成田 哲博 (2007) アクチンフィラメント端の伸長制御機構 月刊Bionics 3月号 314-317 オーム社
30. 成田 哲博 (2009) 繊維状構造のための単粒子解析法 生物物理 49(6), 314-317
31. 成田 哲博 (2013) 電子線トモグラフィーによる細胞内アクチンフィラメント構造解析 顕微鏡 48, 78-83

受賞歴:

- 2007年 風戸研究奨励賞
2008年 文部科学大臣表彰 若手科学者賞