総説

アクチンのフィラメント構造と重合機構 ——重合によるATPase活性化のメカニズム——

若林健之, 村上健次 帝京大学理工学部バイオサイエンス学科・医療技術学部柔道整復学科

Actin assembly activates ATP hydrolysis, which provides structural cues for filament turnover. Polymerized actin supports cellular signaling, intracellular trafficking, and cytokinesis. We present the cryo-electron microscopic structure of F-actin in the presence of phosphate, with the visualization of some α -helical backbones and large side chains. A complete atomic model based on the cryo-EM identified intermolecular interactions, some of which were mediated by magnesium or phosphate ions. A critical role for bending of the proline-rich loop (residues 108-112) in activating ATPase was revealed. Crystal structures of G-actin mutants, which trap the catalytic site in two intermediate states, were solved. These structures combined with cryo-EM data allows us to propose a molecular mechanism for actin assembly and ATPase activation, critical for filament dynamics.

Electron cryo-microscopy / X-ray crystallography / Actin Polymerization / ATP Hydrolysis / Phosphate release

1. 構造から機能へ

アクチンは細胞運動, 細胞接着, 細胞内トラフィック, 細胞分裂などの細胞機能に必要である。筋収縮にはフィラメントそのものが大切であり, 糸状仮足の伸長にはアクチンの動的な重合・脱重合が重要である。フィラメントの伸長はプラス端方向に優先的に起こり, そこではアクチンはATP型である。逆の端(マイナス端)では脱重合しやすい。これをトレッドミリング(treadmilling)とよび, マイナス端で脱重合しやすいのはADP型であるためとされている¹⁾。これはフィラメントでATP分解・リン酸放出が起こるからである。重合には Mg^{2+} が重要であり²⁾, KClよりも50倍以上, Ca^{2+} より数倍も効果的なのはなぜなのか, 基本的性質なのによくわからなかった。

アクチン分子はフィラメント軸に近い内側ドメインと軸から遠い外側ドメインからなる。どちらもさらに2つのサブドメインに分けられ, どれもヌクレオチドと接触している³⁾。重合の際, ATP加水分解速度に較べリン酸(Pi)放出は遅いので, しばらくADP+Pi状態が続く。リン酸は脱重合を遅くし⁴⁾Fアクチン構造を安定化する。これらを理解するためにも, Fアクチンの高分解能構造解析が大切である。X線繊維回折データからのモデリングから構造が提案されてきたが⁵⁾⁻⁷⁾, 重合とATP分解の連関の詳細や Mg^{2+} やリン酸の所在と機能の関係は不明だった。

2. 電子顕微鏡の改良とX線結晶解析との連携

Fアクチンはクライオ電子顕微鏡で観察できるが, 結晶化は難しい。クライオ電顕の弱点として, 十分なコントラストを得るにはデフォーカスが必要だが, 電子ビームのコヒーレンスが不完全な場合デフォーカス量を増すと分解能が下がるという問題がある⁸⁾。

このジレンマ解消のため, 私たちは電子線ホログラフィー用に開発された冷電界放出銃からの高コヒーレンス電子ビームを用いた(EF-2000, Hitachi)。エネルギーフィルターを用いてコントラストを向上させ1.5 μm 以下の低いデフォーカス量でもFアクチンを認識できるようにし(図1左), 特殊蛍光板を備えた高分解能高感度CCDカメラを開発した⁹⁾。改良の結果, 炭素薄膜像のフーリエ変換の高分解能成分の劣化を軽減でき, 4 Åの分解能までの12個ほどの明暗のリングが観察できるようになった。

Gアクチンが重合した際の構造変化を知れば, その変化をGアクチン状態で模倣する変異を工夫できる(第4節参照)。その変異アクチンの結晶構造から原子レベルでの機能可視化をめざした。細胞性粘菌で変異アクチンを発現・精製し¹⁰⁾, ATP/ADP結合部位の変化を2.39 Åの分解能で観察できた¹¹⁾。

Structure of Actin Filament and Mechanism of ATPase Activation upon Actin Assembly

Takeyuki WAKABAYASHI and Kenji MURAKAMI

Department of Biosciences, School of Science and Engineering; Department of Judo Therapy, Faculty of Medical Technology, Teikyo University

図 1 F アクチンのクライオ電子顕微鏡像 (左) とそれらに基づく原子モデル (右)。

3. アクチンフィラメント (F アクチン) の構造

F アクチンは柔らかいが、リン酸 (10 mM) を加えるとピンとなる¹²⁾。ほぼ真っ直ぐな短いセグメント (アクチン分子 26 個, 約 720 Å) を単粒子解析し立体構造を求めた。マイナス端の 14 分子は互いに構造がよく相関したので, 14 分子の構造の平均像でアクチン分子の電顕像を表現することができた。

F アクチンの中心部で 3 分子が相互作用する領域では電顕マップは良質で α ヘリックスや Thr-rich loop (残基 197-204) を観察できた (図 2, 動画 1)。N 端から C 端までのポリペプチド鎖を fitting できた。しかし DNase I 結合ループ (D ループ) 中央部 (残基 41-48) や C 端の α ヘリックス (残基 369-373) はそれほどはっきりせず, 図 1 右のこの部分の 2 次構造は最終的なものとは限らない。Galkin ら¹³⁾ によれば D ループは複数の構造を取る。図 1 右の紫の分子で, D ループは Lorenz らのモデル⁶⁾ ではより手前側にあり, 私たち¹¹⁾ のモデルや藤井ら¹⁴⁾ のモデルでは奥にあり, 小田らのモデル⁷⁾ ではそれらの間にある。

アクチン 3 分子が相互作用している領域 (全体の 44%) の分解能は約 5 Å または約 8 Å であった (単粒子解析の分解能の指標である Fourier Shell 相関 FSC = 0.143 または 0.5 の基準から求めた)。表面領域では電顕マップの質はそれほどよくない。それでもモバイルヘリックス (図 3 左: 残基 226-230, 文献 11 Figure S1 (G)), N 端セグメント (残基 1-5 文献 11 Figure S1 (H)) が一端側に伸びていることも観察でき藤井ら¹⁴⁾ の結果とも一致する。表面部分も含めた全体での分解

図 2 F アクチンの 3 分子結合領域のクライオ電顕マップ (立体図)。

図 3 重合した際の構造変化の概略 (左 PDB 3G37) と F アクチンに結合したリン酸 (等高線 (5 σ)) (右)。

図 4 ヌクレオチド結合領域の X 線結晶構造: 野生形 (左 1NM1) と F アクチン構造を模倣した変異型 (右 3A5L, Pro109Ala)。

能は約 6 Å または約 11 Å であった。

この電顕マップに初期構造として G-ADP アクチン結晶構造をフィットし水分子存在下での分子動力学¹⁵⁾で精密化して原子モデルを構築した (図 1 右)。原子モデルと比較し有意に余剰の電顕密度を, 負電荷で囲まれている場合 Mg^{2+} , 正電荷で囲まれている場合リン酸と解釈した。G アクチン結晶構造でも Mg^{2+} に対応する場所に Mg^{2+} または Ca^{2+} があり, リン酸の場所に SO_4^{2-} があり, 解釈を支持する。 Mg^{2+} はアクチンの 2 分子間結合を媒介し, 低濃度で重合を促進すること

と符合する。リン酸 (Pi-1, Pi-2) を差マップの赤い等高線で示した (図 3 右)。両者とも繊維軸から半径 3 Å 以内にあり、軸近傍に密集している Arg や Lys の静電的反発を低減し F アクチンを安定化する。

F アクチン独特の構造として、円筒状の分子間洞穴 (長さ約 18 Å, 直径約 6 Å, 動画 2) があり、分子 (#1) 裏側のドメイン間の溝を、隣接 2 分子 (#0 と #2) が覆って形成される (図 1 右)。センサーループ (残基 71-77) と Pro-rich loop (残基 108-112) から形成される「バックドア」はリン酸放出を制約し、洞穴に面している。ADP の β リン酸も洞穴に面し、加水分解で生じる γ リン酸の放出経路と考えられる。リン酸結合部位も洞穴に面しており、放出途中のリン酸をトラップできる。メチル化 His73 の側鎖は洞穴に突出し通行を妨げる場所にあり、脱メチル化によりリン酸放出が加速される¹⁶⁾ ことと符号する。

4. アクチン重合の際の構造変化

F アクチンでは G アクチンの構造と比べて、外側ドメインが内側ドメインに対して回転している。詳細は文献 11 の図 2 を御参照下さい。これにより D ループはマイナス端 (一端) 側分子の C 端付近にある疎水クレフト奥側に到達しやすくなり、クレフトの手前側の開口は広がり、開口部にある Tyr143 は溶媒に露出する。これを疎水的な Phe に変異させると重合能は下がる¹¹⁾。重合で 3 分子接触は、G アクチンの結晶構造をそのまま電顕密度にはめ込んだモデルに対して約 2.5 倍に増え、諸ループは図 3 左に示すように変化した。分子の上半分のループは一端方向へシフトし、下半分にある Pro-rich loop は+端方向にシフトし、より屈曲する。Thr-rich loop のシフトで Glu205 は一端側の分子の Arg290 と塩橋を作りやすくなる。この Arg を Glu にすると重合能が低下し¹¹⁾、残基 206-208 の電荷を変えると重合しなくなる¹⁰⁾。

「バックドア」は G アクチンでは閉じており、重合で Pro-rich loop の屈曲により開く。Pro-rich loop の動きは His161 と Pro109 の間のスタッキング相互作用の破断と協奏的に生じる。そこで重合に依存せずに His161-Pro109 間の相互作用を破断するため Pro109 を Ala に変異させた。結晶解析からループが実際に+端側により屈曲しバックドアも開くことがわかった¹¹⁾ (図 4 右)。Mg-ATPase も約 10 倍活性化され¹¹⁾、うまく F アクチン状態を模倣できている。

5. 重合による ATP 分解活性化の 4 段階モデル

F アクチンの中の分子を+端から #1, #2, #3, 新たに加わる G アクチンを #0 とする (図 1 右)。

[1 段] #0 は #2 とはフィラメント軸に平行 (縦) に、#1 とは斜めに結合する。#0 と #2 の結合は疎水的⁵⁾ だが、#0 の Glu207, Gln59 に結合した Mg^{2+} (図 3 左) が #2 の Asp286, Asp288 と結合し縦結合を強化する。

[2 段] #0 の結合で #1 の外側ドメインは回転し、D ループが一端側の #3 の疎水クレフトに結合する。

[3 段] 疎水クレフトの奥側が D ループで塞がれると #3 の Pro-rich ループは+端方向により屈曲し、Pro109-His161 間のスタッキング結合が破断される。

[4 段] 破断により ATP の γ リン酸近傍で Gln137 や His161 が関与する水素結合ネットワークが分断され、水分子は γ リン酸を求核攻撃し、リン酸は開いたバックドアから洞穴へと放出される (動画 2)¹¹⁾。

本モデルでは、アクチン 3 量体重合核¹⁷⁾ への 4 個目の分子の結合が ATPase 活性化に必要である。

謝 辞

本研究は安永研究室 (九工大)、上田研究室 (産総研) との共同研究であり、野口太郎博士とンゴ博士 (上田研)、五味潤由貴 (帝京大・博士課程) に感謝します。日本学術振興会、文部科学省、HFSP (Human Frontier Science Program) に感謝します。

文 献

- 1) Carlier, M. F., Pantaloni, D. (1986) *Biochemistry* **25**, 7789-7792.
- 2) Carlier, M. F. *et al.* (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 10778-10784.
- 3) Kabsch, W. *et al.* (1990) *Nature* **347**, 37-44.
- 4) Fujiwara, I. *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8827-8832.
- 5) Holmes, K. C. *et al.* (1990) *Nature* **347**, 44-49.
- 6) Lorenz, M. *et al.* (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 826-836.
- 7) Oda, T. *et al.* (2009) *Nature* **457**, 44-445.
- 8) 堀内繁雄 (1988) 高分解能電子顕微鏡, 共立出版, 東京.
- 9) Yasunaga, T., Wakabayashi, T. (2008) *J. Electron Microsc.* **57**, 101-112.
- 10) Noguchi, T. Q. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 27721-27727.
- 11) Murakami, K. *et al.* (2010) *Cell* **143**, 275-287.
- 12) Nonomura, Y. *et al.* (1975) *J. Biochem.* **78**, 1101-1104.
- 13) Galkin, V. E. *et al.* (2010) *Nature Struct. Mol. Biol.* **17**, 1318-1323.
- 14) Fujii, T. *et al.* (2010) *Nature* **467**, 724-728.
- 15) Noda, K. *et al.* (2006) *J. Plasma Phys.* **72**, 1037-1040.
- 16) Nyman, T. *et al.* (2002) *J. Mol. Biol.* **317**, 577-589.
- 17) Oosawa, F., Kasai, M. (1962) *J. Mol. Biol.* **4**, 10-21.

若林健之

若林健之（わかばやし たけゆき）

帝京大学医療技術学部・理工学部教授

1970 年東京大学医学系大学院博士課程修了，同年 Lab. Mol. Biol. (Cambridge) 博士研究員，Exchange Fellow of Royal Society，73 年東京大学理学部助手，88 年同教授，2001 年同名誉教授，02 年より現職。

研究内容：筋収縮のカルシウム制御

連絡先：〒 320-8551 栃木県宇都宮市豊郷台 1-1

E-mail: wakabayashi@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp

村上健次（むらかみ けんじ）

Stanford 大学 R. Kornberg 研究室博士研究員

2004 年東京大学理学系研究科博士課程修了，05 年 HFSP 博士研究員（帝京大学理工学部），08 年より現職。

研究内容：RNA ポリメラーゼの再構成

E-mail: kenjim@stanford.edu