

# センターを中心に展開される研究

## アクチン・フィラメントの構造と構造動態

アクチンは高等生物細胞の運動及び細胞内オルガネラ運動の多くを担う細胞骨格である。一方では筋収縮の調節メカニズムを担い、他方非筋細胞では循環的分子運動を担う。後者は、発生分化(原腸形成期の胚細胞の移動)、免疫(好中球の走化性運動)、ガン(ガン細胞の浸潤・転移時の運動)、植物細胞の運動(葉緑体の移動や花粉管の伸長)など多くの細胞機能に関与する。

私たちは成田グループと共同で、筋収縮の調節メカニズムとアクチン循環的分子運動メカニズムの双方を理解することを目的として研究を続けている。ここでの研究成果報告は成田グループの研究報告と重複しない範囲に限ることとする。まず基本的事項を説明したい。

**循環的分子運動:**アクチンは単量体と重合体の2つの状態を循環する。細胞内ではアクチン重合体のB端(伸張端)ではもっぱらATP結合型単量体の重合が、P端ではもっぱらADP結合型単量体の脱重合がおき(図1)、膜やオルガネラを推す力を発生する。これが循環的分子運動(アクチン・トレッドミリング)である。

**協働蛋白質:**循環的分子運動はアクチンの著しい特性であり、アクチンだけでも動く。しかしアクチンのみでは運動速度は遅い。細胞内で有意義な速度(100倍)に加速するのは複数の結合蛋白質の協働のためである:重合開始はArp2/3, forminによって、伸張端への集中はCapping Protein(CP)によって、脱重合はcofilinによって加速される(図2)。

### 1. 脊椎動物の筋肉「細い線維」の構造と筋収縮の調節メカニズム:

筋収縮は細胞内カルシウム濃度によって調節される(1960年代、江橋節郎)。この発見は、カルシウムが生体内情報伝達物質であることを最初に示した画期的発見であった。江橋らはカルシウム受容蛋白質としてトロポニンを見出し、受容構造体として「筋肉細い線維」の分子モデルを提案した(Ebashi, 1972, 図3b)。しかし筋収縮の調節メカニズムを理解するには、分子モデルだけでは不十分であり、これを原子モデルに置き換える必要がある。すなわち、蛋白質・蛋白質相互作用の変化を、アミノ酸側鎖の接触の変化として解明する必要がある。それゆえ、その後の研究は原子構造の解明をめざした。

私たちは、「筋肉細い線維」を構成するトロポニン、トロポミオシン、アクチン重合体の個別の原子構造解明で中心的な貢献をしてきた(図4)<sup>1, 2, 4, 5</sup>。しかし、これでもまだ不十分であり、複合体全体の原子構造が必要となっている。複合体全体の電子顕微鏡構造解析は現在進行中である。ここではすでに解明したアクチン重合体の高分解能構造について述べる。

#### 1-1. アクチン重合体高分解能構造の解明:

アクチンは単量体と重合体の2つの状態をとる。単量体の結晶構造は1990年に解明されていたが、細胞機能の理解のためにより重要な重合体構造は未解明であった。蛋白質の原子構造解明にはX線結晶構造解析法によるが、アクチン重合体は長さを調節できないために結晶を調製できずこの方法を利用できない。そこで私たちは次のような新しい構造解析法を編み出した。

アクチン重合体をガラス細管に高濃度に濃縮し、流動場と高磁場で高配向させた。これにシンクロトロン放射X線を照射してX線繊維回折強度を得た。クライオ電子顕微鏡写真より重合体内のアクチン分子の方向と位置(特に螺旋半径)を求め単量体アクチン構造を計算機内にその方向・位置に置いて仮定の重合体を作った。仮定重合体から予想されるX線繊維回折強度が実際の回折強度と一致するまでアクチン分子を計算機内で変形させた(これはそう簡単なことではない)。こうして得た重合体構造を分子動力学法で最適化した。

こうして得た重合体の高分解能構造(2009, Oda et al, Nature)<sup>5</sup>より、重合に伴ってアクチン分子の形態は大きく変わることが判明した。単量体アクチン分子は中央のヌクレオ



特任教授  
前田 雄一郎

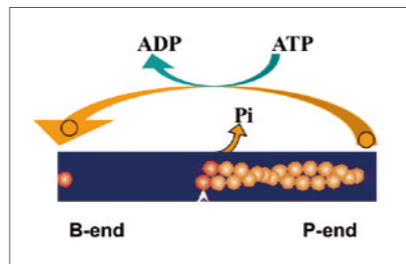


図1: アクチンの循環的分子運動。

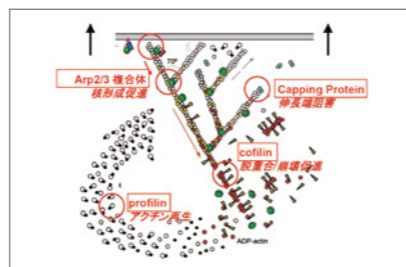


図2: アクチン循環的分子運動の協働蛋白質と分岐的網目構造の構築・崩壊(Pollard, 2007)。

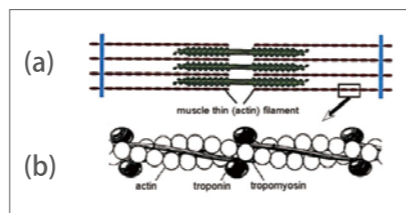


図3: (a)脊椎動物骨格筋・心筋のサルコメア構造。主にアクチンから形成される細い線維とミオシンから形成される太い線維が規則的に配列する。(b)「細い線維」の分子構造モデル(Ebashi, 1972)。

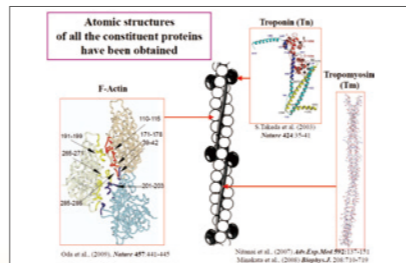


図4: 私たちは細い線維を構成する個々の蛋白質の原子構造解明で中心的な役割を果たしてきた。トロポミオシンC端部分の結晶構造(右)<sup>1, 2</sup>、トロポニン中核部分の結晶構造(中)<sup>4</sup>、アクチン重合体の高分解能構造(左)<sup>5</sup>。

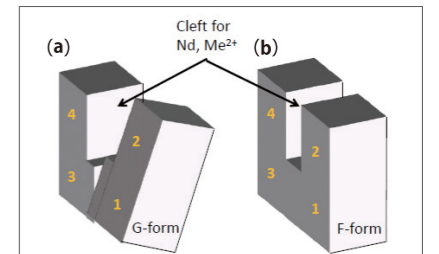


図5: 重合に伴うアクチン分子の形態変化。(a)単量体(G型)、(b)重合体中(F型)<sup>6</sup>。

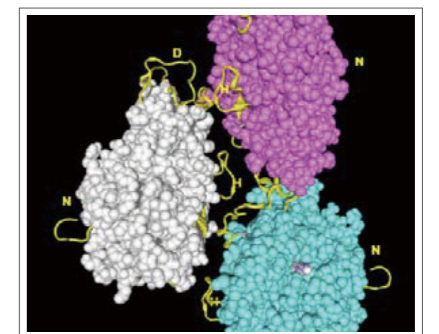


図6: アクチン重合体内のアクチン分子間接触はloop-loop接触である<sup>6</sup>。

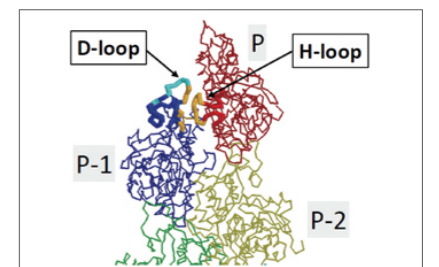


図7: アクチン重合体の自由P端の構造。ここでのみ、分子PのH-loopが分子P-1のD-loopと接触する<sup>6</sup>。

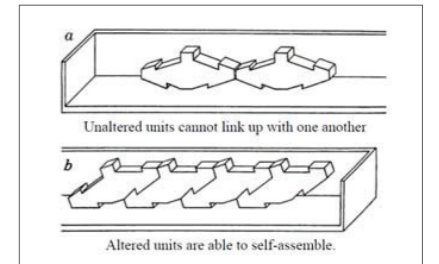


図8: 分子変形の伝播。(a)分子が中立的な形態にあると重合は起きないが、(b)一旦、端の分子が形態を変えると次々に分子が加わり(自己集合)、形態変化が端で伝播する。出典:Penrose (1959) Sci Am. 200:105-114。

チド結合溝の左右が互いに約20度捻れているが、重合体中のアクチン分子はほぼ平坦となる(図5)。これは細胞内でのアクチンの働きを理解する上で基本的に重要な発見である(後述)<sup>6, 9</sup>。この発見はその後急速凍結試料の電子顕微鏡解析によって確認された(2010, 難波ら、若林ら)。

### 1-2. アクチン重合体の構築原理:

重合に伴うアクチン分子の構造変化とその後の私たちの研究からアクチン重合体の構築原理の理解が進んだ。

**第一の構築原理:**重合体中でのアクチン・アクチン間の接触はもっぱら分子表面のloop-loop接触である(図6)。これは従来理解されてきた表面・表面接触よりなる蛋白質・蛋白質相互作用とは著しく異なる。Loop-loop接触は分子本体の相互位置の多少の変動を許容する柔軟さに富み、複合体としての自由エネルギーも、また他の蛋白質との相互作用の速度定数なども広い範囲に調節することが可能な構造である。

自由P端の構造(2011, Narita et al, EMBO J)<sup>9</sup>はその例である。P端では最端分子Pが軸に向かって約7度倒れるため、隣接分子P-1との間で、重合体内部では不可能な余分なLoop-loop接触が形成される(図7)。この相互作用のため、P端への重合およびP端からの脱重合反応の活性化エネルギー(kinetic barrier)がより高くなり、重合および脱重合速度がB端に比して遅くなる。これがアクチンの循環的分子運動を常にB端方向に進行させる原因であることがわかった。

**第二の構築原理:**重合するとアクチン分子は変形するが、そのとき分子内に歪みエネルギーを貯める。分子間のloop-loop接触のために重合体は全体として安定化するが、一時的・部分的に分子間接触が破綻し単量体の形態に戻るアクチン分子もあろう。この部分的な破綻こそがアクチン重合体の柔軟性の基礎であろう。

この力学的歪みのエネルギーは、アクチン重合体の端での単量体の衝突エネルギーに由来する。アクチン分子の変形は端から新たに重合した分子に伝播する(図8)。では、最初の分子はいつどこで変形するのか?これこそ重合核形成蛋白質(Arp2/3, forminなど)の役割であろう。細胞内では核形成蛋白質の活性、すなわちアクチン重合体の新規形成は、時間的・空間的に厳密に調節されている。こうして細胞にとって危険なアクチンの自発的重合開始を回避する。

**第三の構築原理:**細胞内ではアクチン単量体は1分子のMg-ATPを結合し、重合体中のアクチン分子は1分子のMg-ADPを結合する。重合に伴ってATP加水分解反応が起きるが、これはアクチン分子の変形の結果起きることが変異アクチンを使っての実験で示された(2008, Iwasa et al, J.Biol.Chem)<sup>10</sup>。すなわち化学変化(ATPase)が原因となって物理的現象(重合)が結果するのではなく、物理的現象が原因となって化学反応が起きる。ではATPaseで解放されたエネルギーは何に使われるのか?ADP結合型になったアクチン重合体の端はさらに不安定となり平衡を脱重合側に傾ける。そのために一端ではもっぱら重合が、他端ではもっぱら脱重合が起きる状態が出現し、アクチンの循環的分子運動が実現する。すなわちアクチンのATPaseは脱重合を促進して循環的分子運動を駆動する。

**第四の構築原理:**アクチン重合体構造は揺動するため、アクチン結合蛋白質との親和性(結合の平衡定数)も重合体の状態によって影響を受けると考えられる。この点を考えるに至った経緯は以下に述べる。

### 2. アクチン循環的分子運動における蛋白質・蛋白質相互作用:

私たちは、アクチン循環的分子運動(アクチン・トレッドミリング)のメカニズムの研究の一環として、アクチン・キャッピング蛋白質(CP; CapZとも呼ばれる)とアクチン重合体B端の相互作用の深い理解をめざしている。CPはB端に特異的に結合して、そこでの重合・脱重合を阻害し、その結果自由B端の数を減らすことによって、重合反応=アクチン線維の伸張を少数の自由B端に集中させる働きをする。CPはアクチン循環的分子運動に必須の4調節蛋白質のうちの一つである(図2)。

## センターを中心に展開される研究

私たちの研究の結果、CPが「固く」なるとB端から解離しやすくなることが示唆された。このことは、逆にアクチン重合体が「固く」なるとCPをB端から解離しやすくなる可能性も示唆する。例えば、アクチン重合体の側面にコフィリンが結合すると重合体が「固く」なってB端からCPを解離させる、というような調節メカニズムの存在が示唆される。

私たちはまずCP単独の結晶構造を解明した(Yamashita et al, 2003, EMBO J)<sup>7</sup>。相似形の2分子( $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニット)が中心軸の回りにほぼ回転対称の関係で会合している(図9)。次にアクチン重合体B端に結合した複合体の電子顕微鏡構造を解明して(図10)、CP/B端の結合が2段階結合であることを解明した(Narita et al, 2006, EMBO J)<sup>8</sup>。さらに、CPをB端から解離させるメカニズムの解明をめざして、以下の点を明らかにした。

(1) 計算機によるCPの基準振動分析の結果は、CPがCP-L, CP-Sの2つのドメインに分かれ、それぞれは互いにほぼ平行な軸の回りを相反ローリング運動をして揺動していることを示す(図13)<sup>3,11</sup>。

(2) CALMILペプチド(CALMIL蛋白質が共有するCP結合ペプチド(21残基))はCPのun-capperである:すなわちB端に結合しているCPに結合し、CPをB端から解離させる。CP/CARMILペプチド複合体の結晶構造<sup>9</sup>は、このペプチドが天然変性ペプチドとしてCPの表面にある溝に結合することを示す(図11)。この溝はCPのB端結合部位とは離れているので、CARMILペプチドはCPのアロステリック・リガンドであるが、CPの構造も表面電位ポテンシャルもほとんど変化させない。

(3) 他方、TwC36ペプチド(別のアクチン結合蛋白質TwinfilinのC末端36残基)も天然変性ペプチドであり、CP表面の同一の溝に結合する(武田修一ら、未発表)が、CPをB端から解離させない、つまりun-capperとして働くことはない(図12)。

(4) 興味深いことに、双方のペプチドは同一の溝に結合するが、結合様式は完全に同一ではない;CARMILペプチドはCP-LとCP-Sの2つのドメインの境界を越えて結合するが、TwC36は境界を越えない(図13)。これがCPをB端から解離させる能力に差がある原因ではないか、と考えられる。

(5) その考えを支持するように、CP/CARMILペプチド複合体とCP/TwC36ペプチド複合体の計算機による基準振動分析の結果は、前者では相反ローリング運動が著しく抑制されるが、後者ではほとんど影響を受けないことを示した(小池亮太郎、太田元規、武田修一ら未発表)。

これらの結果から、私たちはCARMILペプチドがCPに結合すると、相反ローリング運動を抑制し、その結果CPが「固く」なり、「固く」なったためにアクチン重合体B端との結合が弱くなり解離すると考える。CPのアロステリック・リガンドとしてのCARMILペプチドは、CPの構造変化ではなく構造動態変化を介して作用するのである。現在、構造動態を直接測定してこの仮説を検証する作業を開始している。

すでに述べたように、この仮説が正しいとなると、反対にアクチンB端の構造揺動が何らかの理由で抑制されるとCPとの結合が弱まりB端からCPが解離すると考えられる。このことは2つの重要な意味を持つ。第一に、例えばアクチン重合体にcofilinが結合してアクチン重合体が「固く」なるとB端からCPを解離する、というように複数のアクチン結合蛋白質のアクチン親和性が、アクチン重合体を介して互いに影響を及ぼし合うような調節機構があるに違いない。第二に、アクチン重合体には構造揺動によって区別される2つ以上の異なる状態があるだろう。現在、アクチン重合体のもう一つの状態の探索を始めている。

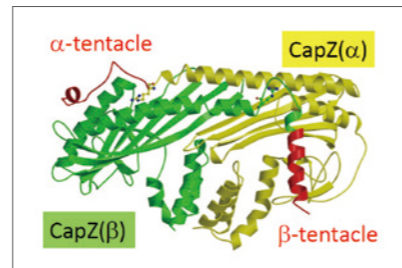


図9: CP(CapZ) 単独の結晶構造。 $\alpha$  (黄)と $\beta$  (緑)の2分子からなる。各分子のC末端(赤)はそれぞれアクチン重合体B端への結合部位<sup>7</sup>。

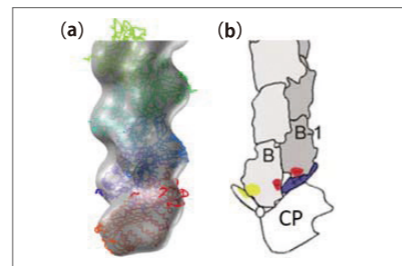


図10: (a) CP/B端複合体の電子顕微鏡構造と (b) 結合モデル<sup>8</sup>。

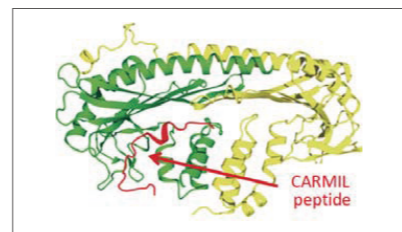


図11: CP/CARMILペプチド複合体の結晶構造<sup>9</sup>。

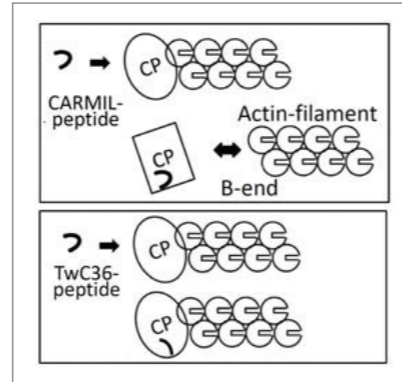


図12: CARMILペプチドのCPへの結合とTwC36ペプチドのCPへの結合の作用は異なる。

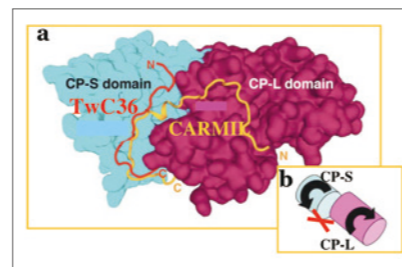


図13: (a) CP上に結合したCARMILペプチドおよびTwC36ペプチドの位置関係。一部未発表<sup>3</sup>。(b) 相反ローリング運動の概念図。

### 当グループが得意とするところ:

- (1) X線結晶学、電子顕微鏡を使った分子レベルの構造解析、蛋白質NMRを使った研究、それらのための蛋白質試料の大量発現系の確立、これら手法・技術の組み合わせの問題についていつも考えています。喜んで議論に参加します。
- (2) X線結晶構造解析のための結晶調製法について。
- (3) 構造生物学研究のための蛋白質試料の大量発現について。

### 本文中で紹介した当グループの研究論文(2006年以降の主要論文を中心に):

1. Nitanaï, Y., Minakata, S., Maeda, K., Oda, N. & Maeda, Y. (2007). Crystal structures of tropomyosin: flexible coiled-coil. *Adv Exp Med Biol* **592**, 137-51.
2. Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Wakabayashi, K., Nitanaï, Y. & Maeda, Y. (2008). Two-crystal structures of tropomyosin C-terminal fragment 176-273: exposure of the hydrophobic core to the solvent destabilizes the tropomyosin molecule. *Biophys J* **95**, 710-9.
3. Takeda, S., Minakata, S., Koike, R., Kawahata, I., Narita, A., Kitazawa, M., Ota, M., Yamakuni, T., Maeda, Y. & Nitanaï, Y. (2010). Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation—steric and allosteric inhibition. *PLoS Biol* **8**, e1000416.
4. Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K. & Maeda, Y. (2003). Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature* **424**, 35-41.
5. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y. & Narita, A. (2009). The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441-5.
6. Narita, A., Oda, T. & Maeda, Y. (2011). Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. *EMBO J* **30**, 1230-7.
7. Yamashita, A., Maeda, K. & Maeda, Y. (2003). Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J* **22**, 1529-38.
8. 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.
9. Oda, T. & Maeda, Y. (2010). Multiple Conformations of F-actin. *Structure* **18**, 761-7.
10. 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.
11. Takeda, S., Koike, R., Nitanaï, Y., Minakata, S., Maeda, Y. & Ota, M. (2011). Actin capping protein and its inhibitor CARMIL: how intrinsically disordered regions function. *Phys Biol* **8**, 035005.