

2006年11月17日
独立行政法人 科学技術振興機構
独立行政法人 理化学研究所
名古屋大学

細胞が形状を変えながら移動する謎の一端を解明

- アクチンフィラメント端での伸縮制御メカニズムが明らかに -

JST（理事長 沖村憲樹）、独立行政法人理化学研究所（理事長 野依良治）、国立大学法人名古屋大学（学長 平野眞一）は、細胞に最も多く含まれるタンパク質“アクチンフィラメント”の端^{注1}の立体的な構造を決定する新たな手法を開発し、それを用いてアクチンフィラメントと **Capping Protein**（キャッピング プロテイン）^{注2}の複合体の三次元構造を決定しました。アクチンフィラメント端でのタンパク質の形を見たのは本研究が世界で初めてです。

アクチンは細胞に最も多量に含まれるタンパク質であり、細胞生存の根幹に関わる重要な役割を担います。アクチンフィラメントはアクチン分子の重合・脱重合によって伸長や短縮することで長さを変え、移動することで、生体の生存に関わる機能を果たします。細胞の中ではアクチンフィラメントの伸長や短縮は制御されていますが、その制御は、アクチンフィラメントの端の部分に結合するタンパク質によって引き起こされます。**Capping Protein**はそのようなアクチンフィラメントの伸長や短縮を制御するタンパク質の一つです。アクチンフィラメントの伸長や短縮の制御メカニズムを理解するため、アクチンフィラメントの端と **Capping Protein** の結合様式の解明が期待されていました。

今回、研究チームは、**Capping Protein** がアクチンフィラメント末端のアクチン分子と結合した複合体の構造の解明に成功しました。これによりアクチンフィラメントの伸長と短縮の制御メカニズムが明らかになりました。

アクチンフィラメント端への結合タンパク質の調節機能は、生命現象の極めて基本的な営みであり、本成果によって、筋収縮、細胞骨格、細胞内シグナル伝達、細胞質分裂などの様々な生命現象やガン細胞の転移現象の理解が大きく進展することが期待されます。また、今回解明した制御メカニズムの応用により、全く新しい原理で駆動するナノモーターの開発が期待されます。

この研究成果は、戦略的創造研究推進事業 ERATO 型研究「前田アクチンフィラメント動態プロジェクト」（研究総括：前田雄一郎）の前田雄一郎研究総括（名古屋大学大学院理学研究科教授、理化学研究所播磨研究所客員主管研究員）と成田哲博研究員らが中心となって、理研播磨研究所放射光科学総合研究センターおよび名古屋大学との共同研究によって得たもので、決定されたアクチンフィラメント- **Capping Protein** 複合体の構造は欧州科学誌「EMBO Journal」オンライン版に2006年11月16日（英国時間）に公開され、誌面では2006年11月29日（英国時間）に掲載される予定です。

1. 本研究の背景

アクチンは、真核細胞の中に最も多く含まれるタンパク質の一つです。アクチン

は細胞内でモノマー（単量体）と、モノマーが連なったフィラメント（重合体）の2つの状態で存在し、その2つの状態間を行き来します。特に、フィラメントの一端（B端）へのモノマーの追加（重合）による伸長と、他端（P端）からのモノマーの脱落（脱重合）による短縮が、ほぼ同一の速度で進行すると、フィラメントが全体として一方向に移動します。このようなアクチンの重合と脱重合によって駆動されるアクチンフィラメントの運動のことを「アクチン・ダイナミクス」と言います（図1）。

細胞内ではアクチン・ダイナミクスの速度、方向、時期、細胞内の位置は厳密に調節されており、それによってはじめて細胞内の輸送も細胞の運動も秩序だったものとなります。細胞内でのアクチン・ダイナミクスの調節は、各々それに特化した多くのアクチン結合タンパク質によって担われています。そのなかでもアクチンフィラメント端に結合するタンパク質は重要な調節作用を担います。タンパク質 **Capping Protein** はアクチンフィラメント端結合タンパク質のひとつで、アクチンフィラメントのB端を塞ぎアクチンのB端における重合や脱重合による伸長や短縮を止めます。

アクチンフィラメントの伸長や短縮はアクチンがアクチンとして機能する上で、非常に重要な役割を担っており、例えば伸縮が損なわれると細胞の形を保てなくなる、細胞の移動能力がなくなる、細胞が分裂できないなど現象が起こるために、生物は生存することはできません。そのため、伸長や短縮の制御メカニズムの解明が期待されていました。

2. 本研究の成果

クライオ電子顕微鏡写真^{注3}からアクチンフィラメントの端の形を決定するために本研究グループが2006年7月に *Journal of Molecular Biology* 誌において発表した新しい画像処理アルゴリズムを使って、B端—**Capping Protein** 複合体のクライオ電子顕微鏡写真(図2)を解析し、その三次元構造を得ました(図3A,D)。こうして得られた構造を既知の **Capping Protein** の原子構造(図4)およびアクチン分子の原子構造を当てはめることによって(図3B,E)、電子顕微鏡写真からアクチンフィラメント端に **Capping Protein** が結合した複合体(B端—**Capping Protein** 複合体)の構造を解明しました(図3G)。これにより、**Capping Protein** によるアクチンフィラメントの伸長短縮の制御メカニズムをシンプルに説明できるようになりました。アクチンフィラメント端の構造を決定したのはこれが世界で初めてのことです。アクチンフィラメントの伸長、短縮の制御メカニズムを構造から明らかにしたのもまた、初めてのことです。

本研究で得られた結果を以下に示します。

- (1) 研究グループは2003年4月に解明した **Capping Protein** の結晶構造から、このタンパク質には2つのアクチン結合領域を持つとの考えを提案していました(図4)。今回の結果から、この提案どおり **Capping Protein** 分子上のアクチン結合領域が確認されました。
- (2) さらに、アクチン分子上の **Capping Protein** 結合部位を知ることができ、

結合に関与するアミノ酸残基をほぼ特定することができました。例えば、Capping Protein 上の結合領域 1 (図 3) では Capping Protein 表面の複数の塩基性アミノ酸残基が、また 2 つのアクチン分子のそれぞれの表面上では複数の酸性アミノ酸残基が結合に関与し、それらの間で静電的な相互作用をすることが推測されました。

- (3) 実際、Capping Protein 側の塩基性アミノ酸を (DNA 組換え操作によって) 酸性アミノ酸に換えた変異 Capping Protein を調製したところ、B 端と Capping Protein の結合は弱くなりました。

3. 今後の展開

今後 Capping Protein だけでなく、その他知られている伸長や短縮に関与するフィラメント端結合タンパク質の結合状態を明らかにし、また、アクチンフィラメントのみの端の構造を明らかにする事によって、アクチン・ダイナミクス全体の分子構造レベルでの解明を目指します。

アクチン・ダイナミクスは生命現象の極めて基本的な営みです。そしてアクチン・ダイナミクスは多数のタンパク質が関与する一連のメカニズムから成り立っています。この全体を分子レベルで明らかにすることができれば、様々な生命現象 (筋肉の収縮、細胞の運動、細胞の形状の調節、細胞内シグナル伝達、細胞質分裂など) の理解を大きく進展させることが期待されます。また、生体内にはアクチンフィラメント上を走るモーターなどが見つかっていますが、アクチンフィラメント自体も、分子の重合や脱重合によって駆動する 1 種の分子モーターと見なすことができます。今までのようなレール上を動くモーターとは大きく異なり、レール自身が動く全く新しい原理で駆動するナノ分子モーターとして医学や工学分野で応用されることが期待されます。アクチン・ダイナミクスの分子レベルでの理解は、そのようなモーターの駆動メカニズム及びブレーキやアクセルに相当する制御メカニズムを構築する上で、重要な役割を果たすと期待されます。

(問い合わせ先)

前田 雄一郎 (まえだ ゆういちろう)

名古屋大学大学院

理学研究科生命理学専攻教授

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

Tel : 052-789-3544/2585 / Fax : 052-789-2989

独立行政法人理化学研究所

播磨研究所放射光科学総合研究センター

宮野構造生物物理研究室客員主管研究員

〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

Tel : 0791-58-2822 / Fax : 0791-58-2836

成田 哲博 (なりた あきひろ)
独立行政法人科学技術振興機構
ERATO 前田アクチンフィラメント動態プロジェクト
アクチンフィラメントの構造と動態グループ研究員
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
独立行政法人理化学研究所播磨研究所内
Tel : 0791-58-1350 / Fax : 0791-58-1360

尾西 裕文 (おにし ひろふみ)
独立行政法人 科学技術振興機構
ERATO 前田アクチンフィラメント動態プロジェクト技術参事
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1
独立行政法人理化学研究所内
Tel : 0791-58-1350 / Fax : 0791-58-1360

黒木 敏高 (くろき としたか)
独立行政法人 科学技術振興機構
特別プロジェクト推進室
〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8
Tel : 048-226-5623 / Fax : 048-226-5703

(報道担当)

独立行政法人科学技術振興機構 (J S T)
広報・ポータル部広報室
Tel : 03-5214-8404

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当
Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715
Mail : koho@riken.jp

国立大学法人名古屋大学 広報室
Tel : 052-789-2016

<補足説明>

注1 "アクチンフィラメント"の端:

アクチンフィラメントとは細胞内骨格の一種で、細胞の形状と強度を保ちます。しかしアクチンフィラメントは静止した構造体ではなく、自身が活発に移動します。移動することによって細胞の形状変化や移動、細胞内での物質輸送など広範な細胞活動を担います。たとえば、アクチンフィラメントの移動が起きないと、細胞が移動できず、その結果多細胞生物の体ができません。すべての細胞はある時期に移動して互いの位置関係を調整することで体を作るからです。またガン細胞は異常に移

動することによって転移します。

アクチンフィラメントはアクチンというタンパク質が数珠状に連なってできたフィラメントです。アクチンフィラメント内ではすべてのアクチン分子の方向は揃っているため、アクチンフィラメントには極性（方向性）があり、一端をB端（プラス端）、他端をP端（マイナス端）と呼びます。細胞内では、B端はほとんどいつも伸長し、P端はほとんどいつも短縮しています。

注2 Capping Protein(キャッピング プロテイン):

Capping Protein は当初骨格筋組織で、アクチンフィラメントのB端に結合するタンパク質として発見されました。その後、一般の細胞に広く分布しアクチンフィラメントのB端における伸長を調節するタンパク質であることが明らかとなりました。

注3 クライオ電子顕微鏡:

タンパク質複合体を観察するために開発された電子顕微鏡。タンパク質複合体（試料）を含んだ溶液を薄く展開し液体エタン中で急速凍結することによって試料をごく薄い氷の層に閉じこめ、さらに冷却して液体ヘリウム温度におき電子顕微鏡で観察します。試料を染色固定する方法に比して、この方法には2つの利点があります。第一に、低温で電子線を照射するためタンパク質試料の電子線による損傷が軽減されます。第二に、タンパク質試料を生理的（自然な）な溶液条件で観察することができます。

<論文タイトル>

"Structural basis of actin-filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study."

(アクチンフィラメントB末端でのアクチン重合阻害メカニズムの 構造学的研究：クライオ電子顕微法による研究)

<研究領域等>

この研究テーマが含まれる研究領域、研究期間は以下のとおりです。

戦略的創造研究推進事業 ERATO 型研究「前田アクチンフィラメント動態プロジェクト」

研究総括：前田 雄一郎 名古屋大学大学院理学研究科教授、
理化学研究所播磨研究所客員主管研究員)

研究期間：平成15年度～平成20年度

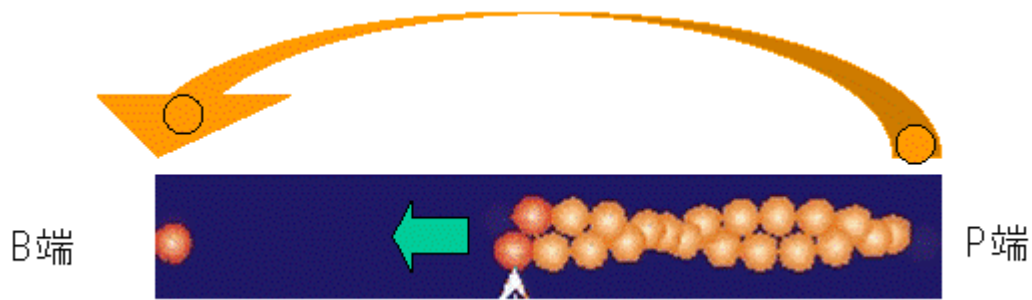


図1 細胞内での重合、脱重合によるアクチン分子の流れ

アクチンはアクチンフィラメントを形成する。アクチンフィラメントには極性（方向性）があります。フィラメントのB端への分子の付加（重合）と、P端から分子が脱落（脱重合）することによってアクチンフィラメントはB端方向（矢印方向）へ動きます。

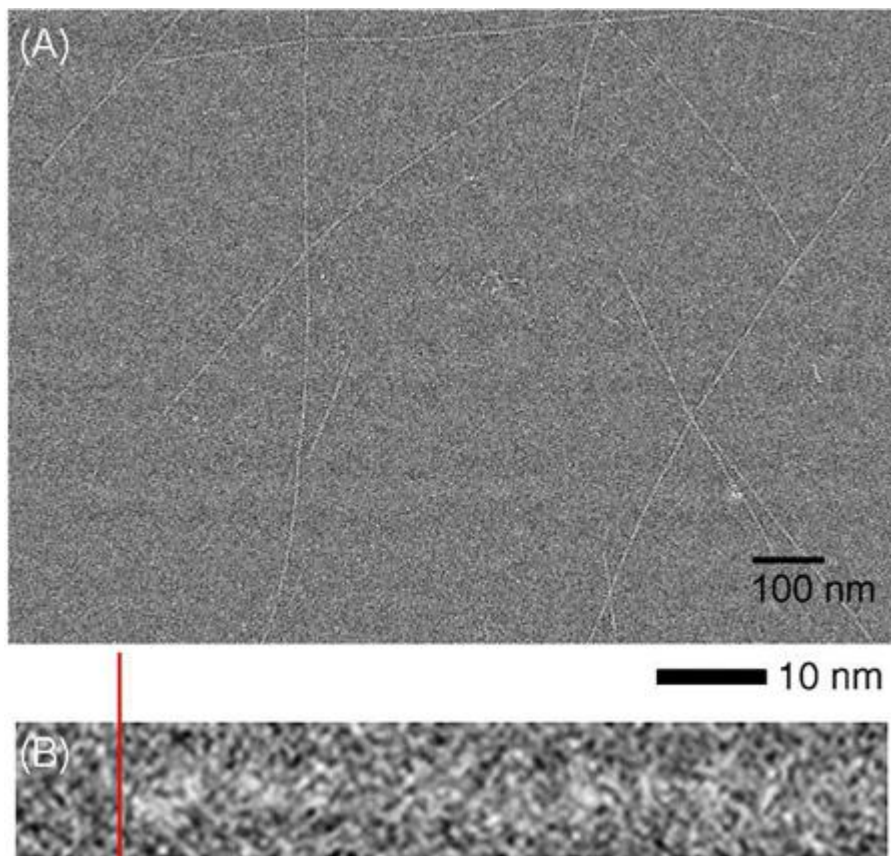


図2 アクチンフィラメントB端-Capping Protein 複合体のクライオ電子顕微鏡写真

- (A) 白く線状に見えるのがアクチンフィラメント。その一方の端に Capping Protein が結合しています。
- (B) 拡大図。アクチンフィラメント1本は細いためフィラメントと周辺の区別は特別な画像処理無しでは不明瞭です。特に長さ方向の端の位置を肉眼で見分けることも困難です。画像解析を実行すると(図3A参照)、Capping Protein が結合

したB端が赤線の位置にあることがわかります。

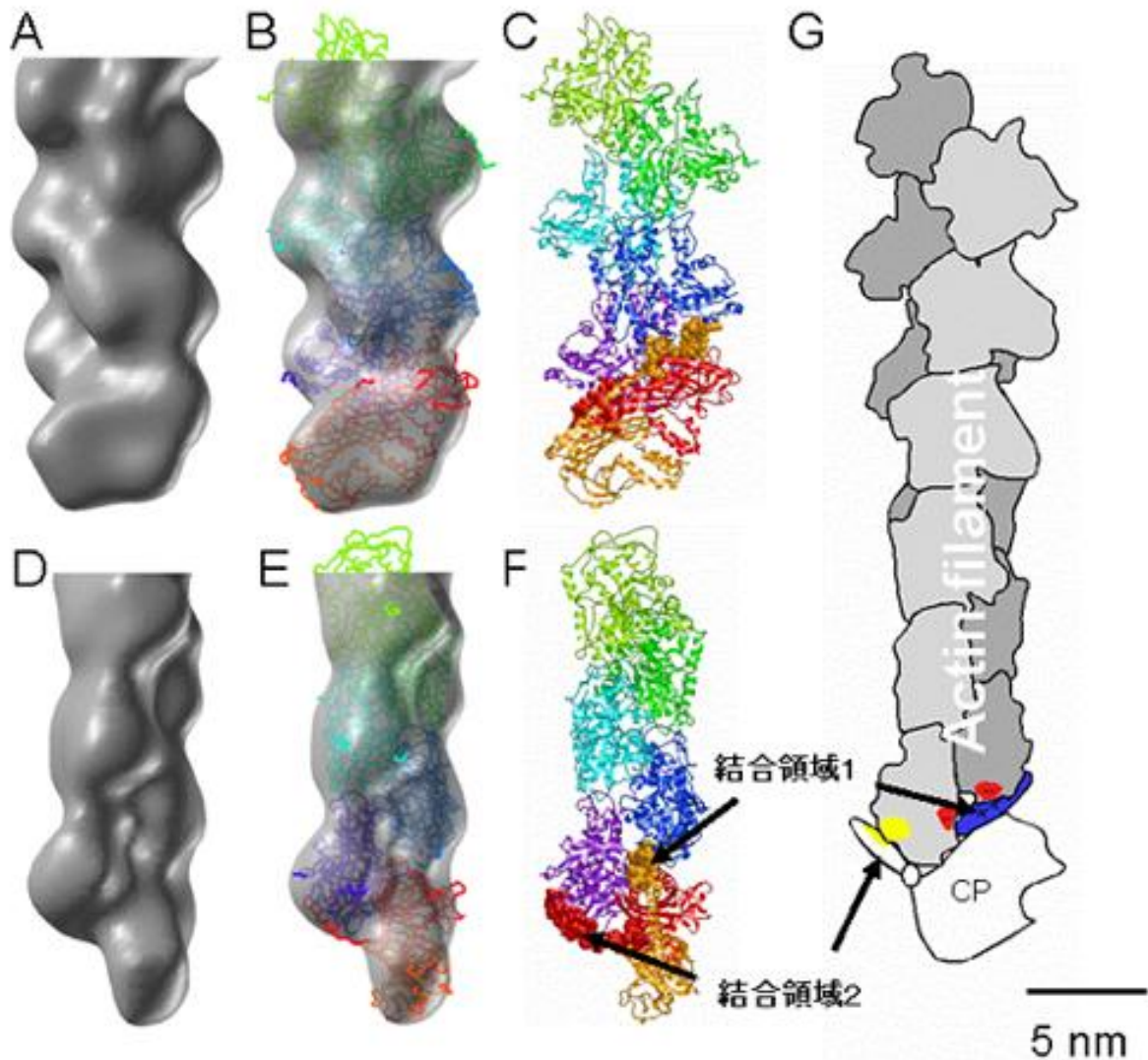
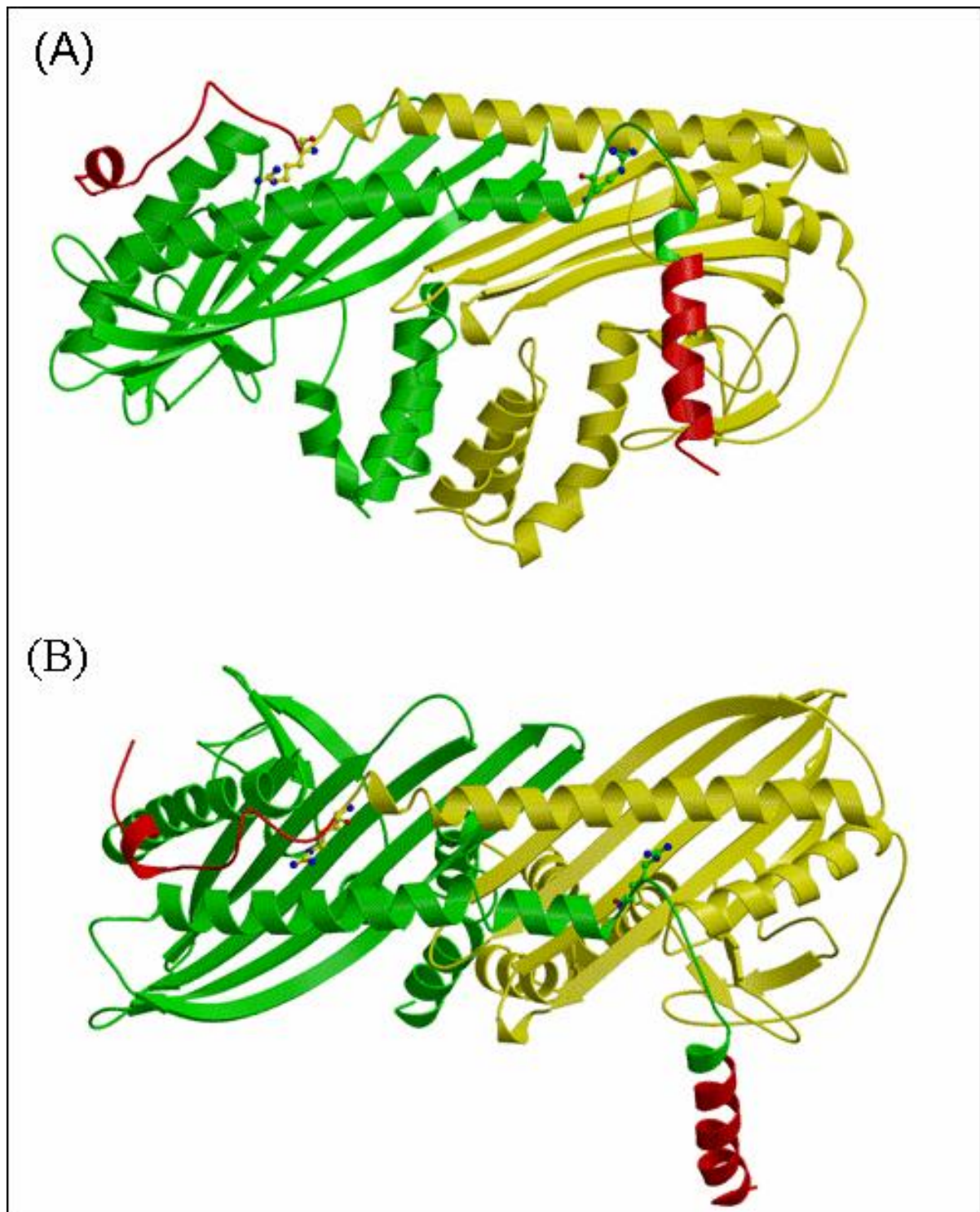


図3 アクチンフィラメント B 端- Capping Protein 複合体の構造とその模式図

A, D : クライオ電子顕微鏡写真の画像解析から得られた構造。クライオ電子顕微鏡写真を新たに開発した画像解析アルゴリズムによって処理して得られた構造です。個々の分子の形が明瞭です。これに、既知の Capping Protein の原子構造 (本研究グループが既に解明した ; 図 4) と、アクチンフィラメント中のアクチン分子の原子座標モデル (先行研究による) を当てはめました。 **C, F** はこうして得られた B 端- Capping Protein 複合体の原子モデル。 **B, E** には、A, D と C, F を重ねて表示しています。 **G** は B 端全体の構造の模式図。

Capping Protein はアクチンフィラメントの端に二カ所の結合領域で結合します。結合領域 1 (青) はフィラメント端の二つのアクチン分子に同時に結合し、結合領域 2 は一番端の一つのアクチン分子に結合します。Capping Protein はこの結合によって、次に結合すべきアクチンモノマーのための結合部位を覆ってしまい、新たなアクチンモノマーの付加によるフィラメント伸長を止めます。また、端の二つのアクチンフィラメン

トに同時に結合することによって、モノマーの解離によるフィラメント短縮を止めます。



Yamashita A, Maeda K & Maéda Y. (2003)
EMBO J. **22**: 1529-1538.

図4 Capping Protein の結晶構造

Capping Protein は2つの領域 (a, 緑 ; b, 黄) から構成されています。A, Bは共に

結晶構造をリボン表示で示しています。A と B の間で Capping Protein を長軸の周りに約 90 度回転しています。本研究チームは 2003 年の *EMBO Journal* において、赤で表示した 2 つの部分がアクチン結合領域であろうと提案しました。