

前田アクチンフィラメント動態プロジェクトの研究成果

目次

1. 研究総括紹介	1
2. プロジェクトの基本理念	6
3. 各テーマの研究目標及び成果と今後の展開	13
3-1 アクチン重合体の高分解能構造とアクチン発現系（テーマ1）	
3-2 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（テーマ2）	
3-3 筋のカルシウム調節のメカニズムの研究（テーマ3）	
4. 全体のまとめ	42
4-1 ERATO の5年間で得られた成果等のアピール	
4-2 今後の展開として目指すこと、期待すること	
4-3 「戦略目標」に対する自己評価	
4-4 総括によるプロジェクトの自己評価	
4-5 その他	
5. 成果リスト	48
5-1 論文	
5-2 招待講演	
5-3 学会発表	
5-4 書籍等	
5-5 特許（国内、海外）	
5-6 受賞関係	
5-7 プレス発表等	

第1章 研究総括紹介



まえだ ゆういちろう

前田 雄一郎

1-1 現職

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻教授
及び附属構造生物学研究センター長
〒464-8602 名古屋市千種区不老町 高等研究院内
Tel: 052-747-6472 Fax: 052-747-6433
E-mail: ymaeda@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp

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
E-mail: ymaeda@spring8.or.jp

1-2 学歴

1972年 東京大学理学部物理学科卒業
1977年 名古屋大学理学系大学院分子生物学専攻博士課程後期修了
1978年 理学博士取得（名古屋大学、指導教官＝大澤文夫）

1-3 職歴

1976年-79年 日本学術振興会特別奨励研究員（大澤文夫研究室）

1979年-84年 博士研究員 (MPI Heidelberg, K.C.Holmes 研) (資金：マックス
プランク財団、ヨーロッパ分子生物学研究機構 (EMBO)、
ヨーロッパ分子生物学研究so (EMBL))、
1984年-93年 ヨーロッパ分子生物学研究so (EMBL Hamburg)、
グループリーダー
1993 年-99 年 松下電器産業 (株) 国際研究所、グループリーダーおよび所長
1998 年-2006 年 理化学研究所播磨研究所主任研究員 (構造生物化学研究室)
2004年-06年 名古屋大学大学院理学研究科併任教授
2006 年-現在 理化学研究所播磨研究所客員主管研究員
(宮野構造生物物理研究室)
2006 年-現在 名古屋大学大学院理学研究科教授
2007 年-現在 名古屋大学大学院理学研究科付属構造生物学研究センター長

1-4 研究分野

構造生理学、生物物理学、構造生物学

1-5 主な学会活動

Apr. 1995 - Aug. 1995 Committee member of BBSRC review of structural
biology, Bath, UK
Feb. 1995 - 2002 学術会議第4部会構造生物学の将来計画に関する検討小委
員会メンバー
Jan. 2000 - Jun. 2000 科学研究費審査委員、生物物理学分野
Nov 2001 国際ワークショップ “Actin filament, from structure to
mechanism” 主催者
June 2002 Gordon Research Conference : Muscle, contractile proteins,
Co-chairperson
Oct 2008 日本学術会議連携会員

1-6 教育貢献

2004/04/01～ 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 教授

1-7 国際学会における主な招待講演 (国内会議を除く)

(2004 年以降に限る)

- Maéda, Y.: “The core domain of cardiac muscle troponin”, Alpbach Workshop on Molecular Motors, Alpbach, Austria, Mar-Apr. (2004)
- Maéda Y.: “Structure of troponin and the mechanism how it works” Structural Mechanisms in Muscle; Jean Hanson's Legacy, London, England, May (2004)
- Maéda Y., Oda T., Stegmann H., Makino K., Hasegawa K., Schroder R., Namba K.; “Modeling of F-Actin: X-ray fiber diffraction and cryoelectron microscopy” Wenner-Gren Foundations Int'l symposium Force Generation in Biological Systems, Stockholm, Sweden, Aug. (2004)
- Maéda Y.: “Structure of actin-tropomyosin-troponin complex and the mechanism of calcium regulation of muscle contractions” XXXV Int'l Congress of physiological Sciences, San Diego, USA Mar (2005)
- Maéda Y., Oda T., Nitani Y., “Tropomyosin crystal structure and structural changes of the regulatory proteins upon Ca^{2+} - binding” Gordon Research Conference on Muscle Contractile Proteins, New London, USA Jul. (2005)
- Maéda Y., Nitani Y., Oda T.: “Aiming at elucidating atomic structures of muscle thin filament complex” Alpbach Workshop “Coiled-coils, Collagen & Co-proteins: IV”, Alpbach, Austria, Sep. (2005)
- Maéda Y.: “Initiating “structural physiology” for understanding the mechanism of calcium regulation of muscle contraction” Max-Planck-Institut für Molecular Physiology Lab of R.S.Goody, Heidelberg, Germany, May (2006)
- Maéda Y.: “Flexibility and flexibility changes in troponin-tropomyosin complex and the mechanism of regulation of muscle contraction” Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology, Brunnen, Switzerland, Sep. (2006)
- Maéda Y.: “A mechanism how the capping protein (CP) caps the actin filament barbed-end, proposed based on the single particle analysis of cryo-EM images” The 21st European Cytoskeleton Forum, Biopolis, Singapore Oct. (2006)
- Maéda Y.: “Structure and Function of Muscle Regulatory Proteins” Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress, Long Beach, CA, USA, Feb. (2008)
- Maéda Y.: “The nature of G- to F-actin transition” Gordon Research Conferences on Muscle and molecular motors” New London, NH, USA June (2008)

1-8 主な原著論文

(2004 年以降に限る)

1. K. Kim, A. Yamashita, M. A. Wear, Y. Maéda, and J. A. Cooper (2004) “Capping

- protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance”, *J.Cell Biol.* **164**:567-80.
2. M. Miki, H. Hai, K. Saeki, Y. Shitaka, K. Sano, Y. Maéda and T. Wakabayashi (2004) “Fluorescence Resonance Energy transfer between points on actin and the C-terminal region of tropomyosin in skeletal muscle thin filaments”, *J.Biochem* (Tokyo), **136**:39-47.
 3. F. Matsumoto, K. Makino, K. Maeda, H. Patzelt, Y. Maéda, and S. Fujiwara (2004) “Conformational Changes of Troponin C within the Thin Filaments Detected by Neutron Scattering” *J.Mol.Biol.* **342**: 1209-1221
 4. T. Oda, K. Namba, and Y. Maéda (2005) “Position and Orientation of Phalloidin in F-Actin Determined by X-Ray Fiber Diffraction Analysis” *Biophysical Journal* **88**: 2727-2736
 5. H. Imai, A. Narita, T. A. Schroer, and Y. Maéda (2006) “Two-dimensional averaged images of the dynactin complex revealed by single particle analysis” *J. Mol. Biol.* **359**: 833-839
 6. A. Narita and Y. Maéda, “Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure” *J. Mol. Biol.* **365**: 480-501.
 7. A. Narita, S. Takeda, A. Yamashita, and Y. Maéda (2006) “Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study” *EMBO J.* **25**: 5626-5633
 8. D.Popp, A.Yamamoto, M.Iwasa, Y.Maéda, (2006) “Direct visualization of actin nematic network formation and dynamics” *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **351**: 348-353.
 9. D.Popp, A.Yamamoto, A. Narita, M.Iwasa, K. Maeda, Y.Maéda, (2006) “Concerning the dynamic instability of actin homolog ParM” *Biochem Biophys Res Commun.* **353**:109-114.
 10. D.Popp, A.Yamamoto, M.Iwasa, Y.Maéda, (2006) “Crowded surfaces Change Annealing Dynamics of Actin Filaments” *J. Mol Biol.* **368**: 365-74.
 11. A. Narita, N. Mizuno, M. Kikkawa, Y. Maéda (2007) “Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules” *J. Mol. Biol.* **372**: 1320-1336
 12. D. Popp, A. Yamamoto, M. Iwasa, Y. Nitnai, Y. Maéda (2008) “Single molecule polymerization, annealing and bundling dynamics of SipA induced actin filaments” *Cell Motility and the Cytoskeleton* **65**: 165-177
 13. S. Minakata, K. Maeda, N. Oda, K. Wakabayashi, Y. Nitnai, Y. Maeda (2008) “The crystal structures of tropomyosin C-terminal fragment 176-273: exposure of the hydrophobic core to the solvent destabilizes the tropomyosin molecule”

Biophysical J. **95**, 710-719

14. D. Popp, A. Narita, T. Oda, T. Fujisawa, H. Matsuo, Y. Nitani, M. Iwasa, H. Onishi, K. Maeda & Y. Maeda (2008) “Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide driven dynamic instability” *EMBO J.* **27**: 570-579
15. S. Akiyama, A. Nohara, K. Ito, Y. Maeda (2008) “Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome” *Molecular Cell* **29**: 703-716
16. M. Iwasa, K. Maeda, A. Narita, Y. Maeda, T. Oda (2008) “Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle α -actin mutants” *J. Biol. Chem.* **283**: 21045-21053
17. D. Popp, M. Iwasa, A. Narita, H. P. Erickson & Y. Maeda FtsZ condensates: An in vitro electron microscopy study. *Biopolymers* January 9, 2009 online
18. T. Oda, M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maeda, A. Narita (2009) The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441-445

1-9 総説等

(2004 年以降に限る)

1. 前田雄一郎 (2005) <結晶構造を解明してから始まる生理学の新しい展開--トロポニン・トロポミオシン・アクチンによるカルシウム調節メカニズムの研究> 生体の科学 Vol. 56 (6) 556-563
2. 前田雄一郎 (2007) <トロポニン構成蛋白質の相互作用> 生体の科学 Vol. 58 (5) 438-439

1-10 特許取得

1. (国内) 特許出願公開番号平成 11 年-310598<トロポニン CI 複合体>
発明者: 前田雄一郎、前田佳代、武田壮一
公開日 1999 年 11 月 9 日、
出願人: 松下電器産業株式会社
2. (国内) 特願 2000-144518 “ポリペプチドの生産方法”、
佐野健一、前田佳代、前田雄一郎、
出願年月日 2001 年 5 月 16 日
3. (国外) U.S.Patent, Docket No. 1490.004, “Method of Producing Polypeptides”
K-I.Sano, K.Maeda & Y.Maeda,
Filed May 10, 2001.

第2章 プロジェクトの基本理念:目標、研究構想、具体的な研究課題

2-1 アクチンはなぜおもしろいのか？なぜ重要なのか？

アクチンは細胞に最も多量に含まれる蛋白質であろう。しかも極めて多岐にわたる重要な細胞機能を担う。

筋肉においてはアクチン・フィラメント複合体(アクチン・トロポミオシン・トロポニンからなる)は筋収縮に関与すると同時に、細胞内カルシウム濃度変化に応じて収縮を調節する。このアクチン・フィラメント複合体は安定な構造を保持しているようである。(ただし構造内部の揺動は機能に重要であろう)。他方、一般の細胞では多くの機能がアクチンの高速な分子運動「トレッドミリング」によって担われる。「トレッドミリング」は、アクチンフィラメントのB端での重合と、P端での脱重合によって駆動され力を発生する。アクチンは常に動的であり、アクチンフィラメントは形成と崩壊をくりかえす。

私たちはこのように「化学的には」単一のアクチンという蛋白質が多くの細胞機能を担い、動的特性も多様であることに興味を持ってきた。そこでは「1機能に1蛋白質が対応する」という「化学的」関係ではなく、「多くの機能に1蛋白質が、1機能には1“存在状態”が対応する」という「物理的」関係があるように思われる。

もちろん多くの機能は多くのアクチン結合蛋白質との相互作用の結果である、だからやはり1機能1蛋白質であるとの反論もあろう。しかしながら、結合蛋白質はそれぞれの機能を顕著かつ効率化しているとしても、これらの機能はアクチンそのものにすでに備わっている点に注目したい。

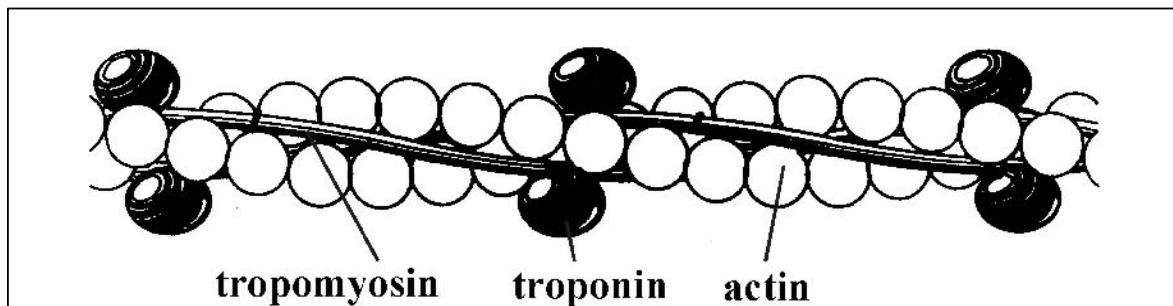
1蛋白質が多数の機能を担うことはアクチンに限ったことではないであろう。特定の蛋白質は単一の機能に特化している側面だけに目を奪われると、そもそも蛋白質が持つ豊かな可能性を見落とすことになるだろう。このような意味で、アクチンが持つ化学的単一性と機能の多様性の関係を深く理解することは、私たちの蛋白質理解そのものの根幹にかかわる問題であり、それゆえ現代の自然認識の中心的課題の一つといえる。

それでは蛋白質アクチンを対象としての生物物理学的研究はどのように進めるべきか？そのためには、逆説的ではあるが、まずアクチンの多様な機能発現の個々のメカニズムを一つ一つ具体的に解明する必要がある。しかもメカニズムについての深い理解とは高分解能の分子構造を基礎にしてはじめて可能となると私たちは考えている。

2-2 先行研究は何をどこまで解明していたか？

アクチン基礎論ともいべき私たちの研究が成り立つのは、以下のような先行研究による豊かな成果があるからである。

- (1) 大澤文夫ら名古屋グループは、アクチンフィラメントの端で重合体(Fアクチン)は単量体(G アクチン)と平衡にあり、重合過程は凝集過程として理解できることを発見した。
- (2) 江橋節郎らは、アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体(アクチンフィラメント複合体)が、筋調節のカルシウム調節を担う構造であることを発見した。



- (3) MF Carlierらフランス CNRS のグループその他は、細胞中でのアクチントレッドミリングにおいて、Arp2/3、アクチン脱重合因子(ADF = cofilin)、キャッピング蛋白質(CP)、Formin などの結合蛋白質はアクチン固有のレッドミリングをより高速化し、より高濃度の単量体と共存可能とし、それゆえより多面的な調節が可能であることを示した。

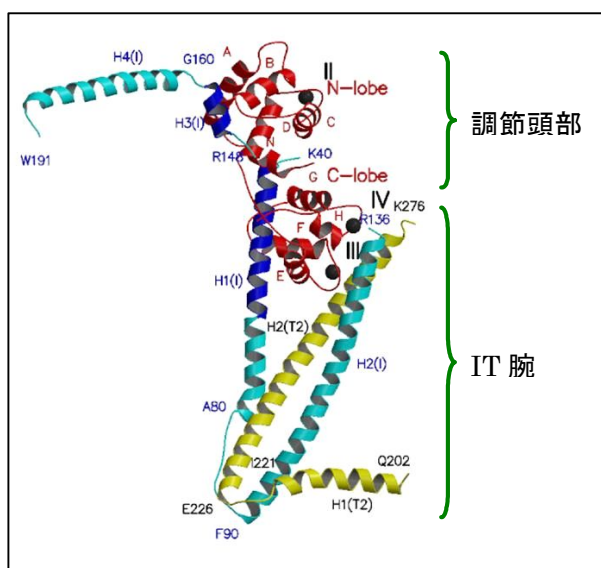
これらの研究によって、筋肉におけるアクチンフィラメント、一般細胞中におけるアクチンフィラメントのそれぞれの機能を担う「役者」がほぼ解明されてきた。また、機能発現のメカニズムについても、かなり詳細な反応速度論的理解が蓄積している。

他方、これらの機能を担う蛋白質の高分解能な構造についての知見は、個々の蛋白質単独の構造はそれなりに解明されてきたとはいえ、アクチンフィラメントとの複合体の構造は全く未解明であった。

2-3 ERATO プロジェクト開始に至る研究

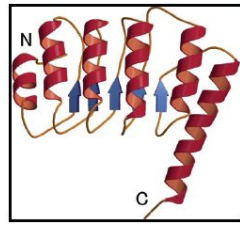
本プロジェクトを開始するまでには、私たちは4つの面で研究を進めていた。

第一、私たちは 1990 年に、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プロジェクトを開始した。このプロジェクトの開始にあたって、困難な結晶化をやり遂げるには自前で DNA から試料を調製することが不可欠であると考え cDNA の塩基配列の決定の作業から開始した。このプロジェクトは、ドイツから日本に研究室を移して続けられ、トロポニン部分複合体の結晶構造解明(Vassilyev et al., *PNAS*, 1998)、さらにトロポニン3量体の結晶構造解明(Takeda et al., *Nature*, 2003)の成果に結実し、トロポニンの結晶構造解明で重要な成果を挙げることができた。また、蛋白質試料の自前調製とそのため独自技術開発が極めて重要であることを確信した。

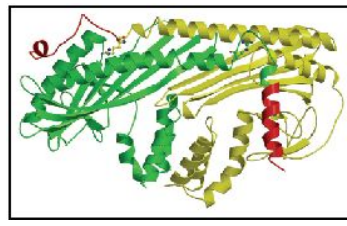


トロポニン 3 量体

第二、1993年に日本に帰国してからは、カルシウム調節のメカニズムを理解するにはどうしてもアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体全体の構造解明が重要であるとの考えから、均一な長さのミニ・フィラメントを調製することによってアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の構造解明をめざすプロジェクトも開始した。この方向での研究も、アクチンフィラメントP端結合蛋白質トロポモジュリン(部分)の結晶構造解明(Krieger et., *Biophys.J.* 2002)や、B端結合蛋白質 CapZ の結晶構造解明(Yamashita et al., *EMBO J*, 2003) という重要な成果を挙げた。



トロポモジュリン



CapZ

第三、 2003 年までには九州大学の大槻・森本らによって、遺伝性心疾患を引起こすトロポニン変異とそれによる機能変調の詳細が調べられた。その結果と、私たちが解明したトロポニン結晶構造を比べてみると、機能変調を説明するには原子座標を知るだけでは不十分であり、どうしても原子座標の揺動(構造動態)を理解する必要を痛感した。

第四、 大きな複合体の構造を解明するためにも、また構造動態を理解するためにも、X線結晶構造解析法だけでは不十分であって、クライオ電子顕微鏡法、蛋白質 NMR 法など複数の研究手法を組み合わせる必要がある。私たちは 1998 年に理化学研究所 SPring-8 センター(播磨)に研究室を持って以来、多様な方法を組み合わせた総合的な構造生物学研究の重要性を提案して、(理研内に)クライオ電子顕微鏡、質量分析機、NMR 装置等を整備してきた。また、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できる研究者を集めることができた。

2-4 本プロジェクトの目標

アクチンフィラメントとその複合体の構造を基にしてメカニズムを解明するために、以下の3つの方向で私たちは研究を展開することにした。

- (1) 複合体を構成する個々の蛋白質の高分解能構造を解明すること。
- (2) 複合体全体の高分解能構造を解明すること。
- (3) 個々の蛋白質の、あるいは複合体の構造だけではなく、構造動態(構造の時間的揺動)を解明すること。

以上の知見に基づいて

■ 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依る筋収縮のカルシウム調節メカニズム

■ アクチン・トレッドミルのメカニズム
の解明を進めること。

私たちの研究の特徴は上記の第二、第三の点を重視することにある。第二の、より大きな複合体の構造を知る必要がある、という点を重視する理由は、アクチンフィラメントの機能の担い手は、個々蛋白質分子のレベルにあるのではなく、蛋白質複合体レベルであること。さらに、複合体中での蛋白質の相互作用の詳細を知ることがメカニズム理解の鍵であることによる。第三の、構造動態を知ることが重視する理由は、メカニズムを理解の鍵は、相互作用の構造そのものよりも構造の動態の理解であろうとの考えに基づく。

2-5 本プロジェクトの研究の進め方

以上の目的を実現するために私たちは次のような基本的な方針で研究を進めた。

- (1) 自前で調製した試料を使ってこそ構造解明の難しい課題を解決できる。この考えに基づき、研究目的に最適化した DNA 組換え技術、試料調製技術を独自開発した。この考えは上述したトロポニン結晶構造解明の研究での経験に基づいている。特に高等生物アクチンの変異蛋白質を発現できなかったことは、アクチンの構造研究に大きな制約となっていた。
- (2) 自前の研究手法を開発してこそ構造解明の難しい課題を解決できる。この考えに基づき、独自の構造解析法を開発から実行した。これはとりわけアクチンフィラメントを中心とした複合体の構造解明のためには重要である。従来の蛋白質高分解能構造の解明はそのほとんどが蛋白質結晶構造解析の方法に依ってきた。しかしアクチンフィラメントはその長さを制御できないために、結晶化することができない、それゆえ蛋白質結晶構造解析の方法を適用できず、新しい方法を開発する必要があった。
- (3) 複数の研究手法(X線繊維回折、X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、NMRなど)を組合せることを重視した。これを重視した理由：それぞれの構造解析法は固有の利点と限界をもっているので、一つの方法に頼るとアクチンの多機能性について十分な理解が得られないと考えられる。
- (4) 大型装置(SPring-8 の放射光施設、高機能クライオ電子顕微鏡(理研)、名古屋大学内の NMR など)へのアクセスを確保することを重視した。
- (5) 専門的力量を備えた専門家を中心にそれなりの規模の研究チームを形成すること。

このようなやり方で研究を展開するには ERATO の枠での推進が必要かつ有効であった。

2-6 特に研究チーム組織の基本方針

第一、 個々の研究員はなるべく個々の研究課題の最初(研究計画)から最後(論文発表)まで一貫して責任を持つ。個々の研究課題を細切れにして、多くの研究員の流れ作業とすることは避ける。もちろん、試料調製(組換え DNA 作業、大量発現等)から測定まですべてに精通することはすぐにはできないが、しかし今後のこの分野の研究の発展を考えると、個々の研究者は全作業をリードできるようになることは絶対必要である。

第二、 本 ERATO プロジェクト組織の特徴は、研究対象はアクチン関連のごく少数の蛋白質や複合体であるが、他方、個々の研究者が用いている研究手法は多岐にわたる点にある。また、試料調製と測定を同一グループ内で実行している。それゆえ、研究現場で研究者同士が**随時情報交換し、議論**することがたいへん有益でありかつ可能である(互いに結果を隠すより積極的にみんなで討論する方がよい)。それを可能にすべく、20名が居室と実験ベンチを一つ屋根の下に持つような仮設研究棟を建設した。

第三、 課題の解決のためにはどうしても**最先端の研究手法を独自に開発**することが必要である。これにはそれなりに時間がかかる。“切り花的研究”ではなく“地下茎”のある研究を心がける。同時に、最先端の技術を開発する作業はすべて自分たちの力ではできないので、世界中の研究室から**優れた技術を導入**することも重視する。本プロジェクトに蓄積している、ないしはこれから導入しようと計画している最先端の技術はこのレポートの最後の一覧表を参照されたい。

第四、 個々の研究員は独立の研究者になる過程の一時期を本プロジェクトで過ごす。当初の研究課題は研究総括等から与えられるとしても、それをどう発展させるか、その後自分なりの研究を作っていくかは、個々人の流儀や考え方による。それは人格の一部であるのでそれを尊重することが重要である。本プロジェクトとしては、個々の研究者の研究の進め方について口うるさい指図はしないし、プロジェクトの(行政的な)都合で研究方向を強制することもしない。総括が果たすべき役割は知的な影響を与えること、あるいはお互いが知的な影響を与え合うような文化を創ることであって、行政的な強制ではない。また、本プロジェクトの終了後は(希望する人は)独立した研究者としてやっていけるよう今から研究内容で(就職の世話ではなく)援助することが重要である。

第五、 研究グループ内の多様性、国際性を確保することに留意する。文化的背景の異なる研究者、女性研究者を含むようにする。1993 年以来常時外国人研究者が参加しており、研究室の打ち合わせは原則として英語で、事務は日本語と英語で行ってきた。海外生活経験のない日本人研究者は当初うまく自己表現ができず苦労するが、5年継続すると国際的な交流の場で立派な発表をできるようになる。

第3章 各テーマの研究目標及び成果と今後の展開

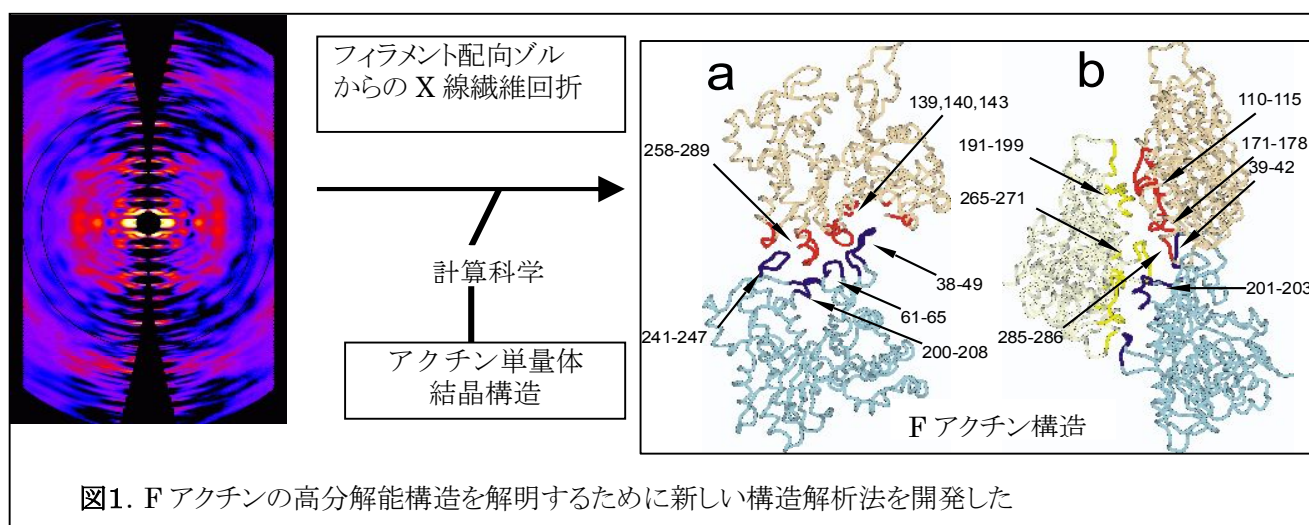
3-1. アクチン重合体の高分解能構造とアクチン発現系（テーマ1）

テーマ1では機能研究の基礎となるアクチン重合体の高分解能構造を解明し、その手段としてアクチンの人工変異蛋白質の作成に取り組んだ。又、比較研究の為に、バクテリア由来のアクチン類似蛋白質である ParM の構造について研究した。

(1-1) アクチン重合体の高分解能: アクチン G-F 変換

背景: アクチンの働きのメカニズムを理解するには F-アクチン(アクチン重合体)の構造を高分解能で知ることが絶対に必要である。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る。一般細胞ではアクチンのトレッドミリングは多くの細胞機能の基盤をなす分子運動であるが、そのメカニズムを理解するには、重合・脱重合のメカニズム、ATP 加水分解のメカニズム、アクチン結合蛋白質との相互作用を理解することが必要である。しかし、G-アクチンの結晶構造は何回も解明されているが、より重要な F アクチンの原子構造は解明されていない。それは F アクチンを結晶化することができないからである。

小田俊郎はこの著しく重要な課題の解明に挑戦してきたが、16年間の努力が実って本年論文発表にまでこぎ着けた。独創的な構造解析法を編み出し結晶なしで高分解能構造を得ることに成功した。2008 年 6 月の Gordon Conference で Ken Holmes は「この構造はいつか F アクチンの結晶構造が得られるまですべての研究者が頼りにすべき構造であり続ける。結晶構造がわかってもこの構造とほとんど同一であろう」と議論をまとめた。これは本プロジェクトの活動の最も大きな成果である。



方法: 3つの最先端の技術を組み合わせた。第一、超伝導マグネットを使って、F-アクチンをガラス細管中に高濃度、高配向させた配向ゾルを調製する方法を確立した。第二、高輝度で安定度の高い SPring-8 の放射X線源を使って、その配向ゾルからのX線繊維回折強度を得た。第三、クライオ電子顕微鏡写真から分解能の高い F アクチンの電子密度分布を得た。第四、最先端の計算科学(基準振動モード計算、分子動力学計算)を駆使して、G-アクチンの結晶構造を変形させ、X 線繊維回折強度と電子

顕微鏡データと整合性のある F アクチンの構造モデルを得た。

結果： 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。G アクチンでは左右2つのドメインは互いに約20度ねじれている。G-F 変換に伴ってそのねじれは解消し、分子が平坦となる。平坦な形状は、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。この平坦化した分子がアクチン螺旋に配列すると、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。

展開： 今後以下の方向で研究を発展させる必要がある。(1)変異アクチンを使ってこの構造の検証を行うこと、(2)ここで開発した構造解析法を使って、例えばアクチンフィラメント・コフィリン複合体などの複合体構造の解明を進めること、(3)ここで得た構造情報を基にして構造動態の研究を進展させること。

- ◆ この課題の中心研究者： 小田俊郎グループ・リーダー
- ◆ 共同研究者： 成田哲博研究推進委員、相原朋樹(理研)、岩佐充貞技術員
- ◆ 発表論文：“The nature of the globular to fibrous-actin transition” , *Nature*, 457, 441-445 (2009).
- ◆ 新聞掲載：
 1. 「アクチン分子構造変化解明:筋収縮・細胞研究に活用」 2009年 1 月22日 日経工業新聞朝刊
 2. 「細胞分裂の動力源「アクチン」構造を解明」 2009年 1 月26日 朝日新聞朝刊

(1-2) アクチンの大量発現系の確立とアクチン変異蛋白質の研究

背景: 酵母アクチンの変異蛋白質は酵母で調製することができる。しかし酵母アクチンと哺乳類など高等生物アクチンでは性質にかなりの差があり、酵母アクチンで得られた結果を高等生物アクチンの議論に援用できない。アクチンは高度に進化した蛋白質であるためか、他のいかなる蛋白質に較べても一残基の置換の影響は著しく大きい。私たちはヒト心筋アクチンと非筋細胞アクチンを昆虫培養細胞 Sf9 で発現することに成功し、幾つかの変異アクチンを得た。それを使ってアクチン分子中での個々の残基の役割を同定することが可能となった。

(1-1) に述べた F アクチンの高分解能構造から、G-F 変換にアクチン分子の平坦化が伴うことがわかった。左右のドメインが互いに平坦になるようにずれるとき残基 Q137 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、すなわち重合が速まると予想される。他方、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。もしそれが正しいなら、側鎖を小さくすれば ATP 加水分解が阻害されるであろう。

方法: 私たちのアクチン発現系の特徴は自分たちがトロポミオシン発現の研究中に偶然発見したバキュロウイルス発現促進塩基配列を翻訳領域 5' 末端に連結する点である。これによって発現量は著しく増加する。しかし可溶性画分に回収できるアクチンの量が少ないため精製蛋白質の量に限りがある。構造生物学的研究に使用するためには一層の改良が必要である。なお、この研究は哺乳類アクチンの大量発現を報じている Trybus 研とは独立に行ってきた。Q137 の2重の役割を検証するため Q137A を発現・精製した。また G-F 構造変換に影響すると考えられる A108G および P109A を調製した。これらの変異アクチンの機能解析を行い、野性型アクチンと比較した。

結果: 野生型アクチンと比べて Q137A では、アクチンの最大重合速度は約 4 倍速く、一方で溶液中へのリンの最大放出速度は約 1/4 に減少した。この結果は Q137 の2重の役割を確認するものであった。A108G ではアクチン重合とリンの放出速度が共に遅くなり、P109A では共に速くなった。これにより 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。

- ◆ この課題の中心研究者： 岩佐充貞技術員、小田俊郎グループリーダー、前田佳代研究員

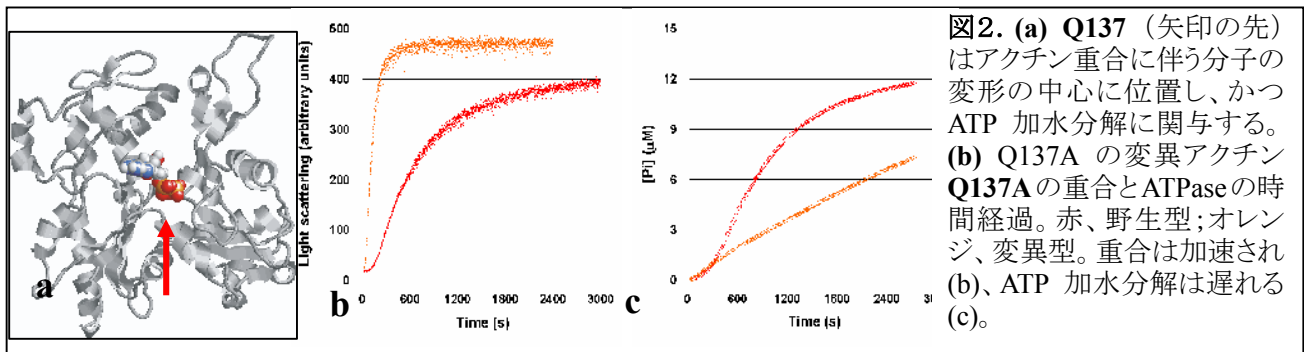


図2. (a) Q137 (矢印の先) はアクチン重合に伴う分子の変形の中心に位置し、かつ ATP 加水分解に関与する。(b) Q137A の変異アクチン Q137A の重合とATPaseの時間経過。赤、野生型; オレンジ、変異型。重合は加速され (b)、ATP 加水分解は遅れる (c)。

◆ 発表論文：

1. 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.

(1-3) モーター蛋白質の関与しないバクテリアのフィラメント形成蛋白質

背景: 中間評価会ではアクチンフィラメントの細胞内での振る舞いを推測するために親水性処理したガラス表面に近く **crowding** な状態でのアクチンフィラメントの動態の研究成果を報告した。この結果は **crowding** な状態では重合・脱重合や **annealing** (重合体の接続) が頻繁に起こり、アクチンフィラメントの動的な性質が細胞形態の変化やオルガネル輸送に深く関与することを示唆するが、高等動物ではモーター蛋白質もまたアクチンフィラメントと相互作用して、形態変化や輸送に関与するのでアクチンフィラメントのみの役割を研究することは困難である。そこで、モーター蛋白質が見つからないバクテリアのアクチンホモログ蛋白質を研究することにした。バクテリアには **ParM** と呼ばれる蛋白質があり、複製した染色体を均等に2娘細胞に分配する機能を担う。

方法: バクテリア由来の **ParM** 遺伝子を発現プラスミドに組み込んで、大腸菌に導入することによって、**ParM** 蛋白質を得た。精製した蛋白質の重合体の構造を電子顕微鏡とX線繊維回折を用いて研究した。又、重合速度や導体を迅速混合装置や全反射顕微鏡、高圧放射光溶液散乱を用いることによって研究した。

結果:

1. 電子顕微鏡とX線繊維回折の結果から、**ParM** 蛋白質の重合体の三次元構造を $24\text{\AA}$ の分解能で得ることが出来た。その結果から、この重合体は、アクチンフィラメントと同様、2重らせん構造を持つが、ねじりの方向がアクチンフィラメントとは逆の左巻きであることが分かった。
2. **ParM** は **GTP** 存在下で **ATP** 存在下に比べてより速やかに重合することが分かった。**ParM** 重合体の崩壊を時間をおいて観察してみると、**GTP** のみ存在する時には重合体の崩壊は起こるが、**ATP** のみが存在する時には崩壊は起こらなかった。この結果は、バクテリア菌体内では **ParM** はアクチンとは異なり、**GTP** をエネルギー源として使っている可能性を支持する。(詳細はPoppレポート(108-121)を参照)

◆ この課題の中心研究者: David Popp 研究員、岩佐充貞技術員、前田佳代研究員

◆ 発表論文:

1. D.Popp, A.Yamamoto, M.Iwasa, Y.Maéda, (2006) "Crowded surfaces Change Annealing Dynamics of Actin Filaments" *J. Mol Biol.* **368**: 365-74.

2. D. Popp, A. Yamamoto, M. Iwasa, Y. Nitnai, Y. Maéda (2008) “Single molecule polymerization, annealing and bundling dynamics of SipA induced actin filaments” *Cell Motility and the Cytoskeleton* **65**: 165-177
3. D. Popp, A. Narita, T. Oda, T. Fujisawa, H. Matsuo, Y. Nitnai, M. Iwasa, H. Onishi, K. Maeda & Y. Maeda (2008) “Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide driven dynamic instability” *EMBO J.* **27**: 570-579

図 3. ParM フィラメントはアクチンフィラメントと反対の左巻である。配向ゾルの X 線繊維回折と電子顕微鏡による。

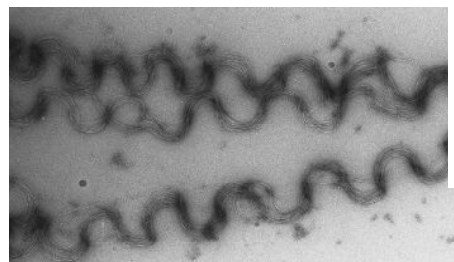
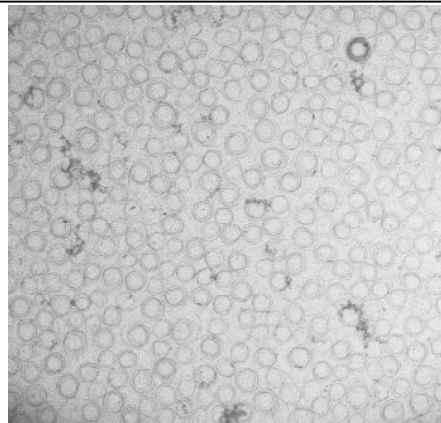
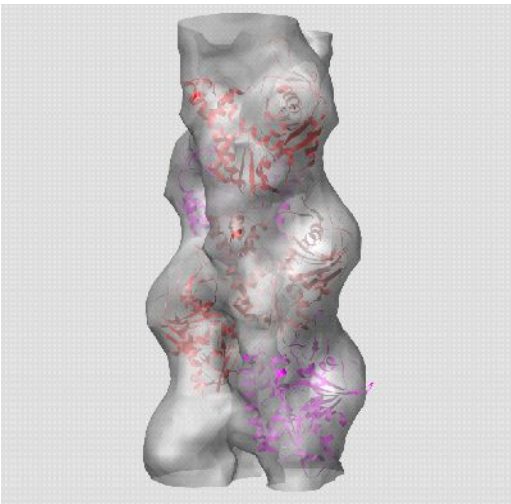


図 4. バクテリア細胞骨格蛋白質 FtsZ. . Crowding agents の存在下でプロトフィラメントが束化し、さらに環を形成したり(上)、スパイラルを形成する(下)。

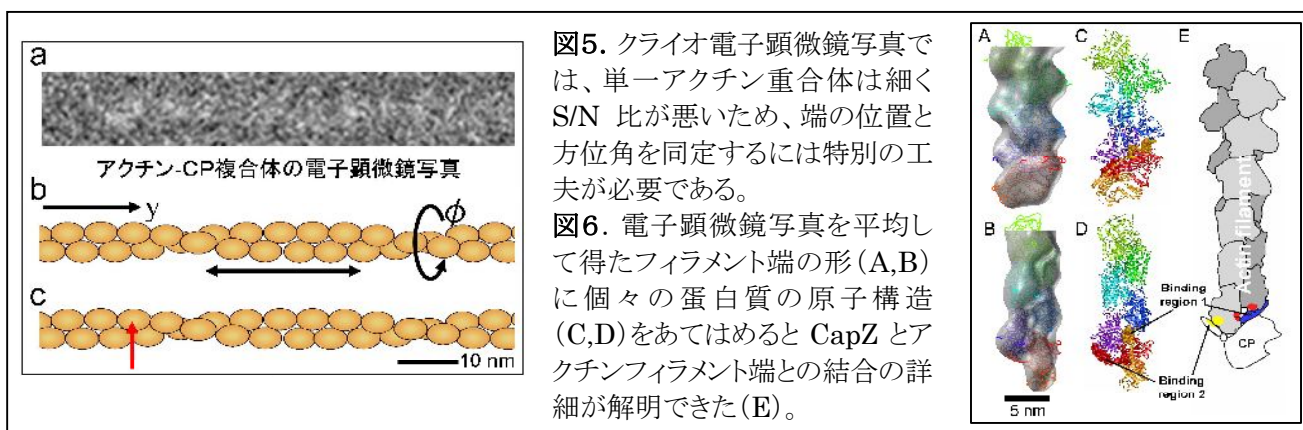
3-2. トレッドミリングなど細胞運動を担うアクチンフィラメントおよび類似の構造 (テーマ2)

テーマ2ではアクチンフィラメントに種々の結合蛋白質が結合した複合体をはじめとする生体の巨大蛋白質複合体の構造を解明する手段を開発して、アクチン端の構造解析やダイナクチン複合体の構造解析に応用した。また、アクチンのトレッドミリング速度の調節に関与する蛋白質の原子構造を研究し、アクチンの重合・脱重合速度の調節機構を明らかにした。

(2-1) 電子顕微鏡法によるフィラメント複合体の三次元構造決定とそのための新たな画像解析法の開発

背景： クライオ電子顕微鏡写真の画像解析法(単粒子解析法)の開発(T. Crowtherら)によって大きな蛋白質複合体の高分解能構造(10 Å 程度まで)を解明できるようになった。他方、アクチン・トレッドミリングに關与する調節蛋白質はフィラメント端に結合するので、フィラメント端の構造を解明したい。しかし単粒子解析法はそのままではアクチンフィラメント端に適用することができない。単粒子解析法では、多数の単粒子像を写真から切り出し平均化して精度をあげるが、このとき(電子線ビームに対して)同じ方向を向く粒子の像のみを平均化する。すなわちノイズの多い画像から粒子の方向を精度よく決めることが重要である。アクチンフィラメントは細いため画像にはノイズが多く、画像からフィラメントの(軸まわりの)向きを決めることも、端の位置を決めることもできないため単粒子解析が適用できなかった。そこで、電子顕微鏡写真の単粒子解析法をベース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。また、この方法を用いて、フリーなアクチン P 端構造の解析を現在進めている。

方法： 染色剤による蛋白質の変性などのアーティファクトを除くためにクライオ電子顕微鏡を用いてアクチンフィラメントと CP の複合体の写真を得た。まず、フィラメント端の暫定的な構造モデルを作る。このモデルをレファレンスとして投影像を作り、端を含んだ電子顕微鏡の元イメージと相関マップを作り、最も良く合う投影方向と位置を決定する。ここで暫定的に決定された位置に基づいて、フィラメントごとの端位置を合わせる。この方法で端に結合した CP の構造を決定することができた。しかも結果はレファレンスに影響されない。



結果： この解析法を用いて得られた構造は 23 Å 程度の分解能であるが、双方の蛋白質の原子座標を参照して、結合部に關与する側鎖をほぼ同定することができた。さら

に CP 変異体を調製してアクチンフィラメント端結合への影響を計測することによって、個々の側鎖の結合への関与を確定することができた。この結合モデルから CP のアクチンへの結合機構を明らかにする事が出来た。CP は先ず α -テンタクルを含む塩基性残基クラスターと、B 端の二つのアクチン分子にまたがる酸性残基クラスターの静電相互作用で結合する。次に、 β -テンタクルがアクチン分子上の疎水性サイトを見つけ、そこに結合することによって、解離速度を下げる。 β -テンタクルの変異体は解離速度にだけ影響を与えるので、このような二段階結合モデルが導きだされた。

◆ この課題の中心研究者： 成田哲博研究推進委員、武田修一技術員

◆ 発表論文：

1. Narita, A. & Maéda, Y. (2007). Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure. *J Mol Biol* **365**, 480-501.
2. Narita, A., Takeda, S., Yamashita, A. & Maéda, Y. (2006). Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *EMBO J.* **25**, 5626-33.
3. 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.
4. Mizuno, N., Narita, A., Kon, T., Sutoh, K. & Kikkawa, M. (2007). Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20832-7.

◆ 新聞掲載：

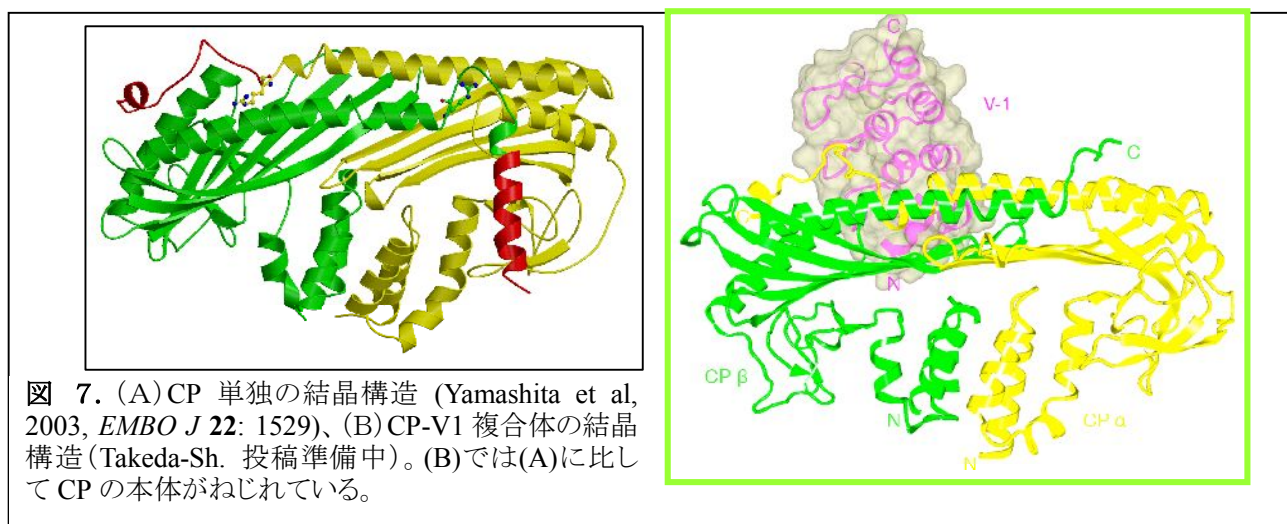
3. 「制御の仕組み解明」 2006 年 11 月 17 日 日本経済新聞朝刊
4. 「たんぱく質の構造解析」 2006 年 11 月 17 日 日経産業新聞朝刊
5. 「収縮の仕組み解明」 2006 年 11 月 17 日 日刊工業新聞朝刊

(2-2) アクチンキャッピングプロテイン(CP)の「捕捉複合体」

背景: CP は細胞内におけるアクチン・トレッドミリングに必須な3蛋白質の1つである。当グループではすでに CP 単独の結晶構造、アクチンフィラメント B 端に結合した電子顕微鏡構造を解明してきた。さらに CP 捕捉(sequester)構造を解明するため、V-1 との「捕捉複合体」結晶構造を解明した。V-1 (myotrophin) は分子量約 13 kDa の ankyrin repeat protein で、4 つの ankyrin repeat motif がタンデムに連結した構造である。V-1 は in vitro において CP と直接結合し、その filament capping 活性を阻害する(sequester する)ことが知られている。細胞内での V-1 の機能はほとんどわかっていない。

方法: CP 及び V-1 の全長タンパク質を大腸菌で別々に発現・精製した後、両者を混合し、CP/V-1 複合体を形成させた。複合体結晶は、ハンギングドロップ蒸気拡散法 {0.1 M Tris-HCl (pH 8.2), 10 % PEG 4000, 20 % isopropanol, 20 mM EDTA, 20 °C} によって得られた。回折データ(分解能 2.2 Å)は、SPring-8 の放射光ビームラインにて収集した。複合体構造は CP の構造を探索モデルとして、分子置換法によって決定した。

結果: この「捕捉複合体」では CP のアクチン結合部位と V1 結合部はほとんど重なることがわかった。また V-1 との結合によって CP の分子全体が変形する(1半分が他の半分に対して回転する)ことがわかった。



展開: アクチントレッドミリングでの CP の役割を全面的に解明するには、さらに CP をアクチンフィラメント B 端から解離させるメカニズムの解明が必要である。このために CALMIL・CP 複合体等の構造解明に着手している。この「解離複合体」ではリガンドがアクチン結合部位から遠隔の部位に結合し CP の形態変化を引起こすと考えられる。

今後はこのアロステリック効果を解明することが課題となる。CPがB端に滞在する時間は*in vitro*の実験では長く、細胞内では3桁も短い。この差は細胞内での高頻度な「解離複合体」形成を示唆する。

- ◆ この課題の中心研究者： 武田修一技術員、成田哲博研究推進委員
- ◆ 共同研究者： 似内靖理化学研究所播磨研究所前任研究員（元カルシウム調節のメカニズムグループリーダー）
- ◆ 発表論文： 現在準備中

(2-3) ダイナクチン複合体の構造と機能

背景: アクチンフィラメントの結晶化は現在の技術ではできていない。これは主にアクチンフィラメントの長さを揃えることができないためであることは既に述べた通りである。しかし、天然には、アクチンとアミノ酸配列の類似した蛋白質 Arp1 があり、長さ一定(約 40 nm)の Arp1 フィラメントとして存在している。これは、Arp1 が単独でフィラメントを作るのではなく、Arp1 フィラメントを中心として、11種類の蛋白質が結合した約1.1 MDaの大きな蛋白質複合体として存在する。Arp1 フィラメントがダイナクチン複合体形成に中心的役割を果たすと考えられること、また、ダイナクチン複合体は細胞分裂や細胞内物質輸送など、生体内で重要な機能を果たしていることに興味を持ち、プロジェクトの1テーマとして研究を開始した。

方法: 電子顕微鏡を使った単粒子解析の方法で、構造解析することにした。損傷が少なく、均一なダイナクチンをニワトリ脳を材料として精製した。また、均一性を増すために、11日目胚のニワトリ脳のみを材料とした。酢酸ウランでダイナクチンを負染色して電子顕微鏡写真を撮影し、この画像解析(単粒子解析等)を実行した。

結果: まずダイナクチンの2次元投影像を得ることができた。これよりわかったこと：(1)ダイナクチンには、3つの突起がある。1つは、shoulder/sidearm で、残りの2つは、pointed-end complex の2つの突起である。(2)ダイナクチンの Arp1 フィラメントは単なる Arp1 の重合体ではなく、3つの部分(アクチン螺旋と同型の Arp1 の重合体を中心とし、pointed-end 側に pointed-end complex、barbed-end 側に特殊な構造)を区別できることがわかった。

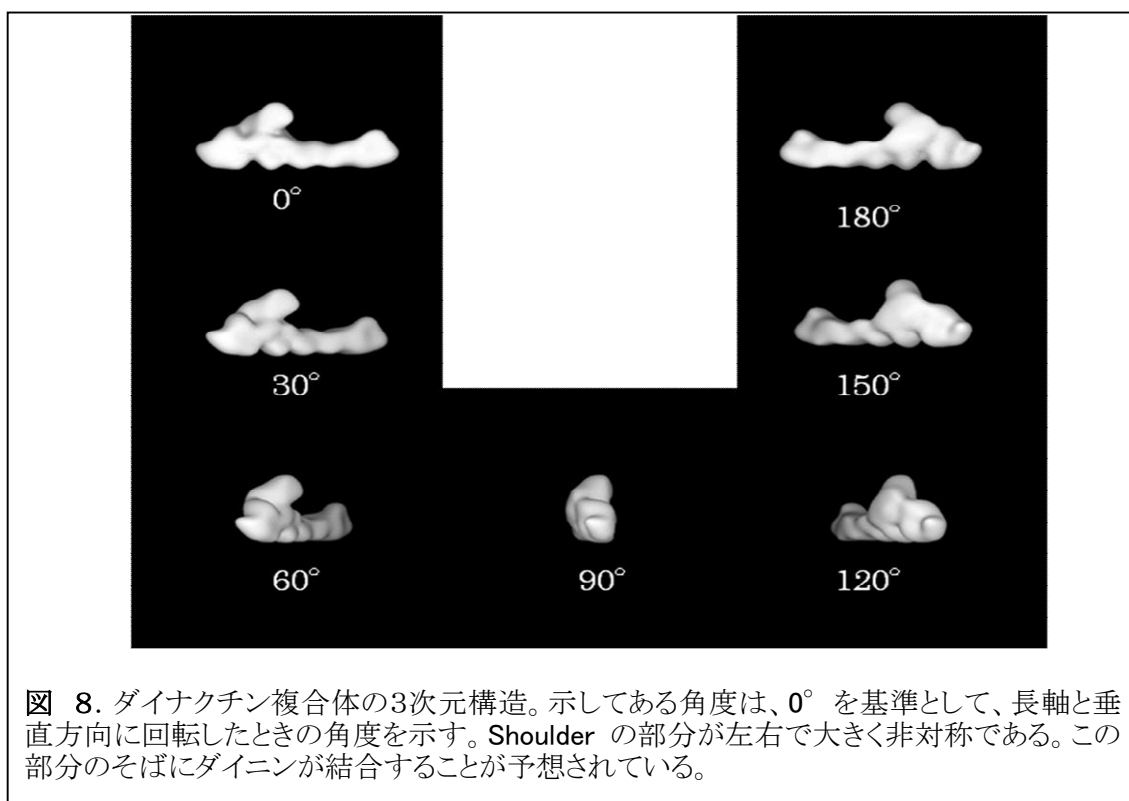
最近、ランダムコニカルティルト法を使って3次元構造を得た。これにより、(1)ダイナクチンの Arp1 フィラメントが螺旋を巻いていること、(2) shoulder 構造は Arp1 フィラメントに対して非対称に結合すること、(3) pointed-end の構造が扁平な構造であることがわかった。今回の結果から、微小管モーターであるダイニン、ホモダイマーとして、左右対称であるが、それと結合するダイナクチンは左右が非常に非対称であることがわかった。この発見は、ダイナクチンの機能を考える上で重要な発見である。

◆ この課題の中心研究者: 今井洋研究員、成田哲博研究推進委員

◆ 発表論文:

1. Imai H., Narita A., Schroer T.A., and Maeda Y. (2006). Two-dimensional averaged images of the dynactin complex revealed by single particle analysis. J. Mol. Biol. 359: 833-839

2. 論文準備中



3-3. 筋のカルシウム調節のメカニズムの研究 (テーマ3)

私たちの研究の一つの目標は江橋らが発見した筋収縮のカルシウム調節のメカニズムを解明することである。そのためには、次の2点が重要である。第一に、カルシウム調節を担う構造は個々の蛋白質ではなく、アクチンフィラメント複合体(アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体)がである。第二に、江橋らが提案した複合体の分子模型を原子構造で置き換える必要がある。

本プロジェクトでは、研究を以下の3点にわたって意識的に展開してきた：

- (1) 複合体を形成する個々の蛋白質の原子構造(高分解能構造)を解明すること。
 - (2) 複合体全体の構造を解明すること。
 - (3) 構造動態を解明すること。
-
- (1) について： 私たちは2003年にトロポニンの結晶構造を解明した。本プロジェクトではトロポミオシンの結晶構造を解明した(後述)。またアクチン重合体の高分解能構造を解明した(前述)。こうして私たちはすべての構成蛋白質の構造解明で中心的な役割を果たした。
 - (2) について： 長さの揃ったミニ・フィラメントを調製しそれを使って複合体全体の構造を解明するとの研究を進めている(後述)。電子顕微鏡を使ってアクチンフィラメント複合体の構造解明をめざす研究については、私たちも取り組んでいるが(ここに記述しない)、多くの技術的問題が未解決である。Lehman たち、Egelman たちの研究も発表されているが、技術的問題は解決されていないと私たちは考えている。
 - (3) について： まずトロポニンおよびトロポミオシン単独の構造動態を解明することから始めた。始めてからわかったことは、この課題が当初私たちが考えたよりずっと難しいことである。(i) 私たちは、心筋トロポニンの可溶化法を考案し NMR 測定にはじめて成功したが、NMR 用試料調製法はまだ未完成である。(ii) トロポミオシン動態を測定するというが、何をどのように測定するか模索が続けている。トロポミオシンについては Tyr の側鎖の回転を測るのが有用であろう。(iii) 測定した動態を基にメカニズムの理解に結びつける方策として、遺伝性心筋症を引き起こす変異を用いるとの研究を開始した。

(3-1) 結晶構造から見るトロポミオシンの柔軟性

背景: トロポニンに Ca^{2+} が結合したとの信号はアクチンに伝わるが、そのときトロポミオシン(Tm)の構造変化が重要な役割を果たすことは疑いない。というのはトロポミオシンのみが全てのアクチンと相互作用するからである。ここで重要な問題は、トロポミオシンのどの程度、どのように柔らかいかということである。そのためには、まず原子構造を知る必要があるので X 線結晶構造解析が必要となる。しかし Tm は柔らかさのためか、そのままではよい結晶はできない。従って、高分解能まで X 線を回折する Tm の結晶を作製する工夫を重ね、Tm の原子構造を得た。

方法: トロポミオシン (Tm) 全長からはよい結晶が得ることができないため Cohen 研 (Brandeis 大学) は複数の断片に分けて個々の結晶構造解析をはじめた。また断片の端により安定な coiled-coil である Leucine zipper を融合した。私たちはこのやり方を踏襲し、最後に残った部分、トロポニン結合部位を含む最も重要な断片の構造を得た。私たちの研究方法の特徴は、よく似た2つのコンストラクト(分子種)から3つの結晶型を得て、これらを比較することによって結晶形成による分子の変形と、分子に内在する分子の変形を区別した点にある。用いたコンストラクトは、Z-rsTm(176-273)-Z および Z-rsTm(176-284)である(Z = Leucine zipper)。

結果: (1) 分子の変形(曲がり)は結晶型に依るが、coiled-coil を形成する2本の helix 間の距離は結晶型に依らず、アミノ酸配列による分子内在性の特性であることがわかった。(2) coiled-coil の7残基周期 (*a-b-c-d-e-f-g-*) のうち *a* と *d* のコアポジションに電荷あるいは極性を持つ残基が位置すると helix 間隔が広がりコアに穴が開く。例えば、Glu218(*a*)のために穴(214-221)ができ、Gln263(*d*)のために穴(263-267)が生じる。(3) Z-rsTm(176-273)-Z の結晶から、これまでトロポミオシン Tm では最良の 1.8 Å 分解能の構造が得られた。そのため疎水性コアに開いた穴に複数の水分子が見られた。coiled-coil 構造はコア残基間の疎水性相互作用により成立しているが、コアにある水分子が疎水性相互作用を分断し、Tm をこの部分で柔らかくするであろう。(3) *a* と *d* の位置に連続して Ala ないしは Ser が位置するとその部分で helix 間隔は狭くなり、やはり曲がり易くなる。

展開: 疎水性コアに開いた穴(214-221)の両端にはチロシン残基が位置する(図9)。チロシン側鎖のベンゼン環の回転速度は約ミリ秒であり、この回転速度を計測することによってミリ秒の時間スケールの分子の構造動態(たとえば呼吸をするような分子構造の運動)を解明することができるであろう。

◆ この課題の中心研究者：
似内靖・理化学研究所播磨
研究所前任研究員（元カル
シウム調節のメカニズムグル
ープリーダー）、南方志帆
（技術員）

◆ 発表論文：

1. Nitnai Y, Maeda K,
Oda N, Minakata S,
Maeda Y. (2007) “Crystal
structures of
tropomyosin: flexible
coiled-coil” , *Adv Exp Med
Biol.* **592**:137-151 (in
Regulatory Mechanisms of Striated Muscle Contraction, ed Setsuro Ebashi & Iwao
Ohtsuki, Springer Verlag).
2. Shiho Minakata, Kayo Maeda, Naoko Oda, Katsuzo Wakabayashi, Yasushi
Nitnai, and Yuichiro Maeda, (2008) The 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.

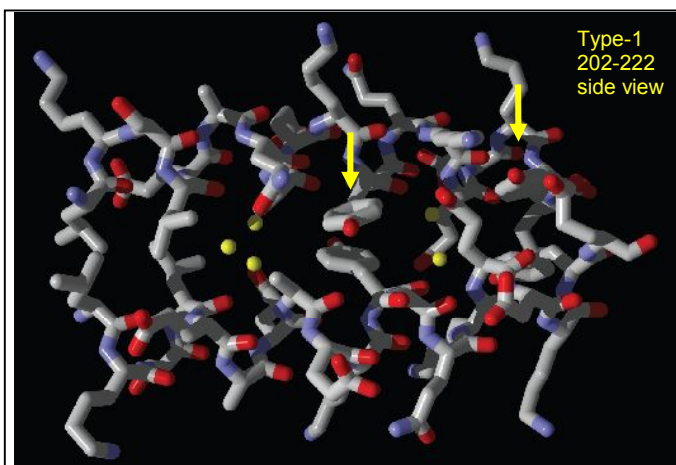


図 9. トロポミオシン結晶構造中の coiled-coil.
E218 近辺の疎水性芯の穴(黄色の球は水分子)。
矢印は2対の Tyr 残基(214 および 221)。

(3-2) 心筋症を引き起こすトロポニン突然変異の研究 I

背景: 家族性心筋症は我が国の特定疾患に指定されている治療の困難な遺伝性の疾患であり、心臓移植の対象にもなっている。家族性心筋症のうち30%以上の例は心筋トロポニンの単一アミノ酸の置換によって引き起こされることが解明された(九州大学の大槻・森本グループ)。

この遺伝病の研究の著しい特徴は、単に病因変異が特定されているだけではなく、その変異に起因する機能変調も巧妙な研究室測定系を使って詳しく調べられている点にある。(最近ではさらにノックインマウスの優れた動物系が確立されつつある)。機能変調は、タイプ1、減少するタイプ2、最大張力が増加するタイプ3に分けられる。2003年私たちが解明したトロポニンコアドメイン(中心部分)の結晶構造の上に病因変異の位置を置いてみると、機能変調のタイプと蛋白質構造の部位との間に単

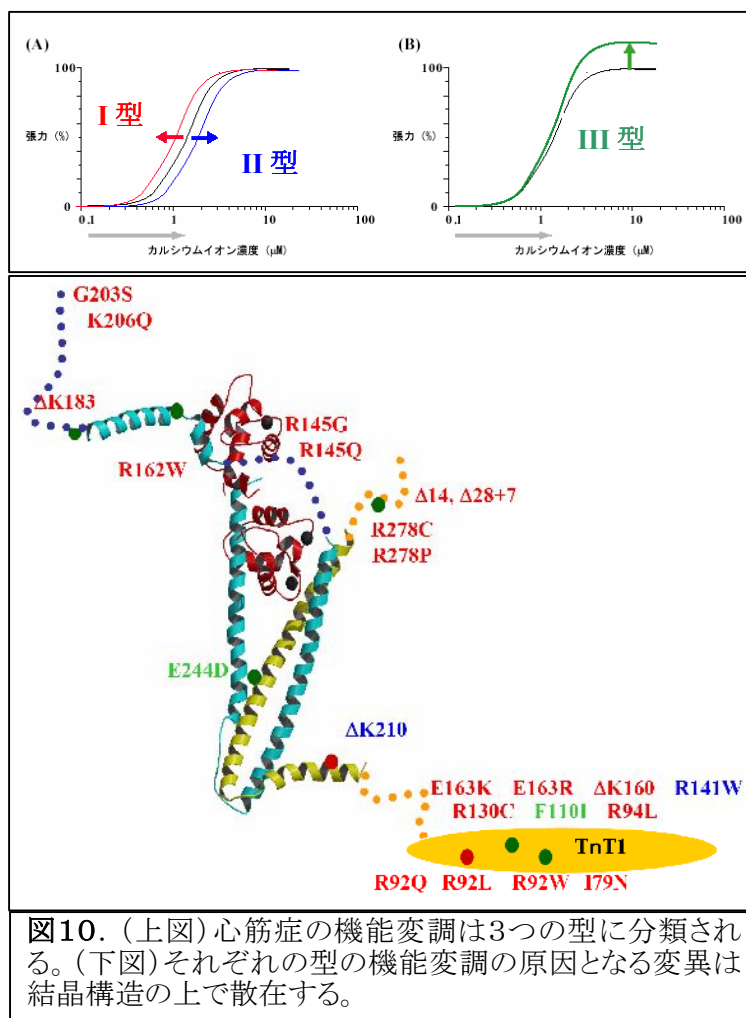


図10. (上図) 心筋症の機能変調は3つの型に分類される。(下図) それぞれの型の機能変調の原因となる変異は結晶構造の上で散在する。

純な対応関係は無く、同一タイプの機能変調を引き起こす変異部位はトロポニンの全体に散らばっている(図10下)。このことはトロポニンの働きを理解するには、分子の構造そのものではなく、構造の揺動をこそ理解することが重要であろうことを示唆する。遠く隔たった部位の置換が同一の構造揺動に同じような影響を与えるのであろう。

私たちは心筋症を引き起こす変異を利用して、トロポニンの機能発現のメカニズムを理解することができるのではないかと考えている。まず、トロポニン分子の内部の構造動態を(NMRで)計測する。次に、心筋症を起こす変異トロポニンを使って、正常型と変異型との構造動態を比較する。この比較から、原因である構造動態と、結果である

機能変調との間の因果関係を特定できる。

そのような研究の対象として、心筋症病因変異 E244D (TnT) および K247R (TnT) に注目した(図 11)。この2つの変異はともにトロポニン中核部分の芯をつくる IT-coiled coil (TnI と TnT の間に形成される heterodimeric coiled coil で 46 残基対からなる)のほぼ中点に位置する。

この2変異に注目した理由は、(1) 私たちが解明した結晶構造に含まれている(病因変異箇所のうち結晶構造外に位置するのが多い)、(2) 比較的知見が蓄積している coiled coil という構造モチーフにある、(3) 以下のような理由からこの部分が特異な動態特性を持つと考えるからである。

Coiled-coil の芯の部分、つまり7残基繰り返しの *a* および *d* の位置には通常疎水性残基があり、coiled coil を安定化させる。ここでは *a* に R111 と K247 と正に荷電した残基が位置し明らかに coiled coil 構造が不安定となっている。他方、この2つの残基は coiled coil の表面でそれぞれ他の2つの負電荷を持った残基と塩橋を形成し(図11)、この塩橋は coiled coil を逆に安定化していると考えられる。2つの変異は coiled coil の安定化要因と不安定化要因が微妙にバランスする箇所にある。

方法： 上記の部位に、アミノ酸側鎖の体積や電荷が野生型とは異なる種々の変異 (E244; D, M, A, K, K247; R, E, A の合計 7 種類) を人為的に導入した TnT 変異体は大腸菌を使って発現し、野性型の TnI や TnC と混合して Tn 変異体を再構成した。これらの変異体を持つ筋原繊維に交換導入し、その ATPase 活性の変化をカルシウムイオン濃度 (Ca^{2+}) 依存的に測定した。また単一筋原繊維が発生する張力を測定した。また、心筋症関連変異体 TnT (E244D) と TnT (K247R) を使って再構成したトロポニンコアドメインの熱変性 CD スペクトル解析、SDSL-ESR スペクトル解析、DSC 解析を行い、蛋白質熱安定性の変化を研究した。

結果： この部位に導入した変異は、ATPase 活性の測定でも張力の測定でも、ほとんどの場合活性を亢進させること、 Ca^{2+} 感受性は変化させないことが明らかとなった。なお、心筋症を引き起こす変異 K247R が活性亢進型の変異であることは今回の測定ではじめて確定した。

熱と塩酸グアニジンに対する構造安定性を CD と DSC を用いて調べると、E244D は天然型に比べて蛋白質変性温度を低下させる。また、SDSL-ESR の測定でこの部分のスピンラベル揺動性が上昇する。よって変性温度の低下はこの部分の不安定化に起因すると考えられる。一方、K247R では天然型に比べて蛋白質変性温度は大きく変化

しないが、変性エンタルピーが半分になるので、より熱変性しやすい構造に変わっていると考えられる。正常型トロポニンの結晶構造においては TnT の E244、K247、および TnI の E110 残基は塩橋を形成するので、これら変異は塩橋を弱め、coiled-coil 構造を不安定化し、その結果トロポニン分子が不安定になると考えられる。

私たちは E244 と K247 を含む特徴的な残基配置を”pair of triads”と定義し、独自に計算機プログラムを書いて PDB の中に同様な残基配置を探した。その結果、(結晶構造が既知の) 16 蛋白質に”pair of triads”が存在することを確認した。これらの構造から、”pair of triads”が別の蛋白質分子と接触すると、coiled-coil の表面の塩橋が大きく乱され、coiled-coil が不安定となることが示唆された。

展開： 家族性心筋症の研究では、病因変異が特定されているばかりではなく、それに起因する機能変調も同定されている。さらに私たちの研究で、変異に起因する構造ないしは構造動態の異常も解明されようとしている。このように分子レベルで発症機序を明らかにすることができれば、心筋症の予防法や治療法を進歩させることができよう。また、この研究は基礎研究としても価値が高い：機能異常の原因となる構造動態異常を特定することによって、トロポニンによる筋収縮の Ca^{2+} 調節メカニズムそのものの解明を進めることができよう。

◆ この課題の中心研究者： 前田雄一郎、中村志芳研究員、松本富美子元研究員、高山舞(名古屋大学学部学生)、由良敬(共同研究者:御茶ノ水女子大)、Corrado Pogessi (共同研究者:University Firenze)、藤原悟(共同研究者:原子力研究機構)

◆ 論文: Yuichiro Maéda, Yasushi Nitani, Toshiro Oda (2007) “From the crystal structure of troponin to the mechanism of calcium regulation of muscle contraction” *Adv Exp Med Biol.* **592**: 37-46 (in *Regulatory Mechanisms of Striated Muscle Contraction*, ed Setsuro Ebashi & Iwao Ohtsuki, Springer Verlag).

(3-3) 心筋症を引き起こすトロポニン突然変異の研究 II

背景: 前章で述べたように、TnI と TnT の突然変異は家族性心筋症の病因である。トロポニンの動的性質の変調と機能変調の間の相関が示唆されている。ここでは正常型 TnI、或いは2種類の変異型 TnI、即ち G203S と Δ K183、を使って再構成したヒト心筋型トロポニンの詳しい NMR 測定を行った。その結果、TnI 変異によって、TnC 結合部位とアクチン・トロポミオシン結合界面で起こる動態変化が心筋症発症の原因であると示唆された。

方法: 大腸菌発現系を使ってヒト心筋 TnI1 アミノ酸残基置換変異体 G203S と TnI1 アミノ酸欠損変異体 Δ K183、正常型 TnC、正常型 TnT 2フラグメント (TnT1 領域を含めると分子会合のため長時間を要する NMR 測定には不向きであった) を大量発現・精製して、トロポニン3量体を再構成し、NMR 測定に使った。高濃度のトロポニンを可溶化するために NMR 溶液には 50mM グルタミン酸と 50mM アルギニンを加えた。この条件を発見することによって初めて心筋トロポニンの NMR 測定が可能となった。TnI と TnT2 の ^1H シグナルと ^{15}N シグナルを2次元スペクトルに展開して、アミノ酸残基の同定を行った。

結果: TnI の K174 から K205 のペプチド領域ではほぼ完全にアミノ酸残基は同定できた。しかし、K157 から K174 の領域では同定できた残基は多くなかった。始めて、TnT2 の Y187 から G199 までと V274 から R286 までの残基は同定できた。これらのシグナルを使って解析を行った。野性型トロポニンと2つの変異体でペプ

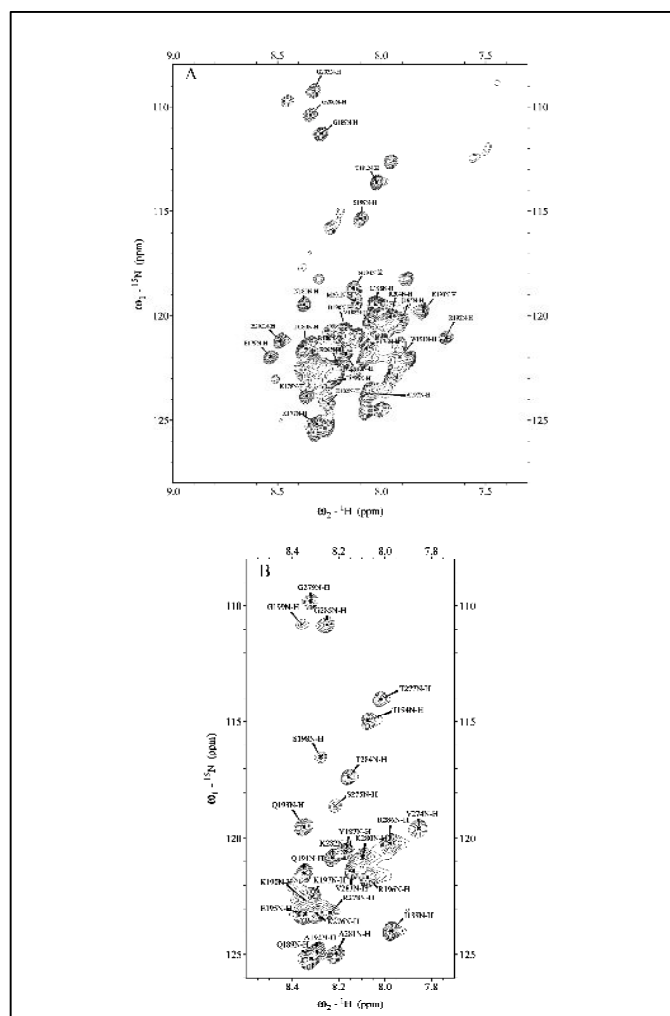


図 12A. 典型的な ^1H - ^{15}N HSQC スペクトラム。試料はヒト心筋 Tn、うち TnI のみを標識した。
図 12B 典型的な ^1H - ^{15}N HSQC スペクトラム。試料はヒト心筋 Tn、うち TnT のみを標識した。

チド領域の揺動(T2/T1 比)を比較したところ、G203S 変異体では T2/T1 比が全体的に増大していた。これは構造が全分子的に不安定になったことを示す。興味深いことは2番目のアクチン・トロポミオシン結合部位(残基番号 173~181)と TnC 結合領域(161~178 及び 191~199)が変異によって増大した。 Δ K183 変異体の T2/T1 比の増大は置換アミノ酸残基の付近に限定されていた。しかし、この増大の位置は2番目のアクチン・トロポミオシン結合部位(173~181)や TnC 結合領域(161~178)のごく近傍であった。我々の結果は直接にアクチンやトロポミオシンとの結合を測ったものではないが、変異がこれらの結合部位の構造に影響を与えることを示唆すると考えられる。

解釈: TnI と TnT には Ca^{2+} 結合部位は存在しない。しかるにこれらの変異はトロポニン複合体の Ca^{2+} 感受性に大きく変化させて、その結果として、心筋症を引き起こす原因となる。これは一見矛盾するようであるが、NMR 測定の研究によってこれらの変異がアクチン、トロポミオシン、TnC との結合部位の構造に影響を与えることが分かった。これは心筋症の原因解明の出発点となると期待できる。

課題: なお、心筋トロポニンの可溶化に成功し測定ができたといっても、NMR 信号を検出できたのは構造をとらないで揺動していると思われる領域に限られる。中核部分からの信号が全く検出されていないが、これは分子数個の小さな会合体を形成しているためと考えられる。心筋トロポニンの構造動態の全体を解明するには中核部分の測定が絶対必要であるが、そのためには試料調製技術のさらなる改良が必要である。

- ◆ この課題の中心研究者:ラサール研究員
- ◆ 論文発表: 現在準備中

(3-4) 長さの揃った短いアクチンフィラメント(ミニフィラメント)の調製

背景: 私たちはトロポニン、トロポミオシン、アクチン重合体それぞれの高分解能構造を解明してきたが、筋収縮のカルシウム調節メカニズムの解明のためには、この3種類の蛋白質から成る複合体の構造を知ることがどうしても必要である。3種類の蛋白質の位置関係と、蛋白質相互間の接触の詳細を知って初めて、トロポニンへのカルシウム結合の信号がトロポミオシンから各アクチン分子に伝達される様子を理解することができる。

方法: 複合体ミニ・フィラメントの調製は重要な課題であるため世界の複数の研究室が取り組んでいる。私たちの構想の特徴は、両端を塞ぐために筋肉で実際にキャッピング機能を担う蛋白質を用いる点である。その構想に基づき、**P** 端のキャッピング蛋白質であるトロポモジュリン(C端半分)と **CP**(キャッピング蛋白質)それぞれの結晶構造を自分たちで解明してきた。

結果: これらの知見を援用できたことで研究は次のように進展している。 **CP**(キャッピング蛋白質)を構成する α , β サブユニットのそれぞれとトロポニン **T** を融合したコンストラクトを調製し、これとトロポニン **C**, トロポニン **I** を同一の大腸菌に共発現した。こうして調製した **CP**-トロポニン複合体とトロポミオシン、トロポモジュリン共存下でアクチンを重合させると、上清に目的とした **40 nm** 程度の長さを持つミニフィラメントが多数見られた。酢酸ウランで染色すると約 **40 nm** の短いフィラメントが多数観察された。このことから、まだ完全ではないがミニフィラメント調製は可能であることがわかった。ゲルろ過によるフィラメント分離(TSK-Gel G5000PW_{XL} ($\phi 7.8\text{mm} \times 300\text{mm}$)): 高分子量側にミニフィラメントと考えられるピークが観察された。このフラクションを集めて電子顕微鏡により観察した。フィラメントの長さの分布を調べたところ **40 nm** 付近の長さにピークが見られたが、長さの短いフィラメントも多数見られたので、まだ改良の必要がある。

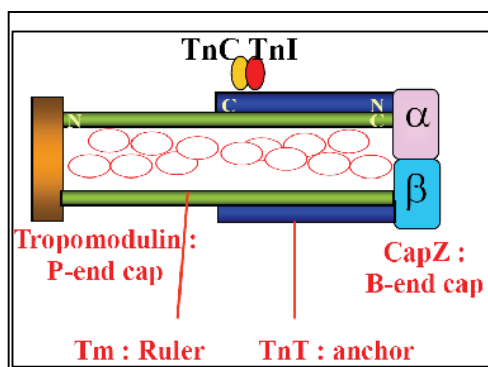
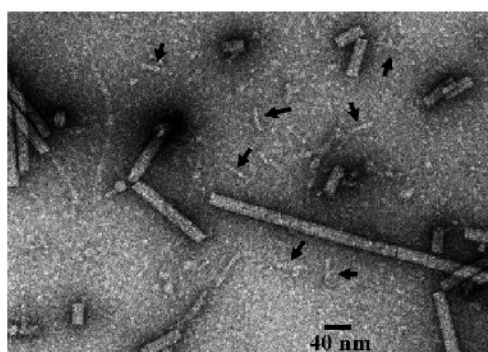


図13. ミニ・アクチンフィラメント複合体の構想。

図14. 既に得られているミニ・アクチンフィラメント複合体(矢印)。大きな粒子は、染色剤の層を厚くし一様な負染色を実現するために意図的に加えた TMV。



- ◆ この課題の中心研究者:木邑(崎山)智恵子研究員、前田佳代研究員、今井洋研究員

3-4. アクチンが関与する分子メカニズムの解明（テーマ4）

テーマ4ではアクチンフィラメントの動態変化が遺伝子の転写調節に係わる機構の分子基盤を研究した。又、アクチンフィラメントがミオシンを活性化し、筋収縮を引き起こす機構の研究に取り組んだ。

(4-1)細胞骨格・細胞接着関連遺伝子群の転写調節因子 MAL の核・細胞質間輸送ならびに転写活性化能をアクチン動態が制御する機構

背景:真核細胞において、低分子量 G 蛋白質 Rho は細胞外のリガンドからのシグナルによって活性化され、アクチン系細胞骨格の再編成をひきおこし、細胞形態、細胞運動、小胞輸送、細胞周期、転写など多様な細胞機能を制御する。本研究の主題は、Rho シグナリングによるアクチン動態の変化がさらに転写を制御するに至る機構の分子基盤の解明である。Rho シグナリングによってアクチン動態の変化がおけると、さらにこれら遺伝子群の転写が制御され、必要な時期に必要な量の蛋白質分子が供給されることで、細胞外からのシグナルに応答した細胞の形態変化や運動性・接着性の変化が効果的に起こることが、近年明らかになりつつある。Rho シグナリングによるアクチン動態変化と、転写制御をリンクする橋渡しの役割をするのは転写因子 SRF (serum response factor)のコアクチベーターとしてはたらく蛋白質 MAL (megakaryocytic acute leukemia; 急性白血病の原因遺伝子の産物)である。MAL の細胞内局在と、転写活性化能へのアクチンの影響には以下の3つの要素があることが最近報告された (Vartiainen *et al.*, 2007)。

- (i) アクチンは MAL の核移行を阻害する。
 - (ii) アクチンは MAL の核外輸送を促進する。
 - (iii) アクチンは核内での MAL と SRF による標的遺伝子の転写活性化を阻害する。
- これらの機構の分子基盤を理解するために、生化学的機能解析を行った。

方法: MAL、核移行を担う輸送因子 (importin) $\alpha : \beta$ ヘテロダイマー、核外輸送受容体 (CRM1)、SRF 蛋白質は全て大腸菌を用いて発現・精製した。importin $\alpha : \beta$ ヘテロダイマー、CRM1、或は SRF と MAL の間の結合は in vitro pulldown assay 法を用いて測定した。

結果: pulldown assay により次のような結果を得た。

- (A) MAL は importin $\alpha : \beta$ ヘテロダイマーに結合し、この結合は RanGTP あるいはアクチンにより阻害される。
- (B) MAL は CRM1, RanGTP と3者複合体 (核外輸送複合体)を形成するが、これはアクチンの有無には依存しない。
- (C) MAL と SRF・標的遺伝子プロモーター領域の結合はアクチンによって阻害される。

これらの結果から、「アクチンは importin $\alpha : \beta$ ヘテロダイマーと MAL の結合を阻害することにより MAL の核移行を妨げる」と結論でき、また、「アクチンは MAL が SRF・標的遺伝子プロモーターに結合することを妨げるため、MAL の核内繫留を解除して核外

輸送を促進すると、同時に、SRF と MAL による転写活性化を抑制することができる」と考えられる。これらの機構により、アクチン動態(重合・脱重合)の変化が MAL の細胞内局在と転写活性化能を変化させるのであろう。この成果はアクチンが“転写調節因子”としても機能するという多機能性の新たな側面を示唆するものである。

◆ この課題の中心研究者:松浦能行グループリーダー、平野秀美技術員

(4-2) アクチンとミオシンの相互作用

背景: 筋肉ではアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの相互作用で両フィラメント間の滑り運動が起こる。アクチン単体とミオシン頭部の結晶構造が解明され、小田らによってアクチンフィラメントの原子構造を見ることが出来るようになったが、アクチンフィラメントが如何にしてミオシンの ATP 加水分解反応を活性化し、アクチンフィラメントを動かすことが出来るのかは未だ解明されていない。原因の1つはアクチン-ミオシン頭部の結晶化に成功していないことがあげられる。そこで、ミオシンのアクチン結合部位と考えられている蛋白質表面の幾つかのループ構造のアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換して、機能変化を研究し、この問題を解明しようと試みた。

方法: ニワトリ砂嚢筋ミオシンのモーター活性を持つフラグメントを昆虫培養細胞を用いて発現した。その為にミオシンフラグメントの遺伝子をバキュロウイルスの遺伝子に組み込んで発現ベクターを作った。レコンビナント・ウイルスを昆虫細胞に感染により導入して蛋白質を発現した。これを生化学的に精製し、実験に用いた。表 1 に機能変

表1. ミオシンの人工変異	
第2アクチン結合ループ	K576A/K568A, E473K
ループ2	K652A, K653A, K652A/K653A
疎水性トリプレット	W546A, W546S, F547A, F547H, P548A, F548G, F548R
プロリンに富むループ	TNPP(532-5)M, TNPP(532-5)K
心筋症ループ	I407A, V409A, D412A, V413A, V414A

化の研究に用いる為に作成した人工変異ミオシンの一次構造上の位置とループの関係を示す。

結果: 人工変異ミオシンのアクチン活性化 ATPase 活性のアクチン濃度依存性を測定した。その結果から、疎水性トリプレットの 3 つの残基をそれぞれアラニンに置き換えたミオシンでは、 $V_{\max}$ は著しく低下したが、 K_{app} は殆ど変化しなかった。特に Phe-547 の人工変異ミオシンでは活性低下は特に著しく殆ど活性化はなくなった。他方、ループ 2 の C 末端にある 2 つのリジン残基 (Lys-652 及び Lys-653) をアラニンに置き換えたミオシンでは $V_{\max}$ が低下すると共に K_{app} も増加した。更に、心筋症ループの Ile-409、Asp-412、及び Val-414 をアラニンに置き換えたミオシンでは $V_{\max}$ が低下したが、 K_{app} は殆ど変化しなかった。このような測定をすべての人工変異ミオシンについて行った結果から、第 2 アクチン結合ループとループ 2 の C 末端は弱い結合のアクチン-ミオシン複合体の形成に関与すること、疎水性トリプレット、プロリンに富むループ、ループ 2 の C 末端、心筋症ループの 4 つは主に弱い結合から強い結合の複合体に変換する過程に関与することを明らかにすることができた。また、ピレン蛍光

アクチンを用いたアクチン-ミオシン結合強度変化の研究から人工変異ミオシンの内、強い結合の複合体に変換する時に最も強く作用するループは疎水性トリプレットにある三つのアミノ酸残基であることが明らかになった。

◆ この課題の中心研究者:尾西裕文技術参事

◆ 発表論文:

1. Toward understanding actin-activation of myosin ATPase: The role of myosin surface loops. Hirofumi Onishi, Sergey, V. Mikhailenko, Manuel F. Morales (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 6136-6141
2. A close look at energy transduction in muscle: Hirofumi Onishi, Manuel F. Morales (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 12714-12719

◆ 新聞掲載:

1. 「筋肉の収縮基本反応解明」 2007 年 7 月 27 日 日経産業新聞
2. 「筋収縮のエネ変換機構分子レベルで解明」 2007 年 8 月 2 日 日刊工業新聞

第4章 全体のまとめ

4-1 ERATOの5年間で得られた成果等のアピール

(1) アクチンフィラメントの高分解能構造を解明したこと:

アクチンは非常に多くの細胞機能に関与しており、もっとも重要な蛋白質の一つと言える。さらに単一蛋白質が多くの存在様式(ないしは異なる動態)をとりその各々が個々の機能に関与するという意味で、蛋白質の持つ「多機能性」をもっともよく体现している蛋白質とも言える。この「多機能性」は蛋白質一般に共通な特性であると考えられるので、アクチンの研究は蛋白質一般の理解を深めるうえで大きな意義を持つ。

アクチンは重合体として働く。より正確には、単量体と重合体の間の変換こそアクチンの本態である。であるなら重合体の原子構造解明は生物学において極めて重要な課題である。

本プロジェクトにおいて小田俊郎はこの課題を見事に解決した。この課題の解決のためには試料調製法(超高磁場でのフィラメントの配向)、構造解析法(X線繊維回折法、ノーマル・モード解析とMD法の結合)の双方で全く新しい方法を確立する必要があった。

細胞機能の解明のためにはそれを担う蛋白質の原子構造の解明が絶対に必要である。しかし繊維状の重合体をつくる細胞骨格系の構造解析は遅れていた。重合体からは結晶を得ることができないからであった。小田の解析方法はその問題に大きな突破口を開いたと言える。確かに小田の方法はアクチンフィラメントの構造を解くためにだけに考案されたものであり、直接の応用には限りがある。しかし、新しい方法開発はいつもそのように特殊で具体的な突破口から始まるものである。

(2) アクチンフィラメントの端の(電子顕微鏡)構造を解明したこと:

アクチンの重合・脱重合は必ずフィラメントの端で起きる。それゆえ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アクチンフィラメントの端の構造を解明することが不可欠である。

成田哲博は単粒子解析法を基に、フィラメントの端の構造を解明する方法を編み出した。それを利用して実際にCP(アクチン・キャッピング蛋白質)がアクチンフィラメントのB端に結合した構造を解明し、これを基に結合のメカニズムを解明した。

この研究は、アクチンフィラメントを中心とした複合体構造の解明に有力な方法を提供した点で重要である。実際、成田自身がこの方法を応用してすでに複数の構造を解明しているし、DallasのM.Rosen研とは共同研究を進めている。

(3) トロポニン、トロポミオシン、アクチンフィラメントの構造動態研究への足がかりを得たこと:

蛋白質のメカニズム解明のためには高分解能構造は必須であるが、それだけで十分とは言えない。構造動態の理解がどうしても必要となる。本プロジェクトでは構造動態の解明へ向けて以下のような進展があった。

心筋トロポニンの心筋症病因変異に注目し、特に coiled-coil の中央での変異が coiled-coil 構造を不安定化させるとの仮説を提案し、それを支持する実験データを蓄積した。さらに心筋トロポニンの可溶化を部分的に実現し、NMR 測定に道を開いた。トロポミオシンのC端側の結晶構造を解明し、coiled-coil 芯部の疎水性芯の中断部分に穴が開いた構造をみつけその部分の構造が不安定であろうと提案した。これら部分の揺動をNMRで測定するに適した側鎖を提案した。アクチン重合体についても、自分たちで解明した高分解能構造から、アクチン重合体は個々の分子の形態変化(平坦化)と螺旋配置の2要素の和と考え、アクチン重合体の構造動態はそれら2要素の分離として考えられるとの仮説を提案した。

以上は仮説の提案であつたり、仮説を支持する間接的事実の集積であつて、構造動態の研究そのものを展開したものではない。しかし構造動態研究の基礎となる高分解能構造を解明したことと、構造動態解明への具体的課題を提示したことの意義は大きい。

試料調製法のさらに一段の改良が実現すれば、一気に動態研究を展開することが可能である。それゆえ動態研究を全面的に展開する準備に目処をつけたといえる。

4-2 今後の展開として目指すこと、期待すること

- (1) アクチンの単量体と重合体間の変換は多くの細胞機能の要素メカニズムとなっている。重合体の高分解能構造を解明し、トレッドミリングのメカニズムの一端を解明したことにより、今後細胞内でのアクチンフィラメントの機能発現のメカニズムの研究が大きく進展すると展望できる。これは脳神経の研究、ガンの研究など多岐にわたる。
- (2) 特に構造生物学の研究の上で弱点になっていた繊維状の蛋白質複合体の構造解析に大きな突破口を開いた。これらの方法を応用することによって近い将来、アクチンフィラメントのトレッドミリングのメカニズムや筋収縮のカルシウム調節のメカニズムの研究が急速に進展すると展望できる。
- (3) 蛋白質の構造を解明するだけではメカニズムは解明できない。構造動態の理解がどうしても必要である。本プロジェクトの研究によって構造動態の本格的な研究を開始する糸口を掴んだ。この研究を今後7-8年で展開することによって、構造動態の理解を深め、我々の時代の蛋白質理解を大きく進めることができよう。

補足： 科学研究の目的は自然認識を深めることである。現代の医療や産業技術の重要なシーズは、自然認識を深めることによって初めて得られるものである。科学研究の成果を産業や社会へ還元することは重要であるが、科学研究の社会的価値を応用にどれだけ近いかという視点から評価することは間違いであって、科学研究の対象がどれだけ現代の自然認識にとって重要かとの視点から評価することが正しいと考える。より中心的問題を解明することによってより大きな社会的価値に結びつけることができる。

4-3 「戦略目標」に対する自己評価

本プロジェクトの開始の基礎となったのは以下の戦略目標である(政府が策定した「科学技術基本計画」による)：

戦略目標17. 遺伝子情報に基づくたんぱく質解析を通じた技術革新
(平成13年度設定)

ヒトゲノム計画が進む中、遺伝子の塩基配列の解析技術は飛躍的に高度化し、併せて、遺伝子情報のデータベース化が急速に展開されている。今後、遺伝子レベルでの生命現象を理解するとともに、遺伝子情報の医療技術等への橋渡しを行うためには、これらの遺伝子情報を活用して、個々の遺伝子が作り出すたんぱく質が生体内でどのような役割を担っているのかを理解し、生命現象との係わりを解明することが重要である。また、これらの研究は、将来的には、遺伝子情報に基づいたゲノム創薬や、高機能食物の実現、たんぱく質の高機能化、たんぱく質のデザイン等の革新技术への展開が期待される重要な分野である。このため、戦略目標として「遺伝子情報に基づくたんぱく質解析を通じた技術革新」を設定し、ポストゲノム研究の大きな柱であるたんぱく質について、その構造・機能解析を進めることにより、たんぱく質の役割を明らかにする。なお、本戦略目標の下で行われることが想定される研究としては、例えば、たんぱく質の構造解析、たんぱく質の機能解析等が考えられる。

本プロジェクトは、「個々の遺伝子が作り出すたんぱく質が生体内でどのような役割を担っているのかを理解し、生命現象との係わりを解明することが重要である」、との戦略目標を、アクチンという重要な蛋白質に適用した研究であると言える。そしてその戦略目標に沿って十分な成果を挙げたと考える。

しかし、上記の戦略目標は、時代の制約とはいえ、必ずしも国際的に見て十分な高い目標を設定したとは言い難い。この戦略目標の記述によれば、「蛋白質の生体内での役割を明確にすること」で目標は終わっており、「構造解析」もその限りで位置づけられているにすぎない。しかし、現在真に必要なとされているのは、ある蛋白質がどのような役割を担っているかを解明するだけではなく、その役割を担うメカニズムを解明することが目標であり、そのためには「構造解析」は必要であるが、それだけでは不十分であるという認識である。つまり、既存の「一分子、一機能」、「構造を見たら機能がわかる」という考えはすでに過去のものであり、我々の認識は「アクチンは多機能」であり、「蛋白質はすべて多機能の可能性を持つ」、「構造を見ただけではメカニズムはわからない」「構造だけではなく、構造動態の解明が必要だ」という考えである。我々の蛋白質認識の多くは結晶構造に追うところが多いが、それはあくまでも静止した近似像であり、真の蛋白質構造は恒に揺動するものであろう。そのようなもう一段深い蛋白質認識を確立することがこれから必要となる。「遺伝子情報に基づいたゲノム創薬や、高機能食物の実現、たんぱく質の高機能化、たんぱく質のデザイン等の革新技术への展開」は、このような新しい蛋白質認識の地平を獲得することなく実現することはできない。

以上のように戦略目標は不十分であったため、戦略目標を基準とした評価では評価が甘くなると思われる。

4-4 総括によるプロジェクトの自己評価

- (1) 研究成果の面で、特にフィラメント状会合体の構造解析の面で、今後の研究の基礎となり、それゆえこの分野の研究をリードする研究成果を挙げることができた。これらの研究成果は国際的にもきわめて独創性の高い、価値のある成果との評価を受けている。
- (2) 今後のメカニズム研究は、構造の解明から、構造動態の解明へと進むであろう。これによって私たちの蛋白質理解も本質的に新しいレベルに深化するであろう。本プロジェクトでは構造動態の研究を本格的に展開するまでは至らなかった(詳しくは事項を参照)が、本格的に展開する準備にめどをつけたと考えている。これは新しい学問領域を創造していくような研究を期待されている ERATO 研究として、プラスに評価されるべきであろう。
- (3) 研究体制の正否は若い研究者がどれだけ育っていったかが評価の基準と考える。この点では、きわめて大きな成果があったと考えている。これは以下のような仕組みを作ったために可能となったと考えている。
 - (i) 研究対象はアクチンとその周辺の構造に絞り、多岐にわたる研究手法(結晶構造解析、小角散乱、電子顕微鏡、NMR、光学顕微鏡、計算科学、蛋白質発現技術)を駆使する。
 - (ii) 各研究員は個々の研究手法の専門家であるが、その部分だけを分業するのではなく、自分の研究課題の最初から最後まで責任を持つ。
 - (iii) 播磨の研究拠点では20名が日常的な研究スペースと居室を共有し、現場でのコミュニケーションの円滑化を図った。
 - (iv) 毎月3回行っている研究報告とそれについての議論は、多面的かつ最先端の議論が活発に交換され、知的刺激に満ちた優れた会合であった。このような議論が交わされる研究室は世界でも希有ではないかと自負している。
 - (v) 外国人研究員が疎外されないように、研究室での議論は原則英語で行ってきた。

4-5 その他

本プロジェクトでは、心筋トロポニンの構造動態の全体を NMR で測定し、それを正常蛋白質と心筋症を引き起こす変異蛋白質の間で比較することによって、機能変調に対応する構造動態異常を同定することを構想した。機能変調の原因となる構造動態異常が同定されれば、どのような構造動態が機能発現に関与するかが解明されると考えた。しかし実際に研究を開始してみると、この構想の実現には2つの技術的問題の解決が必要であることがわかった。

第一の問題は、どのような時間スケールの動態に注目するか、どのような側鎖のどのような動きに注目するか、そのためにはどのような測定法を用いるべきか、について私たちの研究計画はなかなか明確とならなかった。これは専門家の間でも構造動態についての理解がまだ不十分であるとの事情による。この点については、2006年に SAIL 法の開発者である甲斐荘正恒博士と出会い、甲斐荘博士が名古屋大学に研究拠点を移される決意をされ、名古屋大学構内で間近に研究活動を見聞する機会を得て、はじめてこの点について明確な計画を持つことができるようになった。すなわち、Tyr, Phe の環状側鎖、ないしは側鎖のメチル基などの回転は蛋白質の機能に重要と考えられるミリ秒程度の時間で一回転する。この回転速度を計測することによって蛋白質分子全体にわたる大きな構造の揺動を計測することが可能となる。この揺動の正確な計測は SAIL 法で標識した蛋白質を使うことによって可能となる。これらの点は2008年を通じての甲斐荘グループの研究(未発表)で明確となってきた。

第二の問題は、試料調製の問題である。私たちは動態解明の最初の対象を心筋トロポニンとした。これは自分たちで結晶構造を解明した蛋白質であるという理由のみではなく、心筋症を発症する変異が数多く知られており、しかも変異に起因する機能変調も調べられていたからである。しかしこれまで NMR 法による心筋トロポニンの研究論文は発表されていない。私たちがそれに挑戦してはじめて分子の会合体形成が障害であることがはっきりした。Michael Lassalle はこの問題に正面から取り組み、グルタミン酸とリシンをそれぞれ 50mg を蛋白質溶液に加えることによって心筋トロポニンの会合形成をほぼ抑えることに成功した(と思われた)。その結果、構造を形成していない部分からはじめて NMR 信号を得ることができたが、構造を形成している中核部分からはまったく信号を得ることができなかった。これは、未だ分子3-4個の小さな会合体を解離させることができていないためと考えている。

以上のような理由から、心筋トロポニンの構造動態研究を全面的に展開するには至らなかった。しかし6-1で述べたように、トロポニン、トロポミオシン、アクチンのそれぞれについて、動態計測の具体的な対象を明確にしたこと、SAIL 法開発者である甲斐荘グループとの共同研究体制を構築できたことで、今後この研究を本格的に展開する条件がほぼ整備できたと考えている。

第5章 成果リスト

5-1 論文

[2008]

1. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. Toshiro Oda, Mitsusada Iwasa, Tomoki Aihara, Yuichiro Maéda, Akihiro Narita, **Nature** 457, 441-445 (2009)
2. FtsZ condensates: An in vitro electron microscopy study. David Popp, Mitsusada Iwasa, Akihiro Narita, Harold P. Erickson & Yuichiro Maéda, **Biopolymers** in press, January 9, 2009 online
3. Effect of short-range forces on the length distribution of fibrous cytoskeletal proteins. David Popp, Nir S. Gov, Mitsusada Iwasa and Yuichiro Maéda, **Biopolymers** 89, 711-721 (2008)
4. Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle α -actin mutants. Mitsusada Iwasa, Kayo Maeda, Akihiro Narita, Yuichiro Maeda, Toshiro Oda **J. Biol. Chem.** 283, 21045-21053 (2008)
5. Assembly and Disassembly Dynamics of the Cyanobacterial Periodosome. Shuji Akiyama, Atsuhiko Nohara, Kazuki Ito, Yuichiro Maeda **Molecular Cell** 29, 703-716 (2008)
6. Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide driven dynamic instability. David Popp, Akihiro Narita, Toshiro Oda, Tetsuro Fujisawa, Hiroshi Matsuo, Yasushi Nitani, Mitsusada Iwasa, Hirofumi Onishi, Kayo Maeda & Yuichiro Maeda **EMBO Journal** 27, 570-579 (2008)
7. Two-crystal structures of tropomyosin C-terminal fragment 176-273: exposure of the hydrophobic core to the solvent destabilizes the tropomyosin molecule. Shiho Minakata, Kayo Maeda, Naoko Oda, Katsuzo Wakabayashi, Yasushi Nitani, and Yuichiro Maeda **Biophysical Journal** 95, 710-719 (2008)
8. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of full-length yeast tropomyosin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. Vladimir Meshcheryakov, Yasushi Nitani, Robin Maytum, Michael A. Geeves, and Yuichiro Maeda **Acta Cryst.** F64: 528-530 (2008).
9. Single molecule polymerization, annealing and bundling dynamics of SipA induced actin filaments. David Popp, Akihiro Yamamoto, Mitsusada Iwasa, Yasushi Nitani and Yuichiro Maeda **Cell Motility and the Cytoskeleton** 65: 165-177 (2008)

[2007]

10. Three-dimensional structure of cytoplasmic dynein bound to microtubules. Naoko Mizuno, Akihiro Narita, Takahide Kon, Kazuo Sutoh, and Masahide Kikkawa **Proc. Nat. Acad.**

Sci. USA 104, 20832-20837 (2007)

11. Molecular Determination by Electron Microscopy of the Dynein–Microtubule Complex Structure. Akihiro Narita, Naoko Mizuno, Masahide Kikkawa and Yuichiro Maéda **Journal of Molecular Biology** 372, 1320-1336 (2007)
12. A close look at energy transduction in muscle. Hirofumi Onishi、Manuel F. Morales **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 12714-12719 (2007)
13. Crowded surfaces Change Annealing Dynamics of Actin Filaments. David Popp, Akihiro Yamamoto, Yuichiro Maeda **J. Mol Biol.** 368, 365-74 (2007)
14. Molecular Determination by Electron Microscopy of the Actin Filament End Structure. Akihiro Narita, Yuichiro Maéda **J. Mol. Biol.** 365, 480-501 (2007)

[2006]

15. Concerning the dynamic instability of actin homolog ParM. David Popp, Akihiro Yamamoto, Akihiro Narita, Mitsusada Iwasa, Kayo Maeda, Yuichiro Maéda **Biochem Biophys Res Commun.** 353,109-114 (2006)
16. Direct visualization of actin nematic network formation and dynamics David Popp, Akihiro Yamamoto, Mitsusada Iwasa, Yuichiro Maéda **Biochem Biophys Res Commun.** 351, 348-53 (2006)
17. Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. Akihiro Narita, Shuichi Takeda, Atsuko Yamashita, Yuichiro Maéda **EMBO Journal** 25, 5626-5633 (2006)
18. Two-dimensional averaged images of the dynactin complex revealed by single particle analysis. Hiroshi Imai, Akihiro Narita, Trina A. Schroer, Yuichiro Maéda **J. Mol. Biol.** 359, 833-839 (2006)
19. Toward understanding actin-activation of myosin ATPase: The role of myosin surface loops. Hirofumi Onishi、Sergey, V. Mikhailenko, Manuel F. Morales **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 6136-6141 (2006)

[2005]

20. Position and Orientation of Phalloidin in F-Actin Determined by X-Ray Fiber Diffraction Analysis. Toshiro Oda , Keiichi Namba and Yuichiro Maéda **Biophysical Journal** 88, 2727-36 (2005)

[2004]

21. Conformational changes of troponin C within the thin filaments detected by neutron scattering. Fumiko Matsumoto, Kouji Makino, Kayo Maeda, Heiko Patzelt, Yuichiro Maéda, and Satoru Fujiwara **J. Mol. Biol.** 342, 1209-21 (2004)

22. Capping protein binding to actin in yeast: Biochemical mechanism and physiological relevance. Kyoungtae Kim, Atsuko Yamashita, A. Martin, A. Wear, Yuichiro Maeda, and John A. Cooper **J. Cell Biol.** 164, 567-80 (2004)

5-2 招待講演

1. The G- to F-actin structural transition. Toshiro Oda ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
2. Our efforts to prepare fixed length mini-filaments composed of Actin, Troponin and Tropomyosin. Chieko Kimura、Kayo Maeda、Hiroshi Imai、**Yuichiro Maeda** ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
3. Crystal structure of actin capping protein in complex with V-1. Shiichi Takeda ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
4. How does the actin filament activate myosin-catalyzed ATP hydrolysis and move the lever arm of the myosin? Hirofumi Onishi、Manuel F. Morales ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
5. The flexibility of tropomyosin revealed by crystal structures. Shiho Minakata, Kayo Maeda, Naoko Oda, **Yuichiro Maeda**, Yasushi Nitani ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
6. Structure determination of actin filament end structure. Akihiro Narita ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
7. Dual Roles of Q137 of Actin Revealed by Recombinant Human Cardiac Muscle alpha-Actin Mutants. Mitsusada Iwasa, Kayo Maeda, Akihiro Narita, **Yuichiro Maeda**, and Toshiro Oda ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
8. Three dimensional structure of the dynactin complex containing Arp1 polymer as the backbone. Hiroshi Imai, Akihiro Narita, T. A. Schroer, and **Yuichiro Maeda** ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
9. An overview of our study on the actin/Tm/Tn complex. **Yuichiro Maeda** ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
10. Suprastructures and underlying physical principles of the bacterial cytoskeleton. David Popp ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11
11. アクチン細胞骨格系の構造解析 前田雄一郎 蛋白質立体構造解析 NEDO 特別講座 構造生物学講座 2008 9
12. The nature of G- to F-actin transition. **Yuichiro Maeda** Gordon Research Conferences on “Muscle and molecular motors” 2008 6
13. High resolution structure of polymerized actin. **Yuichiro Maeda** IISc-Nagoya University Joint Science and Technology Seminar 2008 6
14. Towards understanding the mechanism of calcium regulation. **Yuichiro Maeda** IISc-Nagoya University Joint Science and Technology Seminar 2008 6
15. Actin dynamics. **Yuichiro Maeda** IISc-Nagoya University Joint Science and

Technology Seminar 2008 6

16. 独自の画像解析法による正常蛋白質複合体の三次元構造決定 成田哲博、**前田雄一郎** 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会 2008 5
17. 家族性心筋症と調節蛋白質トロポニンの構造の揺れ **前田雄一郎** 第 56 回 循環力学研究会 2008 5
18. Structure and Function of Muscle Regulatory Proteins. **Yuchiro Maeda** Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress 2008 2
19. Newly Emerging Possibilities in Structural Biology **前田雄一郎** 日本分子生物学 2006 フォーラム 2006 12
20. 「タンパク質分子の動態と機能の関係」動きがおかしいタンパク質は病気を起こす? **前田雄一郎** 第 12 回名古屋大学理学懇話会生命の「核」を衝く-X 線でみるタンパク質の動的構造- 2006 12
21. クライオ電子顕微鏡法を用いたアクチンフィラメント端の構造決定 成田哲博; 武田修一; 山下敦子; **前田雄一郎** 日本分子生物学会 2006 フォーラム 2006 12
22. 蛋白質分子の動態と機能発現のメカニズムの関係を理解するにはどうしたらよいか? **前田雄一郎** 第二回「生物物理学的アプローチによるゲノム情報解析研究会」 2006 9
23. Flexibility and flexibility changes in troponin-tropomyosin complex and the mechanism of regulation of muscle contraction. **Yuichiro Maeda** Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006 9
24. カルシウム調節、トロポニン、心疾患原子構造からメカニズムの理解へ **前田雄一郎** 名古屋市立大学薬学部 2006 6
25. Initiating “structural physiology” for understanding the mechanism of calcium regulation of muscle contraction. **Yuichiro Maeda** Max-Planck-Institut für Molecular Physiology Lab of R.S.Goody 2006 5
26. 筋収縮のカルシウム調節のメカニズム：原子構造を見てわかること、わからないこと **前田雄一郎** 京都大学理学部玉城講演会 2005 11
27. Modeling of F-actin structure using electron microscopy and X-ray fiber diffraction. Toshiro Oda トロポニン発見 40 周年記念国際シンポジウム 2005 10
28. Structural basis of troponin-tropomyosin mediated calcium regulation **Yuichiro Maeda** トロポニン発見 40 周年記念国際シンポジウム 2005 10
29. Crystal structure of tropomyosin: a flexible coiled-coil. Yasushi Nitani, Kayo Maeda, Naoko Oda, Shiho Minakata, **Yuichiro Maeda** トロポニン発見 40 周年記念国際シンポジウム 2005 10
30. Aiming at elucidating atomic structures of muscle thin filament complex. **Yuichiro Maeda** University of Firenze, Department of Physiology 2005 9

31. 「筋収縮のカルシウム調節のメカニズム：構造を見てわかること、わからないこと」**前田雄一郎** 第43回 茅コンフェレンス「ナノとバイオの融合が拓く新展開」2005 8
32. 「筋収縮のカルシウム調節のメカニズム：構造を見てわかること、わからないこと」**前田雄一郎** 阪大・医・高井研セミナー 2005 7
33. これからの構造生物学とは何か？どのように研究を組織すべきか？ **前田雄一郎** 科学技術の未来を展望する戦略ワークショップ（JST 研究開発戦略センター主催）2005 3
34. "トロポニンの結晶構造と遺伝性心疾患の原因-- 蛋白質の結晶構造からわかること、わからないこと" **前田雄一郎** 小型シンクロトロン光源とその医療・産業応用に関する研究会, 名古屋 2004 12
35. Structure of troponin and the mechanism how it works. **Yuichiro Maeda** Structural Mechanisms in Muscle; Jean Hansons Legacy, London, United Kingdom 2004 5

5-3 学会発表

1. Myosin SH1 thiol as a sensor of rotation of the C-terminal region of the motor domain, the “converter”. Hirofumi Onishi、Yasushi Nitandai Biophysical Society 53rd Annual Meeting 2009 2 ポスター
2. Thermal Stability and Domain Flexibility Analyses of Cardiomyopathy Troponin Mutants (TnT E244D and K247R) by using DSC and SDSL-EPR. Motoyoshi Nakamura, Yasushi Nitandai, Fumiko Matsumoto, Katsuhide Yutani, **Yuichiro Maeda** ERATO workshop “Actin filament, from Structure to Mechanism” 2008 11 ポスター
3. Crystal structure of actin capping protein is complex with V-1 (myotrophin). Shuichi Takeda, Yasushi Nitandai, Shiho Minakata, **Yuichiro Maeda** 第60回日本細胞生物学会 2008 6 ポスター
4. The weak-to strong conformational change of the actin-myosin complex. Hirofumi Onishi, Manuel F. Morales Gordon Research Conferences on Muscle and molecular motors 2008 6 口頭・ポスター
5. Enhanced force generated by destabilization of IT coiled-coil of troponin core domain: Cardiomyopathy-causing mutations K247R and E244D of troponin T **Yuichiro Maeda**, Yasushi Nitandai, Toshiro Oda, Fumiko Matsumoto, Satoru Fujiwara, Kayo Maeda Thick and Thin Filament Regulation in Striated Muscle 2008 5 ポスター
6. ダイナクチン複合体の構造と機能 今井洋、成田哲博、谷本博信、古田真弓、前田佳代、T. A. Schroer、**前田雄一郎** 生体運動研究合同班会議 2008 1 口頭
7. Energy Transduction in Muscle Contraction. Hirofumi Onishi、Manuel F. Morales Biophysical Society 52th Annual Meeting and 16th International Biophysics Congress (IUPAB) 2008 2 ポスター
8. X線小角散乱を用いたシアノバクテリア由来の時計蛋白質 KaiC の構造変化 野原淳志、**前田雄一郎**、伊藤和樹、西脇妙子、景山伯春、近藤孝男、秋山修志 日本生物物理学会第45回年会 2007 12 ポスター
9. 重合核形成因子 Spire によるアクチン二量体形成の促進 伊藤卓冬、小田俊郎、**前田雄一郎** 日本生物物理学会第45回年会 2007 12 ポスター
10. 組換えヒト心筋 α -アクチンの変異体解析で明らかとなったアクチン重合時におけるQ137の2つの重要な役割について 岩佐 充貞, 前田 佳代, 成田 哲博, **前田 雄一郎**, 小田 俊郎 日本生物物理学会第45回年会 2007 12 口頭/ポスター
11. 組換えヒト心筋 α -アクチンの変異体解析で明らかとなったアクチン重合時におけるQ137の2つの重要な役割について 岩佐 充貞, 前田 佳代, 成田 哲博, **前田 雄一郎**, 小田 俊郎 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 2007 12 口頭/ポスター
12. 新規のアクチンフィラメントの長さの固定法～ミニフィラメントの構築～

- 木邑(崎山)智恵子、前田佳代、今井洋、**前田雄一郎** 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 2007 12 ポスター
13. Structures of the actin filament ends revealed by cryo-EM Akihiro Narita, Shuichi Takeda, Atsuko Yamashita, **Yuichiro Maéda** IV. International Conference on Molecular Recognition 2007 8 口頭
 14. New Insights into the Dynamical and Structural Instability of Actin Homolog ParM. David Popp, Akihiro Narita, Tetsuro Fujisawa, Hiroshi Matsuo, Akihiro Yamamoto, Mitsusada Iwasa, Yasushi Nitani, Toshiro Oda, Kayo Maeda, **Yuichiro Maeda** Gordon Conference Motile and Contractile Systems 2007 7 ポスター
 15. Effect of short range forces on the length distribution of fibrous cytoskeletal proteins. David Popp, Nir s. Gov, Akihiro Yamamoto, Mitsusada Iwasa, **Yuichiro Maeda** Gordon Conference Motile and Contractile Systems 2007 7 ポスター
 16. Single Molecule Polymerization, Annealing and Bundling Dynamics of SipA Induced Actin Filaments. David Popp, Akihiro Yamamoto, Mitsusada Iwasa, Yasushi Nitani, **Yuichiro Maeda** Gordon Conference Motile and Contractile Systems 2007 7 ポスター
 17. アクチンキャッピングタンパク質のフィラメント結合機構の解析 武田修一、成田哲博、**前田雄一郎** 第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会 2007 5 ポスター
 18. Structural bases for the flexibility of skeletal muscle tropomyosin. Shiho Minakata, Kayo Maeda, Naoko Oda, **Yuichiro Maéda**, Yasushi Nitani Alpbach Workshop on Molecular Motors 2007 3 口頭
 19. A Molecular Mechanism of Energy Transduction in Muscle Contraction. Hirofumi Onishi, Manuel F. Morales Alpbach Workshop on Molecular Motors 2007 3 口頭
 20. A new image analysis to determine the dynein-microtubule complex structure. Akihiro Narita, Naoko Mizuno, Masahide Kikkawa, **Yuichiro Maeda** Biophysical Society 51st Annual Meeting 2007 3 口頭
 21. アクチンの重合と ATPase の両方に関与すると考えられる部位のアクチン発現系を用いた変異体機能解析 岩佐充貞、前田佳代、成田哲博、**前田雄一郎**、小田俊郎 大沢先生勉強会 2007 2 口頭
 22. ウサギ骨格筋トロポミオシン C 末端フラグメントの結晶構造解析と結晶構造から見るトロポミオシンの柔軟性 南方志帆、似内靖、前田佳代、小田直子、若林克三、**前田雄一郎** 2007 年 生体運動研究合同班会議 2007 1 口頭
 23. Modeling of F-actin 小田俊郎 **前田雄一郎** 第 44 回日本生物物理学会年会・第 5 回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議 2006 11 ポスター
 24. Dual roles of Q137 of actin revealed by use of recombinant human cardiac α -actin. 岩佐充貞、前田佳代、成田哲博、**前田雄一郎**、小田俊郎 51st Biophysical Society Annual Meeting 2007 3 口頭

25. Pointed end structure of Actin Filament Akihiro Narita, Toshiro Oda, **Yuichiro Maeda**
第44回日本生物物理学会年会・第5回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議
2006 11 ポスター
26. Real-Time SAXS Observation of Assembling-Disassembling Cycles of Cyanobacterial
Circadian Clock Proteins. Atsushi Nohara, Kazuki Ito, **Yuichiro Maeda**, Takao Kondo,
Shuji Akiyama 第44回日本生物物理学会年会・第5回東アジア生物物理学シンポ
ジウム合同会議 2006 11 ポスター
27. The binding mechanism of capping protein (CP) to barbed and of actin filament. 武田修
一、成田哲博、森井博史、**前田雄一郎** 第44回日本生物物理学会年会・第5回東
アジア生物物理学シンポジウム合同会議 2006 11 ポスター
28. Dual roles of Q137 of actin revealed by use of recombinant human cardiac α -actin. 岩
佐充貞、前田佳代、成田哲博、**前田雄一郎**、小田俊郎 The 21st European
Cytoskeleton Forum 2006 10 ポスター
29. A mechanism how the capping protein (CP) caps the actin filament barbed-end, proposed
based on the single particle analysis of cryo-EM images. **Yuichiro Maeda** The 21st
European Cytoskeleton Forum 2006 10 口頭
30. A FRET model of the Troponin-Tropomyosin complex. Chieko Kimura-Sakiyama, Yutaka
Ueno, Keiko Uewasa, Katuzo Wakabayashi, and Masao Miki 第44回日本生物物理学会
年会・第5回東アジア生物物理学シンポジウム合同会議 2006 11 ポスター
31. Crowded Hydrophilic Surfaces Change Annealing Dynamics of Actin Filaments. David
Popp 16th International Microscopy Congress 2006 9 ポスター
32. An establishment and analysis of recombinant wild-type and mutant human cardiac actins
岩佐 充貞, 佐野 健一, 前田 佳代, 小田 俊郎, **前田 雄一郎** Fifth East Asian
Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of
Japan 2006 11 ポスター
33. Conformational states of tropomyosin molecule on muscle thin filament as studied by
site-directed spin labeling ESR. Keisuke Ueda, Chieko Kimura, Tomoki Aihara, Shoji
Ueki, Masao Miki, and Toshiaki Arata 20th IUBMB and 11th FAOBMB Congress
2006 8 ポスター
34. The dynactin complex structure revealed by single particle analysis. H.Imai, A.Narita,
T.A.Schroer, and **Y.Maeda** "Gordon Research Conference (three dimensional electron
microscopy) " 2006 6 ポスター
35. 蛍光 1 分子方位計測法に使用する 2 価蛍光色素の合成と蛋白質 への結合 平山
祐, 山本行男, 中村志芳, **前田雄一郎** 理研・分子研合同シンポジウム エクスト
リームフォトリクス研究 第3回「エクストリーム波長の発生と応用」プログラ
ム 2006 4 ポスター
36. 蛍光 1 分子方位計測法の筋のカルシウム調節機構解明への応用 中村志芳、平山祐、

- 銭旻浩、David Pop、**前田雄一郎** 理研・分子研合同シンポジウム エクストリームフォトニクス研究 第3回「エクストリーム波長の発生と応用」プログラム 2006 4 ポスター
37. The structure of F-actin and CapZ complex. Akihiro Narita, Atuko Yamashita, **Yuichiro Maeda** Biophysical Society 50th Annual Meeting 2006 2 口頭
38. Crystal structure of tropomyosin: a flexible coiled-coil. Yasushi Nitani, Kayo Maeda, Naoko Oda, Shiho Ninakata, **Yuichiro Maeda** Biophysical Society 50th Annual Meeting 2006 2 ポスター
39. Roles of myosin surface loops in binding actin, and in “actin activation” of myosin ATPase. Hirofumi Onishi, Sergey V. Mikhailenko, and Manuel F. Morales Biophysical Society 50th Annual Meeting 2006 2 ポスター
40. 単粒子解析法によるダイナクチン複合体の2次元平均像 今井 洋, 成田哲博, T.A.Schroer, **前田雄一郎** 生体運動研究合同班会議 2005 12 口頭
41. 電子顕微鏡写真からアクチンフィラメントの端の構造を決定する新しい画像処理法 成田哲博、武田修一、山下敦子、**前田雄一郎** 生体運動研究合同班会議 2005 12 口頭
42. ウサギ骨格筋トロポミオシンC末端フラグメントの結晶構造解析 似内 靖、前田佳代、小田直子、南方志穂、**前田雄一郎** 日本結晶学会2005年会 2005 12 口頭
43. アクチンの重合阻害のメカニズム 小田俊郎、**前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 ポスター
44. クライオ電子顕微鏡写真からアクチンフィラメント端の三次元構造を決定するための新しい画像処理法 成田哲博、山下敦子、**前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 ポスター
45. キャッピングタンパク質(CapZ)のアクチンフィラメント結合機構の解析 武田修一、成田哲博、森井博史、**前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 ポスター
46. ミオシンモーターにおける力発生機構の解明: ATP加水分解からレバー・アーム回転に至る情報の流れ 尾西裕文 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 口頭
47. ダイナクチンのショルダー複合体の物理化学的性質の解析 古田真弓、前田佳代、今井洋、**前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 ポスター
48. Dynactin 複合体の構成成分 dynamitin(p50)のドメイン構造 谷本博信、前田佳代、今井洋、**前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 ポスター
49. 単粒子解析法によるダイナクチン複合体の2次元平均像 今井 洋, 成田哲博, T.A.Schroer, **前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005

11 ポスター

50. 昆虫細胞を用いた高効率ヒトアクチン発現系の構築と変異アクチンの機能解析
岩佐充貞, 佐野健一, 前田佳代, **前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 ポスター
51. ウサギ骨格筋 α トロポミオシンC末端フラグメントの結晶構造解析; トロポミオシンの曲がりの結晶学的な証拠 似内靖、前田佳代、小田直子、南方志帆、**前田雄一郎** 日本生物物理学会、第43回(2005年度)年会 2005 11 ポスター
52. Two-dimensional averaged images of the dynactin complex revealed by single particle analysis. Hiroshi Imai, Atsuhiro Narita, Trina A.Schroer, and **Yuichiro Maeda** DYNEIN 2005 11 口頭
53. 骨格筋 HMM 溶液構造の温度・圧力依存性 藤澤哲郎、桑本滋生、**前田雄一郎**、岡本洋 第14回 生物関連高圧研究会シンポジウム 2005 9 口頭
54. Aiming at elucidating atomic structures of muscle thin filament complex. **Yuichiro Maeda**, Yasushi Nitani, Toshiro Oda Alpbach Workshop: "Coiled-coils, collagen and co-proteins IV" 2005 9 口頭
55. Switching to an alternative posture of two heads of skeletal muscle heavy meromyosin induced under high pressure: a synchrotron small-angle X-ray Scattering study Tetsuro Fujisawa, Shigeo Kuwamoto, **Yuichiro Maeda**, Yo Okamoto Trends in High Pressure Protein Sciences 2005 9 口頭
56. Probing two heads configuration of heavy meromyosin by high-pressure SAXS technique. Tetsuro Fujisawa, Shigeo Kuwamoto, **Yuichiro Maeda**, Yo Okamoto XX congress of the international union of crystallography 2005 8 口頭
57. A two-dimensional averaged structure of negatively stained dynactin complex. H.Imai, A.Narita, T.A.Schroer, **Y.Maeda** Gordon Research Conference: Motile & Contractile Systems 2005 7 ポスター
58. Determining Structures of Ends of Actin Filaments Atsuhiro Narita, Atsuko Yamashita, **Yuichiro Maeda** Gordon Research Conference: Motile & Contractile Systems 2005 7 ポスター
59. Calcium-induced conformational change of tropomyosin - troponin in the thin filament. Toshiro Oda, Kouji Makino, Shuichi Takeda, Fumiko Matsumoto, **Yuichiro Maeda** Gordon Research Conferences, Muscle: Contractile Proteins 2005 7 ポスター
60. Tropomyosin crystal structure and structural changes of the regulatory proteins upon Ca^{2+} -binding. **Yuichiro Maeda**, Toshiro Oda, Yasushi Nitani Gordon Research Conferences, Muscle: Contractile Proteins 2005 7 ポスター
61. The Crystal Structure of C-terminal Fragment of Rabbit Skeletal α -Tropomyosin; Crystallographic Evidence of Tropomyosin Bending. Yasushi Nitani Kayo Maeda, Naoko Oda, Shiho Ninakata, **Yuichiro Maeda** Gordon Research Conferences, Muscle:

- Contractile Proteins 2005 7 ポスター
62. Myosin surface loops involved in motility and actin activation. Hirofumi Onishi, Sergey, V. Mikhailenko, Manuel F. Morales Gordon Research Conference: Muscle: Contractile Proteins 2005 7 ポスター
 63. 核外輸送複合体の結晶構造 松浦能行 第5回 日本蛋白質科学会年会 2005 7 口頭
 64. A new image analysis to determine three dimensional structure of the end of actin filements. Akihiro Narita, Atuko Yamashita, **Yuichiro Maeda**. Gordon Research Conference: Three Dimensional Electron Microscopy 2005 6 ポスター
 65. Structure of actin-tropomyosin-troponin complex and the mechanism of calcium regulation of muscle contraction. **Yuichiro Maeda** 国際生理学会総会 (IUPS = International Union of Physiological Sciences) 2005 4 口頭
 66. Conformational changes of troponin C within the thin filaments detected by neutron scattering Fumiko Matsumoto, Kouji Makino, Kayo Maeda, Heiko Patzelt, **Yuichiro Maeda** Biophysical Society 49th Annual Meeting 2005 2 ポスター
 67. Ca²⁺によりひき起こされる筋肉細いフィラメントの構造変化 小田俊郎、牧野浩司、武田修一、松本富美子、**前田雄一郎** 生体運動研究合同班会議, 大阪 2005 1 口頭
 68. ヒト筋肉アクチン発現系の構築 岩佐充貞、佐野健一、前田佳代、**前田雄一郎** 生体運動研究合同班会議,大阪 2004 12 口頭
 69. 中性子小角散乱による細いフィラメント中の TnI の構造解析にむけて 松本富美子、弟子丸俊吾、前田佳代、**前田雄一郎**、藤原悟 第42回日本生物物理学会年会, 京都 2004 12 ポスター
 70. Modeling of F-actin: X-ray fiber diffraction and cryoelectron microscopy. Toshiro Oda, **Yuichiro Maeda** Wenner-Gren Foundations International Symposium “Force Generation in Biological Systems”, Stockholm, Sweden 2004 8 ポスター
 71. Fiber diffraction patterns from native thin filament sols-Interpretation of thin filament structure. Toshiro Oda Alpbach workshop on “Molecular Motors”, Alpbach, Austria 2004 3 ポスター
 72. Modeling of F-actin: X-ray fiber diffraction and cryoelectron microscopy. **Yuichiro Maeda**, Toshiro Oda Alpbach workshop on “Molecular Motors”, Alpbach, Austria 2004 3 口頭

5-4 書籍等

1. Thiol reactivity as a sensor of rotation of the converter in myosin. Hirofumi Onishi, Yasushi Nitani Biochem. Biophys. Res. Commun. 369, 115-123 (2008)
2. トロポニン構成蛋白質の相互作用 前田雄一郎 生体の科学 58巻5号 (2007)
3. アクチンフィラメント端の伸長制御機構 成田 哲博 月刊 Bionics 3月号 (2007)
4. Modeling of the F-Actin Structure. Toshiro Oda, Heiko Stegmann, Rasmus R. Schröder, Keiichi Namba, and **Yuichiro Maéda** Regulatory mechanisms of striated muscle contraction (eds. S. Ebashi, I. Ohtuki) (2006)
5. From the crystal structure of troponin to the mechanism of calcium regulation of muscle contraction. **Yuichiro Maéda**, Yasushi Nitani and Toshiro Oda Regulatory mechanisms of striated muscle contraction (eds. S. Ebashi, I. Ohtuki) (2006)
6. Crystal structures of tropomyosin: flexible coiled-coil. Yasushi Nitani Kayo Maeda, Naoko Oda, Shiho Minakata, **Yuichiro Maéda** Regulatory mechanisms of striated muscle contraction (eds. S. Ebashi, I. Ohtuki) (2006)
7. アクチンの比較生物学 小田俊郎 生体の科学 56巻6号 564-570 (2005)
8. 結晶構造を解明してから始まる生理学の新しい展開--トロポニン・トロポミオシン・アクチンによるカルシウム調節メカニズムの研究 前田雄一郎 生体の科学 56巻6号 556-563 (2005)
9. 蛋白質複合体結晶構造が明らかにした蛋白質相互作用の多様性、巧妙性：核外輸送複合体の場合 松浦能行 生体の科学 56巻6号 564-570 (2005)

5-5 特許（国内、海外）

なし

5-6 受賞関係

なし

5-7 プレス発表等

プレス発表：平成 18 年 11 月 17 日「細胞が形状を変えながら移動する謎の一端を解明」

掲載記事：平成 18 年 11 月 17 日 日経産業新聞 朝刊

平成 18 年 11 月 17 日 日本経済新聞 朝刊

平成 18 年 11 月 17 日 日刊工業新聞 朝刊

記事掲載：平成 19 年 7 月 27 日 日経産業新聞

記事掲載：平成 19 年 8 月 2 日 日刊工業新聞

プレス発表：平成 21 年 1 月 22 日「X 線繊維回析でアクチンフィラメントの構造を解明」

掲載記事：平成 21 年 1 月 22 日 日経工業新聞

平成 21 年 1 月 26 日 朝日新聞 朝刊