



ゲルゾリンファミリータンパク質との共結晶化による F型アクチン原子構造の解明

武田修一

名古屋大学大学院理学研究科附属構造生物学研究センター

キーワード：アクチン, キャッピングタンパク質, 細胞骨格, X線結晶構造解析

1. 概要

アクチンキャッピングタンパク質 (CP) は、アクチン繊維 (F アクチン) の端に強固に結合することによって、単量体アクチン分子 (G アクチン) の結合・解離脱を防ぐことから、生体内におけるアクチンダイナミクス制御において重要な役割を果たすことが知られている。CP は2つのサブユニット (α 、及び β サブユニット) からなるヘテロダイマータンパク質であり、それぞれのサブユニットについて異なるアイソフォームが存在することが知られている。本研究では、マウスのアイソフォーム組成が異なる二種類の CP ($\alpha 1 \beta 2$ 、及び $\alpha 2 \beta 2$) の X 線結晶構造を決定した。

2. 背景と研究目的

アクチンは、ほとんどの真核細胞において、最も大量に存在するタンパク質であり、細胞運動、筋収縮、個体発生など様々な生体現象に重要な役割を果たしている。単量体 G アクチンは重合することによって、二重らせん状の F アクチンを形成する。両者間の遷移はダイナミックであり、アクチン会合状態の空間・時間的制御には、様々な結合タンパク質が関与することが知られている。F アクチンは極性を持つ繊維であるが、CP はアクチン重合・脱重合が活発に起こる端 (プラス端) に結合することで、そこでの伸長・収縮を防ぐことが知られている。タンパク質の機能を理解する上で、その立体構造情報は極めて重要である。これまでにニワトリ [1, 2]、及び粘菌 [3] 由来の CP の X 線結晶構造が報告されているが、哺乳類 CP の構造は未決定である。さらに脊椎動物体細胞には、2つの α サブユニットアイソフォーム ($\alpha 1$ 、及び $\alpha 2$) が存在することが知られている、その構造・機能の違いはわかっていない。そのため本研究では、アイソフォーム組成が異なる二種類のマウス CP ($\alpha 1 \beta 2$ 、及び $\alpha 2 \beta 2$) の原子構造の決定を目指した。

3. 実験内容

結晶化に用いたマウス CP $\alpha 1 \beta 2$ 、及び $\alpha 2 \beta 2$ タンパク質は、大腸菌発現系を用いて精製した。市販のキットを用いて、結晶化条件のイニシャルスクリーニングを行った。得られたヒット条件を最適化することで、それぞれのタンパク質の単結晶を得た。回折実験は、AichiSR 単結晶用ビームライン BL2S1 (波長 = 1.12 Å) にて行った。それぞれのタンパク質について複数の凍結結晶を用いて、回折実験を行ったところ、 $\alpha 1 \beta 2$ については分解能 2.0 Å、 $\alpha 2 \beta 2$ については分解能 2.1 Å の反射データセットを収集することに成功した。得られたデータセットを、サイト備え付けのプログラム XDS で処理したのち、既知のニワトリ CP の結晶構造を探索モデルとして、分子置換法で初期位相を求め、さらに構造精密化作業によって原子構造を決定した。

4. 結果および考察

それぞれのタンパク質の結晶構造を Fig. 1 に示す。大まかな構造はマッシュルーム状をしており、 α 、 β サブユニット間の立体配置は両者間でほぼ変わらないことがわかる。図では示さないが、既知のニワトリ、及び粘菌 CP とほぼ同様の構造をしている。つまり種間で CP のヘテロダイマー構造は高く保

存されていることが確認された。このことは、進化過程における F アクチンの高度な構造保存性と関連しているものと考えられる。また、 α サブユニットアイソフォームの違いも、高次構造にはほとんど影響を与えないことが、明らかとなった。これは $\alpha 1\beta 2$ と $\alpha 2\beta 2$ が、ほぼ同じアフィニティで F アクチンに結合するという報告[4]を裏付けるものである。現在、両者の構造の差異を詳細に比較検討中である。

5. 今後の課題

今回得られた2つの CP アイソフォームの構造情報を元に、両者の機能の違いを様々な視点から研究する必要がある。さらに、CP に結合することで F アクチン結合活性を制御する因子が存在することが知られている。それらの制御因子との複合体の原子構造の解明することで、細胞内アクチンダイナミックスについて、新たな知見が得られることが期待される。

6. 参考文献

1. Yamashita, A., K. Maeda, and Y. Maéda, *Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping*. *The EMBO Journal*, 2003. **22**(7): p. 1529-1538.
2. Takeda, S., et al., *Two distinct mechanisms for actin capping protein regulation--steric and allosteric inhibition*. *PLoS Biol*, 2010. **8**(7): p. e1000416.
3. Eckert, C., et al., *Conservation and divergence between cytoplasmic and muscle-specific actin capping proteins: insights from the crystal structure of cytoplasmic Cap32/34 from Dictyostelium discoideum*. *BMC Struct Biol*, 2012. **12**: p. 12.
4. Bhattacharya, N., et al., *Binding of myotrophin/V-1 to actin-capping protein: implications for how capping protein binds to the filament barbed end*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(41): p. 31021-30.

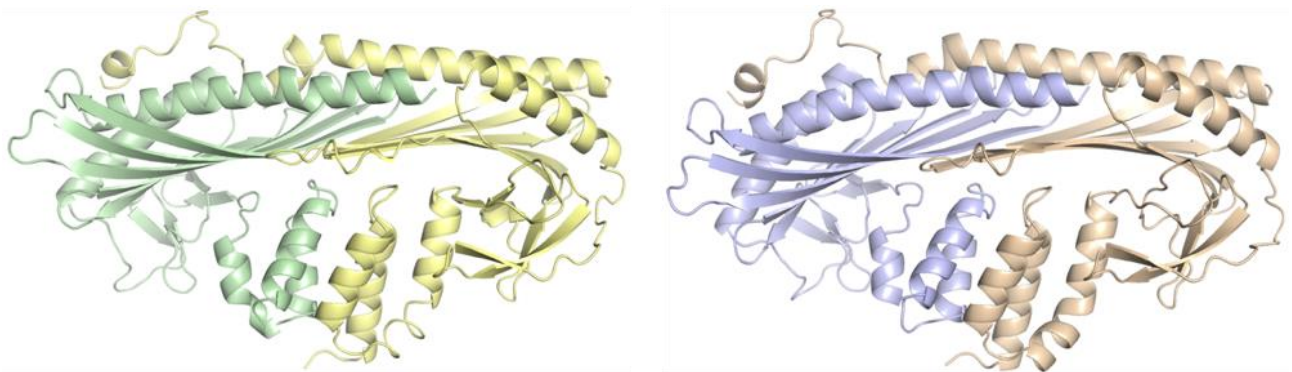


Fig. 1 マウスCPの結晶構造

左: $\alpha 1$ (黄) $\beta 2$ (緑)

右: $\alpha 2$ (桃) $\beta 2$ (紫)