

戦略的創造研究推進事業
ERATO
追跡評価用資料

「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

2014 年 7 月

目次

要旨	1
プロジェクトの展開状況（まとめ図）.....	3
第 1 章 プロジェクトの概要.....	4
1.1 研究期間	4
1.2 プロジェクト発足時における科学技術や社会の背景	4
1.2.1 科学技術の背景.....	4
(1) アクチンモノマー（G-actin）の構造に関する研究	5
(2) アクチン重合体（F-アクチン）の構造	6
(3) アクチンのトレッドミリング、アクチンの重合/脱重合のメカニズム、アクチン結合タンパク質（ABPs: actin-binding proteins）に関する研究	6
(4) 原核生物のアクチン様タンパク質（アクチンホモログ）	10
(5) アクチンと疾患	10
(6) プロジェクト開始時におけるアクチン研究の諸課題	12
(7) プロジェクト開始時における前田グループの研究成果	13
1.2.2 社会の背景	14
1.3 プロジェクトのねらい	14
1.3.1 プロジェクトの目標.....	14
1.3.2 先進設備の利用.....	15
1.4 研究体制	16
(1) 研究発足時（2003 年 10 月～2004 年 7 月）	16
(2) 2005 年度以降（①、② 2005 年 4 月設置、③ 2005 年 5 月設置）	16
1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義	18
1.5.1 アクチン重合体の高分解能構造とアクチン発現系.....	18
(1) アクチン重合体の高分解能構造	18
(2) アクチンの大量発現系の確立とアクチン変異タンパク質の研究	20
(3) モータータンパク質の関与しないバクテリアのフィラメント形成タンパク質に関する研究 ..	21
1.5.2 F-アクチンの末端部の構造の決定及び制御.....	21
(1) 電子顕微鏡による F-アクチンの B 端の構造の決定	21
(2) アクチン CP 複合体の構造	22
第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況.....	23
2.1 各テーマの現在の状況	23
2.1.1 アクチン重合体の高分解構造とアクチン発現系.....	23
(1) アクチン線維の末端部の構造と制御	23
(2) CP のアクチン B 端キャッピングの制御メカニズムの解明.....	23
2.1.2 トレッドミリングなど細胞運動を担うアクチンフィラメントおよび類似の構造 ..	27

2.1.3 新規構造解析法の応用（技術の波及効果）	28
(1) アミロイドの構造の測定（理研脳科学研究センター 田中研究室との共同研究）	28
(2) バクテリア・アクチンホモログ	28
(3) HLSV(Hibiscus Latent Singapore Virus)の構造（シンガポール国立大学との共同）	28
(4) 筋肉の細いフィラメント(大阪大学基礎工学部生命工学科との共同研究)	28
2.2 プロジェクトメンバーの活動状況	29
第3章 プロジェクトの成果の波及と展望.....	31
3.1 科学技術への波及と展望	31
3.1.1 学術的な新発見や発明による科学技術への波及.....	31
(1) 代表的論文と被引用件数の年次推移	31
(2) F-アクチンの高分解能構造の決定の論文が各分野の研究者に与えた影響	32
(3) 専門書への掲載	35
3.1.2 学会活動	36
(1) Gordon Research Conference	36
(2) Alpbach Workshop on Molecular Motors(会長：K.C.Holmes)	36
3.1.3 科学技術への波及のまとめ.....	36
3.2 社会経済への波及と展望	37
3.2.1 医療への応用.....	37
(1) 疾患の要因解明	37
(2) 創薬への応用	37
3.2.2 マスコミによる注目.....	39
(1) 線維状タンパク質の伸縮の仕組みを解明	39
(2) アクチンの分子構造変化を解明—筋収縮・細胞研究に活用	39
(3) 細胞運動を制御する仕組みの一部を解明	39
3.2.3 将来への展望.....	40
【参考文献】	41

要旨

アクチンは、真核細胞にのみ豊富に存在するタンパク質であり、筋肉収縮、細胞、運動、細胞分裂や細胞骨格等において重要な役割を果たしていることが知られている。

本プロジェクトは、アクチンフィラメントとその複合体を構成する個々のタンパク質の高次構造の解明、複合体全体の高分解能構造の解明および構造動態の解明を行い、生体内でのアクチンフィラメント複合体の作用メカニズムを解明することを目的として、2003年11月1日～2009年3月31日まで4つの研究テーマで実施された。

第1の研究テーマ「アクチン重合体の高分解能構造とアクチン発現系」では、F-アクチンの高濃度・高配列ゾルから得たX線繊維回折強度を基に、G-アクチンの結晶構造、クライオ電子顕微鏡画像、コンピューターでの計算科学の解析結果を組み合わせ、世界で初めてアクチン重合体の高分解能構造を解明することができた。また、アクチン分子はATP結合溝で左右2つのドメインに分かれているが、アクチンの単量体では左右2つのドメインは互いに約20度捻じれた状態にあり、アクチン重合体では平板化することを発見し、G-F変換に伴ってその捻じれが解消し、線維状のアクチン分子が平板化されること、このドメインの回転による平板化が安定なヘリックス構造のアクチン重合体の形成に不可欠であることを明らかにした。

第2の研究テーマ「トレッドミリングなど細胞運動を担うアクチンフィラメントおよび類似の構造」では、クライオ電子顕微鏡写真の画像解析法（単粒子解析法）をベースに新しい方法を開発して高分解能（23Å程度まで）で大きなタンパク質複合体の三次元構造を解明できるようになり、アクチン-CP複合体構造を決定し、アクチンの重合・脱重合速度の調節機構を明らかにした。

第3の研究テーマ「筋のカルシウム調節のメカニズムの研究」では、高分解能のトロポミオシンの結晶を作製する方法を開発してカルシウム調節を担うアクチンフィラメント複合体（アクチン・トロポミオシン・トロポニン）を形成するトロポミオシンの結晶構造を明らかにした。

第4の研究テーマ「アクチンが関与する分子メカニズムの解明」では、ミオシンのアクチン結合部位と考えられているループ構造のアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換した人工変異ミオシンの研究から、アクチン-ミオシン複合体形成において最も強く接触するのがミオシンの疎水性トリプレットループにある三つのアミノ酸残基であることを明らかにした。

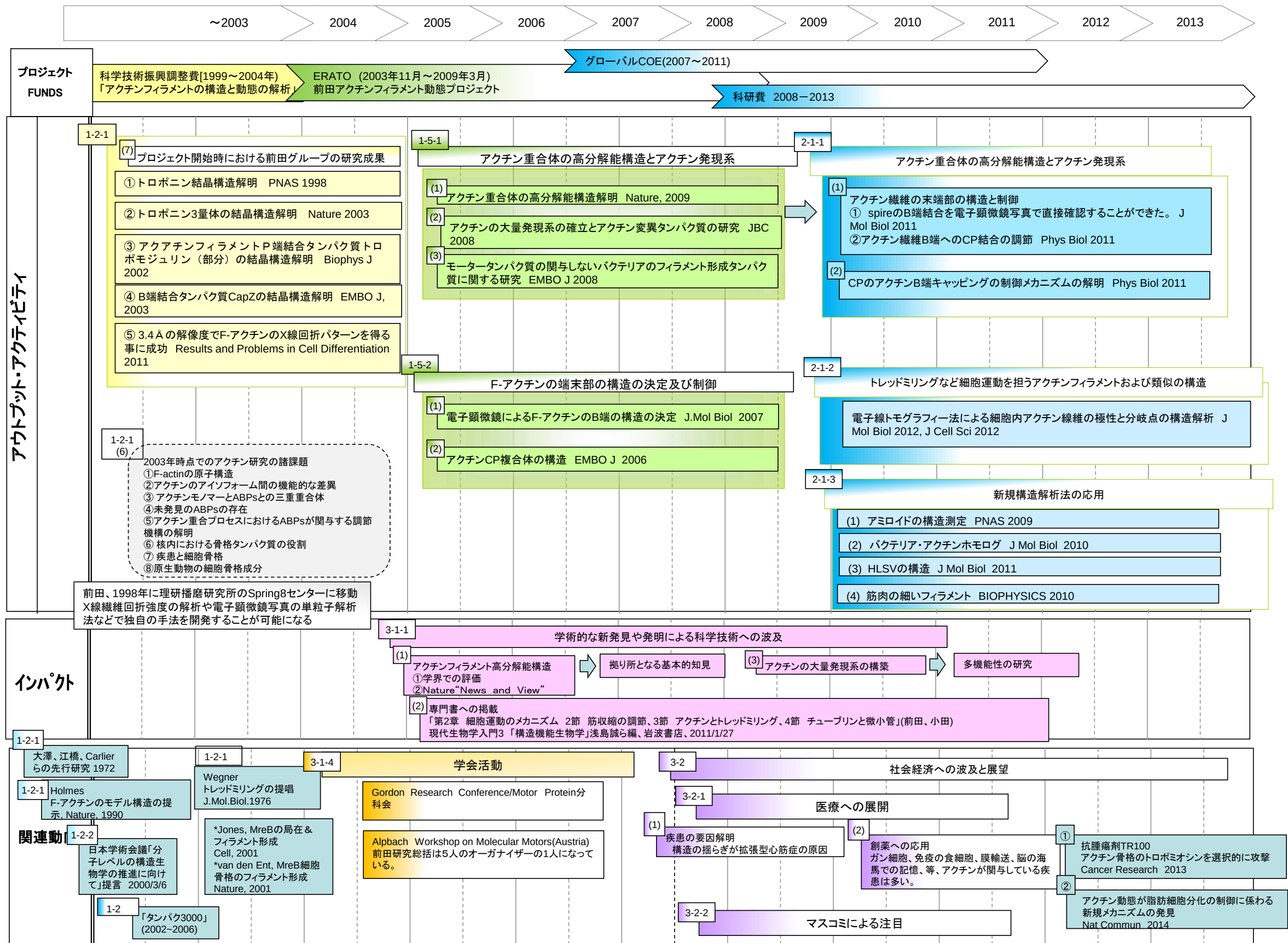
本プロジェクト終了後、「筋のカルシウム調節のメカニズムの研究」と「アクチンが関与する分子メカニズムの解明」の研究テーマは終息したが、「アクチン重合体の高分解能構造とアクチン発現系」と「トレッドミリングなど細胞運動を担うアクチンフィラメントおよび類似の構造」の研究テーマは、名古屋大学大学院理学研究科の構造生物学研究センターにおいて継続されている。

現在、タンパク質の構造生物学の研究は、X線解析や電子顕微鏡写真画像解析等による構造解析だけでは学問的に評価されない時代になり、タンパク質の構造と機能、*in vivo*での

生理的な役割等も含めた総合的な研究が求められている。したがって、物理科学だけでなく生物化学、薬理学、医学の研究者で構成される研究グループをつくるか、或いは他の施設の研究者との連携が必要になっている。

またアクチン研究の創薬への応用に関しては、本プロジェクトの直接の成果ではないが、アクチン細胞骨格中の腫瘍細胞に特異的な tropomyosin のアイソフォームを標的にする抗癌剤が開発された。担癌ヌードマウスおよびヒト腫瘍細胞での実験から神経芽細胞腫およびメラノーマに有効であることが分かった。2015 年からヒトでの臨床試験が予定されている。

プロジェクトの展開状況（まとめ図）



第 1 章 プロジェクトの概要

1.1 研究期間

平成 15 年 11 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日

1.2 プロジェクト発足時における科学技術や社会の背景

1.2.1 科学技術の背景

アクチン (Actin) は、分子量 43kDa の球状のアクチンモノマー (G-actin) とその重合体である線維状アクチン (F-actin) として真核細胞にのみ豊富に存在するタンパク質であり、筋肉収縮、細胞運動、細胞分裂や細胞骨格等において重要な役割を果たしていることが知られている。

アクチンは、1942 年にハンガリーの Szeged 大学 A. Szent-Györgyi 研究室の F. G. Straub¹により筋肉抽出物から ATP 存在下でミオシンを活性化するタンパク質として発見・命名された。また、Straub は G-アクチンから F-アクチンへの重合が ATP の加水分解をとともうことも発見した。

1965 年、江橋等はアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体が筋収縮におけるカルシウム調節を担うことを発見した²。さらに、1970 年に細かい線維 (thin filament) を構成する 3 種のタンパク質 (アクチン、トロポミオシン、トロポニン) の分子模型を「絵」として提案した³。しかし、その後、トロポニン、トロポミオシン、アクチンフィラメントともそれぞれ単独の立体構造は解明されたが、3 種タンパク質の複合体の高分解能の立体構造は不明のままである。

Straub によるアクチンの発見以降、多くの研究者がアクチンに関する研究に取り組んできたが、アクチン関連の研究が本格的に進展し著しい多くの成果が得られるようになったのは 1970 年代以降であり、遺伝子組換え技術の急速な進歩に伴って発展してきた遺伝子工学によるタンパク質調製技術の進歩、および X 線回折装置、クライオ電子顕微鏡、NMR 等の分析機器の性能向上に伴うタンパク質の構造解明技術の進歩、さらにコンピューターの計算速度の飛躍的アップに伴うタンパク質構造解析ソフトの進歩等がアクチン研究の発展に大きく貢献したと言える。

これまでのアクチンに関する研究は、大きく分けて (1) アクチンモノマー (G-actin) の構造、(2) アクチン重合体 (F-アクチン) の構造、(3) アクチンフィラメントのトレッドミリング (treadmilling)、アクチンの重合 (polymerization) / 脱重合 (depolymerization) のメカニズム、およびアクチンに結合するアクチン結合タンパク質 (actin-binding

¹ Straub FB, *Studies Inst Med Chem Univ Szeged*, 2, 3-15, 1942(参考文献 1)

² Ebashi S *et al.*, *Prog Biophys.Mol.Biol.*, 18, 123-183, 1963 (参考文献 2)

³ Ebashi S, *Nature*, 240, 217-218, 1972 (参考文献 3)

proteins:ABPs)、(4)細菌のアクチンホモログ、(5)アクチンとヒト疾病、の研究分野で行われてきた。

本プロジェクトの研究内容は、アクチンの構造及び機能、アクチンの重合/脱重合のメカニズム、アクチン結合タンパク質/複合体等の研究領域を含んで非常に多岐に渡っているもので、追跡調査に当り、プロジェクト発足時のこれらの研究動向を把握することが必要と思われる。

プロジェクト発足時の科学研究の背景について理解を深めるために、プロジェクトがスタートした 2003 年頃のアクチン関連分野の研究動向とプロジェクト発足に至るまでの前田グループの研究成果について以下に説明する。

(1) アクチンモノマー (G-actin) の構造に関する研究

1977 年、Mannherz 等 (ハイデルブルグ大) は初めて骨格筋アクチンとウシ肝臓 DNase I との複合体の共結晶を得たが、双晶 (twinning) の問題のため X 線構造解析の解像度が悪く、三次元構造の解明には至らなかった⁴。13 年後の 1990 年、同じ共同研究者の Kabsch 等 (ハイデルブルグ大) が G-アクチンと DNase I との複合体の共結晶を用いて 2.4 Å の解像度で G-actin の最初の結晶構造解析に成功した⁵。それ以来、アクチン結合タンパク質 (actin-binding proteins: ABPs) との複合体の共結晶を用いた構造解析が行われ、現在まで約 80 個以上の G-アクチンの構造が報告されている。しかし、結合した分子やヌクレオチドの状態に関係なく、得られた G-アクチンの構造は基本的に同じであった。

2001 年、Dominguez グループ (ペンシルバニア医科大) は、アクチンの C 末端のシステイン残基をローダミンで修飾してアクチンの重合を抑制することにより、初めて ABPs との複合体ではない高品質の G-アクチンの結晶を得ることに成功した。同時に、彼らはヌクレオチド結合クレフトに ADP が存在した状態で初めて G-アクチンを結晶化させ、1.541 Å の解像度で構造解析に成功した⁶。

Dominguez 等の立体構造と Kabsch 等の立体構造の間には、DNase I が結合する G-アクチンのサブドメイン 2 に大きな差異が認められた。2003 年、Dominguez 等は非分解性 ATP アナログである

AMPPNP (adenosine 5'-(β , γ -imino)triphosphate) を結合した状態の TMR (tetramethylrhodamine-5-maleimide) 修飾アクチンの X 線結晶構造解析を 1.85 Å の解像度で成功した。この構造と以前に構造解析に成功した ADP と結合した TMR 修飾アクチンとを比較して、DNaseI 結合ループにおけるサブドメイン 2 の触媒部位にある Ser-14 の側鎖がリン酸放出に伴い回転し、これが引き鉄となってメチル化 His-73 を含むループの転移が起る事を明らかにし、ヌクレオチド依存性の構造的な変化が線維状アクチンの動態を制御

⁴ Mannherz HG *et al.*, *Eur.J.Biochem.*, 104, 367-369, 1980 (参考文献 4)

⁵ Holmes KC *et al.*, *Nature*, 347, 44-49, 1990 (参考文献 5)

⁶ Otterbein LR *et al.*, *Science*, 293, 708-711, 2001 (参考文献 6)

することを報告した⁷。

(2) アクチン重合体 (F-アクチン) の構造

G-アクチンの構造と F-アクチン中のアクチン・サブユニットの構造は密接に関連しているが、実際は異なっており、アクチン線維は結晶化できず、また線維中のアクチンモノマーの構造は G-アクチンの構造とは異なっている。そのため、F-アクチンの構造に関する研究は、主に F-アクチンの配向ゲルの X 線繊維回折画像および電子顕微鏡から得られるデータを使って行われてきたが、まだ F-アクチンの高分解能の原子構造は解明されておらず、以下に紹介する Holmes 等のモデルも含めて、まだ構造モデルの段階に過ぎない。過去、40 数年間のドイツ、英国、米国および日本における多くの研究者の努力にもかかわらず、まだ F-アクチンの原子構造は解明できない状態にあった。

2003 年時点では、1990 年に Holmes 等⁸が発表した G-アクチンモノマーのヘリックスを F-アクチンの配向ゲルを使い 25-30 Å の低解像度で得られた X 線繊維回折画像にフィットさせる方法で得られた F-アクチン線維の原子構造モデルが広く認められていた。

(3) アクチンのトレッドミリング、アクチンの重合/脱重合のメカニズム、アクチン結合タンパク質 (ABPs: actin-binding proteins) に関する研究

1976 年に Wegner は、精製アクチンの水溶液中の臨界状態でのアクチンの重合と脱重合についての研究から、ATP-G アクチンはアクチンフィラメントの急激に成長している barbed(+) end に主に結合し、次いでフィラメント中で ATP の加水分解が起こり、ADP-アクチンモノマーが主に pointed(-)end から解離する「head to tail polymerization」の現象を動態方程式の手法を用いて理論的に解明し、これをトレッドミリング(treadmilling)と命名した^{9,10}。

2003 年に dos Remedios (2013 年までにアクチン関連の論文 83 報を発表しているオーストラリアの代表的なアクチン研究者)等は ABPs に関するレビュー「Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments」¹¹の中で、ABPs は、①G-アクチンモノマー結合タンパク質(thymosin β 4、DNase)、②フィラメント脱重合タンパク質(CapZ、cofilin)、③アクチンフィラメント末端結合タンパク質(P 端/tropomodulin、B 端/CapZ)、④フィラメント切断タンパク質(gelsolin)、⑤架橋タンパク質(arp2/3)、⑥安定化タンパク質(tropomyosin)、⑦モータータンパク質(myosin ファミリー)の 7 種類に分類されること、また代表的な 8 個の ABPs (ADF/cofilin family、profilin family、gelsolin Superfamily、thymosins、DNase I、capping proteins、Arp2/3 Complex) を選んで、その構造および機

⁷ Graceffa P *et al.*, *JBC*, 278, 34172-34180, 2003 (参考文献 7)

⁸ Holmes KC *et al.*, *Nature*, 347, 44-49, 1990 (参考文献 5)

⁹ Wegner A, *J.Mol.Biol.*, 108, 139-150, 1976 (参考文献 8)

¹⁰ Wegner A, *J.Mo.Biol.*, 161, 607-615, 1982 (参考文献 9)

¹¹ dos Remedios CG *et al.*, *Physiol Rev.*, 83, 433-473, 2003 (参考文献 10)

能等に関する研究動向について述べている。

ADF (actin depolymerizing factor)/cofilin は、発見が 1980 年と早かったため研究が進んでいて、cofilin の高分解能原子構造の解明、ADF/cofilin のトレッドミリング、アクチン脱重合、アクチン重合の核形成、アクチンフィラメントの切断 (Severing) における役割等について多数の発表があり、アクチンの重合/脱重合に大きな役割を持っていることが分かってきた。

profilin は、アクチンモノマーとの共結晶の高分解能原子構造が解明されるとともに、細胞膜とアクチン骨格の間のシグナル伝達に役割をもっていることが示唆されているが、研究論文も少ないことから研究者の関心が低いことが分かる。

gelsolin superfamily には、gelsolin、villin、adseverin、CapG、flil、severin が含まれるが、gelsolin の高分解能原子構造は解明されていて、F-アクチンとの結合に関する構造研究の発表も多い。gelsolin の *in vitro* での機能に関しては、アクチン脱離、キャッピング、カルシウム依存性についての発表が多い。

thymosin β 4 (T β 4) は、分子量が約 5kDa の低分子タンパク質であり、疎水性アミノ酸が殆どないアミノ酸組成から溶液中では明確な構造をとっていないと思われる。T β 4 は、アクチンモノマーに結合してアクチンの重合を阻害することが分かっているが、細胞内の分布と機能に関する発表が多い。

DNase I の高分解能原子構造は解明されており、2 個のカルシウム結合サイトの存在が分かっている。DNase I はアクチンに高い親和性を有していて、ATP-actin-DNase の結晶構造も解明されている。DNase I は、細胞中の G-アクチンを測定する上で非常に有用なツールであるが、細胞骨格のダイナミクスにおける役割は不明である。しかし、DNaseI がアクチンと特異的に固く結合することや細胞内に広く分布していることから、生物学的な役割を有していることが示唆される。

CapZ は、骨格筋の Z-disc に存在するヘテロダイマーのタンパク質である。これまで、報告されている CapZ の機能は①アクチン会合の核形成、②既存のアクチンフィラメントの捕捉、③アクチンフィラメントの B 端におけるアクチン会合の制御、④アクチンフィラメントの B 端でのアニーリングの除去、⑤Z-disc でのアクチンフィラメントの会合の是正である。*in vivo* での CapZ のアクチンフィラメントのキャッピングは、セカンドメッセンジャーの PIP/PIP₂ により制御されていることが分かっている。なお、CapZ の結晶構造は 2003 年に前田グループの山下等が発表した¹²。tropomodulin (Tmod) は、tropomyosin の存在下でアクチンフィラメントの P 端に強く結合してアクチンフィラメントの伸張を抑制することが分かっている。なお、Tmod のアクチン結合サイトの C 末端半分の結晶構造は 2002 年に前田グループの Krieger 等が発表した¹³。

Arp2/3 複合体は、分子量 220kDa の大きなタンパク質で酵母から哺乳動物まで広く存在す

¹² Yamashita A *et al.*, *EMBO J.*, 22, 1529-1538, 2003 (参考文献 11)

¹³ Krieger I, *et al.*, *Biophys. J.*, 83, 2716-2725, 2002 (参考文献 12)

ることが知られている。Arp2/3 複合体の結晶構造は、2001 年に Pollard 等のグループにより解明されたが精製の過程で失活したため、活性状態の結晶構造ではない。Arp2/3 の主な機能は、ラッピングしている細胞膜の近傍でアクチンフィラメント会合の核を形成させて分岐点を生み出すことにあると考えられている。このプロセスには μM オーダーの ATP を必要とする。Arp2/3 によるアクチンフィラメント会合の核生成は、成長因子等の細胞外シグナルの PIP_2/GPCR (Cdc42) を介した WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) の活性化があり、次いで活性化 WASP がアクチンモノマーと Arp2/3 を結合して新しいアクチンフィラメント会合の核を形成させ、ドーターフィラメントを 70 度の角度でマザーフィラメントに会合させて行くと考えられている。したがって、Arp2/3 は分岐点に局在することになる。表 1-1 に主な ABPs の特性について記載した。

表 1-1 主な ABPs の特性¹⁴

ABPs	Actin	ADF /Cofilin	Profilin	Gelsolin	Thymosin β 4	DNaseI	CapZ	Arp2/3
分子量 (kDa)	43	18-19	14.9	80	4,963	29	59	220
細胞内濃度 (μM)	60-70 ¹⁾ 300 ²⁾	20	20-100	~5	>500	不明	0.6	2
P 端 結合	○	○	very weak	○	○	○	X	○
B 端 結合	○	○	○	X	○	X	Blocks Exchange	X

1) 非筋肉細胞 2) 筋肉細胞

Pollard 等は、2000 年に樹状の核形成/アレートレッドミリングに対する第一世代の数量モデルを提唱しているが¹⁵、「アクチンフィラメントの重合と脱重合を伴う細胞性運動に関するレビュー」¹⁶の中で、運動細胞は細胞膜の中で高分子が成長する時に物理的な力を生み出すアクチンフィラメントの分岐ネットワークを構築して先端を伸張させていること、また、actin、WASP、 PIP_2 、Arp2/3、ADF/cofilin、capping protein を含む一連のコアとなる ABPs が運動性細胞のアクチン骨格の動態の制御に関与していることを紹介している。このモデルは大変単純化されていて、構成成分が 5 個の ABPs と ATP となっているが、ABPs が関与するトレッドミリングを理解する上で参考になる。図 1-1 は、そのモデルを示したものであるが、トレッドミリングに関与する ABPs の役割が示されている。

¹⁴ Dos Remedios CG *et al.*, *Physiol Rev.*, 83, 433-473, 2003 (参考文献 10)

¹⁵ Pollard TD *et al.*, *Annu. Rev. Biophys.*, 29, 545-576, 2000 (参考文献 13)

¹⁶ Pollard TD *et al.*, *Cell*, 112, 453-465, 2003 (参考文献 14)

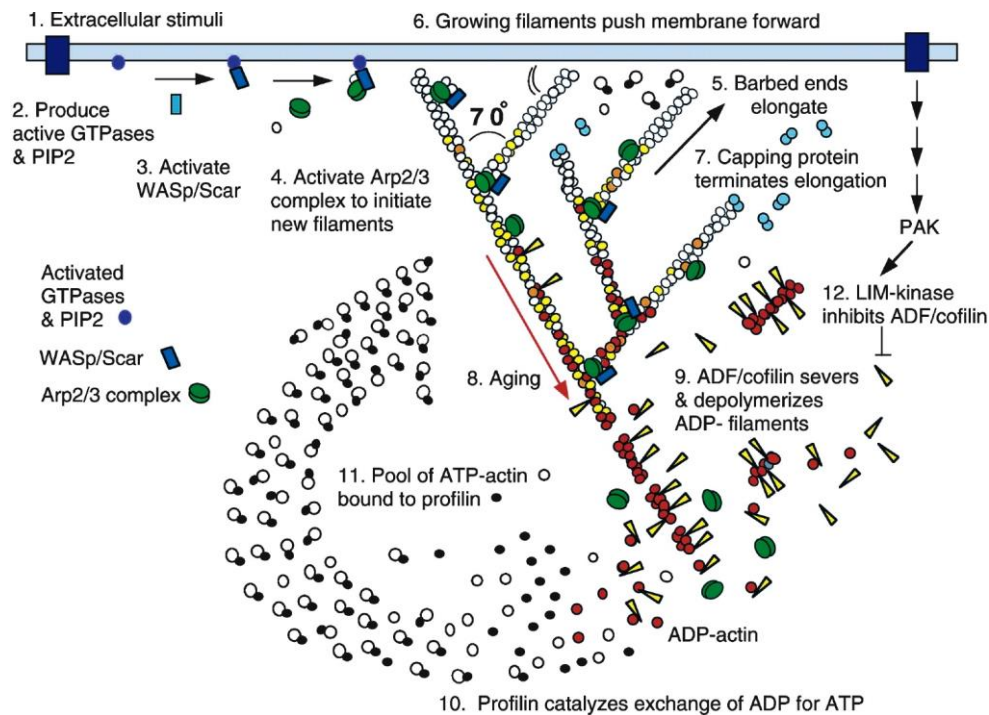


図 1-1 トレッドミリングに關与する ABPs¹⁷

図の説明：

1. 細胞外のシグナルが受容体を活性化
2. 共役シグナル伝達系が Rho ファミリーの GTPase と PIP2 を活性化
3. WASp/Scar タンパク質の活性化
4. WASp /Scar タンパク質がブランチを形成するフィラメントの所で Arp2/3complex とアクチンを接合させる。
5. 新しいブランチの B 端での急速な成長。
6. 成長するフィラメントが膜を前進させる。
7. Capping protein がフィラメント伸張を終結。
8. 各アクチン・サブユニットに結合している ATP が加水分解してフィラメントが熟成(白色のサブユニットが黄色に変わる)。次いで、 γ -リン酸の解離が起こる (サブユニットが赤色に変わる)。
9. ADF/cofilin がリン酸の解離を促進し、フィラメント末端から ADP-アクチンフィラメントの切り離し、ADP アクチンの解離を促進する。
10. profilin が ADP の ATP への交換を促進し (サブユニットが白色に変わる)、サブユニットのリターンを促進する。
11. profilin に結合した ATP-アクチンのプールが整い、B 端が伸張する時に利用可能になる。
12. Rho ファミリーの GTPase が PAK と LIM kinase を活性化して、ADF/cofilin をリン酸化する。これによって、フィラメントのターンオーバーが減速する。

¹⁷ Pollard TD *et al.*, *Cell*, 112, 453-465, 2003 (参考文献 14)

(4) 原核生物のアクチン様タンパク質 (アクチンホモログ)

大腸菌の染色体に菌の形態や抗生物質メシリナム (mecillinam) 感受性に関与する 2 個の遺伝子 *mrd* と *mre* が存在することは知られていたが、*mre* 遺伝子に該当するタンパク質は分離同定されていなかった。

1988 年、Doi 等は *mreB* 遺伝子をクローニングして大腸菌で発現させ、分子量 37kDa のタンパク質 MreB を分離同定した¹⁸。しかし、アクチンのアミノ酸配列とのホモロジーが低かったため、長い間研究の対象にはならなかったが、2001 年に Jones 等¹⁹は *Bacillus subtilis* の MreB が *in vivo* で細胞表面に局在して細胞骨格状のフィラメントを形成していること、次いで、2001 年に van den Ent 等²⁰が *Thermotoga maritima* の MreB が細胞骨格状のフィラメントを形成することが発表されると状況が一転した。その後、MreB は、重合プロセスや重合体の結晶構造解析等の構造関連、さらに生物物理学および生化学の研究対象として脚光を浴びている。

低プラスミド R1 の低コピー数に関与する *parA* 遺伝子は 3 個の遺伝子 *parM*、*parR* および *parC* から構成されているが、1997 年に Jensen 等²¹は ParM タンパク質を大腸菌で発現させ、ParM が ATPase 活性を持ち、ParM の ATPase 活性は ParR/ParC 複合体の存在で大幅に増加することを発見した。

その後、ParM は、プラスミド分離における機能とメカニズム、重合プロセスや重合体の結晶構造解析等の構造関連、さらに生物物理学的および生化学的な研究が盛んに行われている。

その他のバクテリアのアクチンホモログとしては、2000 年に van den Ent 等²²が *Thermotoga maritima* 由来の細胞分裂タンパク質 FtsA の結晶構造を報告している。

(5) アクチンと疾患

ヒトにおけるアクチン変異は比較的最近まで不明であった。アクチン疾患の変異は大部分が優性突然変異であり、これまで 100 以上の異なった変異が報告されているが、劣性突然変異はわずか 6 つである。ヒトゲノムには 6 個のアクチン遺伝子、ACTA1、ACTA2、ACTB、ACTC、ACTG1、ACTG2、が存在し、これらの内、4 個の遺伝子は、心筋 (ACTC)、平滑筋 (ACTA2)、腸筋肉 (ACTG2) 及び骨格筋 (ACTG1) 中で特異的に発現し、細胞質アクチン遺伝子に分類されている 2 個の遺伝子は全ての細胞で発現していることが分かっている²³。

ACTC 心筋遺伝子の変異が拡張型心筋症/dilated cardiomyopathies (Olson *et al.*, 1998)

¹⁸ Doi M *et al.*, *J.Bacteriol.*, 170, 4619-4624, 1988 (参考文献 15)

¹⁹ Jones LJ *et al.*, *Cell*, 104, 913-922, 2001 (参考文献 16)

²⁰ van den Ent F *et al.*, *Nature*, 413, 39-44, 2001 (参考文献 17)

²¹ Jensen RB *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 269, 505-513, 1997 (参考文献 18)

²² van den Ent F *et al.*, *EMBO J.*, 19, 5300-5307, 2000 (参考文献 19)

²³ Actin-Binding Proteins and Disease, New York, Springer (参考文献 20)

²⁴ 又は肥大型心筋症/hypertrophic cardiomyopathies (Mogensen et.al, 1999²⁵; Olson et.al. 2000²⁶)の原因となることが報告された。また、ACTA1 遺伝子における変異が先天性のファイバー型不均衡/CFTD (Laing et.al, 2004²⁷)を含む先天性 XXX ミオパシー/congenital myopathies (Nowak et.al, 1999²⁸)をもたらし、ACTG1 遺伝子中の変異が常染色体優性難聴をもたらすことが報告されている (Zhu et.al. 2003²⁹)。

表 1-2 に示すように、いくつかの腫瘍細胞において Actin-binding protein 遺伝子の発現が脱制御されていることが報告されており、疾患へのアクチンの関与が明らかになりつつある。

表 1-2 腫瘍細胞において脱制御されている actin-binding protein 遺伝子³⁰

ABP	actin function	Cancer	ABP	actin function	Cancer
α -actin 1	FA-crosslinking	Melanoma	Moesin	FA-binding	Bladder, Breast Ovary
α -actin 3	FA-crosslinking	Breast Prostate(C/N)	L-Plastin	FA-binding	Colon, leukemia Ovary, Prostate
α -actin4	FA-crosslinking	Colon(C/N) Neuroblastoma	Profilin 1	GA-binding	Breast Prostate
Arp2	FA-binding Y-branching	Colon(C/N), Gastric Breast, Prostate(C/N)	Profilin 2	GA-binding	Breast Prostate
Arp3	FA-binding Y-branching	Colon(C/N), Gastric Breast, Prostate(C/MC)	Talin	FA-binding	Breast Prostate
Calponin1	FA-binding	Fibrosarcoma Renal angiomyolipomas	Thymosin β 4	GA-sequestaring	Fibrosarcoma Colon, OSCC
CapG	FA-binding	Melanoma, Glioblastoma Breast, Prostate(C/MC)	Thymosin β 10	GA-sequestaring	Ovary, Gastric RCC, Breast
CAPZA	FA-capping	Ovary, Breast Prostate(C/MC)	Thymosin β 15	GA-sequestaring	Breast, lung Prostate
Cofilin 1	FA-dynamizing	Ovary, Breast Prostate(C/MC)	NB-thymosin β	GA-sequestaring	Neuroblastoma Breast, Prostate

²⁴ Olson TM et al., *Science*, 280, 750-752, 1998(参考文献 21)

²⁵ Mogensen J. et al., *J Clin Invest.*, 103, R39-43, 1999 (参考文献 22)

²⁶ Olson TM et al., *J Mol Cell*, 32, 1687-1694, 2000(参考文献 23)

²⁷ Laing NG et al., *Ann Neurol*. 56, 689-694, 2004 (参考文献 24)

²⁸ Nowak KJ et al., *Nat Genet*, 23, 208-212, 1999 (参考文献 25)

²⁹ Zhu M et al., *Am J Hum Genet*, 1082-1091, 2003 (参考文献 26)

³⁰ Actin-Binding Proteins and Disease, New York, Springer (参考文献 20)

Coronin 1a	FA-binding	Breast Prostate	Transgelin	FA-crosslinking	Colon, Prostate Esophagus
Cortactin	FA-crosslinking	Hepatocellular carcinoma Breast Prostate	Tropomyosin- 1	FA-binding	Breast, Prostate Bladder, Colon
Ezrin	FA-binding	Rhabdomyosarcoma, Breast, Esophagus, Prostate(C/MC)	Tropomyosin- 4/5	FA-binding	Bladder, Breast Lung(C/N)
Eplin- α	FA-crosslinking	Oral cancer cells Prostate Breast	VASP	G/FA-binding	Bladder, Breast Lung(C/N)
Fascin 1	FA-binding	Breast Prostate(C/MC)	Vinculin	FA-binding	Melanoma Breast, Prostate
Filamin A/C	FA-crosslinking	Melanoma	N-WASp	G/FA-binding	Liver Prostate
Filamin C		Gastric	WAVE2	G/FA-binding	Melanoma Prostate
Gelsolin	FA-capping and severing	Breast, NSLC stage I,II Bladder, Ovary, RCC	WABE3	G/FA-binding	Breast Prostae
LASP1	FA-binding	Breast			
MIMA/B	GA-binding	Blader Prostate			
Mena	G/FA-binding	Breast			

(6) プロジェクト開始時におけるアクチン研究の諸課題

シドニー大学の dos Remedios CG が 2003 年のレビューの中で当時のアクチン研究における諸課題を取り上げている³¹。これはプロジェクト開始時、アクチン研究においてどのような課題があったのかを専門家以外の者が知る上で大変参考になると思われるので、以下に紹介する。

① F-アクチンの原子構造

アクチンモノマーの詳細な原子構造は分かっているが、未だ F-アクチンの原子構造は不明。これまでの F-アクチンの原子構造は ABP と共結晶したアクチンを使って行われたものである。

② アクチンのアイソフォーム間の機能的な差異

③ アクチンモノマーと ABPs との三重重合体

³¹ dos Remedios CG *et al.*, *Physiol. Rev.*, 83, 433-473, 2003 (参考文献 10)

in vitro でのアクチンと 2 種の ABP (cofilin、DNase) の三重重合体形成は確認されているが、in vivo における三重重合体の役割はあるのだろうか？ さらに、アクチンと他の ABPs との三重重合体について同様に調べる必要があると思われる。

④ 未発見の ABPs の存在

2003 年時点で、過去 5 年間で 65 個の新しい ABPs が発見された。まだ、新規 ABPs の発見が期待される。

⑤ アクチン重合プロセスにおける ABPs が関与する調節機構の解明

⑥ 核内における骨格タンパク質の役割

⑦ 疾患と細胞骨格

疾患における細胞骨格と ABPs の役割は新しく出てきた課題である。

⑧ 原生動物の細胞骨格成分

バクテリアのアクチンホモログの in vivo における機能や調節機構が不明。

(7) プロジェクト開始時における前田グループの研究成果

1990 年から前田らは EMBL (欧州分子生物学研究所支所、ドイツ・ハンブルグ) においてトロポニンの結晶構造解明の研究を開始し、その後、帰国して 1993 年に日本に研究拠点を移し研究を継続してきた。

その後、1998 年に理研播磨研究所の Spring8 センターに研究室を持って以来、理研内にクライオ電子顕微鏡、質量分析機、NMR 装置等を整備すると共に、最先端の計算科学を援用する研究者を集めて X 線繊維回折強度の解析や電子顕微鏡写真の単粒子解析法などで独自の手法を開発することが可能になった。

その結果、

①トロポニン部分複合体の結晶構造解明³²、②トロポニン 3 量体の結晶構造解明³³の研究成果を得ることができた。

また、アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の構造解明を目指す研究を開始し、これらの研究から③アクチンフィラメント P 端結合タンパク質トロポモジュリン (部分) の結晶構造解明³⁴や④B 端結合タンパク質 CapZ の結晶構造解明³⁵ 等の重要な研究成果が得られた。

さらに、キャピラリーの中で濃縮されたアクチン溶液に強力な磁場 (13.5 Tesla) を掛け配向性の良い F-アクチンゾルを調製する方法を開発し、これにより⑤3.4 Å の解像度で F-アクチンの X 線回折パターンを得る事に成功した³⁶。

³² Vassilyev DG *et al.*, *PNAS*, 95, 4847-4852, 1998 (参考文献 27)

³³ Takeda S *et al.*, *Nature*, 424, 35-41, 2003 (参考文献 28)

³⁴ Krieger I *et al.*, *Biophys. J.*, 83, 2716-2725, 2002 (参考文献 12)

³⁵ Yamashita A *et al.*, *EMBO J.*, 22, 1529-1538, 2003 (参考文献 11)

³⁶ Oda T *et al.*, *Results and Problems in Cell Differentiation*, 32, 43-58, 2001 (参考文献 29)

1.2.2 社会の背景

20 世紀末に遺伝子情報に基づいたゲノム科学の大きな進展があった後、21 世紀に入り、大型放射光発生施設の設置による X 線結晶構造解析の精度向上、高磁場化による NMR 性能向上、クライオ電子顕微鏡の性能向上等の機器性能での進歩及びコンピューターの大型化による計算速度の飛躍的アップにともなうタンパク質構造解析ソフトの進歩等もあり、タンパク質の立体構造を原子レベルで明らかにし、それに基づいて生命現象の諸相を明らかにしようという構造ゲノム科学研究に対する関心、必要性が高まってきた。また、タンパク質は、生体内で重要な機能を担っていて複雑な生命現象を維持する基本的な物質であり、多くのヒトの疾患がタンパク質の多様な作用に関連していることが分かってきた。疾患に関係するタンパク質の構造及び機能を解析することで、タンパク質の働きを制御することができる化合物の予測が可能になり、疾病を治療する創薬プロセスを大幅に短縮することが期待された。2000 年 6 月に、日本学術会議は「分子レベルの構造生物学の推進に向けて」という報告書を発表し、2002 年から 2006 年にかけて行われた文部科学省の超大型プロジェクト「タンパク 3000」はその 1 つの具体的な行動であった。「タンパク 3000」では世界先端施設（SPring-8/理研播磨研究所、YNMR/理研横浜研究所、KEK-PF/文部省高エネルギー加速機構）を駆使し、我が国の産官学の研究能力を結集して、約 3000 種のタンパク質の基本構造の解明およびその機能の解析を目指した。なお、その成果については、現在、文部省創薬等支援技術基盤プラットフォームの HP にリンクした「タンパク 3000 構造ギャラリー」にて公開されている。

大槻・森本等（九州大学医学部）は、1996 年～2004 年の間、遺伝性拡張型心筋症の病態発現機構とトロポニン分子突然変異の関係について研究を進め、トロポニン遺伝子の突然変異による心筋症では、心筋細胞の収縮・弛緩調節に関する細胞内カルシウムイオンに対する感受性の劣化が原因であり、カルシウム感受性が増加する突然変異では肥大型心筋症あるいは拘束型心筋症が発症し、逆にカルシウム感受性が低下させる突然変異によって拡張型心筋症が引き起こされる恐れが強いことを明らかにした。

1.3 プロジェクトのねらい

1.3.1 プロジェクトの目標

F-アクチンとその複合体の構造と制御のメカニズムを解明するために、以下の 3 つの方向で研究を展開した。

- (1) 複合体を構成する個々のタンパク質の高分解能構造の解明
- (2) 複合体全体の高分解能構造の解明

アクチンフィラメントの機能の担い手は、個々のタンパク質分子のレベルにあるのではなく、タンパク質複合体のレベルにある。さらに、複合体中でのタンパク質の相互作用の詳細を知ることがメカニズム解明のキーである。

(3)個々のタンパク質の、あるいは複合体の構造動態（構造の時間的揺動）の解明

メカニズム解明のためには、相互作用の構造そのよりも構造の動態を理解することが重要である。

以上の研究で得られた知見に基づいて、「アクチン・トロポミオシン・トロポニンから形成されるアクチンフィラメント複合体による筋収縮のカルシウム調節メカニズムの解明」および「アクチン・トレッドミルのメカニズムの解明」を進める。

しかし、本プロジェクトの対象タンパク質であるF-アクチンは、分子量が極めて大きく、線維状重合体のため結晶化も困難であり、通常のNMRやX線結晶解析では測定できず、最新の設備や技術を利用した上に特別な工夫が必要であった。

1.3.2 先進設備の利用

タンパク質が働くメカニズムを知るには原子構造を知ることが重要であるが、線維状重合体であるF-アクチンは通常のX線結晶構造解析法やNMR解析法を適用できないので、最新の放射光発生設備や機器をできるだけ利用して、独自の構造解析法を開発し、これまで世界的に手が付けられなかった問題を解決することが、本プロジェクトの狙いであった。

表 1-3 に示すように、本プロジェクト進行時には、理研播磨研究所の中でX線の光源としてSPring-8の高輝度放射光ビームラインやクライオ電子顕微鏡の利用が可能であった。また、ラボ用高輝度X線発生装置、高磁場NMR、DNAシーケンサ等の機器設置及び測定技術の開発の面で充実してきていた。

表 1-3 タンパク質の解析に用いる先進設備の利用状況

利用機器・システム	プロジェクト前	プロジェクトでの利用	プロジェクト終了後
タンパク質材料の調製用発現系	・大腸菌発現系 ・ <i>in vitro</i> 発現系 ・昆虫細胞発現系	・大腸菌発現系 ・高発現系昆虫細胞系	・大腸菌発現系 ・高発現系昆虫細胞系
X線発生装置（結晶構造解析）	・ラボ用X線発生装置	・Spring-8(1997年稼働/理研) 放射光の輝度は従来の1億倍 ・ラボ用高輝度X線発生装置	・SACLA(2011年稼働/理研) X線自由電子レーザー
NMR（構造解析）	・低分子タンパク質（25kDa以下）の解析	・800、600、500MHz ・アクチン配向ゲルの調製	SAIL-NMR法（同位体アミノ酸標識）による構造動態測定

クライオ電子顕微鏡 (構造解析)	・らせん対称タンパク質の構造解析	・繊維状タンパク質のフィラメント端部の構造解析	・超低温クライオ STEM
タンパク質構造解析用ソフト	MD (Molecular dynamics simulation)法によるタンパク質運動性評価	NMA (Normalmode analysis) 法による基準振動解析	・スーパーコンピュータの大型化で複雑な構造計算が可能。 MD 法による構造解析時間の大幅短縮

1.4 研究体制

本プロジェクト開始時（2003 年 11 月）は理化学研究所播磨研究所で、「蛋白質動態グループ」、「動態解析グループ」、「調節と動態グループ」の 3 グループで立ち上げたが、前田研究総括の名古屋大学教授への移動に伴い、研究拠点を 2 箇所とし、2005 年 5 月、播磨研究所に「アクチンフィラメントの構造と動態グループ」と「カルシウム調節のメカニズムグループ」、名古屋大学に「細胞内アクチン制御システムの構造と機能グループ」が設置された。

研究総括：前田雄一郎

研究顧問：甲斐荘正恒、

研究推進委員：渡辺信久、成田哲博（2007 年 11 月 1 日～2009 年 3 月 31 日）

(1) 研究発足時（2003 年 10 月～2004 年 7 月）

グループ	グループリーダー
① 蛋白質動態	前田 雄一郎（兼）
② 動態解析	小田 敏郎
③ 調節と機能	似内 靖

(2) 2005 年度以降（①、② 2005 年 4 月設置、③ 2005 年 5 月設置）

グループ	グループリーダー
① アクチンフィラメントの構造と動態	小田 敏郎 成田 哲博（～2007 年 10 月）
② カルシウム調節のメカニズム	似内 靖（2007 年 9 月退任） 前田 雄一郎（2007 年 9 月～兼任）
③ 細胞内アクチン制御システムの構造と機能	松浦 能行

本プロジェクトは全体の人数が少ないので（研究員以上は総勢 8 名）、研究総括が全員を直接指導できることや、課題解決のためには、方法主体のグループと課題主体のグループが経系と横系のように組み合わせられる必要があり、どちらかのグループ分けを組織的グループとして固定するのは適当でないと考えられ、形式的には 3 グループを設置したが、実質的には一つの組織として運営された。

1.5 プロジェクト終了時点での研究成果やその意義

「アクチン重合体の高分解能構造とアクチン発現系」の研究テーマについては、小田グループが担当し、高磁場のマグネットを使ってキャピラリー中に高濃度・高配向させたアクチン重合体ゾルからのアクチン重合体(F-アクチン)のX線繊維回折強度とクライオ電子顕微鏡写真の電子密度分布のデータから高分解能の F-アクチンの構造モデルを得ると共に、バキュロウイルス/昆虫細胞 Sf9 細胞で発現させたアクチン変異タンパク質の研究から、アクチン分子中の個々のアミノ酸残基の役割を明らかにした。

「トレッドミリングなど細胞運動を担うアクチンフィラメントおよび類似の構造」の研究テーマについては、成田グループが担当し、クライオ電子顕微鏡写真の画像解析法（単粒子解析法）ベースに新しい方法を開発して高分解能（23 Å 程度まで）で大きなタンパク質複合体の三次元構造を解明できるようになり、アクチン-C P 複合体構造を決定し、アクチンの重合・脱重合速度の調節機構を明らかにした。

「筋のカルシウム調節のメカニズムの研究」は前田グループが担当し、高分解能のトロポミオシンの結晶を作製する方法を開発してカルシウム調節を担うアクチンフィラメント複合体（アクチン・トロポミオシン・トロポニン）を形成するトロポミオシンの結晶構造を明らかにした。

「アクチンが関与する分子メカニズムの解明」の研究テーマについては、松浦グループが担当し、ミオシンのアクチン結合部位と考えられているループ構造のアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換した人工変異ミオシンの研究から、アクチン-ミオシン複合体形成において最も強く接触するのがミオシンの疎水性トリプレットループにある三つのアミノ酸残基であることを明らかにした。

以下、プロジェクト終了時点における主な研究成果について紹介する。

1.5.1 アクチン重合体の高分解能構造とアクチン発現系

(1) アクチン重合体の高分解能構造

アクチンの働きのメカニズムを理解するためには F-アクチンの構造を高分解能で知ることが必要である。また、筋収縮およびそのカルシウム調節のメカニズムを理解するにはアクチンフィラメント複合体の構造と構造動態の理解が鍵を握っている。しかし、G-アクチンの結晶構造は既知であったが、より重要な F-アクチンの原子構造は F-アクチンが線維状の重合体のため結晶化が困難であり未だ解明されていなかった。

小田等は、当時の最大級の 800MHz の NMR に使われていた 18.5 テスラ (tesla) の超電導マグネットを使って F-アクチン溶液に高い磁場を掛け、ガラス管中に高濃度・高配向させた F-アクチンのゾルの調製方法を確立し、この配向ゾルに高輝度で安定度の高い SPring-8 の放射 X 線源を使って X 線繊維回折強度を得ることに成功した。このデータとクライオ電子顕微鏡写真から得られた分解能の高い F-アクチンの電子密度分布のデータを解析するた

めに最先端の計算科学である MD 法 (Molecular dynamics simulation: 分子動力学計算) 及び NMA 法 (Normal mod analysis: 基準振動モード計算) を駆使し、また G-アクチンの結晶構造を変形させて計算される回折データにも合わせてフィットを行い、顕微鏡データと整合性のある F-アクチン構造モデルを得ることに成功した³⁷。図 1-2 は、F-アクチンの観察された回折像と構造モデルから計算で得られた回折像を比較したものであるが、両者がほぼ一致していることが分かった。

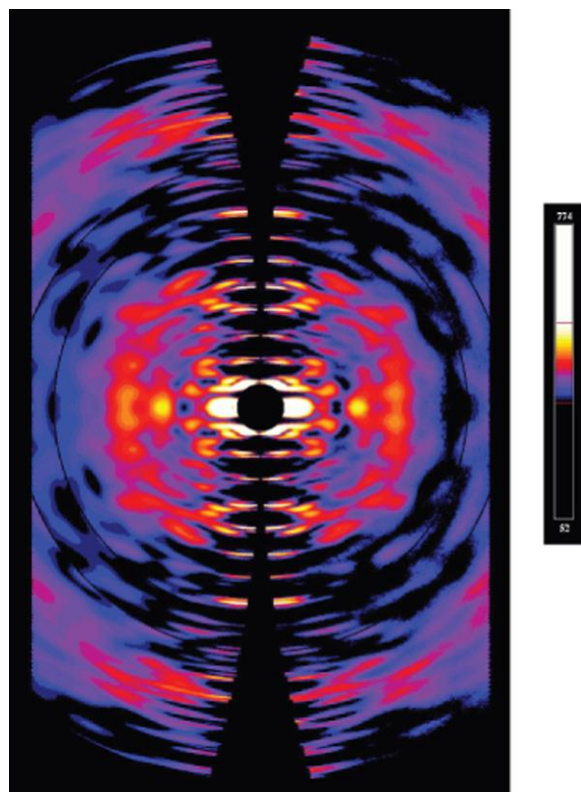


図 1-2 F-actin の X 線繊維回折像

左側半分：観測された回折像

右側半分：構造モデルから計算で得られた回折像

上記の F-アクチンの構造モデルにおいて、アクチン分子は中央の ATP 結合溝で左右 2 つのドメインに分かれる。図 1-3 に示したように、G-アクチンでは左右 2 つのドメインは互いに約 20 度捻じれている。G-F 変換に伴ってその捻じれは解消し、線維状のアクチン分子がフラットになる。このドメインの回転によるフラット状態形成が安定ならせん状 F-アクチンの形成に不可欠であることを明らかにした。フラットな形状は、アクチンの分子形状としてはじめてであり、F-アクチンに特徴的である。このフラットな分子がらせんに配列すると、アクチン・サブユニット相互間に (inter-strand および intra-strand) 多くの接触

³⁷ Oda T *et al.*, *Nature*, 457, 441-445, 2009 (参考文献 30)

が形成される。特に第3サブドメインの突起部と第4サブドメインの3本のループ構造の間に形成される「ボール・ソケット連結」が intra-strand 相互作用で中心的な役割を担う。Inter-strand 相互作用は2本のループによって担われる。G-アクチン分子がF-アクチンに取り込まれたとき、サブユニットのフラット化つまり、ドメインの回転によりアミノ酸残基 Gln137（グルタミン）とγリン酸とが接近し、ATP の加水分解反応を促進すること示唆した。

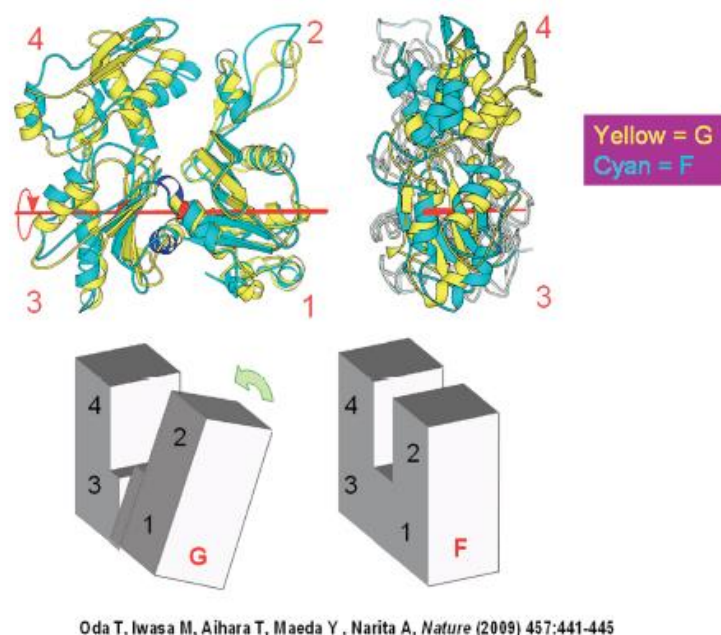


図 1-3 重合に伴うアクチン分子の構造変化³⁸

図の説明：

アクチン分子は単量体（G アクチン）では分子の両半分は互いに約20 度ねじれているが、重合体（F アクチン）中では分子は平板となる。

上段の図：G-アクチンを黄色、F アクチンをシアン色で示して、リボン表示したそれぞれの分子構造を重ねた。

下段の図：アクチン分子の構造変化の模式図を示す。重合に伴って左右のドメインのねじれがなくなり、平板化することを示している。

(2) アクチンの大量発現系の確立とアクチン変異タンパク質の研究

F-アクチンの高分解構造から、G-F 変換にアクチン分子のフラット化を伴うことが分かったので、左右のドメインが互いにフラットになるようにずれる時にアミノ酸残基 Q137(グル

³⁸ 上原記念生命科学財団研究報告集 24(2010)「アクチンフィラメントの構造とアクチントレッドミリングの作動メカニズムの解明」https://ueharazaidan.yoshida-p.net/houkokushu/Vol.24/pdf/045_report.pdf (参考文献 31)

タミン) はそのずれ接触面に存在するため、この残基の側鎖を小さくすれば構造変化が、すなわち重合が促進されると予想される。一方、Q137 の側鎖は捕捉した水分子を介して ATP 加水分解にも参加しているとの仮説がある。

ヒト心筋アクチンと非筋肉細胞アクチンを世界で初めて、昆虫培養細胞 Sf9/エンハンサー-L21 系で発現することに成功した。アミノ酸残基の 1 部を変更して均一性の高いサンプルを調製しその影響を調べる研究を行う上で極めて有効であると考えている。アミノ酸残基 Q137 は G-F 変換のずれ接触面に存在するので、残基の側鎖を小さくすれば構造変化が、すなわち重合が早まり、又、捕捉水分子の減少により、ATP 加水分解が阻害されることが予想される。137 番目のグルタミンをアラニンに変異させたアクチン変異体 Q137A では、アクチンの重合速度は 4 倍に、溶液中へのリンの放出速度は 1/4 に減少し、予測は正しいことが証明された。

また、108 番目のアラニンをグリシン変異させた変異体 A108G では、アクチン重合とリン酸の放出速度が共に遅くなり、109 番目のプロリンをアラニンに変異させた変異体 P109A では共に速くなったことから、A108 および P109 はアクチン重合時の構造変化のみに関与することが示唆された³⁹。

(3) モータータンパク質の関与しないバクテリアのフィラメント形成タンパク質に関する研究

バクテリアのアクチンホモログである ParM はバクテリアのプラスミド分離に関与する繊維状タンパク質である。この ParM 遺伝子を発現プラスミドに組み込んで大腸菌で発現させ、得られた精製タンパク質を使って ParM 重合体の分子構造およびヌクレオチド結合時の動的不安定性のメカニズムについて調べた。その結果、この重合体はアクチンと同様に 2 重らせん構造を持つが F-アクチンと反対の左巻きであることが分かった。また、ParM は GTP 存在下で ATP 存在下に比べて速やかに重合することから、バクテリア菌体内では ParM はアクチンと異なり、GTP をエネルギー源として使っている可能性が示唆された⁴⁰。

1.5.2 F-アクチンの末端部の構造の決定及び制御

(1) 電子顕微鏡による F-アクチンの B 端の構造の決定

細胞内のアクチンフィラメントは、CP(筋肉では CapZ)、Arp2/3 複合体、gelsolin、formin、tropomodulin のような末端結合タンパク質の結合により制御されている。成田等は、電子顕微鏡写真の単粒子解析法をベースに独自に新しい方法を開発し、アクチン-CP 複合体構造を決定した。まず、クライオ電子顕微鏡を用いて得られたアクチン CP 複合体写真から暫定的な構造モデルを作成し、最も良く合う投影方向と位置を決定する。次いで、暫定的に決

³⁹ Iwasa M, *et al.*, *J Biol Chem*, 283, 21045-21053, 2008 (参考文献 32)

⁴⁰ Popp D *et al.*, *EMBO J.*, 27, 570-579, 2008 (参考文献 33)

定した位置に基づいて、フィラメントごとの末端部の位置を合わせることで、アクチン-CP 複合体の三次元構造を決定することができた⁴¹。

(2) アクチン CP 複合体の構造

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使って、CP がアクチンフィラメントの B 端に結合したアクチン-CP 複合体の EM 構造を 23 Å の解像度で決定した。

さらに、CP の結晶構造とアクチンフィラメントの構造モデルをフィットさせて得られた本構造から、図 1-4 に示すような複合体の CP とアクチンフィラメント B 端の間に 2 つの主な結合領域が存在する 2 段階結合モデルを構築することができた⁴²。これは、アクチンフィラメントの末端構造を決定した初めての報告である。

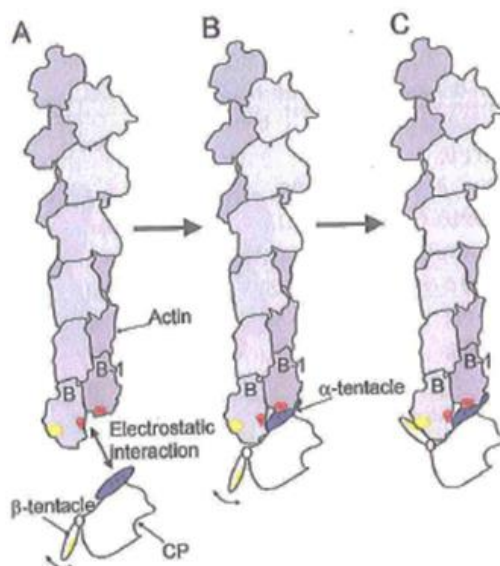


図 1-4 CP のアクチンへの結合モデル

図の説明：

第 1 段階(A)：CP の α -tentacle(青色)の塩基性残基とアクチンフィラメント下部の酸性残基（赤色）が互いに引き合う。この相互作用が結合のオン速度(on-rate)を決める。結合していない β -tentacle（黄色）は 46-252 残基周辺の塩基性領域によって自由に動ける。

第 2 段階(B)： α -tentacle がアクチンフィラメント下部に結合する。

結合していない β -tentacle は自由に動けるので、アクチンフィラメント上の結合位置を探す。

第 3 段階(C)： β -tentacle はアクチンフィラメントの末端プロモーター B の外側の表面にある疎水性クレフト(黄色)に結合する。この結合により結合のオフ速度(off-rate)が低下して結合が安定化する。

⁴¹ Narita A *et al.*, *J Mol Biol*, 365, 480-501, 2007 (参考文献 34)

⁴² Narita A *et al.*, *EMBO J*, 25, 5626-5633, 2006 (参考文献 35)

第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1 各テーマの現在の状況

2.1.1 アクチン重合体の高分解構造とアクチン発現系

(1) アクチン線維の末端部の構造と制御

アクチン結合タンパク質を金粒子 (Au) で標識し、その負染色電子顕微鏡像を画像解析することによって結合部位を決定する方法を開発し、actin nucleators (アクチン重合開始剤) の一つである spire がアクチンの B 端 (barbed end) に結合することを明らかにした。これまで具体的な立証が難しかった spire の B 端結合を電子顕微鏡写真で直接確認することができた⁴³。本法の特徴は、標識部位として組換えタンパク質の His-tag を使うこと、金粒子の大きさを負染色で直接観察可能な 5-10nm としたこと、金粒子試薬の不安定性を回避するため使用直前に 2 試薬を混合して標識する方法を開発したこと、電子顕微鏡の画像解析からアクチン重合体の極性を決定する方法を組み合わせたことである。

(2) CP のアクチン B 端キャッピングの制御メカニズムの解明

CP がアクチンフィラメントの B 端に結合してアクチンをベースとする葉状仮足の動態においてキーとなる役割を果たし、V-1 および CARMIL タンパク質が直接 CP に結合して CP のフィラメント B 端キャッピングを阻害することも分かっている。また、V-1 は CP の B 端との相互作用を完全に阻止するのに対して、CARMIL タンパク質 B 端に結合した CP に作用してフィラメントからの離脱 (uncapping と呼ばれる) を促進すること、これら 2 つの制御因子の間には機能的な差があることも明らかになっている。しかし、これら 2 つの制御因子がどのように CP を阻害するかを示す分子メカニズムについては未だ十分に理解されていなかった。

武田等は、CP/V-1 複合体および CARMIL タンパク質の CP 結合モチーフ由来のペプチドと CP との複合体の結晶構造解析から得られた両方の原子構造を比較することにより、異なるアクチン制御因子が関与する多様なメカニズムについて本質的な洞察を行い明らかにした⁴⁴。以下、その概要について述べる。

- ・ CP は 2 つの結合部位、即ち、一つは α -サブユニットの C 末端にある塩基性残基 (basic triad)、次いで塩基性接触部位に隣接した疎水性ポケットで V-1 と結合する。
- ・ 図 2-1 に示したように、V-1 の CP との結合部位は、CP がアクチンフィラメントをキャップする時の 2 つのプロモーターの間に深く埋められている。

⁴³ Ito T *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 408, 26-39, 2011 (参考文献 36)

Ito T *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 408, 18-25, 2011 (参考文献 37)

⁴⁴ Takeda S *et al.*, *PLoS Biol.*, 8, e1000416, 2010 (参考文献 38)

- CP は 2 つの剛体のドメインから構成され、これらのドメインは柔軟性のある領域で繋がっており、多様な構造変化を生じる。
- CARMIL ペプチドは立体的に CP を阻害するのではなく、CP/V-1 結合をアロステリックに阻害する。図 2-2 に CARMIL ペプチド/CP 複合体と B 端との結合を示した。
- CARMIL ペプチドは内因性の CP 揺動性を変化させ、CP-L と CP-S ドメインの間の回転を抑制する。

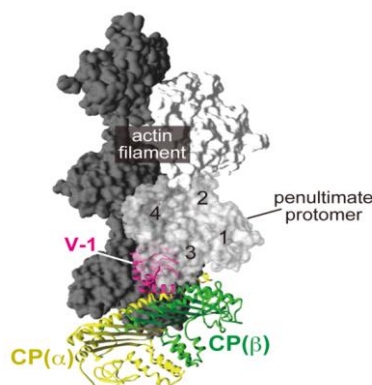


図 2-1 V-1 による CP の B 端結合の立体的な阻害

図の説明： CP/アクチンフィラメント B 端の EM モデルの上に CP/V-1 複合体の構造モデルを重ねた図。CP/V-1 複合体はオリジナルの CP モデルにある CP(β)47-173 の C(α)に重ね合わせた。アクチンのプロトフィラメントは表面モデル（白色またはグレー）で示されている。最後から 2 番目のプロモーター（サブドメイン 1-4 がラベルされている）は、V-1 による立体的な阻害を示していることは明らかである。

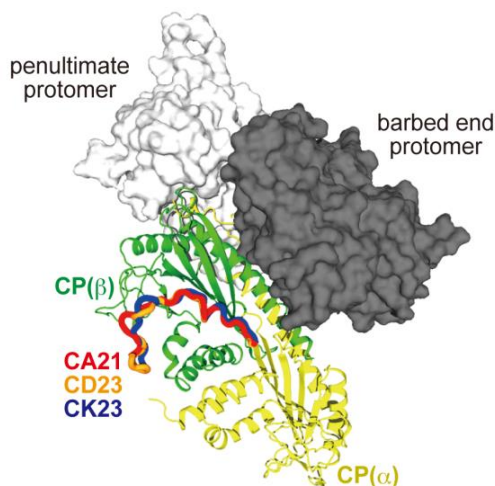


図 2-2 CARMIL ペプチド/CP 複合体と B 端との結合

図の説明： CP(β)3-244 の Cα 位置を用いた CP/フィラメント B 端構造の EM モデルの上に CP/CARMIL ペプチド複合体の構造を重ね合わせたもの。B 端（グレー）と最後から 2 番目（白色）のプロモーターが表面モデルで示されている。CARMIL ペプチドは CP との結合ではアクチンフィラメント B 端とは直接には競合しないことがわかる。

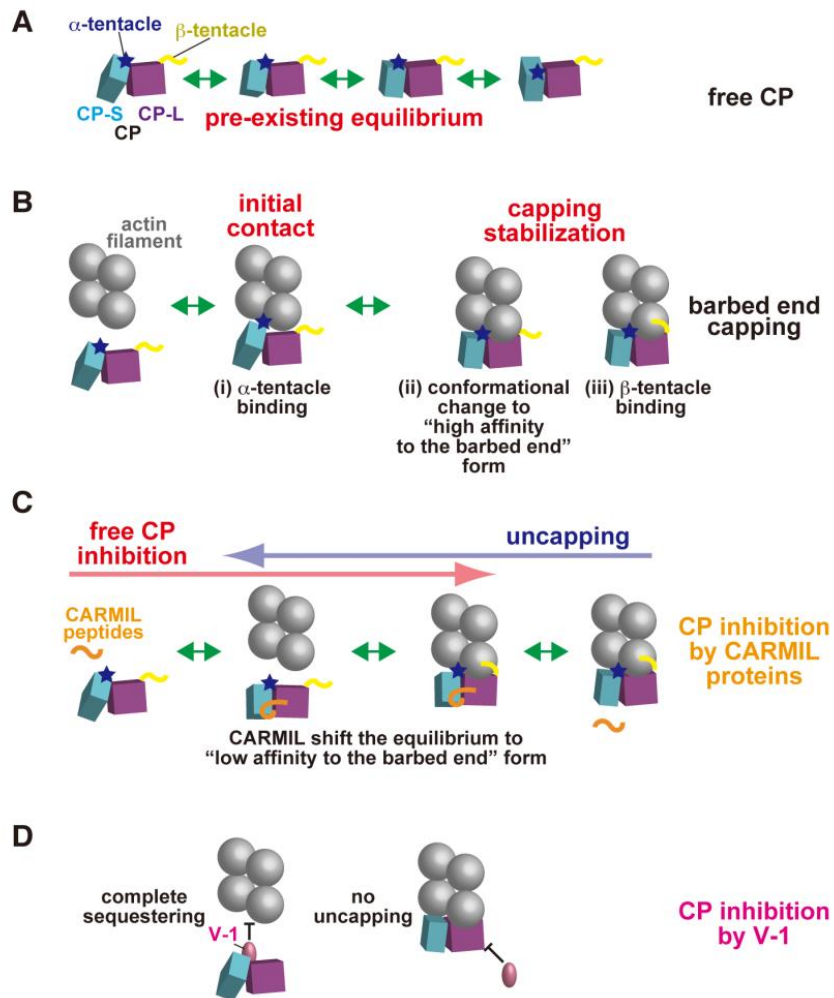


図 2-3 CP によるアクチンフィラメントのキャッピングおよび V-1 と CARMIL タンパク質によるキャッピング抑制の分子メカニズムの模式図

図の説明：

A. 遊離 CP と既存 CP 間の構造的平衡

遊離の CP は、CP-L (紫色) ドメインと CP-S (シアン色) ドメインとの間の回転 (twisting) に起因する多型の構造を有する既に存在している CP との間で平衡関係にある。CP のアクチン B 端へのアフィニティーは、その構造に左右される。

B. CP によるアクチンフィラメント B 端のキャッピング

(i) CP の α -tentacle 領域 (青色) 上の塩基性トライアド (basic triad) 残基が B 端に静電的に結合する。この初期の結合は(ii)および(iii)の構造変化によってさらに安定化する

* basic triad : CP の α -サブユニットに保存されている 3 つの塩基性アミノ酸残基 (Lys256 Arg260、Arg260)を示す。

(ii) B 端高親和性 (high affinity to the barbed end) 型への適応的構造変化

(iii) β -tentacle (黄色) のフィラメントへの支持的結合

C. CARMIL タンパク質による CP のキャッピング阻害

CARMIL タンパク質が CP の構造的柔軟性を妨げる事でアロステリックに CP のアクチンフィラメント B 端へのキャッピングを阻害する (例えば、(B) の (ii) のステップを阻止)。

遊離 CP の阻害 (赤色の矢印) では、CARMIL タンパク質は 2 つのドメインにまたがって結合し、回転運動 (twist motion) を抑制する。

Uncapping (青色の矢印) では、CARMIL タンパク質はフィラメント B 端に結合した CP (the barbed end-bound CP) と相互作用する。これは、結合部位がアクチンプロモーターによって阻害妨害されていないために可能になる。どちらのプロセスにおいても、RMIL タンパク質は CP の構造的平衡を B 端低親和性 (low affinity to the barbed-end) 型にシフトさせ、それによって CP のキャッピング活性が弱まる。CP に結合した CAMIL タンパク質は、CP の α 又は β -tentacle とフィラメントの結合には直接的に影響しない。

D. V-1 による CP のキャッピング阻害

CARMIL タンパク質に比べて、V-1 は CP のアクチンフィラメントとの主要な結合部位と相互作用することで CP の B 端への結合を立体的に妨害し、それによって CP のキャッピング活性を消失させる (例えば、(B) の (i) が阻害される)。

一方では、V-1 は uncapping 活性を欠如している。何故なら、CP の V-1 との結合位置は、CP がフィラメントをキャップする時、2 つの末端プロモーターの間に深く埋め込まれた状態になっている。ただし、V-1 との結合は、CP_{V-1} 構造中に CP を保持させていることから CP の構造的な柔軟性に影響しているに違いないことを留意すべきである。しかし、この影響が V-1 による CP のキャッピング阻害の主要因ではないと思われる。

2.1.2 トレッドミリングなど細胞運動を担うアクチンフィラメントおよび類似の構造

電子線トモグラフィー法による細胞内アクチン線維の極性と分岐点の構造解析

アクチンのトレッドミリングのメカニズムを理解するためには、個々のタンパク質の相互作用が起こる位置、すなわち網目構造中でのアクチン結合タンパク質の分布を知る必要がある。

電子線トモグラフィーは、透過型電子顕微鏡（TEM）で様々な角度から撮影した試料の投影像（TEM 像）をもとにコンピューター上に三次元像を再構成して材料の微細な三次元構造を解析する手法であるが、オーストリア科学院の J. V. Small 等はアクチン細胞骨格に適した電子線トモグラフィー法を開発し、細胞内葉状仮足のアクチン網目構造の高コントラストで良好な分解能の画像を得たことを報告している。前田等は、Small 研と共同でその解析法を開発し、純粋にトモグラムの構造情報だけで個々のアクチン重合体の極性を決定した⁴⁵。

また、細胞内葉状仮足のトモグラムの解析からアクチン線維の分岐点に Arp2/3 複合体が配置することを確認することができた⁴⁶。

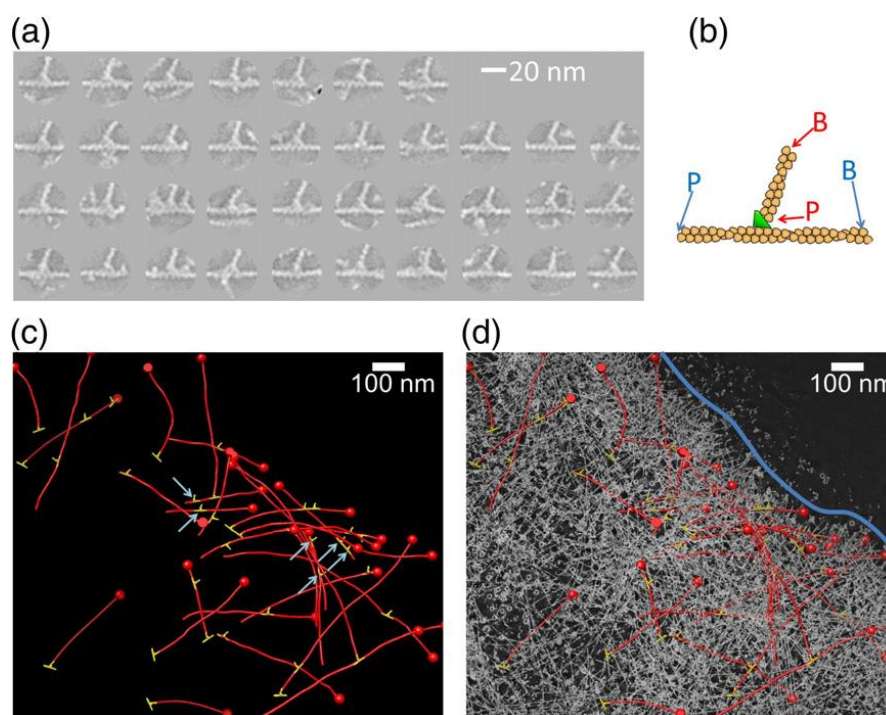


図 2-4 Swiss 3T3 細胞内葉状仮足の Arp2/3 により誘導されたアクチンフィラメントの分岐

⁴⁵ Narita A *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 419, 359-368, 2012(参考文献 39)

⁴⁶ Vinzenz M *et al.*, *J. Cell. Sci.*, 125, 2775-2785, 2012(参考文献 40)

図の説明：

(a) 分岐の二次元画像のギャラリー

(b) Arp2/3 によって誘導された分岐の系統図

母フィラメントの P 端と B 端 は、それぞれ青色の “P” と “B” で示されている。娘フィラメントの B 端と P 端は、それぞれ赤色で示されている。

(c) 分岐（黄色）の分布と方向及び分岐に結合されていたフィラメントの痕跡（赤色のチューブ）の B 端（赤色の珠）の位置

(d) アクチン網目構造中の Arp2/3 の分岐

2. 1. 3 新規構造解析法の応用（技術の波及効果）

本プロジェクトで適用したアクチン重合体の構造解析法をベースに各種研究者との共同研究が進み、下記の研究成果が得られた。

(1) アミロイドの構造の測定（理研脳科学研究センター 田中研究室との共同研究）

ハンチントン病の原因タンパク質ハンチンチンエキソン（アミロイド）を異なる温度（4℃と 37℃）で凝集させたところ、4℃で形成したアミロイドの構造は、より脆弱で、 β シートに加え、ループやターン構造を含み、ポリグルタミン酸が露出して、毒性が強いことが分かった⁴⁷。

(2) バクテリア・アクチンホモログ

バクテリア由来のアクチンホモログ AlfA の構造を高圧 X 線小角散乱で調べた。AlfA の重合速度は極めて速く、安定性は ParM と F-アクチンの中間であることが分かった⁴⁸。

(3) HLSV (Hibiscus Latent Singapore Virus) の構造（シンガポール国立大学との共同）

HLSV はトバモウイルス (Tobamovirus) の 1 種で長さ 3000 Å、直径 180 Å の棒状の形状を有している。3.5 Å の解像度で X 線繊維回折法により原子構造を決定した。ウイルス粒子は 18kDa の単量体の外被タンパク質で構成され、ウイルスの軸に対して、右巻きにらせん状に配列されていることが分かった⁴⁹。

(4) 筋肉の細いフィラメント（大阪大学基礎工学部生命工学科との共同研究）

骨格筋収縮の制御メカニズムに関連する薄いフィラメントの構造変化を明らかにするために、生きたカエルの筋肉を使って、リラックスしているときと、Ca²⁺を加えて活性化し

⁴⁷ Nekooki-Machida N *et al.*, *PNAS*, 106, 9679-9684, 2009 (参考文献 41)

⁴⁸ Popp D *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 397, 1031-1041, 2010 (参考文献 42)

⁴⁹ Tewary SK *et al.*, *J.Mol.Biol.*, 406, 516-526, 2011 (参考文献 43)

たときの X 線繊維回折像を測定した。Ca²⁺がトロポニン C に結合すると、トロポニンが繊維軸の方に～6 Å 動き、反時計回りに～16° 回転する。トロポミオシンはトロポニン T の尾と共に、アクチンの内部ドメインの方に～12°、半径方向に～7 Å 移動する。これはミオシンがアクチンに結合する余地を残すためと思われる。活性化において、トロポミオシンの運動の立体的な抑制に加えて、トロポニンの運動とアクチン中の構造変化が制御メカニズムの重要な要素であることが示唆された⁵⁰。

2.2 プロジェクトメンバーの活動状況

プロジェクトに参加した研究者は研究総括以外に 13 名であったが、長期的に従事した研究者は 7 名で、中心的に活躍した研究者は、成田哲博、小田俊郎、David Popp の 3 名である。David Popp はドイツからの研究者であるが、ERATO では主としてバクテリアのアクチンホモログの研究を行い、ERATO 終了後はシンガポールの国立分子細胞研究所で研究を行っている。

前田研究総括は現在名古屋大学理学研究科構造生物学研究センター特任教授で、表 2-1 に示す科研費基盤研究(S)「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」及び武田科学振興財団からの寄付金で活発な研究を続けている。

成田哲博氏は現在名古屋大学理学研究科構造生物学研究センター准教授で、主として下記の科研費若手研究(B)「電子顕微鏡法によるアクチンフィラメント重合核形成機構の解明」で、クライオ電子顕微鏡によるアクチン関連の研究を行っている。成田氏は 2007 年に風戸研究奨励賞、2008 年には文部科学大臣表彰若手科学賞を受賞している。又、2012 年には「さきがけ」研究者「アクチンフィラメント網動態の電子顕微鏡法による階層的理解」([ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術]研究領域(研究総括 若槻壮市))に選定された。

小田俊郎氏は現在兵庫県立大学生命理科学研究科特任教授で、兵庫県理化学研究所播磨研究所に駐在しており、下記の科研費 基盤研究(C)「F-アクチン形成機構の研究」を利用して、線維状高分子の構造研究を行っている。

⁵⁰ Matsuo T *et al.*, *BIOPHYSICS*, 6, 13-26, 2010 (参考文献 44)

表 2-1 研究助成金の獲得の推移

競争的研究資金	名称	研究 代表者	研究年度													
			2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
ERATO	前田アクチンフィラメント動態	前田雄一郎														
1	科研費 基盤研究 (S)	前田雄一郎														
2	JST 戦略的国際科学技術協力推進事業 日仏研究交流	前田雄一郎														
3	科研費 若手研究 (B)	成田哲博														
4	JST A-STEP	成田哲博														
5	JST さきがけ	成田哲博														
6	科研費 基盤研究(C)	小田俊郎														

研究概要

1	「アクチン重合体の構造の解明とトレッドミリング分子運動のメカニズムの解明に関する研究」 ・ P 端の構造と CARMIL の作用メカニズムを解明
2	「膜近傍でのアクチン重合核形成反応のメカニズムに関する研究」
3	「F-アクチンの形成開始機構の解明に関する研究」 ・ Arp2/3 複合体の形と存在場所及びフォルミンの結合位置を解明
4	「1msec のパルスで写真が撮れる新しい電子顕微鏡の開発」
5	「アクチンフィラメントのダイナミクスとその制御機構の解明に関する研究」
6	「アクチン重合の自発的核形成に関する研究」 ・ X 線小角散乱法により、塩混合初期における 2 量体形成を確認。

第 3 章 プロジェクトの成果の波及と展望

3.1 科学技術への波及と展望

3.1.1 学術的な新発見や発明による科学技術への波及

(1) 代表的論文と被引用件数の年次推移

- ① Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, Narita A, “The nature of the globular to fibrous-actin transition”, *Nature*, 457, 441-445, 2009
- ② Kim K, Yamashita A, Martin A, Wear A, Maeda Y, Cooper J A, “Capping protein binding to actin in yeast: Biochemical mechanism and physiological relevance”, *J Cell Biol*, 164, 567-80, 2004
- ③ Popp D, Narita A, Oda T, Fujisawa T, Matsuo H, Nitani Y, Iwasa M, Onishi H, Maeda K, Maeda Y, “Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide driven dynamic instability”, *EMBO Journal*, 27, 570-579, 2008
- ④ Narita A, Takeda S, Yamashita A, Maeda Y, “Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study”, *EMBO Journal*, 25, 5626-5633, 2006
- ⑤ Narita A, Maeda Y, “Molecular Determination by Electron Microscopy of the Actin Filament End Structure”, *J Mol Biol*, 365, 480-501, 2007

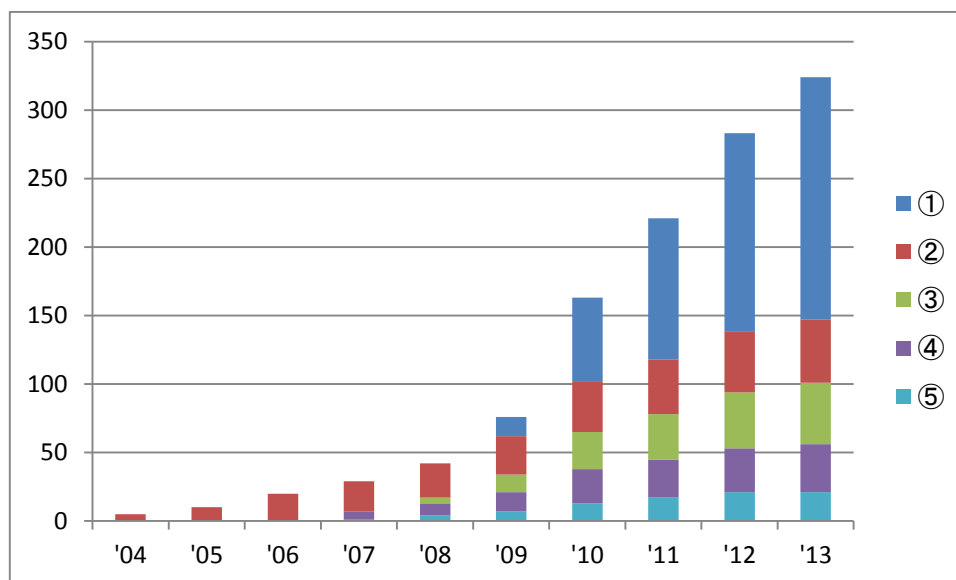


図 3-1 主要論文被引用件数（累計）（2013 年 11 月 10 日 WOS で検索）

図 3-1 に示したように、②、③、④および⑤の論文の被引用件数は 2005 年から 2013 年

まで、定常的に伸びており、同分野の研究者に影響を及ぼしているものと想定される。一方、①の F-アクチンの論文の被引用件数は、報告が出された 2009 年から、2013 年までに急増していることが分かり、本論文のインパクトの大きさが示唆される。そこで、本論文の被引用の内容について、分析してみた。

(2)F-アクチンの高分解能構造の決定の論文が各分野の研究者に与えた影響

①引用した論文の分野別分類

図 3-2 は本論文を引用した論文（2009 年から 2013 年まで）について、Scopus の分野別に分布を表示したものであるが、工学、数学、物質科学などのバイオ以外の分野でも引用されていることが分かる。

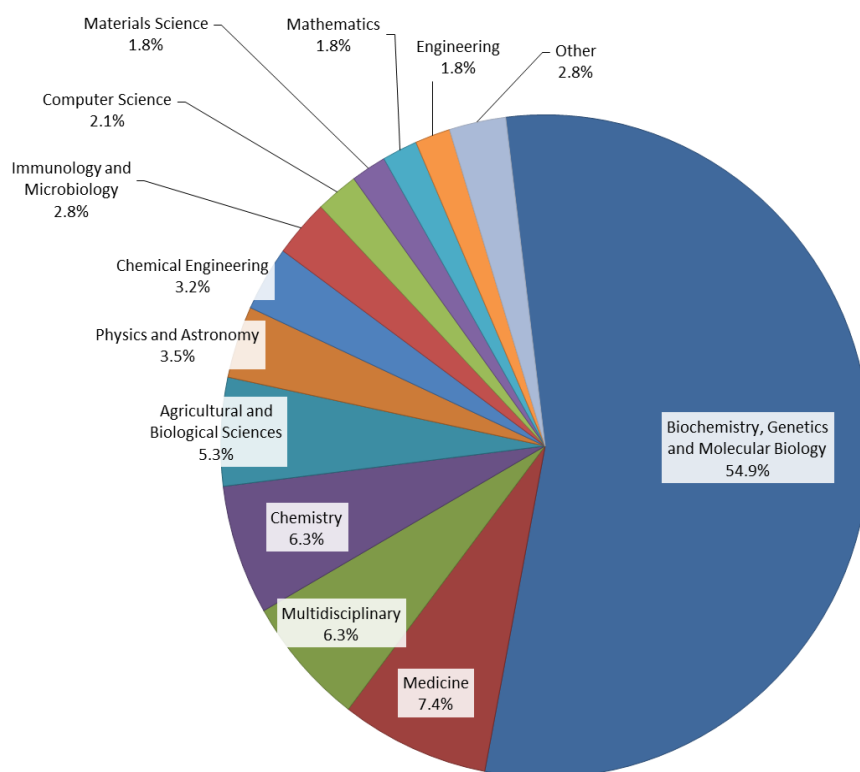


図 3-2 F-アクチン高分解能構造の論文を引用した論文の分野別分類
(2014 年 2 月 25 日 Scopus で検索)

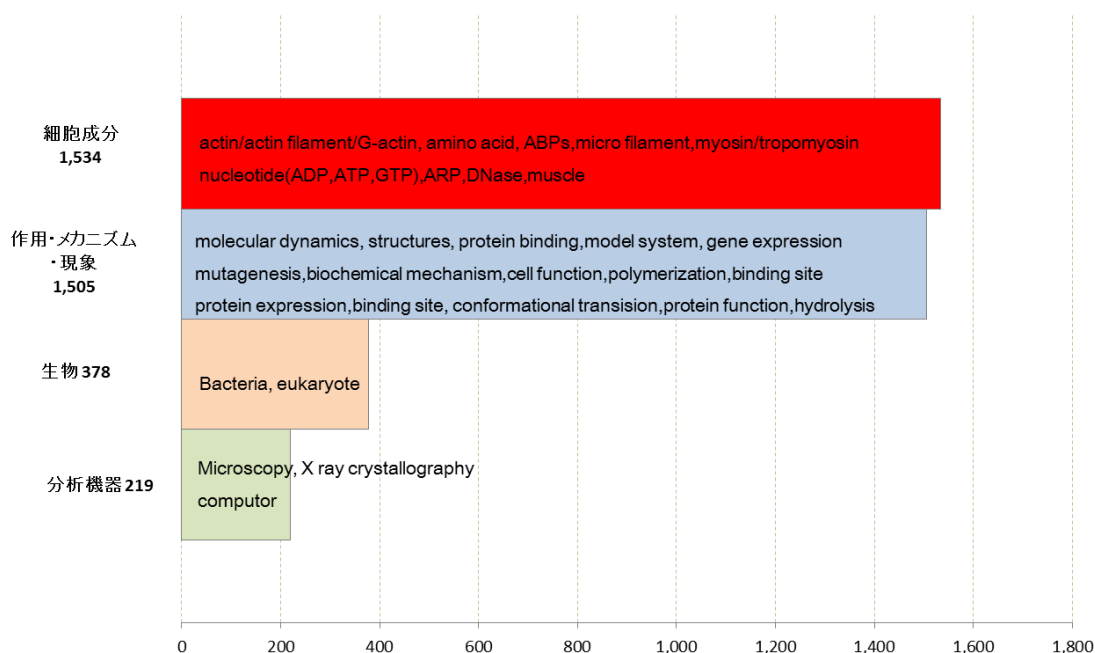


図 3-3 F-アクチン高分解能構造の論文を引用した論文に記載されたキーワードの分類
(2014 年 2 月 25 日 Scopus で検索)

図 3-3 は、本論文を引用した論文に記載されているキーワード中で、「actin、ABP、micro filament」等のアクチン関連の細胞成分および「molecular dynamics、structure、polumerization」等のアクチン関連の作用・メカニズムに関連したキーワードがほとんどであり、生物の基礎研究の進展が示唆された。

②構造生物学分野以外の研究領域の研究者への本論文の影響

構造生物学分野以外の研究領域に対して本論文がどのような影響を与えたかを把握する方法として、当該研究領域の研究動向が記載された総説論文(review)で評価することにした。

本論文を引用した論文の中から構造生物学以外の研究分野の総説を選び、その中で被引用文献数が比較的多い総説（被引用文献が多い事は幅広く当該研究分野の動向を紹介していると判断できる）について内容を確認したので、以下に紹介する。

➤植物のアクチン動態の研究分野

1990 年代から植物の細胞骨格アクチンの研究を行っている米国パデュー(Purdue)大学の Staiger 教授は、最近の総説「Regulatin of actin dynmics by actin-binding proteins in pollen」⁵¹で(被引用文献数：170 件)、アクチン細胞骨格関連の研究動向に係わる記述の中で本論文を引用して、アクチンフィラメントが右巻き of 二重らせん構造を呈する事や G-ア

⁵¹ Staiger CJ *et al*, *J Exp Bot*, 1969-86, 2010 (参考文献 45)

クチンから F-アクチンへの遷移メカニズムが明らかになったこと等をかなり詳しく紹介している。

また、Staiger 研究室の B. Day 等は、植物の病原抵抗性とアクチン動態に関する最近の総説「The Pathogen-Actin Connection: A Platform for Defense Signaling in Plants」⁵²の中で（被引用文献数：150 件）、前述の総説と同様にアクチン細胞骨格関連の研究動向に係わる記述の中で本論文をかなり詳しく取り上げている。

したがって、本論文が植物のアクチン動態の研究者に影響を与えたことは、明らかであると思われる。

➤ナノチューブの研究分野

医薬品のドラッグデリバリー研究分野の中でペプチド分子の自己集合 (self-assembly) に関連した研究分野の 2 つの総説⁵³の中で（引用文献数：129 件、65 件）、本論文が価値のある論文と紹介されているが、内容に関する記述はない。したがって、ペプチドの自己集合の研究に対しては、本論文は殆ど影響を与えなかったと思われる。

③構造生物学関連の学界での評価

2008 年の Gordon Research Conference では、アクチン研究の大御所であるドイツの Holmes は講演後の講評で、「本モデルは F-アクチンの結晶構造が得られるまで、全ての研究者が頼りにすることになり、長期にわたって広い分野の多くの研究者に引用されるものとなるであろう。」と述べた（前田研究総括）。

また、2009 年の Nature に掲載された F-アクチンの高分解能構造モデルの論文は、Holmes が高く評価して、同じ号の News & Views に論文の紹介を行っている⁵⁴。その中で、Holmes は細胞骨格アクチンの構造における研究の流れと共に本論文の成果について論点を明確にして紹介すると共に、本論文が、これまで不明であった F-アクチンの高分解能構造の解明、さらに G-アクチンから F-アクチンへの遷移メカニズムの解明に貢献したことを評価し、次のようにコメントした。「How monomers of the cytoskeletal protein actin join to form the stable polymers crucial to muscle contraction and cellular motility has been a long-standing question. A state-of the art approach provides an answer」（細胞骨格タンパク質アクチンがモノマーから筋肉収縮や細胞運動に不可欠の安定なポリマーをどのように形成するか、これが長い間の疑問点であった。本論文は、その疑問に答える最先端のアプローチである）。

本プロジェクトで得られたタンパク質の構造解析法は、強力な磁場による配向制御とい

⁵² Day B, et al., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 49, 483-506, 2011(参考文献 46)

⁵³ Pouget E et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 4230-4241, 2010(参考文献 47)

Valéry C et al., *Soft Matter*, 7, 9583-9594, 2011(参考文献 48)

⁵⁴ Holmes KC, *Nature*, 457, 389-390, 2009(参考文献 49)

う試料調製法、X線繊維回折法を中心として、種々の線維会合体タンパク質の構造解析にも応用できると期待される。

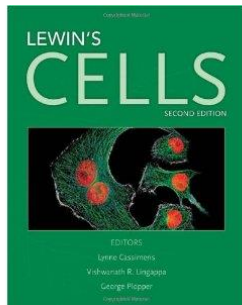
(3) 専門書への掲載

① F-アクチンの高分解能構造、トレッドミリングなど細胞運動を担うアクチンフィラメントおよび類似の構造、筋のカルシウム調節のメカニズムの研究成果については、最近出版された専門書に記載されており、同分野の研究者の育成にも広く貢献している。

表 3-1 専門書への記載

	編者：	浅島 誠、黒岩常祥、小原雄治
	著者：	前田雄一郎、小田俊郎ら
	書名：	現代生物学入門 3 構造機能生物学
	出版社：	岩波書店
	出版年：	2011 年
	掲載ページ：	47-109
	第 2 章 細胞運動のメカニズム 「筋収縮の調節」、「アクチンとトレッドミリング」、の項でその発見、構造、動態、メカニズムが記載されている。	

② LEWIN' S CELLS SECOND EDITION (ed.Lynne Cassimeris et al.)Jones and Bartlett の ACTIN の項に参考文献として挙げられている。		
---	--	--

	編者：	Lynne Cassimeris, Vishwanath R Lingappa, George Plopper
	著者：	Enrique M, De La Cruz and E. Michael Ostap
	書名：	LEWIN 'S CELLS SECOND EDITION
	出版社：	JONES AND BARTLETT PUBLISHERS
	出版年：	2011 年
	掲載ページ：	590 References

3.1.2 学会活動

プロジェクト終了後、前田総括が主に活動している国際学会は下記の2つである。

(1) Gordon Research Conference

1931年、ジョンホスピンス大学のゴードン博士の提唱で始まった国際的な研究会議であり、毎年、国際的に認められた科学者が集まり、採択されたテーマで講演・討議が行われる。

➤ 2002年6月9-14日

議長 David M Warshaw 氏と前田雄一郎氏

➤ 2005年7月3-8日

演者、演題 Y. Maeda. “Tropomyosin crystal structure changes of the regulatory proteins upon Ca^{2+} binding”

➤ 2008年6月29日-7月4日

演者、演題 Y. Maeda, “The nature of the G-to F-actin transition”

(2) Alpbach Workshop on Molecular Motors(会長: K. C. Holmes)

オーストリアのアルプバッハで開催されているモータータンパク質に関する国際会議。

前田総括は、5人のオーガナイザーメンバー (M. Geeves, J. Kendrick-Jones, Y. Maeda, R. R. Schröder, L. Sweeney) の一人である。

3.1.3 科学技術への波及のまとめ

(1) 本プロジェクトで得られた F-アクチンの高分解能構造が今後のアクチンの研究の基本構造になることと、構造解析に関する実験の手法が他の線維状タンパク質の構造解析に応用可能であるという点で、今後の構造生物学の進展に対して波及効果は大きい。

(2) F-アクチンの末端での制御では、分子間の相互作用に柔軟かさやループ結合という新しい概念を導入した。タンパク質の相互作用を理解する上でのブレークスルーとなった。

(3) 昆虫細胞によるタンパク質高発現系の構築は、アクチンのみならず、大量のタンパク質が必要な構造生物学の研究に寄与すると期待される。

(4) F-アクチンの高分解構造の解明の Nature の論文が2013年11月までに184件(WOSで2013年11月時)が幅広い分野で引用されていることから、プロジェクト終了後の科学技術への波及効果が極めて大きいことを示している。

3.2 社会経済への波及と展望

3.2.1 医療への応用

(1) 疾患の要因解明

拡張型心筋症の原因となるトロポニン変異体の構造と揺らぎの研究で、構造揺らぎが重要な役割を果たすという極めて新しい提案を行っている。この仮説が検証されれば、揺らぎを抑えるという新しい観点での創薬が可能になると期待でき、タンパク質機能における揺らぎの重要性を問いかけたこの研究の社会的波及効果は大きいと言える。

(2) 創薬への応用

ガン細胞、免疫の食細胞、膜輸送、脳の海馬での記憶等、アクチンが関与している疾患は多く、今後検討すべき重要な課題と思われる。

①腫瘍細胞のアクチン骨格に作用する新規抗癌剤 (TR100) 2013 年、オーストラリアの New South Wales 大学の Stehn 等は、新規抗癌剤 (TR100) が腫瘍細胞においてアップ制御されているアクチンフィラメント中のトロポミオシンのアイソフォームを選択に標的にして特異的なアクチンフィラメント個体群を崩壊させることを発表した⁵⁵。担癌ヌードマウスでの *in vivo* 実験およびヒト腫瘍細胞での *in vitro* 実験から、TR100 は神経芽細胞腫 (neuroblastoma) およびメラノーマ (melanoma) の生育を抑制した。また、重要な点は、TR100 は心臓の構造や機能に対する副作用は認められなかったことである。2015 年からのヒトでの臨床試験開始を予定している。

②慶應義塾大学医学部・先端医科学研究所の信末&佐谷らの研究チームは、日本大学・生物資源科学部の加野教授らとの共同研究により、細胞骨格タンパク質のアクチンの動態変化が脂肪細胞への分化を誘導する現象のメカニズムを解明することに成功した⁵⁶。

多能性の細胞分化能を有するマウスの脱分化細胞株 (DFAT) を用いて、脂肪分化過程におけるアクチン細胞骨格の動態変化および PPAR γ (peroxisome proliferative-activated receptor γ) の発現を調べた結果、RhoA-ROCK シグナル伝達のダウンレギュレーションによりアクチンストレスファイバーの脱重合が起こり、脂肪細胞への分化の前にモノマーの G-アクチンのレベルが増加することが分かった。さらに、モノマーG-アクチンと転写活性化補助因子 MKL1 (megakaryoblastic leukemia1) との結合により MKL1 の核移行の阻害が、PPAR γ 発現のカギとなる出来事であることが分かった。

この発見により、脂肪細胞分化の制御メカニズムについて新たな洞察が提供された。

⁵⁵ Stehn JR *et al.*, *Cancer Research*, 73, 5169-5182, 2013 (参考文献 50)

⁵⁶ Nobusue H *et al.*, *Nat Commun*, 5, 3368, 2014 (参考文献 51)

今後、癌細胞の基となる癌幹細胞の形態を変化させて、機能的な正常脂肪細胞へと導くという新たな癌治療戦略の開発に寄与する可能性が期待される。

なお、2014年2月26日、本論文に関連して、科学技術振興機構と慶應義塾大学は共同で下記のプレス発表を行った⁵⁷。

アクチン細胞骨格の動態が脂肪分化を誘導するメカニズムを解明
～癌細胞の分化制御を標的とした治療法確立・治療薬開発に期待～

慶應義塾大学医学部・先端医科学研究所の信末&佐谷等の研究チームは、日大生物資源研究所の加野等の研究チームとの共同研究により、アクチン細胞骨格の動態が変化が脂肪細胞への分化を誘導する現象の分子機構について解明した。本研究では、「細胞は、初めに特異的な転写因子の発現によって機能的におよび形態的に分化する」というこれまでの細胞生物学の常識を覆し、細胞の形態変化によって、その細胞の運命が決まるという、一見逆とも思える現象のメカニズムの一端が明らかにされた。今後、癌細胞の基となる癌幹細胞の形態を変化させて、機能的な正常脂肪細胞へと導くという新たな癌治療戦略の開発に寄与する可能性が期待される。

なお、本研究は CREST の研究領域「人工多能性幹細胞(iPS 細胞)作製・制御等の医療基盤技術」における研究課題「人工癌幹細胞を用いた分化抑制異常解析と癌創薬研究」(研究代表者:佐谷秀行)、科研費助成事業新学術領域研究「人工癌幹細胞を用いた治療抵抗性克服戦略の開発」(研究代表者:佐谷秀行)、及び先端医療技術産業化研究事業の研究課題「細胞治療技術における細胞調整技術、評価技術及び作用機序等の基礎研究」(研究分担者:加野浩一郎)における研究の一環として行われた。

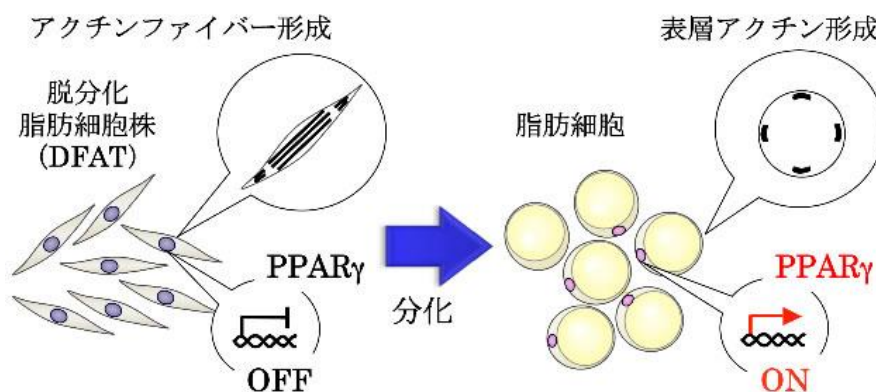


図 3-4 脂肪細胞への分化とアクチン細胞骨格変化

⁵⁷ アクチン細胞骨格の動態が脂肪分化を誘導するメカニズムを解明～癌幹細胞の分化制御を標的とした治療法確立・治療薬開発に期待～ <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140226/index.html>

3.2.2 マスコミによる注目

(1) 線維状タンパク質の伸縮の仕組みを解明

当研究グループは独自の画像処理プログラムを開発し、アクチンフィラメントにタンパク質が結合した構造を世界で初めて決定できた。細胞の分裂や運動、強度の維持などに重要な繊維状タンパク質アクチンフィラメントの伸び縮みのメカニズムを原子レベルで解明した。フィラメントの一方の端ではアクチンが結びつくことで伸び、もう一方の端ではアクチンがフィラメントから離れることで縮む。このメカニズムは筋肉の収縮や細胞の運動など生命現象の理解だけでなく、病原菌の感染メカニズムの解明やアルツハイマー病などの難病治療にも貢献できる研究成果ということで注目された。

- ①日本経済新聞『名大、細胞の動力「アクチン」、制御の仕組み解明、超微小モーターに道』
- ②日経産業新聞『名大などの研究チーム、細胞「動力源」を制御、たんぱく質の構造解析』
- ③日刊工業新聞『名大と JST、繊維状たんぱく質の伸縮の仕組みを解明』
(3 紙共 2006/11/17 発表)

(2) アクチンの分子構造変化を解明—筋収縮・細胞研究に活用

理化学研究所と名古屋大学は、細胞の運動などを担っているタンパク質「アクチン」が集まってできるアクチンフィラメント（繊維の束）の構造を、高磁場を使って液晶状に配向させ、大型放射光施設 SPring-8 による X 線繊維回折法と超低温電子顕微鏡や計算科学を活用して、解明した。単独のアクチンは中心に ATP 結合の溝を持ち、二つの大きな部分がねじれているが、アクチンフィラメントになるとねじれがなくなり、平たい構造になることが分かった。この成果で、筋肉や細胞の運動の研究が進み、アクチンがかかわる病気の原因究明にも役立つことが期待された。

- ①日刊工業新聞『理研など、アクチンの分子構造変化を解明—筋収縮・細胞研究に活用』
(2009/1/22 発表)
- ②朝日新聞『細胞分裂の動力源「アクチン」構造を解明』(2009/1/26 発表)

(3) 細胞運動を制御する仕組みの一部を解明

名古屋大学理学研究科の前田雄一郎教授らは理化学研究所、東北大学と共同で、細胞運動を制御する仕組みの一部を解明した。細胞運動は細胞内にあるタンパク質のアクチンが繊維状に連なり、細胞膜を内側から押すことで進行する。アクチンと結合し、細胞運動の進行を抑えるアクチンキャッピングタンパク質(CP)、CP の量を調整する「V-1」、「カーミル」の結合を X 線結晶構造解析により、原子レベルで調べ、メカニズムを解明することができた。V-1 は CP がアクチンと結合する部分を覆い隠すように結合し、カーミルはアクチンと

結合した CP に結合し、両者の結合力を弱めて引き剥がす働きを持つことを突き止めた。ガン細胞は細胞運動で転移するため、それを抑える薬の開発などに繋がる可能性があるという注目された。

①日刊工業新聞『名大など、細胞運動を制御する仕組みの一部を解明』(2010/07/08 発表)

3.2.3 将来への展望

本プロジェクトは先駆的な基礎的研究課題に挑戦しているため、即効的な社会的、産業的なインパクトは少ないが、2つの点で、かつて世界の誰もが成しえなかった、極めて大きな成果を挙げている。その意味で、ERATO 本プロジェクトのねらいを達成し、先導的な研究成果が得られた。

第 1 点は、結晶化できない線維状タンパク質の立体構造を解明できる手段を切り開いたことで、その後の応用範囲は広大であるといえる。

第 2 点は、あらゆる生物の中核をなしているアクチンについて、その構造や機能、多くのタンパク質との複合体の構造、分子間の相互作用を解明したことで、アクチンは細胞核にも存在することが認められているので、今後、色々な生命活動に関する研究への応用が期待される。

【参考文献】

- (1) Straub FB, *Studies Ins Med Chem Univ Szeged*, 2, 3-15, 1942
- (2) Ebashi S, Endo M, "Calcium ion and muscle contraction.", *Prog Biophys.Mol.Biol.*, 18, 123-183, 1963
- (3) Ebashi S, "Calcium ions and muscle contraction", *Nature*, 240, 217-218, 1972
- (4) Mannherz HG, Goody RS, Konrad M, Nowak E, "The interaction of bovine pancreatic deoxyribonuclease I and skeletal muscle actin", *Eur.J.Biochem.*, 104, 367-369, 1980
- (5) Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W, "Atomic model of the actin filament", *Nature*, 347, 44-49, 1990
- (6) Otterbein LR, Graceffa P, Dominguez R, "The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state", *Science*, 293, 708-711, 2001
- (7) Graceffa P, Dominguez R, "Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics", *J Biol Chem.*, 278, 34172-34180, 2003
- (8) Wegner A, "Head to tail polymerization of actin.", *J.Mol.Biol.*, 108, 139-150, 1976
- (9) Wegner A, "Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments", *J.Mol.Biol.*, 161, 607-615, 1982
- (10) dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ, "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments.", *Physiol Rev.*, 83, 433-473, 2003
- (11) Yamashita A, Maeda K, Maeda Y, "Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping.", *EMBO J.*, 22, 1529-1538, 2003
- (12) Krieger I, Kostyukova A, Yamashita A, Nitani Y, Maeda Y, "Crystal structure of the C-terminal half of tropomodulin and structural basis of actin filament pointed-end capping", *Biophys J*, 83, 2716-2725, 2002
- (13) Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD, "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells.", *Annu.Rev.Biophys.*, 29, 545-576, 2000
- (14) Pollard TD, Borisy GG, "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.", *Cell*, 112, 453-465, 2003
- (15) Doi M, Wachi M, Ishino F, Tomioka S, Ito M, Sakagami Y, Suzuki A, Matsushashi M., "Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of Escherichia coli cells.", *J.Bacteriol.*, 170, 4619-4624, 1988
- (16) Jones LJ, Carballido-López R, Errington J., "Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in Bacillus subtilis.", *Cell*, 104, 913-922, 2001

- (17) van den Ent F, Amos LA, Löwe J, “Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton.”, *Nature*, 413, 39-44, 2001
- (18) Jensen RB, Gerdes K., “Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex”, *J.Mol.Biol.*, 269, 505-513, 1997
- (19) van den Ent F, Löwe J., “Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*.”, *EMBO J.*, 19, 5300-5307, 2000
- (20) Actin-Binding Proteins and Disease, Edited by C.dos Remedios and D.Chhabra, Springer
- (21) Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT., “Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure.”, *Science*, 280, 750-752, 1998
- (22) Mogensen J, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U, Borglum AD., “Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy.”, *J Clin Invest.*, 103, R39-43, 1999
- (23) Olson TM, Doan TP, Kishimoto NY, Whitby FG, Ackerman MJ, Fananapazir L., “Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy.”, *J Mol Cell*, 32,1687-1694, 2000
- (24) Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y, Shimakawa S, Hagiwara T, Ouvrier R, Sparrow JC, Nishino I, North KN, Nonaka I., “Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion.”, *Ann Neurol.* 56, 689-694, 2004
- (25) Nowak KJ, Wattanasirichaigoon D, Goebel HH, Wilce M, Pelin K, Donner K, Jacob RL, Hübner C, Oexle K, Anderson JR, Verity CM, North KN, Iannaccone ST, Müller CR, Nürnberg P, Muntoni F, Sewry C, Hughes I, Sutphen R, Lacson AG, Swoboda KJ, Vigneron J, Wallgren-Pettersson C, Beggs AH, Laing NG., “Mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene in patients with actin myopathy and nemaline myopathy.”, *Nat Genet*, 23, 208-212, 1999
- (26) Zhu M, Yang T, Wei S, DeWan AT, Morell RJ, Elfenbein JL, Fisher RA, Leal SM, Smith RJ, Friderici KH., “Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26).”, *Am J Hum Genet*, 73, 1082-1091, 2003
- (27) Vassilyev DG, Takeda S, Wakatsuki S, Maeda K, Maéda Y., “Crystal structure of troponin C in complex with troponin I fragment at 2.3-Å resolution.”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 4847-4852, 1998
- (28) Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maéda Y., “Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form.”, *Nature*, 424, 35-41.2003
- (29) Oda T, Makino K, Yamashita I, Namba K, Maéda Y., “The helical parameters of F-actin precisely determined from X-ray fiber diffraction of well-oriented sols”, *Results and Problems in Cell Differentiation*, 32, 43-58, 2001
- (30) Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maeda Y, Narita A, “The nature of the globular-to fibrous-actin transition”, *Nature*, 457, 441-445, 2009
- (31) 上原記念生命科学財団研究報告集 24(2010)「アクチンフィラメントの構造とアクチントレッドミリングの作動メカニズムの解明
https://ueharazaidan.yoshida-p.net/houkokushu/Vol.24/pdf/045_report.pdf
- (32) Iwasa M, Maeda K, Narita A, Maéda Y, Oda T., “Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle alpha-actin mutants.”, *J Biol Chem*, 283, 21045-21053, 2008

- (33) Popp D, Narita A, Oda T, Fujisawa T, Matsuo H, Nitani Y, Iwasa M, Maeda K, Onishi H, Maeda Y, "Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability", *EMBO J*, 27,570-579, 2008
- (34) Narita A, Maeda Y, "Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure", *J Mol Biol*, 365, 480-501, 2007
- (35) Narita A, Takeda S, Yamashita A, Maeda Y., "Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study.", *EMBO J*, 25, 5626-5633, 2006
- (36) Ito T, Hirayama T, Taki M, Iyoshi S, Dai S, Takeda S, Kimura-Sakiyama C, Oda T, Yamamoto Y, Maeda Y, Narita A., "Electron microscopic visualization of the filament binding mode of actin-binding proteins.", *J Mol. Biol.*, 408, 26-39, 2011
- (37) Ito T, Narita A, Hirayama T, Taki M, Iyoshi S, Yamamoto Y, Maeda Y, Oda T., "Human spire interacts with the barbed end of the actin filament.", *J Mol. Biol.*, 408, 18-25, 2011
- (38) Takeda S, Minakata S, Koike R, Kawahata I, Narita A, Kitazawa M, Ota M, Yamakuni T, Maeda Y, Nitani Y., "Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation—steric and allosteric inhibition.", *PloS Biol.*, 8, e1000416, 2010
- (39) Narita A, Mueller J, Urban E, Vinzenz M, Small JV, Maeda Y, "Direct Determination of Actin Polarity in the Cell", *J Mol Biol*, 419, 359-368, 2012
- (40) Vinzenz M, Nemethova M, Schur F, Mueller J, Narita A, Urban E, Winkler C, Schmeiser C, Koestler SA, Rottner K, Resch GP, Maeda Y, Small JV., "Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia.", *J. Cell. Sci.*, 125, 2775-2785, 2012
- (41) Nekooki-Machida Y, Kurosawa M, Nukina N, Ito K, Oda T, Tanaka M., "Distinct conformations of in vitro and in vivo amyloids of huntingtin-exon1 show different cytotoxicity.", *PNAS*, 106, 9679-9684, 2009
- (42) Popp D, Narita A, Ghoshdastider U, Maeda K, Maeda Y, Oda T, Fujisawa T, Onishi H, Ito K, Robinson RC, "Polymeric Structures and Dynamic Properties of the Bacterial Actin AlfA", *J Mol Biol*, 397,1031-1041,2010
- (43) Tewary SK, Oda T, Kendall A, Bian W, Stubbs G, Wong SM, Swaminathan K., "Structure of hibiscus latent singapore virus by fiber diffraction: a nonconserved his122 contributes to coat protein stability.", *J.Mol.Biol*, 406, 516-526, 2011
- (44) Matsuo T, Ueno Y, Takezawa Y, Sugimoto Y, Oda T, Wakabayashi K, "X-ray fiber diffraction modeling of structural changes of the thin filament upon activation of live vertebrate skeletal muscles", *BIOPHYSICS*, 6, 13-26, 2010
- (45) Staiger CJ, Poulter NS, Henty JL, Franklin-Tong VE, Blanchoin L. "Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen.", *J Exp Bot*, 1969-86, 2010
- (46) Day B, Henty JL, Porter KJ, Staiger CJ, "The pathogen-actin connection: a platform for defense signaling in plants", *Annu Rev Phytopathol*, 49:483-506, 2011

- (47) Pouget E, Fay N, Dujardin E, Jamin N, Berthault P, Perrin L, Pandit A, Rose T, Valéry C, Thomas D, Paternostre M, Artzner F, “Elucidation of the self-assembly pathway of lanreotide octapeptide into beta-sheet nanotubes: role of two stable intermediates”, *J Am Chem Soc*, 132, 4230-41, 2010
- (48) Valéry C, Artzner F, Paternostre M, “Peptide nanotubes: Molecular organisations, self-assembly mechanisms and applications”, *Soft Matter*, 7, 9583-9594, 2011
- (49) Holmes KC, “Structural biology: actin in a twist”, *Nature*, 457, 389-390, 2009
- (50) Stehn JR, Haass NK, Bonello T, Desouza M, Kottyan G, Treutlein H, Zeng J, Nascimento PR, Sequeira VB, Butler TL, Allanson M, Fath T, Hill TA, McCluskey A, Schevzov G, Palmer SJ, Hardeman EC, Winlaw D, Reeve VE, Dixon I, Weninger W, Cripe TP, Gunning PW., “A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells.”, *Cancer Research*, 73, 5169-5182, 2013
- (51) Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H, Kano K, “Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation”, *Nat Commun*, 5, 3368, 2014