



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. 背景と研究目的

アクチンはほとんどの真核細胞で最も多く発現している細胞骨格タンパク質であり, 様々な生命現象へ関与している. 単量体アクチン (G アクチン) は, 集合し繊維状の F アクチンを形成することで機能するため, 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, 非常に重要である. アクチンは ATPase であり, 結合 ATP は重合にともなって加水分解され, 分解産物の Pi が放出されることで, ADP-F アクチンとなる. この Pi 放出によって繊維構造が不安定化し, 脱重合しやすくなる. アクチンは ATP 結合クレフトをはさむ 2 つの大きなドメインからなる. G アクチンでは両ドメインが約 20 度ねじれたコンフォメーションをとっているが, 重合時にドメイン間で回転運動が起こり, ねじれの少ない平板化した F 型アクチン構造をとる (Oda, Nature, 2009). 近年の電子顕微鏡技術の発展によって, 3.6 Å 分解能の ADP-F アクチン構造が明らかとなった (von der Ecken, Nature, 2016). しかし, ATP 加水分解やヌクレオチド依存的な繊維構造の安定の変化などのアクチンの基本的な特性の理解には至っていない. このためには, F 型アクチンの構造を, 異なるヌクレオチド状態で, なおかつ水分子やカチオンなどのリガンド位置を確定できるレベルの高分解能で決定することが必須である. 水分子を含む高分解能構造を決定するための唯一の手法は, X 線結晶構造解析である. これまで多くの研究者が F 型アクチンの結晶化に取り組んできたが, アクチンは重合性タンパク質であることから, 結晶化には不適な試料であり, これまで PDB に登録されている 100 以上のアクチン結晶構造は全て G 型である. F 型アクチン結晶構造を得るためには, 複数のアクチン分子を厳密に繊維状に配置させる補助因子が必要である.

我々は, 真正粘菌タンパク質であるフラグミンが, アクチンオリゴマー安定化テンプレートとして機能することを見出した. フラグミンはゲルゾリンファミリータンパク質の一員であり, Ca^{2+} によって活性化され, アクチン繊維を切断する活性を持つ. 1 分子のフラグミンはアクチン 2 分子と強固に結合する (この複合体を FA₂ complex と呼ぶ). 条件検討の結果, FA₂ complex の単結晶を得ることに成功し, あいちシンクロトロン BL2S1 ビームラインによる回折実験によって, 2.3 Å 分解能での構造決定に成功した. FA₂ complex 中で, アクチン 2 分子は繊維内の縦 2 分子と同様に配置しており, フラグミンはそれを固定するように結合していた. このうち, 重合・脱重合が活発に起こる B 端に位置するアクチン分子のコンフォメーションは F 型であった. さらにこの結晶は非対称単位内に 2 つの FA₂ complex を含んでおり, それぞれの“アクチン縦ダイマー”はアクチン繊維の二本のストランドの様に接触していた. このアクチン 4 分子からなる繊維様原子構造によって, 側鎖レベルでの繊維構造が明らかとなり, 重合メカニズムについての詳細な議論が可能となった. また, ミオシンなどのアクチン結合タンパク質の作用機序研究にも重要な情報を与えるものである. 我々はさらにフラグミンの N 末端側ドメイン F1 単独でもアクチンコンフォメーションを F 型化させることができることを発見した. この F1A complex の結晶構造は高分解能 (1.2 Å) で, 結合リガンド (ヌクレオチド, カチオン, 水) の位置まではっきりと同定できる. 前回までの BL2S1 における測定で, F1A complex (結合ヌクレオチドは ADP) の構造の決定に成功した. この構造において ATP 加水分解によって生じた無機リン酸が抜けた後のスペースにクロライドイオンが結合していた. これは結晶化母液に含まれる塩化カリウムに由来するものと考えられる. 今回は塩化カリウムを含まない溶液条件で得た結晶を用いることで, クロライドイオンを結合しない F1A complex の構造決定を目

指した.

2. 実験内容

結晶化に用いたフラグミン F1 ドメインは,大腸菌発現系を用いて精製した。骨格筋アクチンはニワトリササミより生成した。両者タンパク質を混合することで, F1A complex を得た。既知の結晶化溶液から塩化カリウムを除いた条件下で単結晶を得た。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。分解能 1.6 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 XDSGUI で処理した。

3. 結果および考察

既知の F1A complex 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/Coot による構造精密化作業によって原子構造を決定した。全体構造はクロライドイオンを結合している F1A complex と同一であった。予想通り ADP 付近にはクロライドイオンは確認できなかった。クロライドイオンは水分子によって置き換わっていたが,主鎖構造に多型が観察された。おそらく ADP アクチンの構造揺らぎを反映しているものと考えられる。

今回観察された ADP アクチン主鎖構造の多型は,生体内におけるアクチンダイナミックスを考える上で非常に興味深い現象である。溶液条件などを検討して,この構造揺らぎの意義を検証する必要がある。

4. 参考文献

特になし