

変異アクチンの結晶解析：アクチン重合・ミオシン相互作用と構造の関係

Crystal Structures of Mutant Actin: A Role of Tyrosine 143 for Polymerizability and Interactions with Myosin

若林 健之^{1*}、五味 由貴¹、大貫 貴広¹

¹ 帝京大学理工学部, 〒320-8858 宇都宮市豊郷台 1-1

Takeyuki Wakabayashi^{1*}, Yuki Gomibuchi¹ and Takahiro Ohnuki¹

¹School of Science and Engineering, Teikyo University,

1-1 Toyosatodai, Utsunomiya, 320-8858, Japan

1 はじめに

アクチンは収縮タンパク質であるミオシンのATP分解を加速するタンパク質として骨格筋から単離されたが、その後の研究で、筋肉アクチンと相同な細胞性アクチンが全ての真核細胞に存在し、細胞運動、細胞接着、細胞内小胞輸送、細胞分裂などの細胞機能に必要であることが分かった。細胞の形態もアクチンフィラメントの長さや配置で決定されるので、細胞骨格とも呼ばれる。真核細胞ではアクチンはトロポミオシンを結合している。横紋筋のトロポミオシンでは、head-to-tailに重合できる分子のみがアクチンと結合出来る[1]。

バクテリアなどの原核細胞にも立体構造がアクチンに似ているMreBなどが報告され、古細菌にもアクチン様タンパク質が存在することが知られるようになり、アクチンは細胞骨格タンパク質として全ての生物に一般的に存在し、これらの生物でも細胞の形を決めている。磁性をもつマグネトソームと呼ばれる細胞内小器官をもつ細菌では、アクチン様タンパク質がこれらを細胞内で一列に整列させる働きをしている。

医学的には、細胞質アクチンの変異によって細胞が癌化し、変異が積み重なると悪性度が増すことが知られている。癌細胞が周囲の組織に浸潤したり、転移したりする過程でも細胞質アクチンの関与が知られている。筋肉アクチンの変異は筋収縮力を変える場合は心臓機能に影響し、家族性心筋症の原因遺伝子の一つでもある。

医学研究からは、聴覚異常、視覚異常の原因の一つがアクチン遺伝子変異であること示され、アクチンが筋肉収縮・細胞運動だけでなく、聴覚や視覚にも働いていることが分ってきた。

細胞のアメーバ運動では、アクチンの重合反応が重要な役割を担っている。細胞質アクチンは重合と脱重合をダイナミックに繰り返している。重合はフィラメントのプラス端（またはb端）と呼ばれる側で起こりやすく、脱重合はマイナス端（またはp端）でおこりやすい。そこで定常状態ではフィラメントはプラス端方向に移動しているかのように見え、これをトレッドミリングと呼ぶ。このような方向性をもったフィラメントの伸長は、細胞の仮足（糸状仮足、葉状仮足）の伸長の基盤であるので、そのメカニズムの解明が待たれていた。

私達は高分解能クライオ電子顕微鏡像からの三次元構造再構成法とX線結晶解析法を組み合わせ、アクチンフィラメントの構造と機能を研究してきた。アクチンが重合する際の立体構造変化、アクチンが重合によるATP分解促進機構、分解で生じたリン酸の放出を遅延させることによりアクチンの脱重合がプラス端で起こりにくくしている機構へのインサイトを得た[2]。

例えば、重合には陽イオンが重要であるが、Mgイオンは、Kイオンよりも数十倍も有効である理由は、Mgイオンが縦方向に並んだ2つのアクチン分子からのカルボキシル基の間の静電的反発を緩和するだけでなく、結合の中核となることも初めて明らかにした。

重合反応の際にTyr143（図1）は例外的に溶媒露出度が増すだけでなく、重合の際、よりオープンになる疎水性クレフトに面しており、ミオシンとの相互作用の可能性もあるので、この残基に変異を導入し、重合反応、ミオシンとの相互作用を吟味し、構造との関係を知るために結晶解析を行ってきた。



図1；重合後のアクチン分子の原子構造モデル（高分解能クライオ電子顕微鏡像からの三次元密度マップを擬似的ポテンシャルとして用いて、結晶構造を初期モデルとして分子動力学により精密化した[2]）

2 実験

細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) の発現系を用いて、細胞質アクチンに変異を導入した。アクチンのカルボキシル末端側にチモシンとヒスタグ (His₆) を融合させ、タグを利用して NiNTA カラムにより、野生型アクチンと分離した後、融合した部分をタンパク質分解酵素で切断して変異型アクチンを精製した。切断によってリンカーを含めて融合した部分は除かれ、カルボキシル末端は野生型アクチンと同じ Phe375 となる。Tyr143 を変異させ、Tyr143Phe、Tyr143Trp、Tyr143Ile の3種の変異アクチンをゲルゾリン S1 と共結晶とし、ビームライン BL-1A, BL-5A, BL-17A, NW12A で反射データを収集した。ロボットの利用が出来るようになり、作業の効率が向上した。これらの結晶は薄い板状であり、細いビームラインを用いて、高分解能の反射パターンが得られる部分の検索に有効だった。

3 結果および考察

野生型の細胞質アクチン、3種の変異アクチンについて、ゲルゾリン S1 との共結晶を板状結晶として得た。結晶の対称性はどれも $P2_12_12_1$ であり、分解能は 1.8--2.3 Å の範囲に分布していた。現在、構造を精密化している。フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンなどの側鎖では芳香環に穴が空いていることも観察でき、2 Å 程度の分解能が達成されているようである。Tyr143Trp 変異体では、ミオシン ATP 分解活性化の K_{app} が低下しており、この酵素学的カイネティクスから、アクチンフィラメントとミオシン・ADP・リン酸複合体との親和性が約 2 倍に増加していると解釈でき (ウサギアクチンと比較すると約 3 倍)、これに対応する構造変化を吟味している[3]。Tyr143Ile 変異体ではミオシン ATP 分解活性化能が低下しており[3]、残基 143 は芳香性アミノ酸であるか、または Bulky な側鎖であることが重要であることを示しているが、それが構造変化を介しているのかを決定できると期待している。

アクチンのヌクレオチド結合部位には多数の水分子が水素結合を介してネットワークを形成しており、アクチン単量体のリガンドである ATP が加水分解されるのを防いでいるように見える[2]。このようにアクチンの水分子はアクチン機能と密接な関係があるので、水分子にも注目して解析をすすめている。

4 まとめ

アクチンが重合する際に、Tyr143がより溶媒に露出されるという例外的な振る舞いに着目して、細胞性粘菌の発現系を用いてこの残基をフェニルアラニン、トリプトファン、イソロイシンに変異させた。酵素学的カイネティクスの解析により、トリプトファン変異体は ATP の存在下でのミオシン親和性が向上し、イソロイシン変異体ではミオシンATP分解

の活性化能が低下する。また NaCl による重合能は低下する。これらは Tyr143 が、重合やミオシンとの相互作用において重要な役割を果たしていることを示している。そこで、3種の変異アクチンと野生型アクチンをヒト・ゲルゾリン S1と共結晶し、構造解析を進めている。

謝辞

ビームライン担当者の方々に感謝致します。

参考文献

- [1] Murakami *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 7200-7205 (2008).
- [2] Murakami *et al.*, *Cell* **143**, 275-287. (2010).
- [3] Gomibuchi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun. Lett.* **441**, 844-848 (2013).

* tw007@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp