



# 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

アクチンはほとんどの真核生物細胞中で最も発現量の多いタンパク質であり、繊維状アクチン (F アクチン) の重合機構を原子構造レベルで説明することは、様々な生理現象を理解する上で必須である。本研究では、F アクチン切断因子であるゲルゾリンファミリータンパク質の一種、フラグミンとの複合体を用いて、F 型アクチンの結晶構造を決定する事を目標とする。これまで F 型アクチンの結晶構造は報告されておらず、よって本研究の成果はアクチン研究全体に大きなインパクトを与えることが期待される。またゲルゾリンファミリータンパク質は様々な病理現象との関連が示されており、その作用機序の解明は非常に重要である。フラグミンは構造的に相同な3つのドメイン (F1 から F3) より構成される。今回の測定では、C 末端側の2つのドメイン (F2/F3) の X 線結晶構造を決定した。得られた構造は、アクチンとの複合体中の F2/F3 ドメインとほぼ同一であり、Ca<sup>2+</sup>を介して両ドメインが結合していた。

## 2. 背景と研究目的

ゲルゾリンファミリータンパク質は Ca<sup>2+</sup>によって活性化され、F アクチンと結合し切断することが知られている。これまでの BL2S1 における測定によって、全長フラグミンとアクチン2分子の複合体 (FA<sub>2</sub> complex) の結晶構造が得られている。この構造において、すでに報告されているゲルゾリンとアクチンの複合体結晶では見られなかった新規の Ca<sup>2+</sup>結合部位が2箇所見つかった。一つはフラグミン F2、F3 とアクチンを介する分子間 Ca<sup>2+</sup>結合部位であり、もう一つは F2 と F3 間に位置する分子内 Ca<sup>2+</sup>結合部位であった。しかし、FA<sub>2</sub> complex 構造において分子内 Ca<sup>2+</sup>結合部位の Ca<sup>2+</sup>に相当する電子密度は貧弱であった。このことは、この部位が低アフィニティ Ca<sup>2+</sup>結合部位である、あるいは本来は Ca<sup>2+</sup>以外のカチオン結合部位であるのだが、結晶化母液中にはカチオンが Ca<sup>2+</sup>しか含まれていないため、結果的に Ca<sup>2+</sup>が本来の配位構造とは違う形で結合している、可能性を示唆している。さらに分子間 Ca<sup>2+</sup>結合部位についてフラグミンがアクチンと結合していない場合でも Ca<sup>2+</sup>が結合しているのか、はわかっていない。これらの疑問に答えるために、フラグミン F2/F3 ドメインを異なるカチオン条件で結晶化し、その構造決定を目指した。

## 3. 実験内容

結晶化に用いたフラグミン F2/F3 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、カチオンとして 10 mM CaCl<sub>2</sub> が存在する条件 (F2/F3\_Ca)、及び 10 mM CaCl<sub>2</sub> に加えて 10 mM MgCl<sub>2</sub> が存在する条件 (F2/F3\_CaMg) で単結晶を得た。回折実験は、あいち SR 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、回折実験を行なったところ、F2/F3\_Ca については分解能 1.85 Å、F2/F3\_CaMg については分解能 2.15 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、既知のフラグミン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 Phenix による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

それぞれの結晶構造を Fig. 1 に示す。F2/F3\_Ca と F2/F3\_CaMg の全体構造はほぼ同じであった。F2/F3\_Ca だけではなく、F2/F3\_CaMg においても分子内  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位には  $\text{Ca}^{2+}$  が結合していたことから、この部位は他のカチオン結合部位ではなく  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位であることがわかった。今回の F2/F3\_Ca 結晶化母液は 10 mM  $\text{CaCl}_2$  を含む条件であったが、FA<sub>2</sub> complex の場合  $\text{CaCl}_2$  濃度は 0.2 mM であった。従って、この部位は結合定数が数 mM ほどの低アフィニティ  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位であるであることを示唆する。さらに F2/F3\_Ca、F2/F3\_CaMg 共に分子間  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位へのカチオンの結合は観察されなかった。このことはこの部位がアクチンが存在することで初めて機能するカチオン結合部位であることを示している。また F2/F3\_Ca、F2/F3\_CaMg の構造は FA<sub>2</sub> complex の F2/F3 ドメインとほぼ相同であったことから、フラグミンは  $\text{Ca}^{2+}$  の結合のみでアクチンとの結合可能な活性化状態となることが示唆された。

#### 5. 今後の課題

ゲルゾリンなどの他のファミリータンパク質でも、同様のカチオン結合様式を共有しているのかは、非常に興味深い。

#### 6. 参考文献

特になし

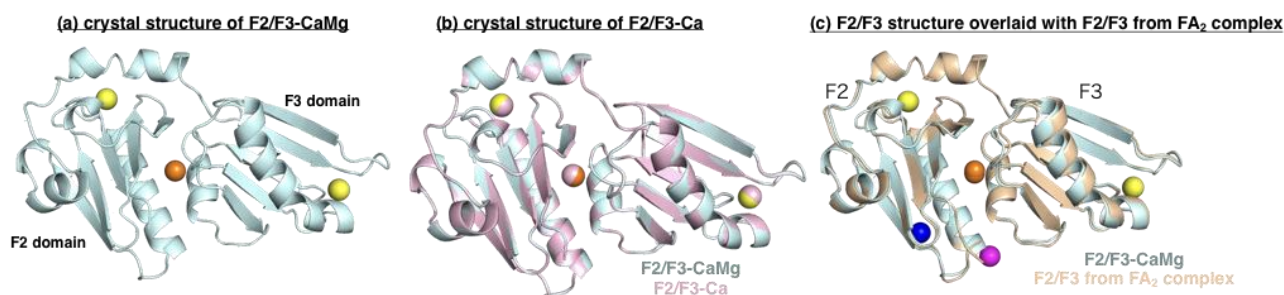


Fig. 1 F2/F3-CaMg、及びF2/F3-Caの結晶構造

(a) F2/F3-CaMg結晶構造. ポールで示されているのが $\text{Ca}^{2+}$ . 黄色がすでにゲルゾリン・アクチン複合体で報告されている $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位. オレンジで示されているのが分子内 $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位. 10 mM  $\text{CaCl}_2$ に加えて10 mM  $\text{MgCl}_2$ が存在するにも関わらず、結合カチオンは $\text{Ca}^{2+}$ であった.

(b) F2/F3-Ca結晶構造(桃色)をF2/F3-CaMg結晶構造(水色)と比較した. 両者はほぼ同じ構造をとっている.

(c) F2/F3-CaMg結晶構造(水色)をFA<sub>2</sub> complex中のF2/F3(小麦色)と比較した. 両者はほぼ同じ構造であった. またFA<sub>2</sub> complexでは分子間 $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位に結合していたが(青色ポール)、F2/F3-CaMg結晶構造ではこの部位にカチオンの結合は見られない.