

# 蛋白質間相互作用のおもしろさ、奥深さ： アクチン研究の現場から

前田雄一郎

名古屋大学大学院理学研究科  
構造生物学研究センター(生命理学専攻兼任)

# 問題意識の 源流



大沢文夫

1922 -

アクチン重合過程を  
凝集過程として再発見

本人撮影

江橋節郎

1922-2006

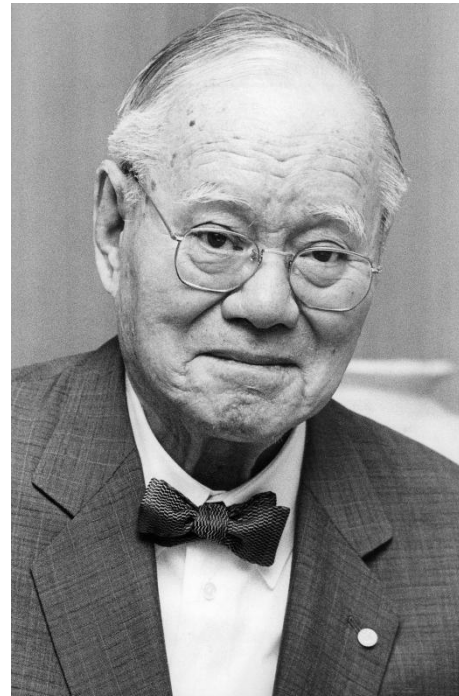
筋収縮のカルシウム  
調節の発見



名取礼二

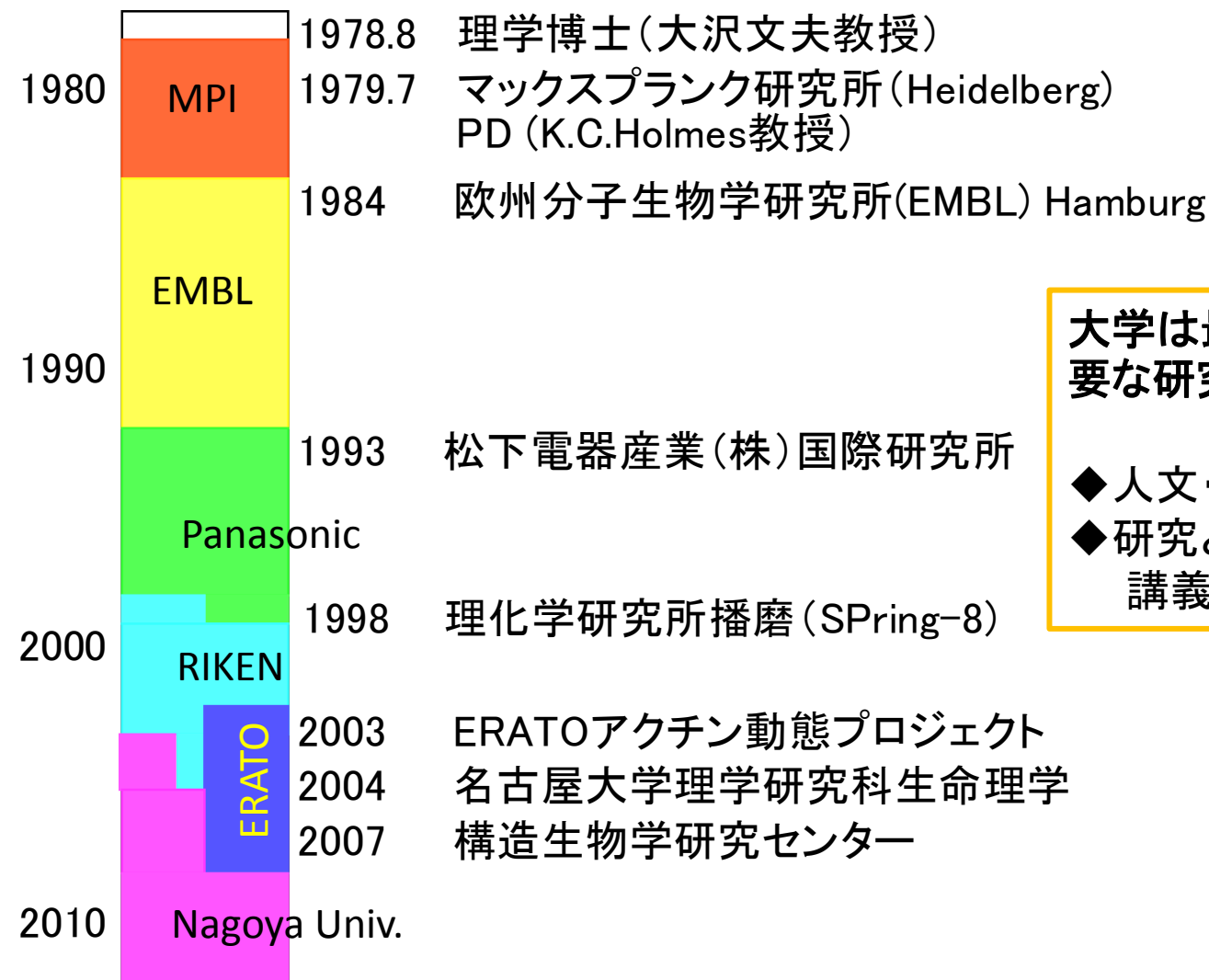
1912-2006

脱鞘筋繊維(名取の  
筋繊維)の創出



名取禮二「名取禮二撰集  
康寧を求めて-私の歩いてきた道-」  
(株)医学書院出版サービス、2003年  
より

# 所属研究組織の変遷



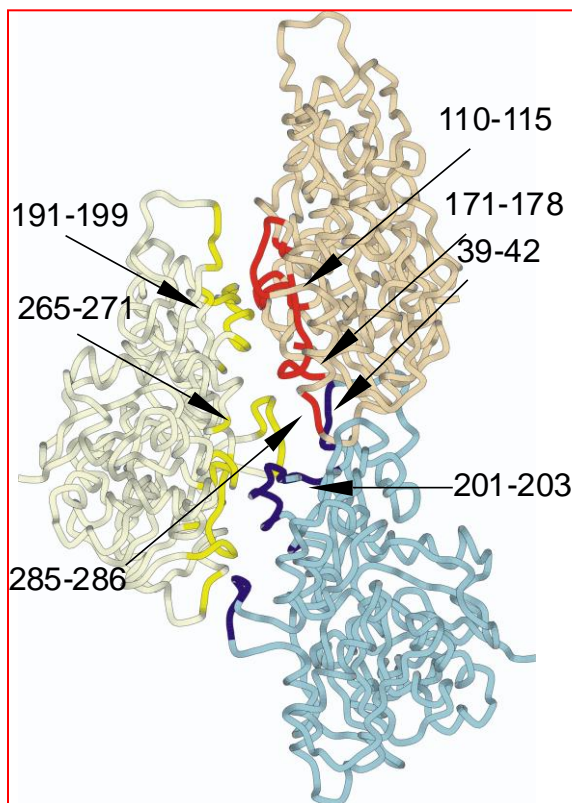
大学は最も優れ、かつ社会的に重要な研究の場である

- ◆ 人文・社会科学研究者との対話
  - ◆ 研究と教育の統一
- 講義をすることが重要

# 筋肉細胞中のアクチンフィラメント複合体

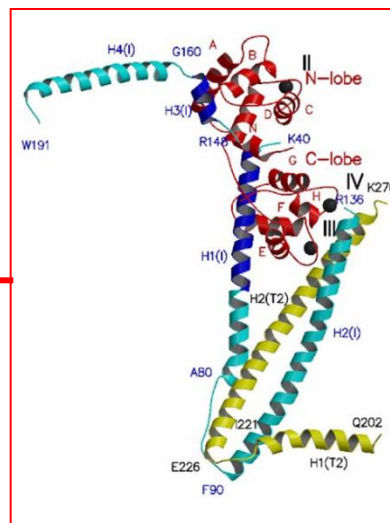
# 筋肉アクチンフィラメント複合体の構成蛋白質の高分解能構造

F-Actin



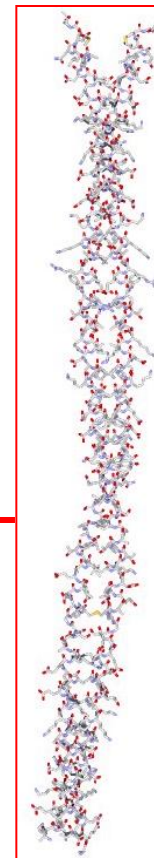
Oda et al., (2009) *Nature*, 457:441-446

Troponin (Tn)

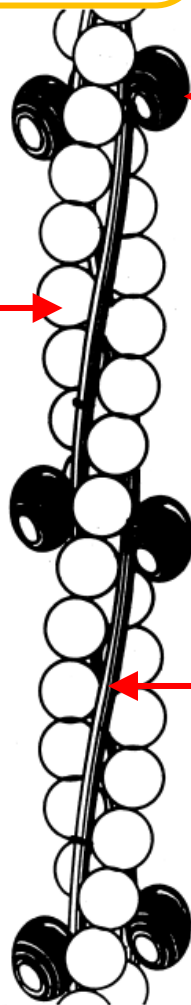


S.Takeda et al. (2003)  
*Nature* 424:35-41

Tropomyosin (Tm)

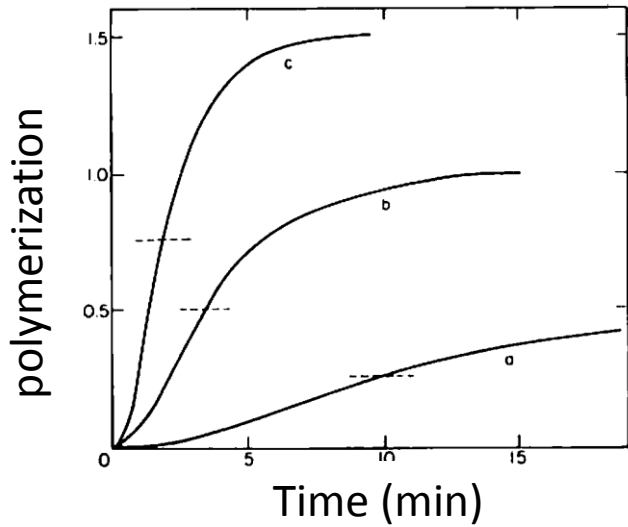
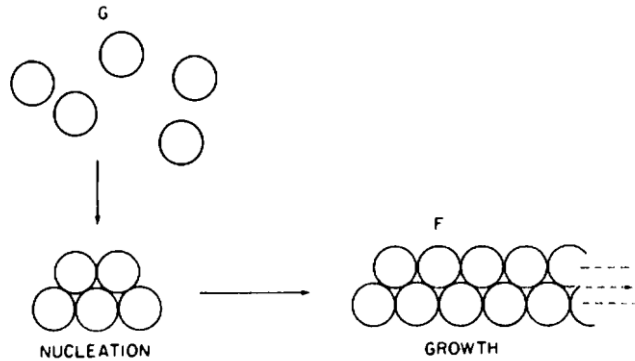


Nitanai et al., (2007) *Adv.Exp.Med.*592:137-151  
Minakata et al., (2008) *Biophys.J.* 95:710-719

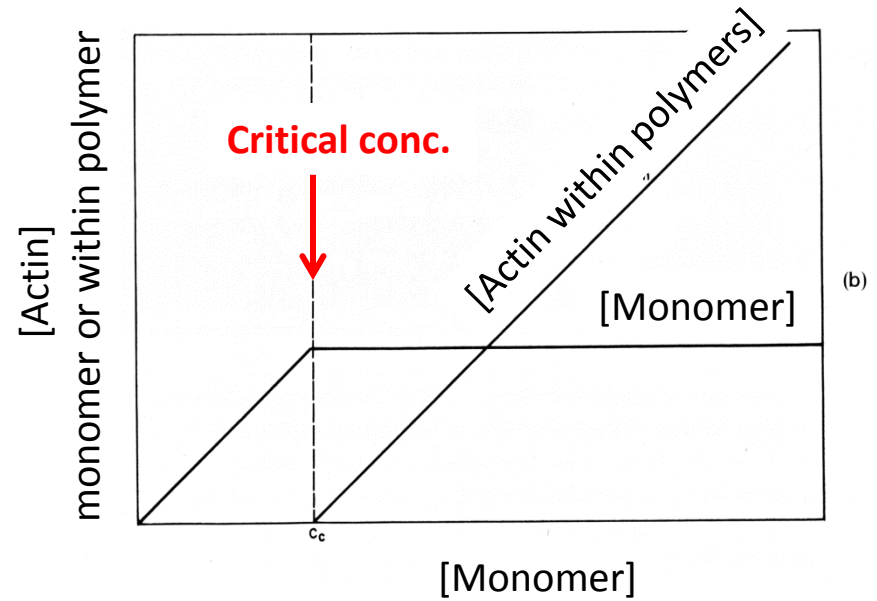


# 一般細胞中でのアクチン分子運動 < アクチンレッドミリング >

# 大沢文夫の生物物理学



Polymerization Process  
= Nucleation + elongation

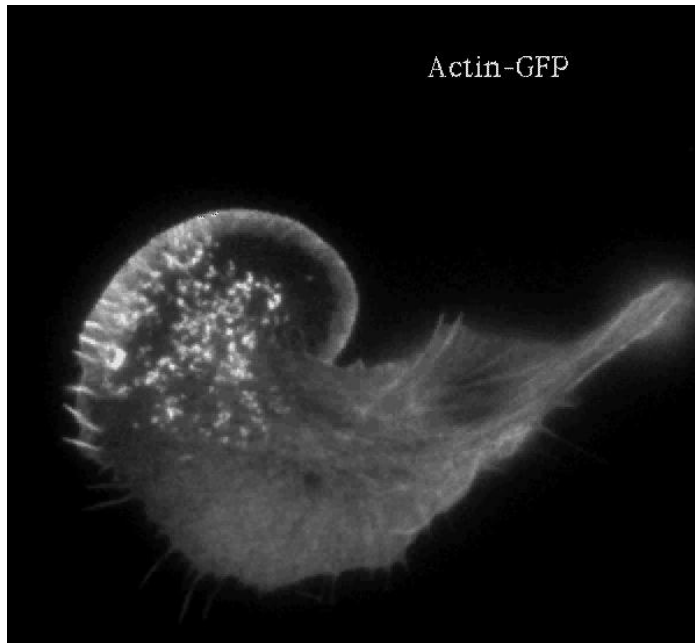


Polymerization is  
a condensation phenomenon.

End concentration is in equilibrium with  
Monomers.

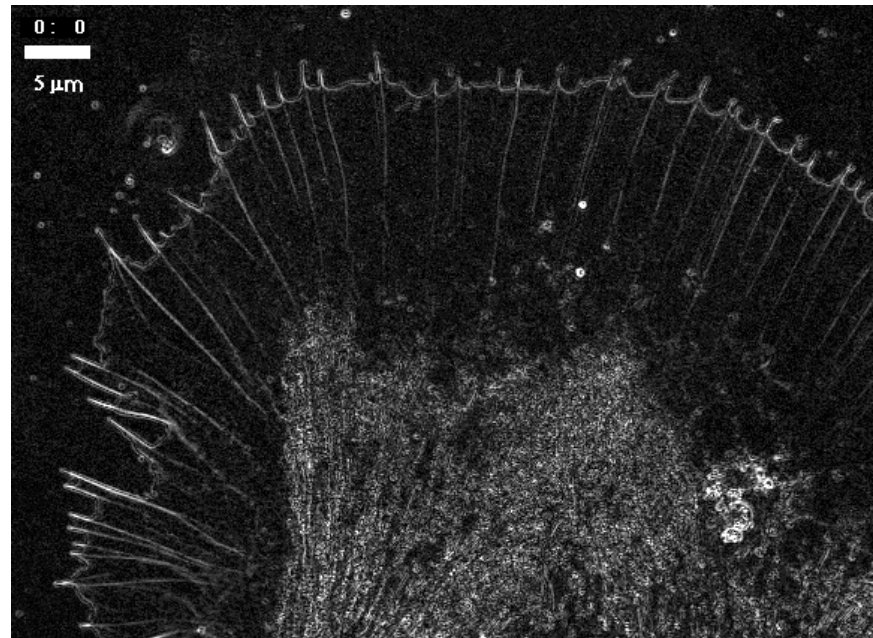
# アクチン分子運動が展開される構造

Lamellipodia 葉状仮足



GFP-actin-transfected melanoma cell  
by J.V.Small at [http://cellix.imba.oeaw.ac.at/  
lamellipodium-in-3d/](http://cellix.imba.oeaw.ac.at/lamellipodium-in-3d/)

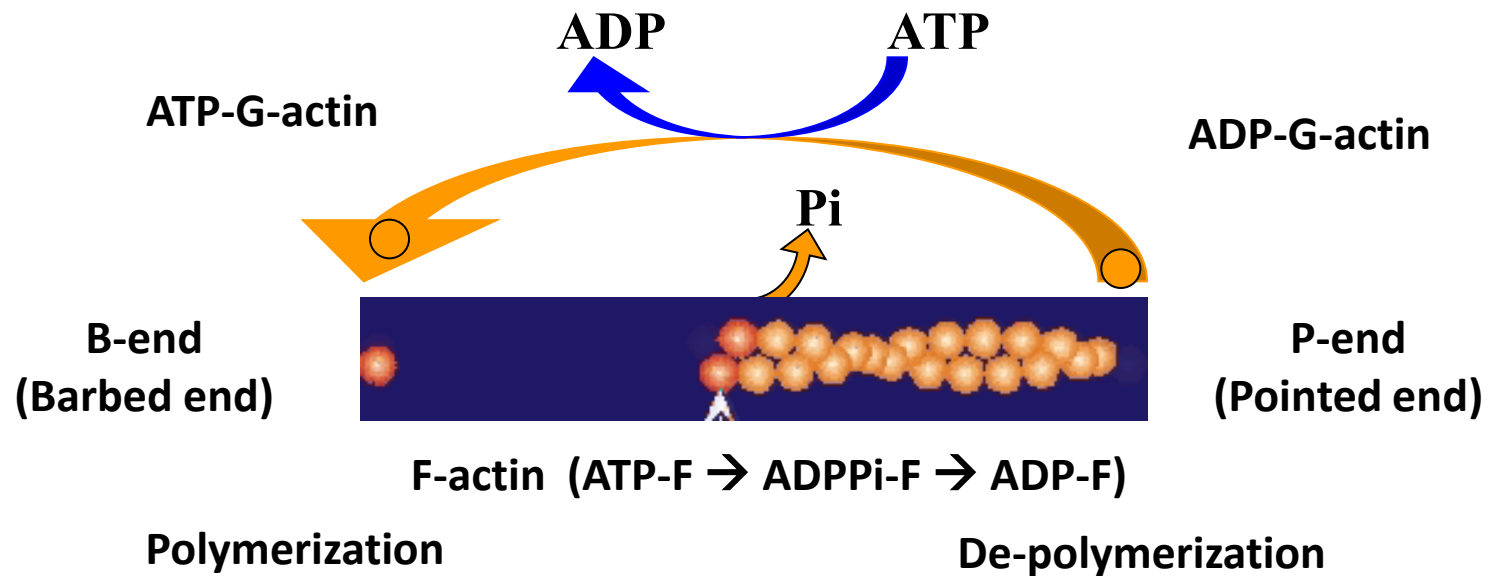
Filopodia 糸状仮足



Filopodia in live growth cone of *Aplysia* bag cell neurons  
observed with Pol-Scope  
**K. Katoh, K. Hammar, P. J. S. Smith, and R. Oldenbourg**  
*Molecular Biology of the Cell* **10**, 197–210, (1999)

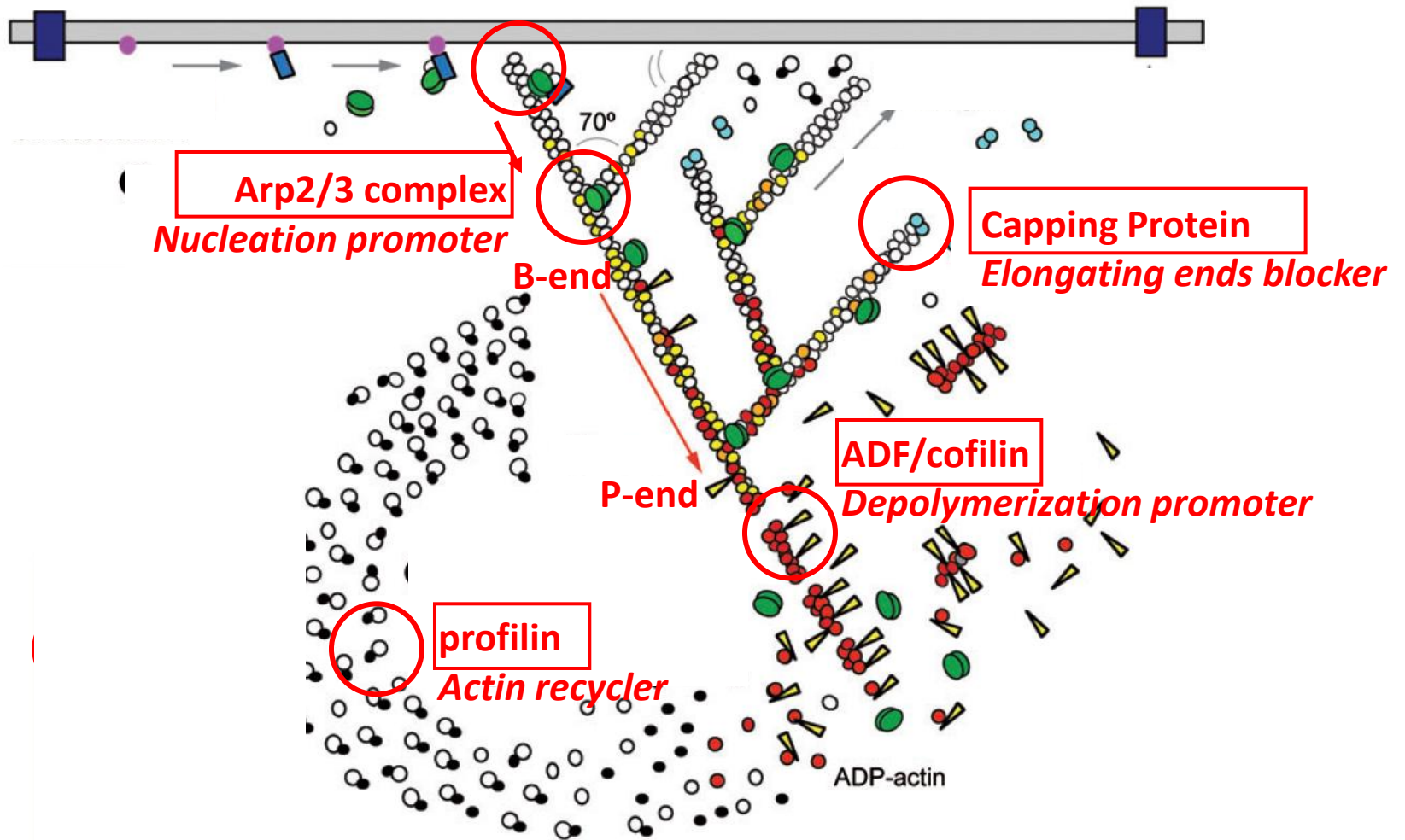


# アクチン・トレッドミリング



	[G-actin] at Steady state	speed
Purified actin ( <i>in vitro</i> )	0.1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{m}$ / 90 min
Lamellipodia ( <i>in vivo</i> )	2 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{m}$ / 1 min

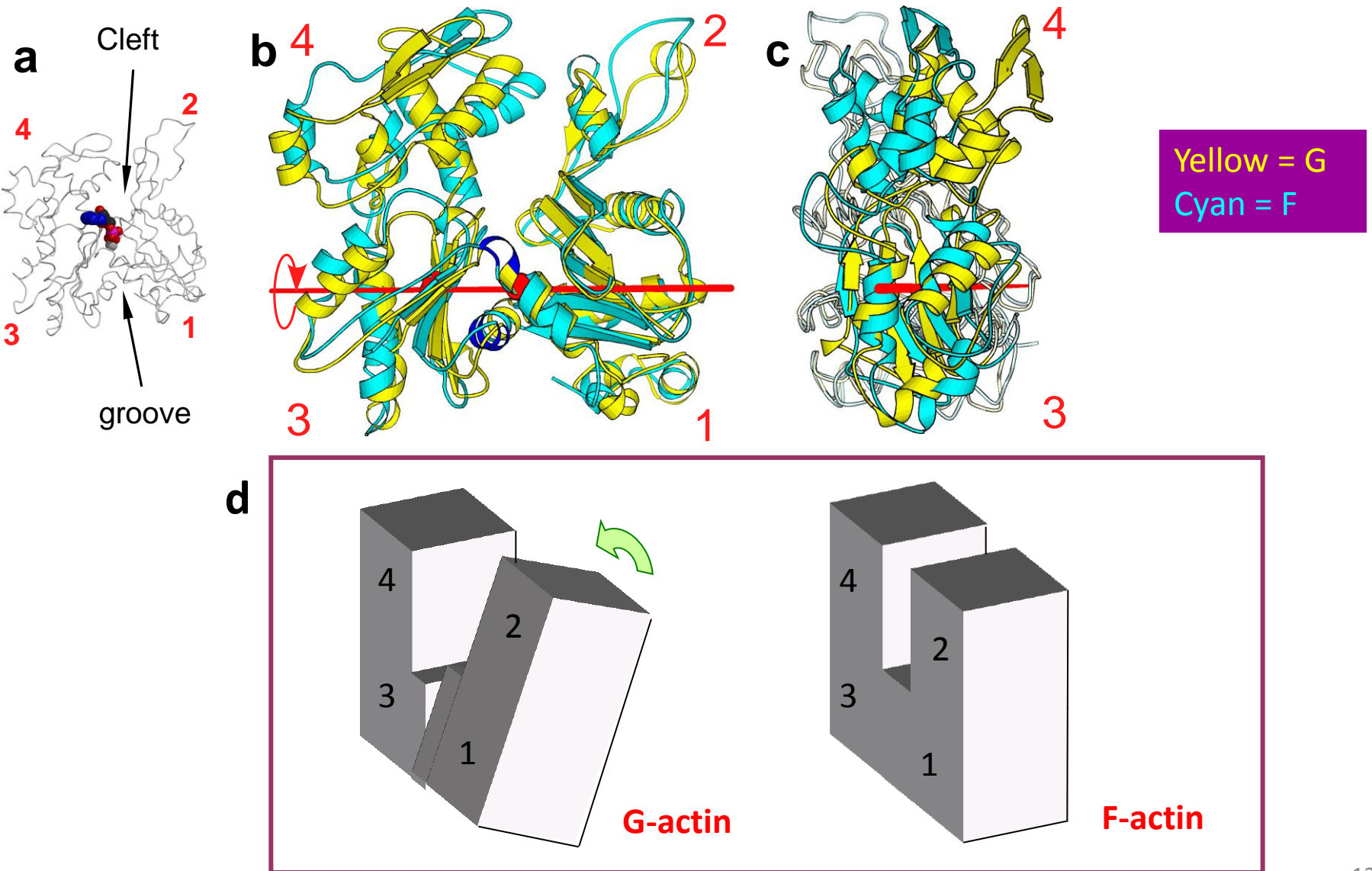
# トレッドミリング運動の調節蛋白質



# アクチン・アクチン分子間相互作用

1. 重合に伴うアクチン分子の変形 (G型 → F型)  
F型には力学的歪みのエネルギーが蓄えられている
2. 重合反応におけるATP加水分解の役割  
ATP加水分解は重合を駆動するのではなく、脱重合を準備する
3. 重合体中の分子間相互作用は主にループ間相互作用である
4. アクチン重合体に結合する蛋白質の結合の強さは  
分子構造が固くなると弱くなるのではないか？

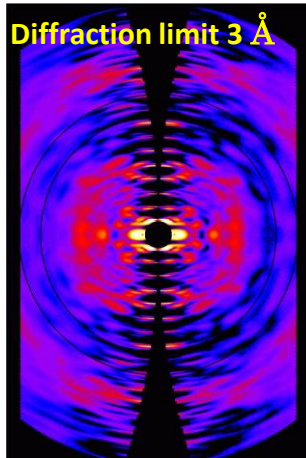
# 重合に伴うアクチン分子の変形 G型→F型



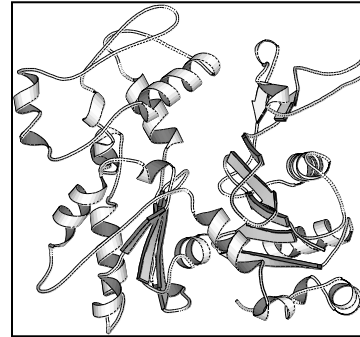
# 結晶を用いることなく アクチン重合体の高分解能構造を解明



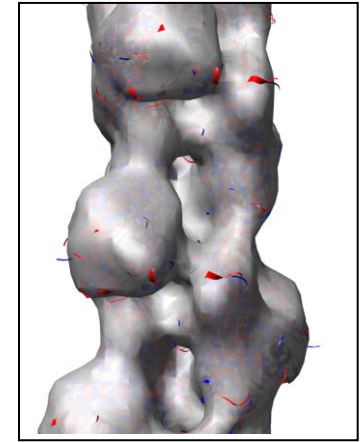
Super-conducting magnet 18.3 T



X-ray fiber diffraction intensities



Crystal structure of G-actin

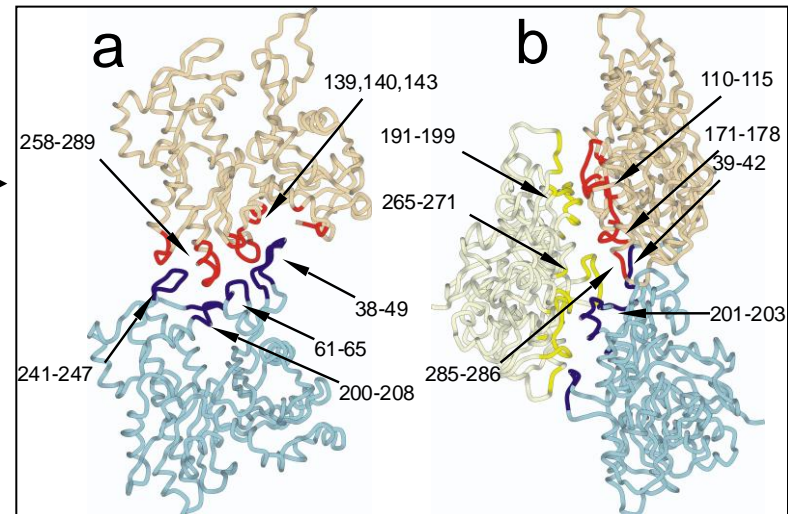


Cryo-EM  
13.8 Å resolution

from highly oriented F-actin sol



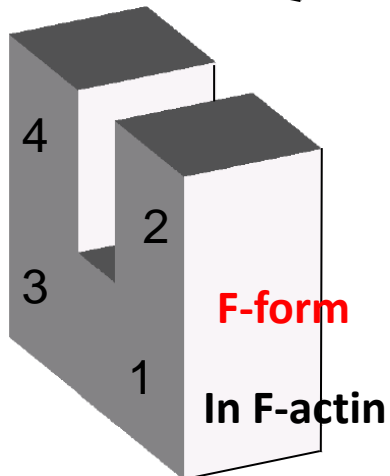
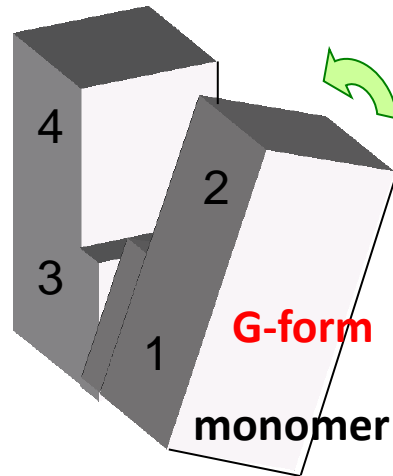
Computer science  
normal modes analysis,  
MD



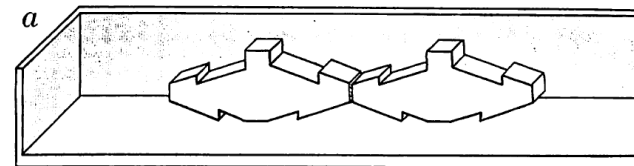
Fujii, T., Iwane, A. H., Yanagida, T. & Namba, K. (2010). Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* **467**, 724-8.

Murakami, K., Yasunaga, T., Noguchi, T. Q., Gomibuchi, Y., Ngo, K. X., Uyeda, T. Q. & Wakabayashi, T. (2010). Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell* **143**, 275-87.

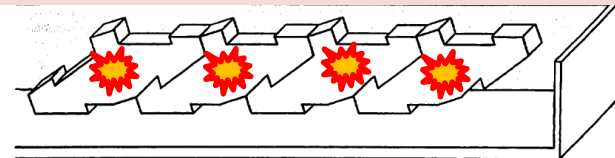
# F型はG型よりエネルギー的に不安定 F型には力学的歪みのエネルギーが蓄えられている 変形は重合時に分子から分子に伝搬する



Units in neutral position are not able to self-assemble



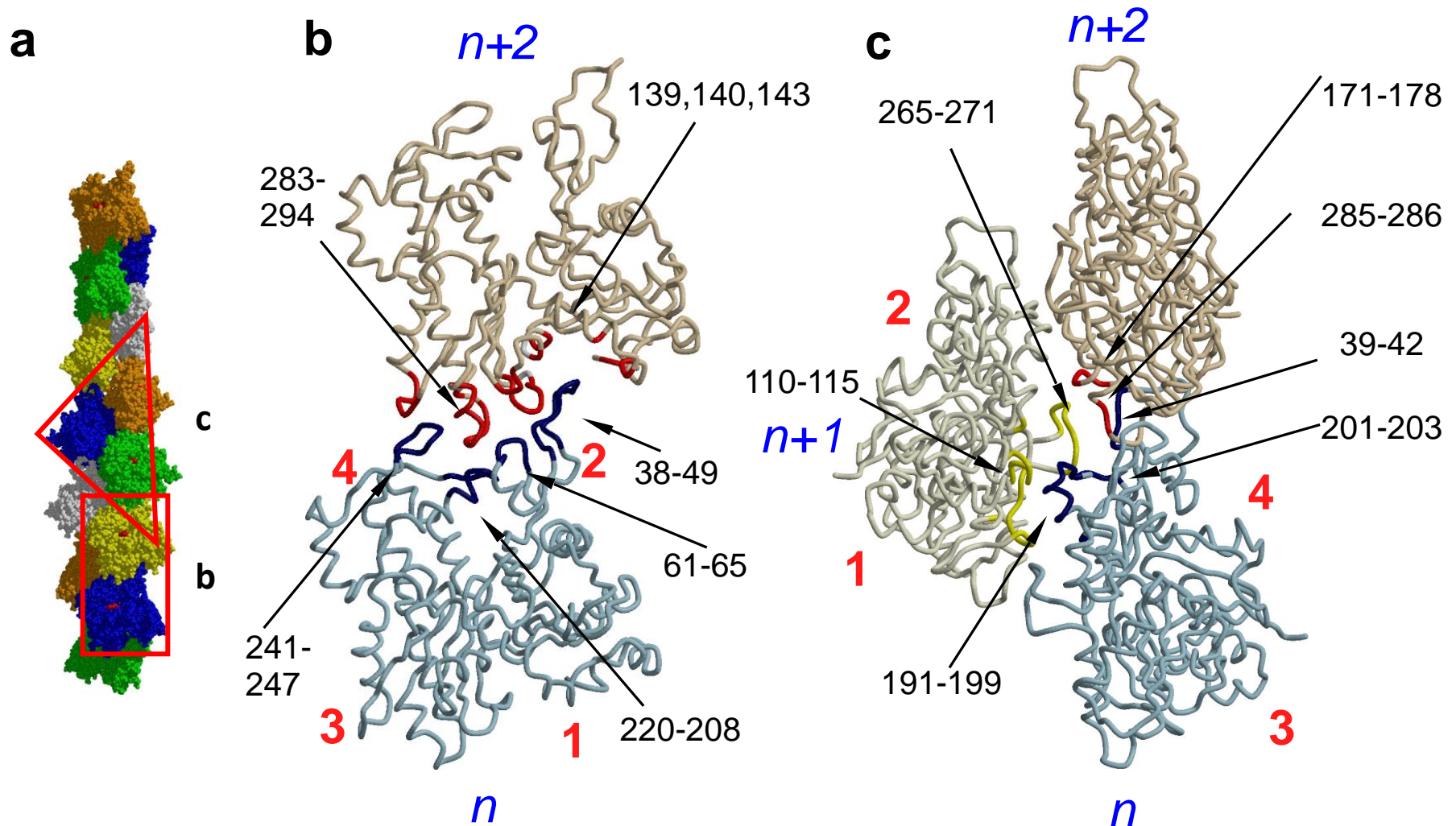
Altered units can self-assemble



DLD Caspar (1991) *CurrBiol.* **1**:30-32.

LS Penrose (1959) *SciAm.* **200**:105-114.

# 不安定なF型から構成される重合体の安定化 分子間接触による





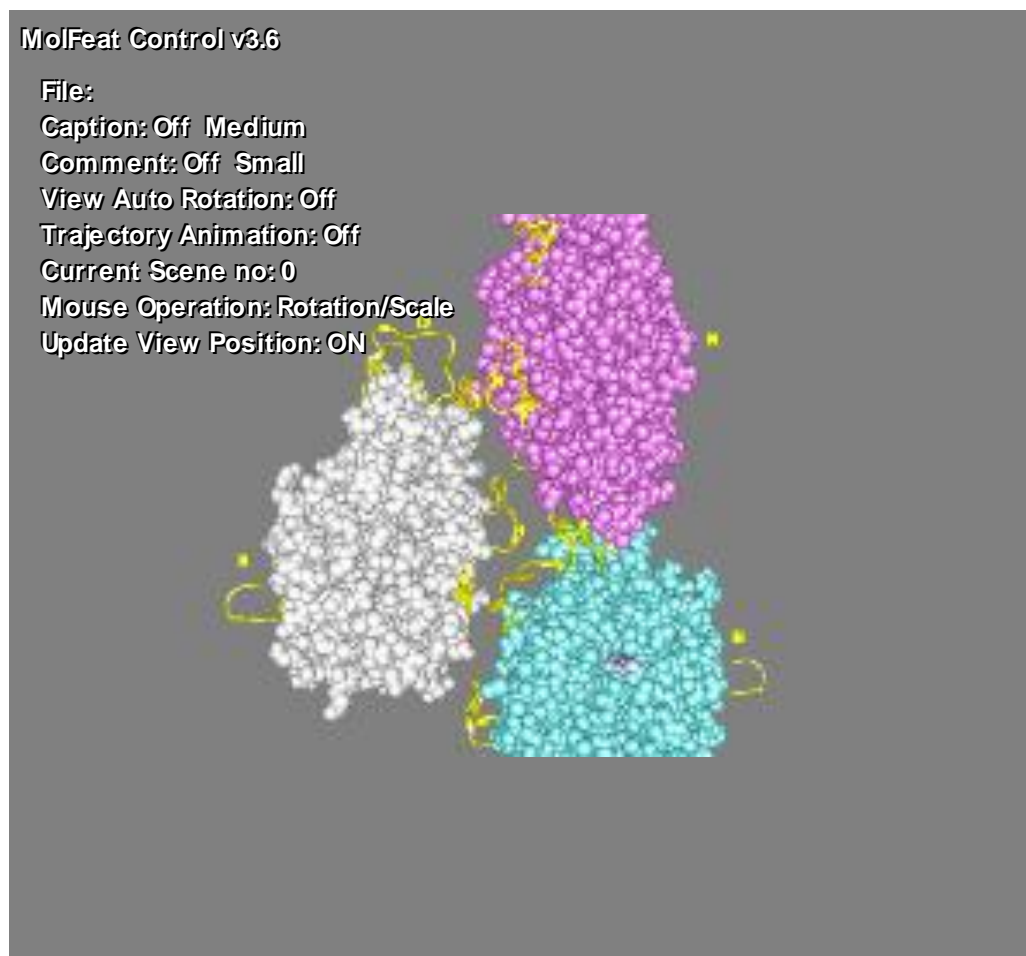
# アクチン・アクチン分子間相互作用

1. 重合に伴うアクチン分子の変形 (G型 → F型)  
F型には力学的歪みのエネルギーが蓄えられている
2. 重合反応におけるATP加水分解の役割  
ATP加水分解は重合を駆動するのではなく、脱重合を準備する
3. 重合体中の分子間相互作用は主にループ間相互作用である
4. アクチン重合体に結合する蛋白質の結合の強さは  
分子構造が固くなると弱くなるのではないか？

# アクチン・アクチン分子間相互作用

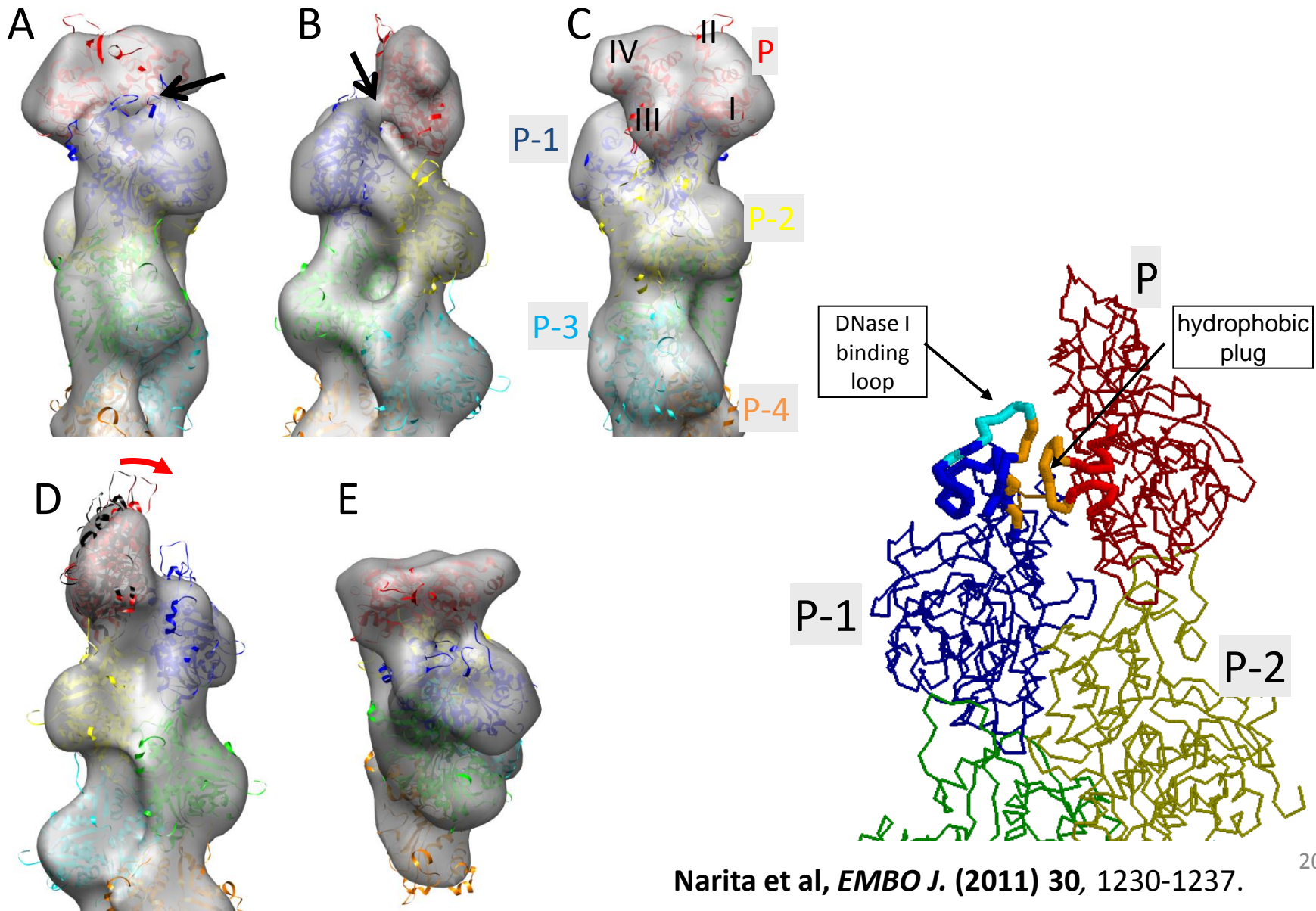
1. 重合に伴うアクチン分子の変形 (G型 → F型)  
F型には力学的歪みのエネルギーが蓄えられている
2. 重合反応におけるATP加水分解の役割  
ATP加水分解は重合を駆動するのではなく、脱重合を準備する
- 3 重合体中の分子間相互作用は主にループ間相互作用である
- 4 アクチン重合体に結合する蛋白質の結合の強さは  
分子構造が固くなると弱くなるのではないか？

# 重合体中の分子間相互作用は主にループ間相互作用



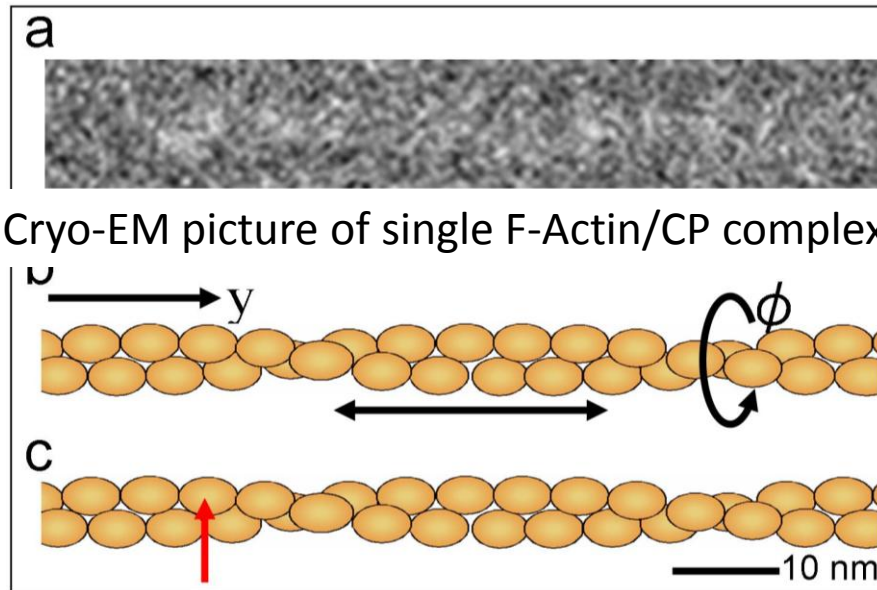
# アクチン重合体 P端 の構造

## 新規接触 D-loop (P-1) / H-loop (P)



# アクチン重合体の端の構造解析のための方法開発

## Single particle analysis of cryo-EM pictures

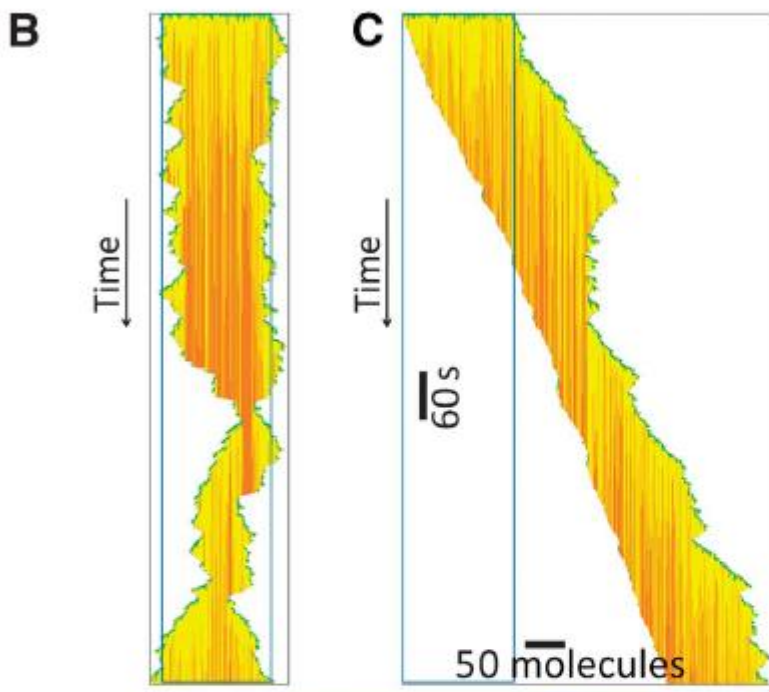
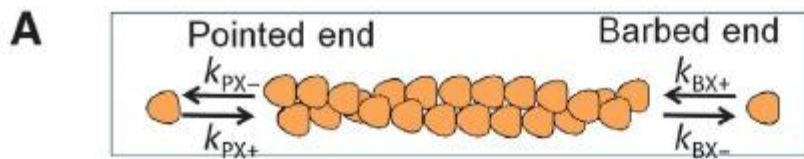


Cryo-EM picture of single F-Actin/CP complex

Narita, A & Maéda, Y  
*J. Mol. Biol.* (2007)  
365:480-501

To average many images, the axial and azimuth position of individual protomers should be correctly determined.

- To do so, the known filamentous structure is used as the reference (b)
- From comparison between image (a) and the reference (b),  $y$  (the axial coordinate) and  $\phi$  (azimuth coordinate) are obtained.
- Then, it is relatively easy to specify (by choosing an integer number) the protomer to which a binding protein is attached.
- Obtained initial structure should be refined.



- ATP-actin
- ADPPi-actin
- ADP-actin

P端に  
 新規ループ・ループ結合  
 → P端での重合、脱重合  
 双方の速度を減速  
 → B端方向に移動

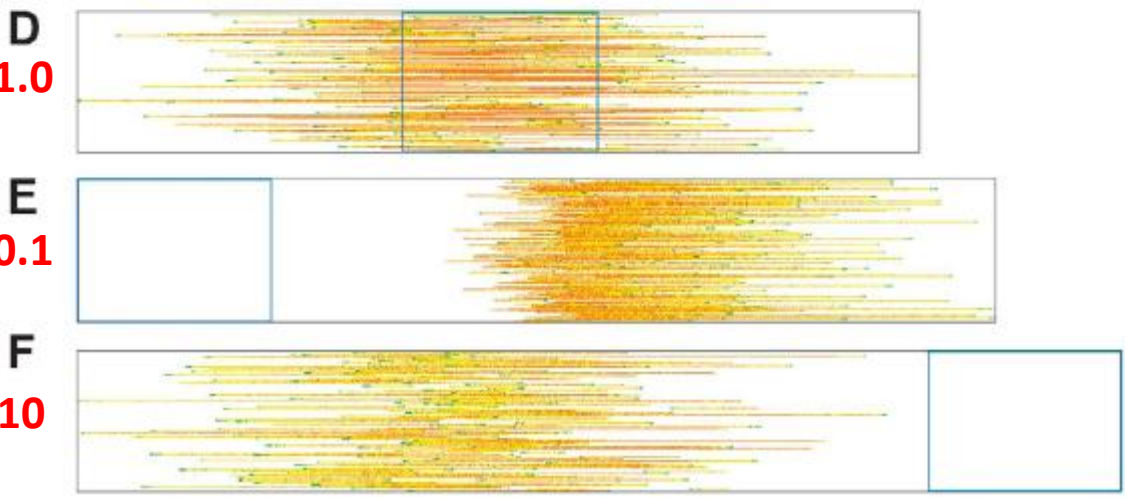
**B-end**

X=	$k_+$	$k_-$	$C_C = k_-/k_+$
ATP	$10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1 \text{ s}^{-1}$	$0.1 \mu\text{M}$
ADPPi	$3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0.3 \text{ s}^{-1}$	$0.1 \mu\text{M}$
ADP	$3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$6 \text{ s}^{-1}$	$2 \mu\text{M}$

**P-end, for  $r = 0.1$**

X=	$k_+$	$k_-$	$C_C = k_-/k_+$
ATP	$1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0.1 \text{ s}^{-1}$	$0.1 \mu\text{M}$
ADPPi	$0.3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0.03 \text{ s}^{-1}$	$0.1 \mu\text{M}$
ADP	$0.3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0.6 \text{ s}^{-1}$	$2 \mu\text{M}$

$r = k_{PX+}/k_{BX+} = k_{PX-}/k_{BX-}$



ATP hydrolysis in F-actin =  $0.3 \text{ s}^{-1}$   
 $\text{P}_i$  release rate at either end =  $2 \text{ s}^{-1}$  22  
 $\text{P}_i$  release rate in F-actin =  $0.003 \text{ s}^{-1}$

# アクチン・トレッドミリングのメカニズム

ATP-Gアクチン濃度を  $1\mu\text{M}$  と仮定する

1. ATP-Gアクチンが重合体端に結合する  
B端での重合速度 ( $10\text{ s}^{-1}$ ) は ATP加水分解速度  $0.3\text{ s}^{-1}$ より速い  
P端での重合速度 ( $1\text{ s}^{-1}$ ) は ATP加水分解速度  $0.3\text{ s}^{-1}$ と同程度

よってB端はほとんど常にATP-Fアクチン。P端はADP-Fアクチンである頻度が高い  
**この差は端の特性による (P端のkinetic barrierが上昇した)**

2. ATP-Fアクチンが存在するB端の臨界濃度は  $0.1\mu\text{M}$  ( $< 1\mu\text{M}$ )  
ADP-Fアクチンが存在するP端の臨界濃度は  $2\mu\text{M}$  ( $> 1\mu\text{M}$ )

よってB端は伸張り、P端は短縮する

**この差は(端とは関係なく)結合ヌクレオチドによる  
ADP-Fアクチンの端がより不安定 (ATP加水分解による)**

# アクチン・アクチン分子間相互作用

## チューブリン・チューブリン相互作用

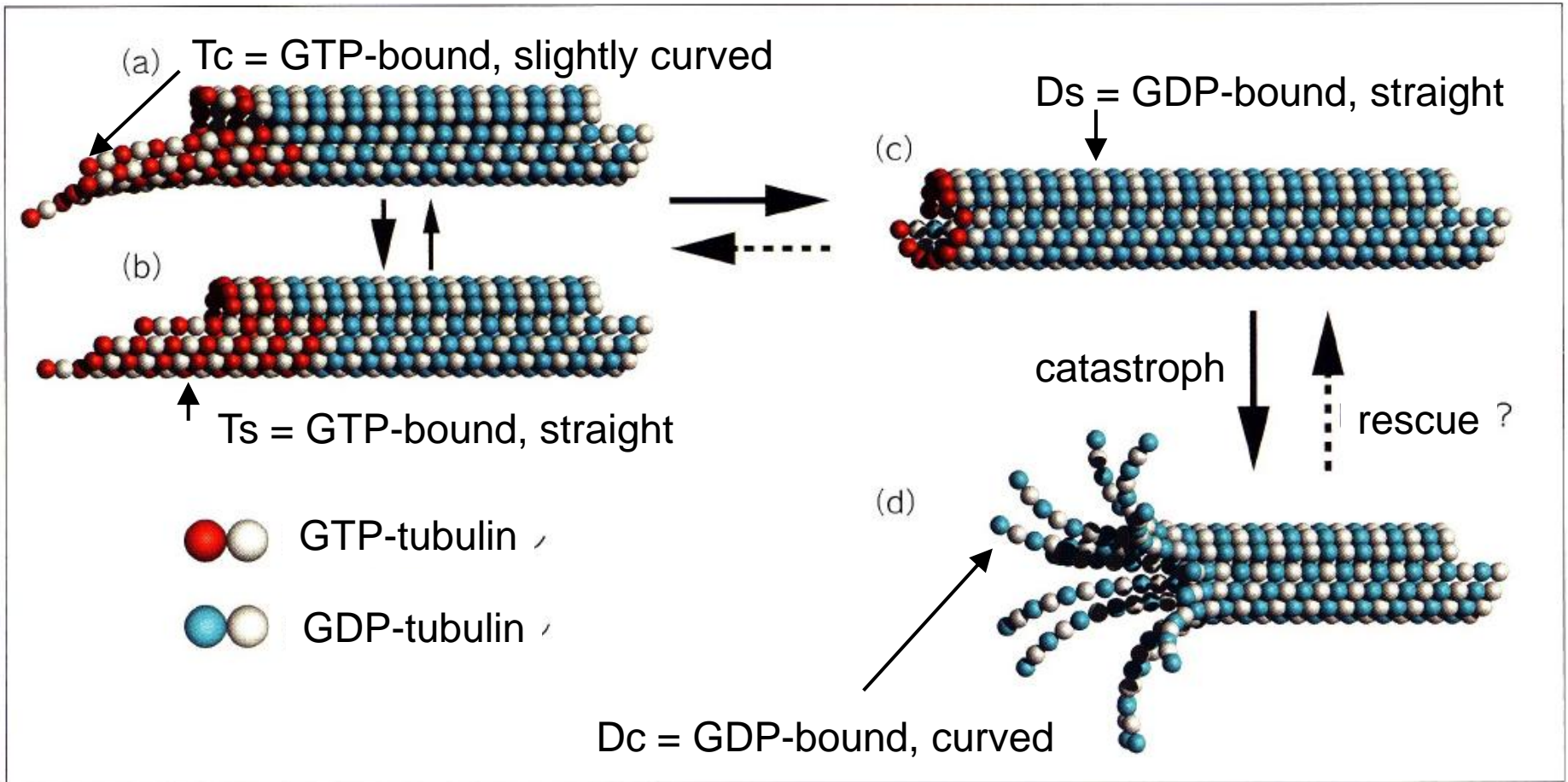
1. 重合に伴うアクチン分子の変形 (G型 → F型)  
F型には力学的歪みのエネルギーが蓄えられている
1. 重合に伴うチューブリン分子の変形 (湾曲型 → 直線型)  
直線型には力学的歪みのエネルギーが蓄えられている
2. 重合反応におけるATP加水分解の役割  
ATP加水分解は重合を駆動するのではなく、脱重合を準備する
2. 重合反応におけるGTP加水分解の役割  
GTP加水分解は重合を駆動するのではなく、脱重合を準備する
3. 重合体中の分子間相互作用は主にループ間相互作用である
3. 重合体中の分子間相互作用は主にループ間相互作用である
4. アクチン重合体に結合する蛋白質の結合の強さは  
分子構造が固くなると弱くなるのではないか？

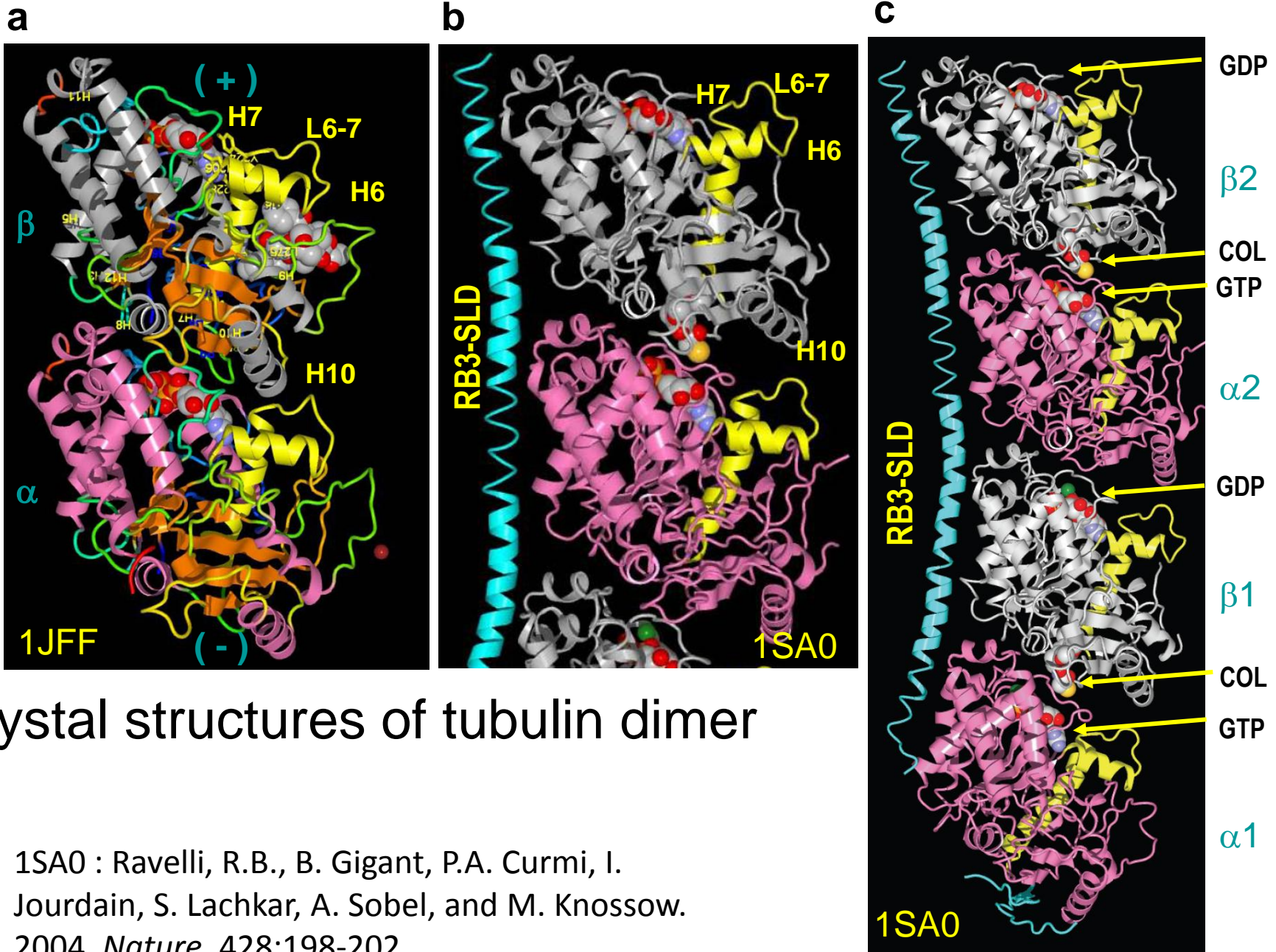


# 微小管プロトフィラメントの多型

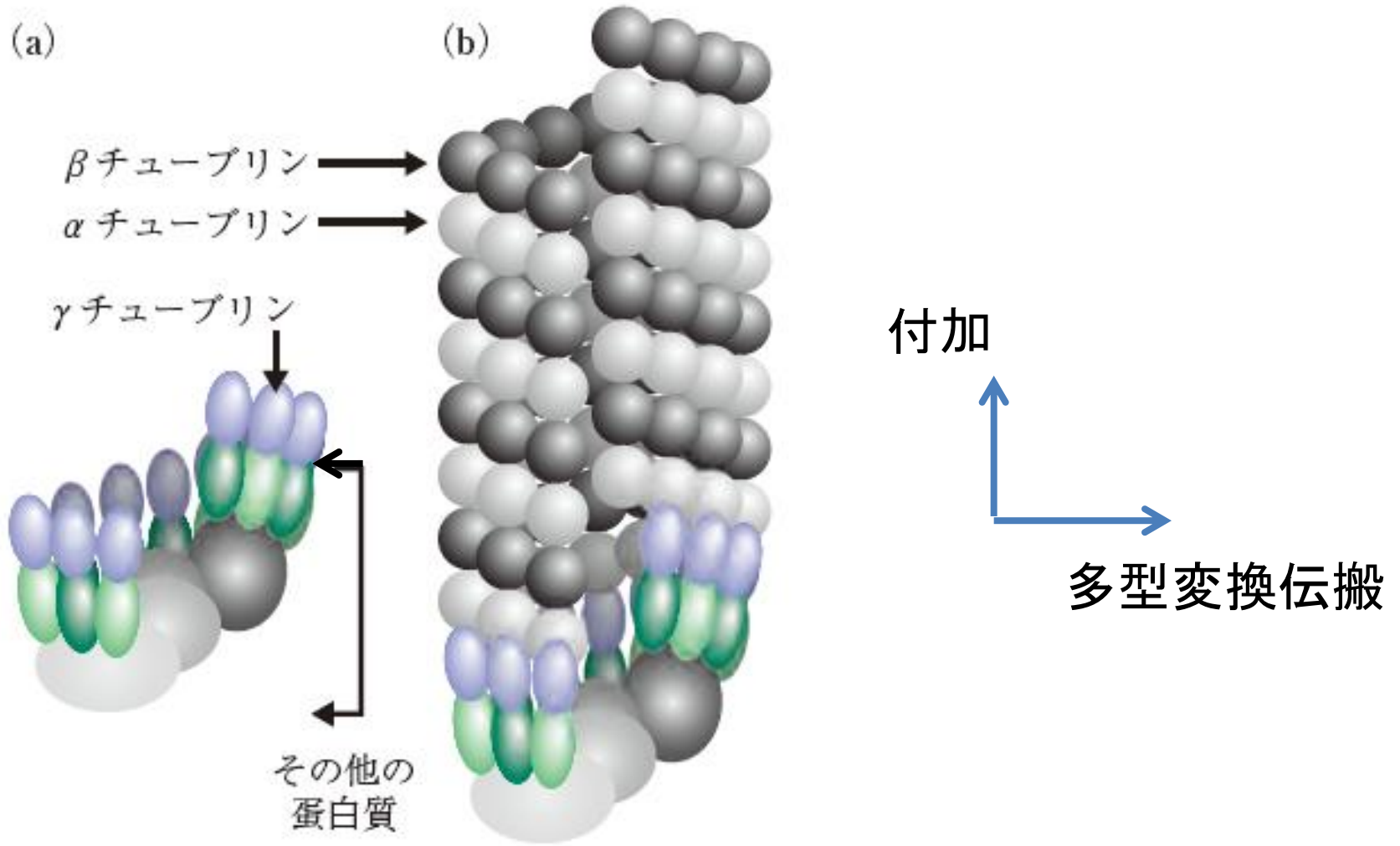
GTP結合型/GDP結合型、湾曲型/直線型

*In vitro*、(+)end





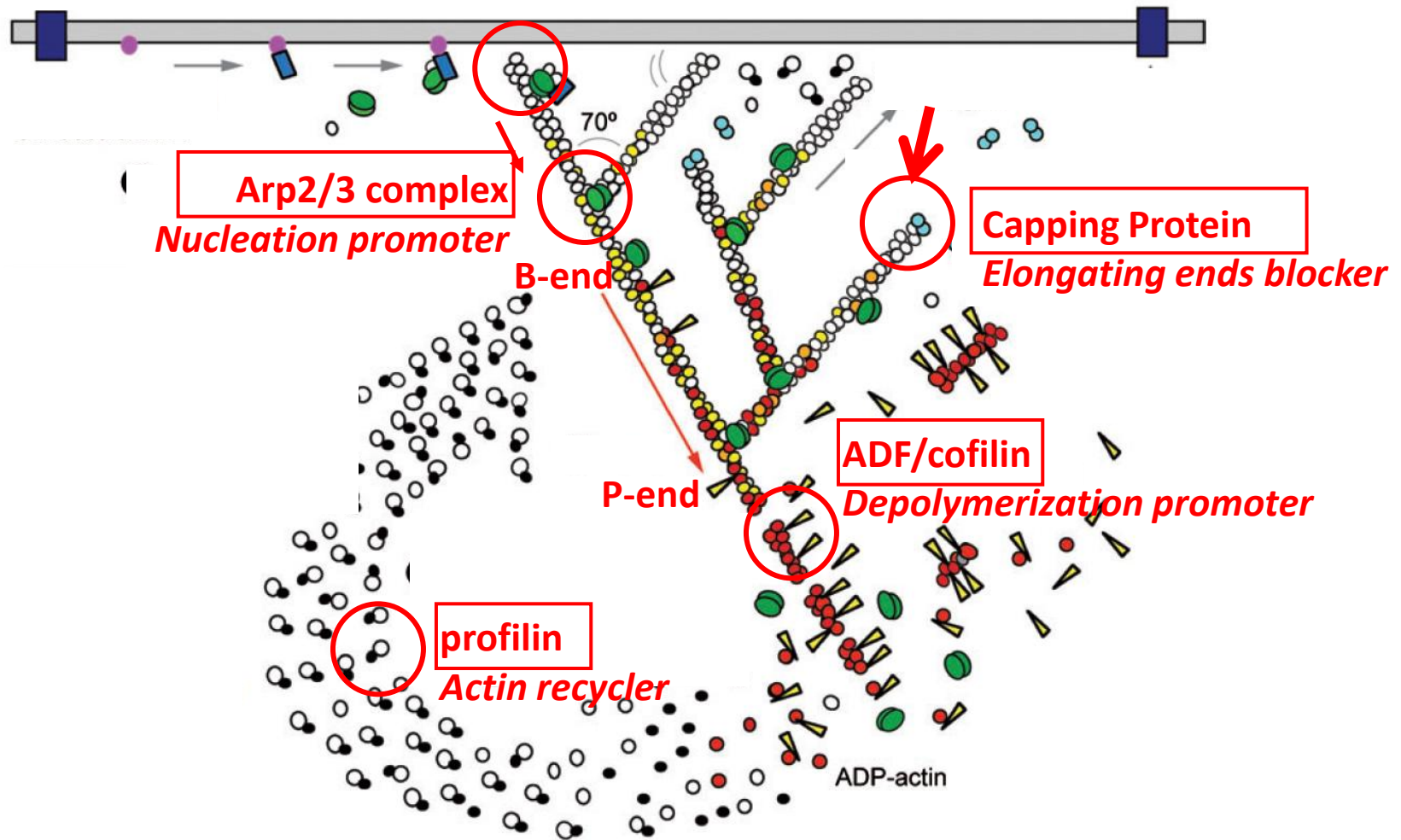
# $\gamma$ -Tubulin Ring Complex ( $\gamma$ TRC)



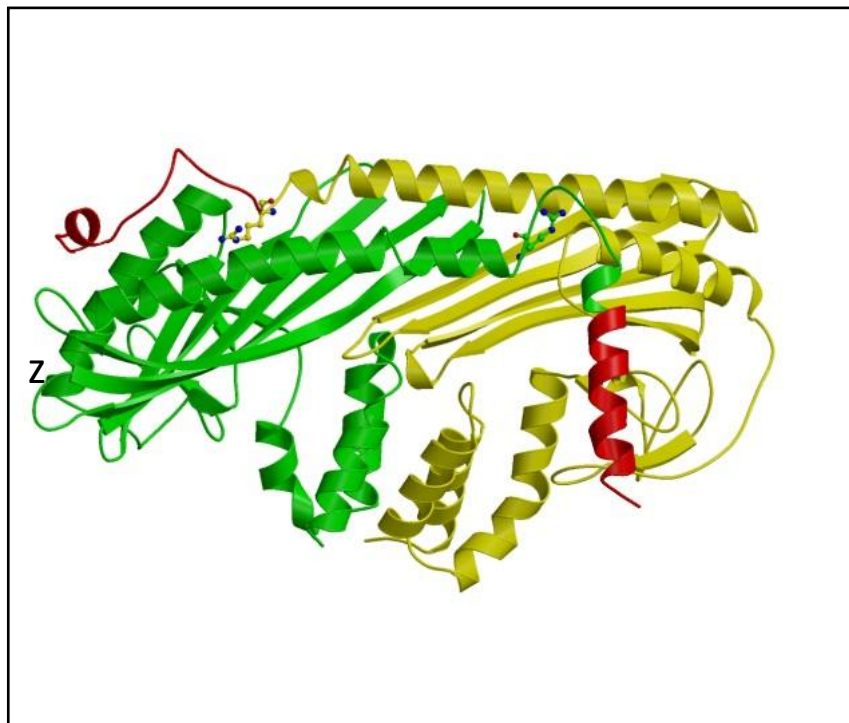
# アクチン・アクチン分子間相互作用

1. 重合に伴うアクチン分子の変形 (G型 → F型)  
F型には力学的歪みのエネルギーが蓄えられている
2. 重合反応におけるATP加水分解の役割  
ATP加水分解は重合を駆動するのではなく、脱重合を準備する
3. 重合体中の分子間相互作用は主にループ間相互作用である
4. アクチン重合体に結合する蛋白質の結合の強さは  
分子構造が固くなると弱くなるのではないか？

# トレッドミリング運動の調節蛋白質

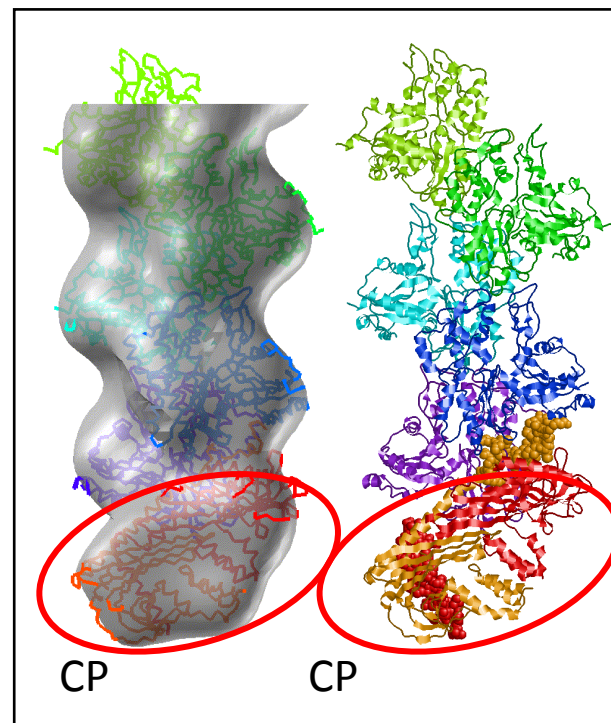


# CP 単独の結晶構造、アクチン重合体B端への結合



Crystal structure of CP

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

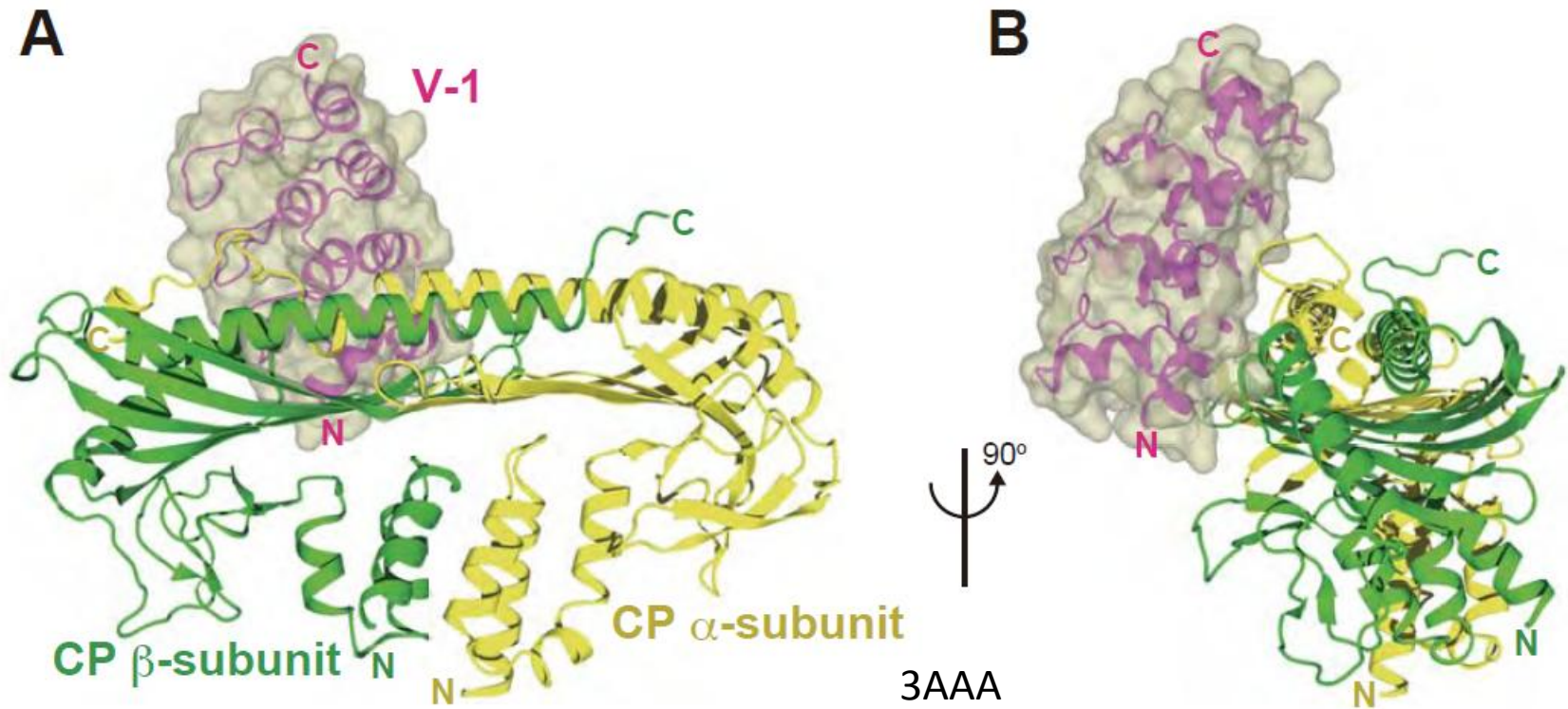


EM structure of  
CP/B-end of F-actin

Narita A, Takeda S,  
Yamashita A, Maéda Y. (2006)  
*EMBO J.* 25:5626-33.

# CP /V-1 複合体の結晶構造

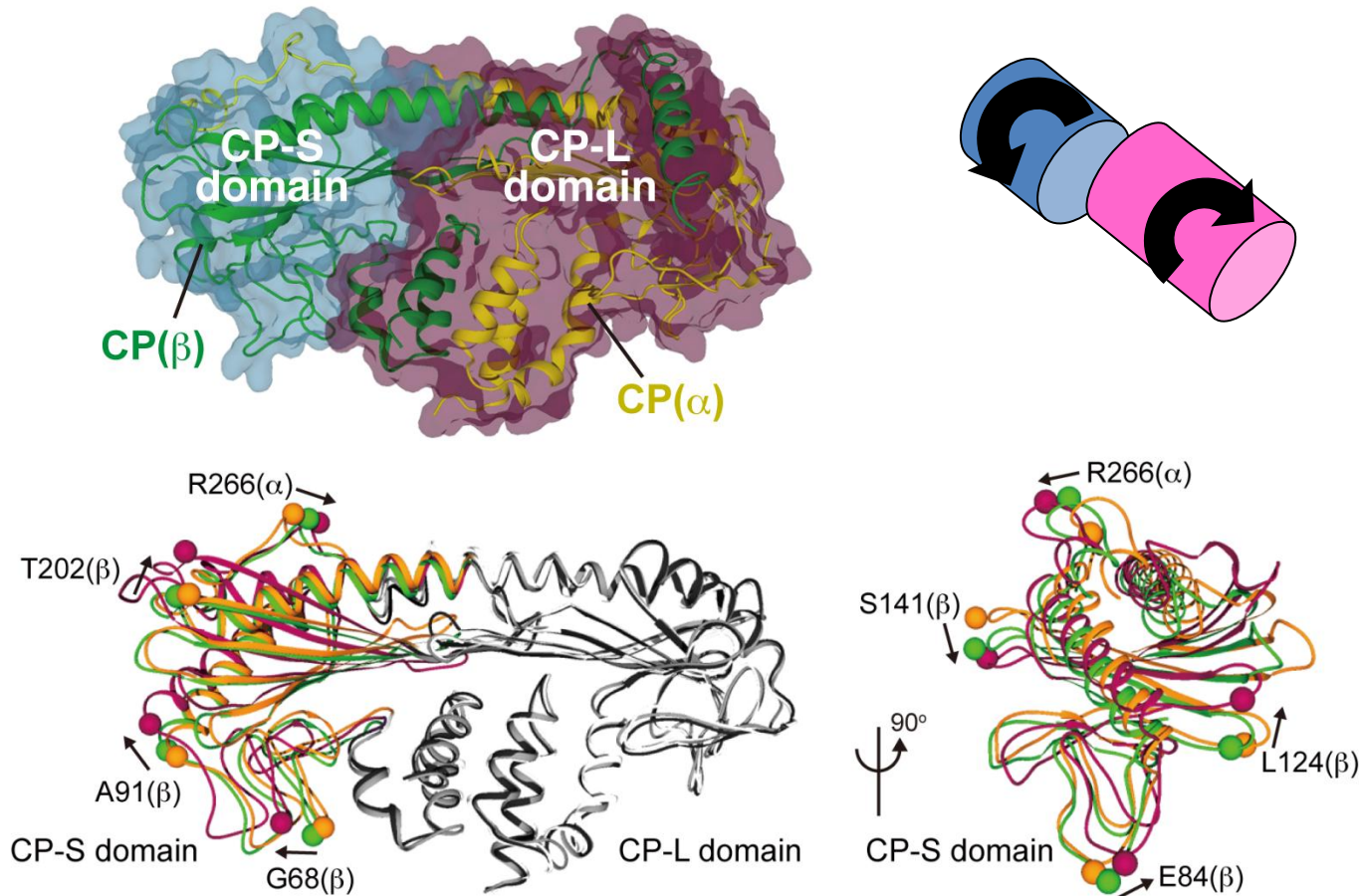
V-1 sequesters CP by binding CP on the actin B-end binding region



# V-1 の結合によるCPの変形

## 2つの部分が相反ローリング

CP is divided into two domains, and the twisting angle between the two is variable.

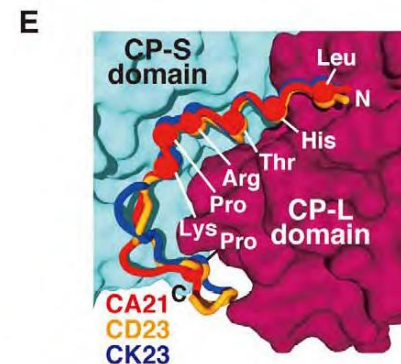
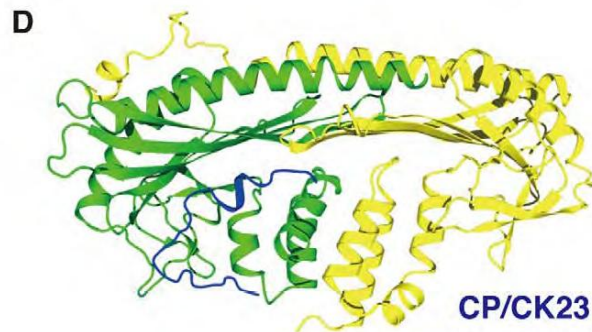
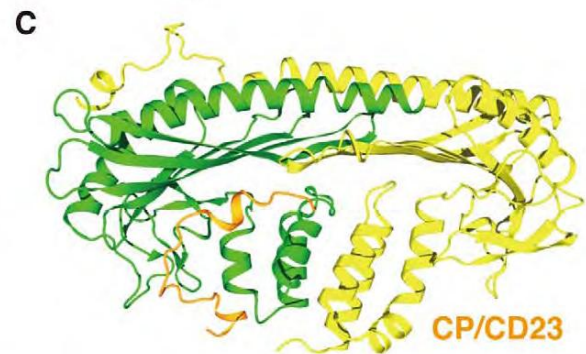
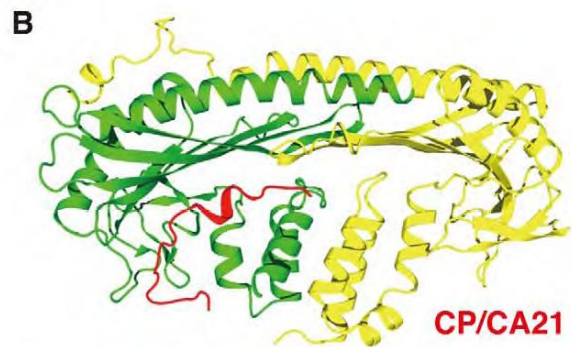
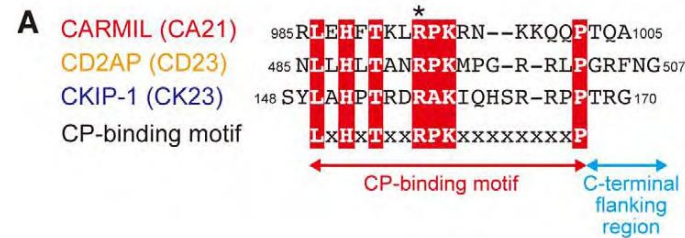




# CP/CARMILペプチド 複合体の結晶構造

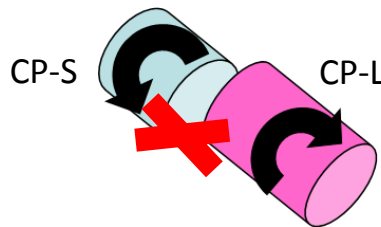
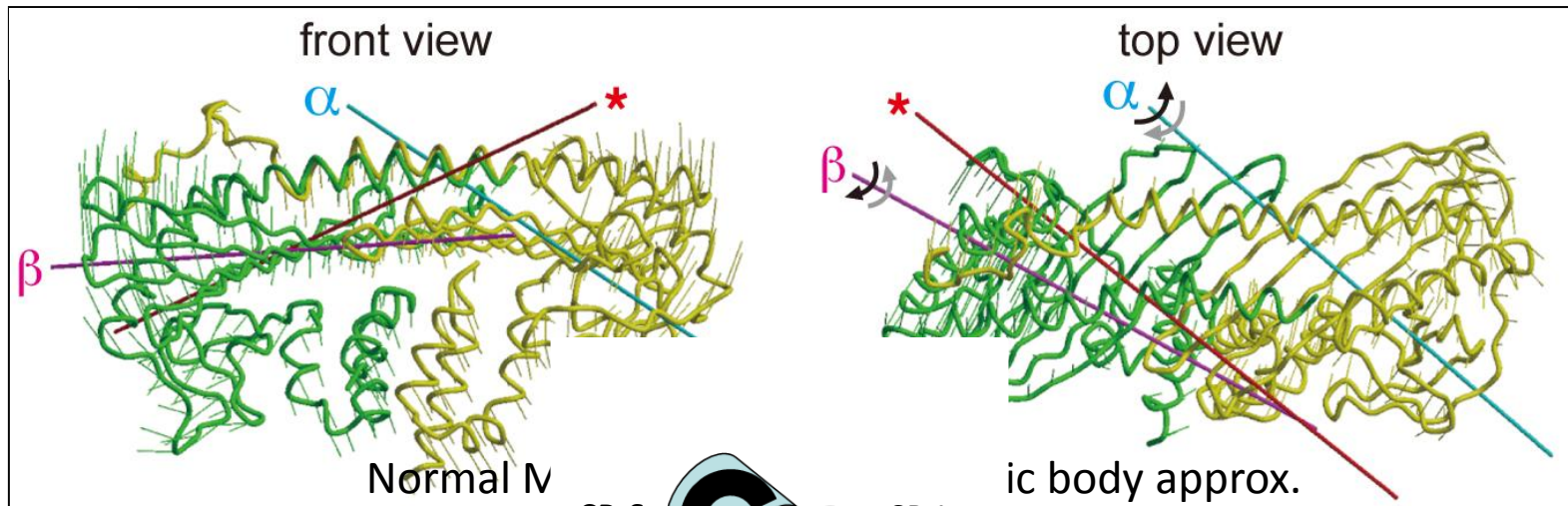
## CP単独の構造とほぼ同一

CARMIL peptides binding groove on CP is remote from the actin binding region and spans the two domains across the boundary

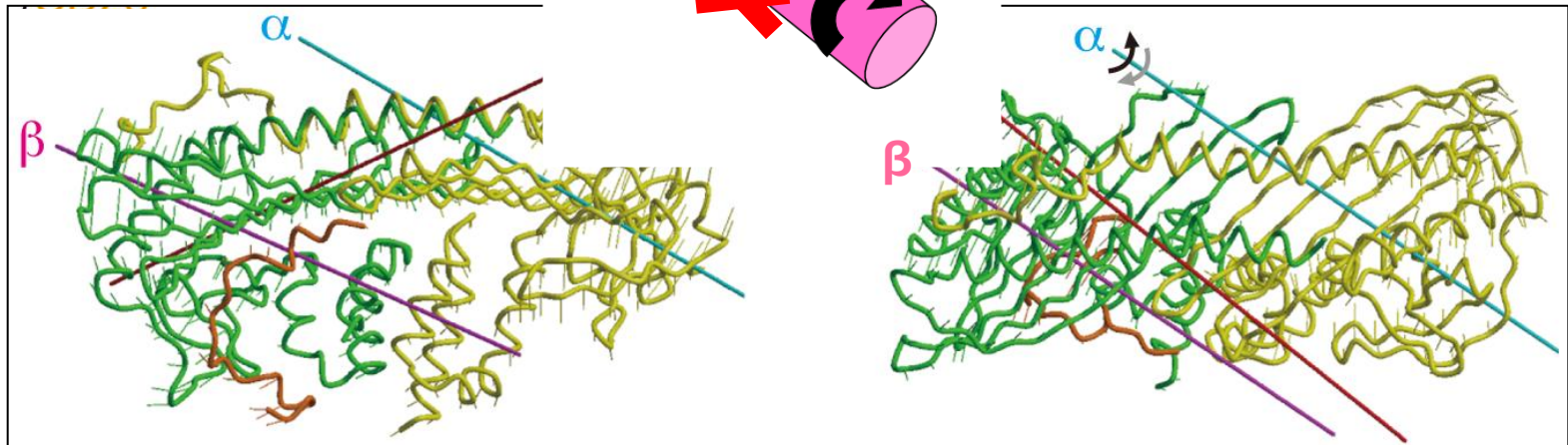


# Normal Mode Analysis with elastic body approx.

## Free CP



## With CARMIL peptide



\* — rotational axis by structural comparison  
 —  $\alpha$  — rotational axis by normal mode analysis  
 —  $\beta$  — rotational axis by normal mode analysis  
 —  $\alpha$  —  $\alpha$ -subunit axis  
 —  $\beta$  —  $\beta$ -subunit axis

Takeda, S. et al. (2010)  
*PLoS Biol* 8, e1000416.

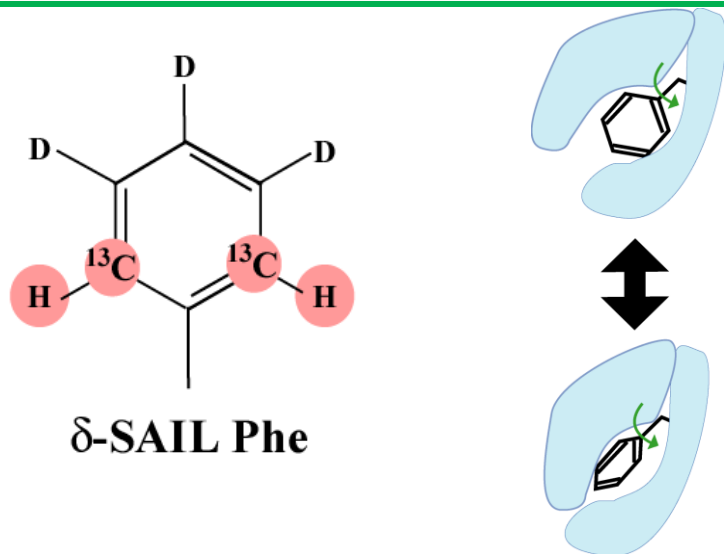
## 今後の課題

### 蛋白質相互作用の解明： 3つの研究方向

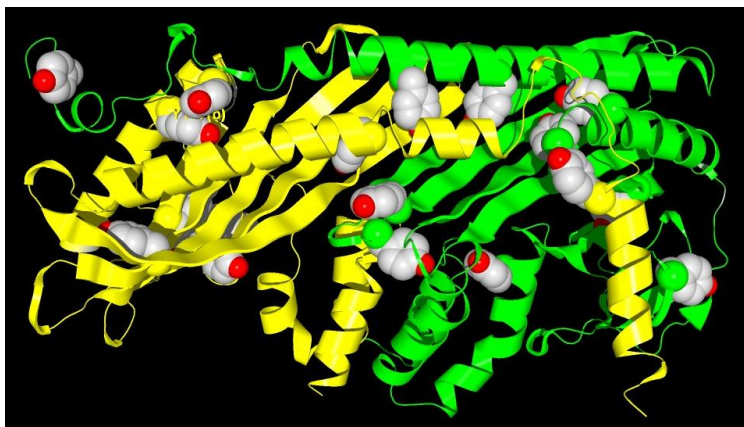
1. 分子の会合動態  
← 分子の構造動態の変化を解明する
2. 複合体の高分解能構造を解明する
3. 細胞内での分子の会合動態と複合体の構造を解明する

# 研究方向 1 蛋白質分子の構造動態を知る

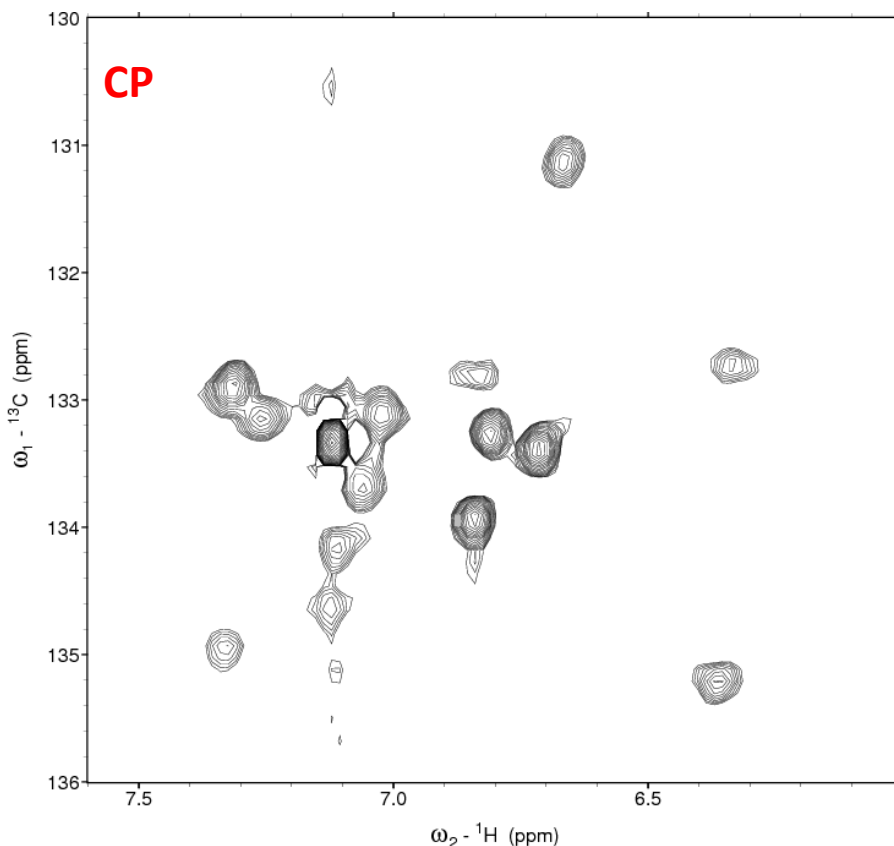
## CP 分子内の各部の「柔らかさ」を直接測定する(SAIL-NMR法)



SAILアミノ酸 (Stereo Array Isotope Labeling): 原子を選択的に同位体標識  
 → 芳香環の回転を測定可能  
 → 分子各部の「柔らかさ」の計測



**SAIL- $\text{Y}\delta\text{-}^2\text{H}^{14}\text{N}^{12}\text{C}$  CP $\beta\Delta$ C33**:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  arom CH TROSY  
 (0.13 mM CP 40 mM sodium acetate [pH 6.45], 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1%  $\text{D}_2\text{O}$ ) Measurement: av900 with CRYOPROBE, NS = 32,  $d_1=4\text{s}$ , Temp. = 310 K

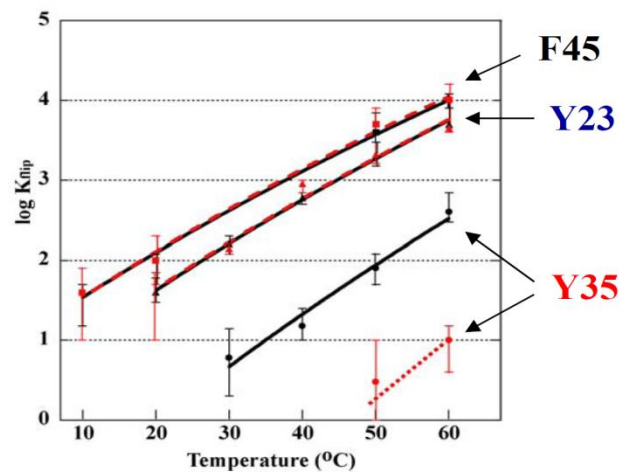
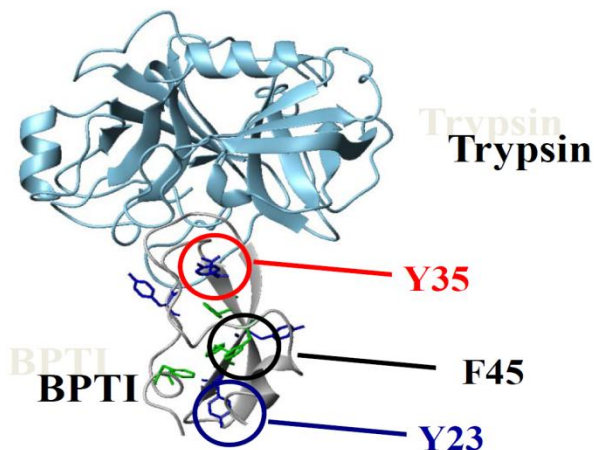
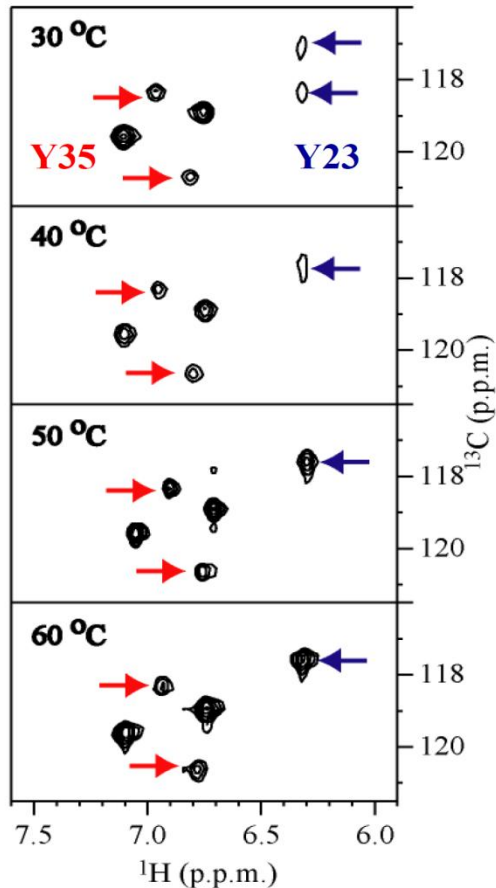
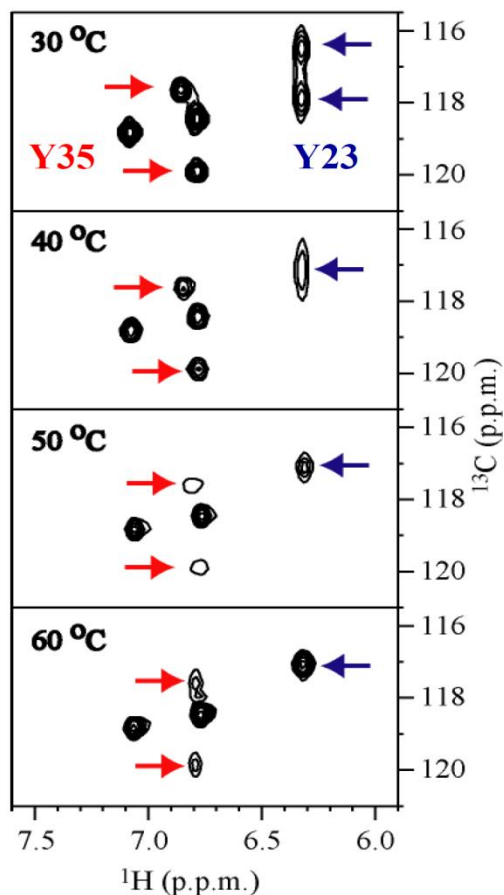


CP: 19個のTyrが分子全体に分布  
 CARMILペプチド結合による回転速度の変化?  
 甲斐荘らとの共同研究

# Trypsin binding reduces the aromatic ring flipping rates

Free in solution (5.8kDa)

Trypsin complex (30.5kDa)



**Ring flipping rate of Tyr-35 drastically slows down in the trypsin complex**

M.Takeda & M.Kainosho, unpublished

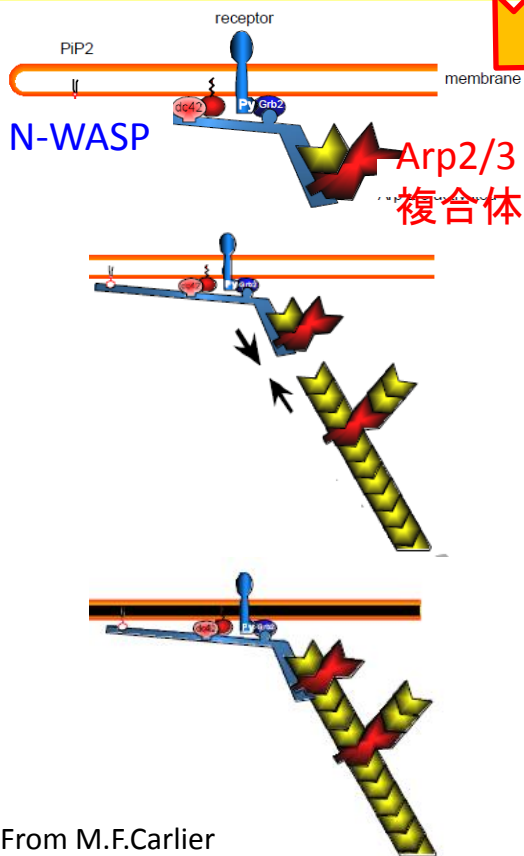
— Free — Complex

# 研究方向 2. 蛋白質複合体の構造解明:

## (1) 重合の開始、(2) 脱重合加速のメカニズム解明

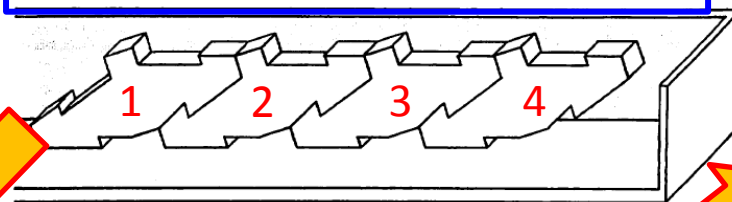
核形成促進因子  
(Arp2/3)

(1) 最初のアクチン分子、「誰」がいつ、どのように変形するか?

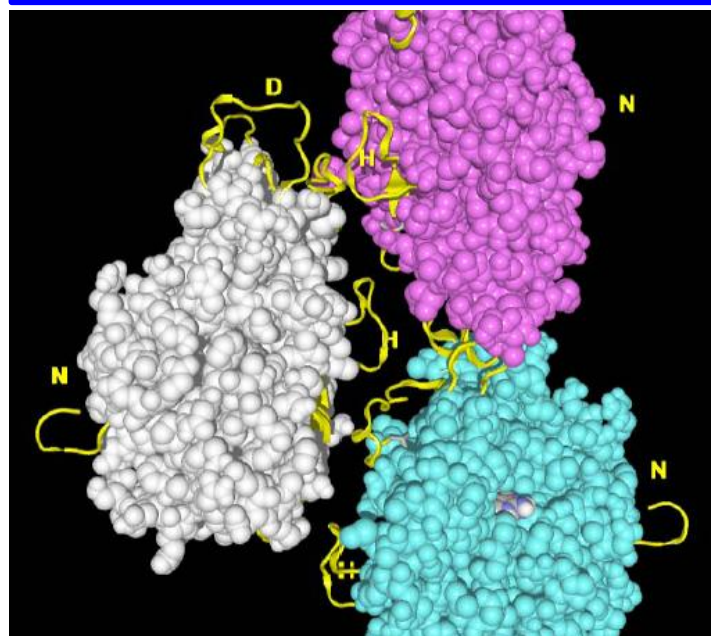


From M.F.Carlier

アクチンの変形は伝搬する  
自発的には重合ははじまらない



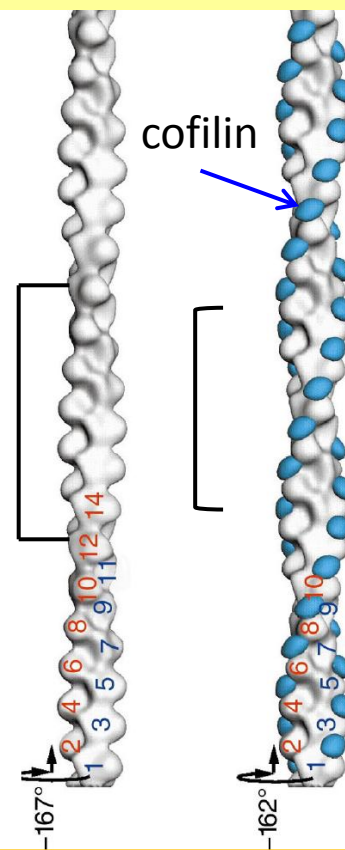
ループ・ループ結合



3. アクチン重合体の柔らかさ  
ループ・ループ結合の部分的破綻?

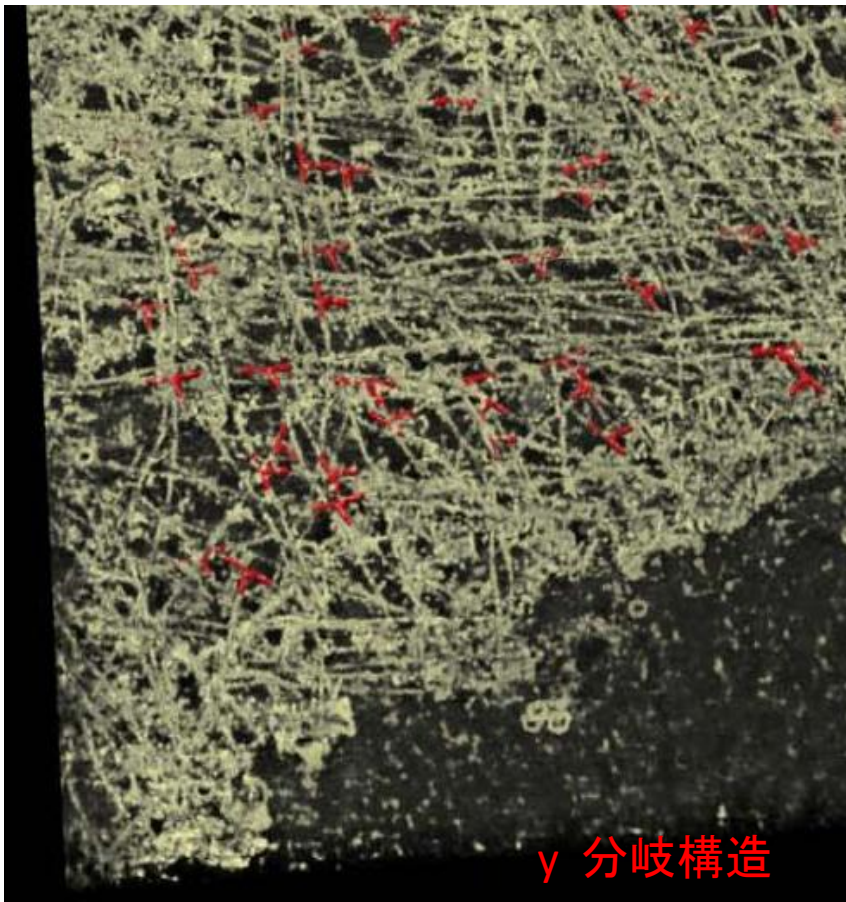
脱重合促進因子  
(cofilin)

(2) どのように  
ループ間結合すべてを  
同時に外すのか?



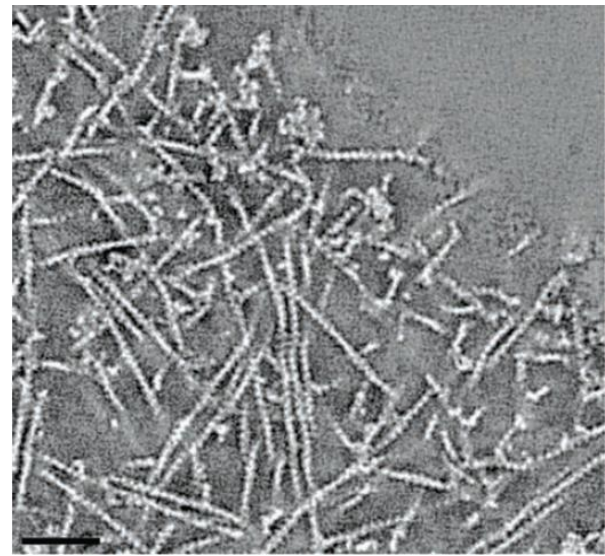
Bamburg, McGough, & Ono (1999),  
*Trends Cell Biol* 9, 364-70.

# 研究方向 3. 細胞内の会合動態と複合体の構造解明: 膜近傍でのアクチン伸張点・分岐点の配置(電子線トモグラフィ)

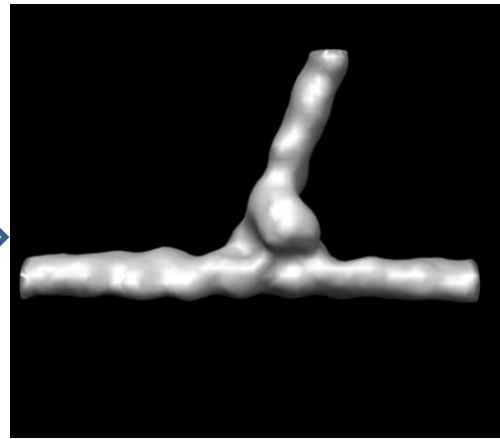
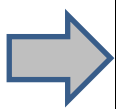
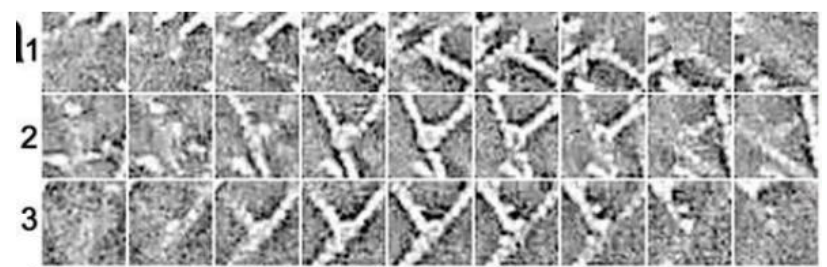


$\gamma$  分岐構造

アクチン重合体の分岐構造 (Lamellipodium)  
Small 研が撮影、成田が解析  
新規試料調製法を開発中(臼倉研と共同)



← J.V.Small,  
Nature Cell Biol.  
(2010)



A.Narita, J.Müller, J.V.Small. Un-published

# Acknowledgement:

***ERATO project /  
Nagoya University  
Structural Biology Res. Cntr.***

Akihiro Narita,  
Yasushi Nitani,  
Shuichi Takeda,  
Shiho Minakata,  
Atsuko Yamashita,  
Mitsusada Iwasa,

Kayo Maeda,

***RIKEN, Spring-8 Center***  
Toshiro Oda,  
Tomoki Aihara

***Nagoya University,  
Structural Biology Res. Cntr.***  
Masatsune Kainosho  
Youhei Miyanoiri  
Mitsuhiro Takeda

***Nagoya University,  
Ecotopia Science Institute***  
Jiro Usukura

***The Institute of Molecular Biotechnology  
(IMBA), the Austrian Academy of Sciences***  
John Vic Small

***Nagoya University,  
Bio-informatics***  
Motonori Ota  
Ryotaro Koike