

**アクチンフィラメントの構造と動態：  
特にカルシウム調節のメカニズムの解明**

Structure and dynamics of actin filament complex:  
mechanism of calcium regulation of muscle contraction

**前田 雄一郎 (MAEDA YUICHIRO)**  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要

アクチンは筋収縮とその調節を担う。また重合・脱重合に駆動されるトレッドミリングの分子運動を介して多くの細胞機能を担う。本研究では、構造および構造動態を、細胞内・複合体レベル・分子内の3階層で解明し、それを基礎にアクチンとその結合蛋白質の離合・集散のメカニズムを解明する。それによって蛋白質分子の相互作用一般の理解を深めることを目標とする。

研究分野：構造生理学、生物物理学

科研費の分科・細目：生物物理学、構造生物化学

キーワード：蛋白質の構造・動態・機能、NMR、X線結晶解析、高分解能電子顕微鏡解析

1. 研究開始当初の背景

アクチンは多くの細胞機能を担う重要な蛋白質である。これらのメカニズムを理解するには、アクチン重合体とそれに結合する蛋白質の3次元構造を解明する必要があるが、構造解明は遅れていた。アクチン重合体は線維状の重合体を形成するため結晶を形成せず、X線結晶構造解析の方法を使えない。細くて柔らかいため電子顕微鏡画像解析法も適用できなかった。また適当な発現系もなかった。

2. 研究の目的

私たちの研究グループでは、長年の努力でこれら技術的困難を打開する新規方法を解決してきた(次項参照)。本研究ではそれら方法を活用して、アクチン重合体を核とする複合体の構造を解明する。また単なる構造解析から、構造の動態の解析に進み機能発現のメカニズムと関連付ける。

3. 研究の方法

独自に新規な解析方法を開発して使用した。

(1) 結晶を用いることなくX線繊維回折法を中心にしてアクチン重合体の高分解能構造を解明する方法。

(2) アクチン重合体の構造解析に特化したクライオ電子顕微鏡写真の単粒子解析法。

(3) 哺乳類アクチンを昆虫培養細胞に発現する方法。

(4) 蛋白質分子の構造動態を計測するSAIL-NMR法(甲斐荘)。

4. これまでの成果

(1) すでに私たちはトロポニンの結晶構造を解明している(2003, *Nature*)。本研究でトロポミオシン<sup>4</sup>とアクチン重合体<sup>3</sup>(次項)の高分解能構造を解明した。これにより、筋肉「細いフィラメント」複合体を構成するすべての蛋白質の構造を解明した。筋収縮とその調節のメカニズムの解明のためには、今後「細いフィラメント」全体の原子構造を知る必要がある。しかしこれら単体の構造があって初めて複合体の構造を解釈できる。

(2) アクチンは単量体の結晶構造は既知であるが重合体の構造は未知であった。私たちはアクチン重合体の高濃度・高配向ゾルを調製しそのX線繊維回折強度を基に独自の構造解析法を開発することによって重合体の高分解能構造を解明した<sup>3</sup>。本研究では、アクチン重合には大きな形態変化(G型からF型)が伴うことを初めて発見した。F型は不安定であり一分子ではこの状態に存在できないが、重合体内では分子間結合のため存在できるようになる。重合体内では分子内に歪みのエネルギーが貯まっている。この歪みエネルギーが放出されるために崩壊(脱重合)しやすくてきている。また結合が局所的に破壊するとアクチン重合体が柔らかくなる。筋収縮のカルシウム調節を理解するためにも、アクチン・トレッドミリングの理解のためにも、この柔らかさの理解が重要である。

(3) 細胞内ではアクチン重合の自発的な開始は危険であるためそれが不可能にできている。既存の重合体端のアクチン分子はすでにF型になっており、この端では形態変化が触媒的に起き重合体は伸張する。しかし膜の内側で最初のアクチン分子の形態変化は「誰」がどのように起こすのか? Arp2/3 複合体、Formin など核形成促進因子がその役割を担う。今後のトレッドミリングのメカニズムの研究の中心課題は、これらがアクチン分子と接触してその形態を変化させる過程の理解することである。

(4) アクチン重合体P端の構造を初めて解明した。これには独自に開発したクライオ電子顕微鏡写真の画像解析法を適用した。先端のアクチン分子が傾くため次の分子との間に新規のループ・ループ結合が形成される。この結合はP端でのアクチン分子の重合・脱重合反応の kinetic barrier となり、反応速度はB端に比して双方向とも一桁遅くなる。これがトレッドミリングがB端方向に走行する理由である。蛋白質相互作用によって駆動される一方運動系にはアクチン・ミオシン、微小管・キネシンなど数多くあるが、本研究は運動方向決定のメカニズムを解明した最初である。

(5) 本研究から、アクチン分子の分子間結合は主に分子の表面ループ同士の結合であることがわかった。この考え方は今後の研究に多くの指針を与える。アクチン重合体の柔らかさを理解するためにはループ間接触の安定性を計測するべきであろう。重合・脱重合反応はループ間の交換であろうから各ループの挙動を調べるべきであろう。

(6) CP (キャッピング蛋白質) はアクチン重合体のB端に結合して、B端での重合と脱重合を阻害する。CP トレッドミリングに必須の蛋白質の一つである。本研究では、CP とその調節蛋白質との複合体の結晶構造を解明し調節の作動メカニズムを考察した。CARMIL ペプチドはCPに結合し、CPをアクチン重合体B端から解離させる。CARMIL ペプチドはCPをアロステリックに調節するが、それは従来から知られた形態変化を介したタイプではなく、揺動抑制による新しいタイプであるとの示唆を得た。このことは、アクチンB端側の構造揺動もCP/B端結合の強さに大きく影響することを意味する。すなわちアクチン重合体とその結合蛋白質の間の相互作用を検討するには、構造揺動による親和性の大きな変化を考慮する必要がある。

## 5. 今後の計画

- (1) 筋肉「細いフィラメント」=アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体全体の構造解明。
- (2) N-WASP+Arp2/3+アクチンの結晶構造を解明し Arp2/3 がアクチン分子の変形促進過程を構造的に理解する。
- (3) アクチン重合体とコフィリン複合体の構造を解明し、脱重合(崩壊)促進のメカニズムを解明する。
- (4) CPの構造動態を SAIL-NMR法を用いて測定し、CARMILペプチドの結合の影響を調べる。
- (5) トロポニンの構造動態を測定する。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む) 【発表論文(査読あり)】

1. Narita, A., Oda, T., and Maéda, Y. (2011) Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end, *EMBO J*. Epub 2011/03/08.
2. Takeda, S., Minakata, S., Koike, R., Kawahata, I., Narita, A., Kitazawa, M., Ota, M., Yamakuni, T., Maéda, Y., and Nitani, Y. (2010) Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation--steric and allosteric inhibition, *PLoS Biol* 8, e1000416.
3. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., and Narita, A. (2009) The nature of the globular- to fibrous-actin transition, *Nature* 457, 441-445.
4. Minakata, S., et al. (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, 710-719.
5. Iwasa, M., Maeda, K., Narita, A., Maéda, Y., and Oda, T. (2008) Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle alpha-actin mutants, *J Biol Chem* 283, 21045-21053.

## 【国際学会等での基調講演】

1. Maéda Y. "The nature of G- to F-actin transition". Gordon Research Conf. on "Muscle and molecular motors", New London, NH, USA, July 2, 2008
2. Maéda Y. "Towards understanding the basic properties of F-actin" Biochemical Interactions: from molecules to Function, April 23, 2009, Velen (Münsterland), Germany

【表彰】 2008年 文部科学大臣表彰・若手科学者賞 成田哲博

## 【ホームページ等】

<http://str.bio.nagoya-u.ac.jp:8080/Plone>