

研究報告書

「アクチンフィラメント網動態の電子顕微鏡法による階層的理解」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 成田 哲博

1. 研究のねらい

アクチンフィラメントは、真核細胞において、細胞骨格、接着、運動、分裂等様々な重要な役割を果たし、神経回路形成、癌細胞浸潤、花粉管伸長、細胞分化など様々な観点から盛んに研究されている。これらすべてに共通して、アクチンフィラメントは重合、脱重合を通じて常に形成と消滅を繰り返しており、この動態ゆえに内的、外的環境に応じたアクチンフィラメントネットワークを動的に形成する。このアクチンフィラメント動態を理解することは、ヒトも含めた真核生物において起こる非常に広い範囲の現象の理解に必要不可欠である。この動態はもちろん蛋白質の三次元構造によって説明されるべきものであるが、アクチンフィラメントは X 線結晶解析や NMR 法による構造決定が事実上不可能であるため、電子顕微鏡法による構造解析が最も有効な手段である。アクチンフィラメント動態の理解に向けて、以下の3つを柱として研究を行った。

1: アクチン-コフィリン複合体、アクチン-フォルミン複合体の三次元構造解析

コフィリンはアクチンの脱重合、切断促進において中心的な役割を果たす蛋白質であり、細胞内で不必要なアクチン線維を壊すのに主要な役割を担っている。私達はクライオ電子顕微鏡法によって、従来よりも高分解能の構造解析を行い、脱重合、切断促進機構を説明するモデルを構築し、変異体実験によって確かめる。また、フォルミンはアクチンフィラメント形成開始の多くを担い、極めて重要であるが、そのフィラメントとの結合状態の構造がまったくわかっていない。フォルミンはフィラメント端に結合して、しかも一つの構造に留まらないため、解析が非常に難しい。新しい顕微鏡法の開発も視野に入れ、この難題に挑んだ。

2: バクテリアアクチンホモログ ParM の三次元構造解析

原核生物においてもアクチンホモログが存在するが、その構造は多様であり、アクチン線維のような二重らせん構造をとらないものも多い。様々な ParM 線維の高分解能構造解析を通じて、生物における線維構造構築の一般原理に迫ることを目標とする。

3: 細胞内アクチンフィラメント構造解析

アクチンフィラメントが細胞内に作る構造、特に細胞膜との結合状態は、細胞における多様なアクチンフィラメントの機能を理解するのに必要不可欠である。そのための手法開発を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

アクチン-コフィリン複合体については、7 Å 台の分解能でクライオ電子顕微鏡写真から三次元構造解析を行い、アクチン第2サブドメインで従来見られない α -helix が観察され、大きな構造変化があることがわかった。この α -helix 構造は X 線結晶解析では観測され、アクチンフィラメントにおいても予測されていたが、フィラメント構造においていままで可視化されたことはな

かった。これを確かめる変異体実験を現在行っている。アクチン-フォルミン複合体については難航しているが、この解析のための技術開発において、走査透過型電子顕微鏡の構造解析への有用性が明らかになってきている。透過型電子顕微鏡は焦点はずれ量に伴う像の歪みが避けられないが、低加速の走査透過型電子顕微鏡を用いることで、コントラストを保ちながら、歪みの無い像が得られた。ParM の解析においては、3つの構造解析を行い、同じ ParM ファミリーでありながら、あるものはバネのようであり、あるものは4本のプロトフィラメントから形成され、あるものは極性が無いなど、非常に多様な線維構造をとることが明らかになってきている。

細胞内アクチンフィラメント構造解析については、負染色トモグラフィー、修正徳安法などさまざまな方法を試したが、最終的には新型チップスキャン AFM を使用する手法に行き着いた。オリンパスが開発したチップスキャン型 AFM である BIXAM の性能評価をオリンパスと共同で行った結果、5.5 nm 周期のアクチンフィラメント中のアクチン分子の並びが見え、その像から、フィラメント重合端、脱重合端の方向が決定できた。また、アクチンフィラメント上の幅 2 nm のトロポミオシンが直接観察された。さらに、細胞膜の一部とその上に結合した構造を残すアンルーピング法を用いると、アクチンフィラメント、クラスリン、カベオラなど、細胞膜上の構造が nm オーダー分解能で観察することができ、細胞内アクチンフィラメント構造解析に一定の目処をたてることができた。チップスキャン型 AFM は蛍光顕微鏡との結合が容易で、現在相關顕微鏡として用いるための手法開発を行っている。

(2) 詳細

1: アクチン-コフィリン複合体、アクチン-フォルミン複合体の三次元構造解析

産業技術総合研究所の電子顕微鏡(300 kV, ヘリウムステージ、エネルギーフィルタ装備)を使わせていただき、アクチン-コフィリン複合体構造をクライオ電子顕微鏡法により解析、7 Å 程度の分解能で三次元構造決定を行った(右図)。矢印で示した α -helix は、従来のどのアクチン線維構造でもループであり、アクチン線維構造の中で α -helix をとっているのは初めてである。このループ-ヘリックス転移によるフィラメント内の結合の切り替えがコフィリンによるアクチンフィラメント切断の鍵を握ると考えている。現在これを確かめる変異体実験を行っており、その結果が出次第論文を投稿する。

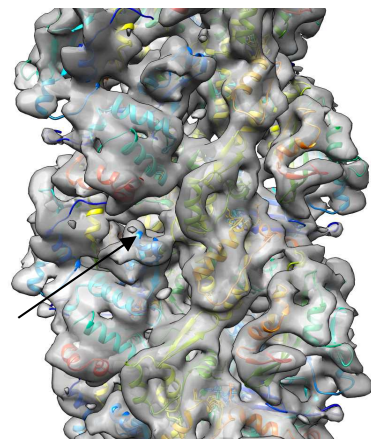


図 1: アクチン-コフィリン複合体構造

アクチン-フォルミン複合体については、アクチン線維の端に結合し、かつ複数の結合状態の構造をとるフォルミンは構造解析が困難であることが予測された。この構造解析を行うためには、電子顕微鏡像を構造ごとに仕分ける必要であり、そのためには、低分解能(4 nm 以下)から中間分解能(2-4 nm)の歪みの少ないシグナルが必要である。しかし、通常の透過型電子顕微鏡(TEM)は、電子の干渉によって像を得る位相コントラストが主なコントラストである関係上、低分解能のシグナルが非常に弱い。また、焦点はずれ量(デフォーカス量)により、像が大きく異なる。私達は、必要な分解能領域のシグナルを効率的に歪み無く得るために、走査透過型電子顕微鏡(STEM)と負染色の組み合わせを試すことにした。STEM は、試料上の点に電子線を収束照射し、散乱しない電子の量を計測、電子線

を試料上でスキャンすることによって像を得る。その原理のため、位相コントラストの邪魔になる

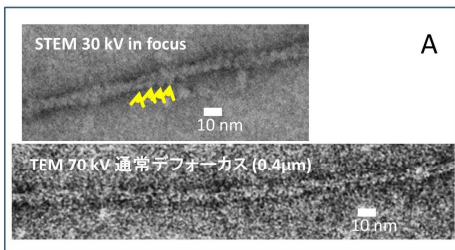
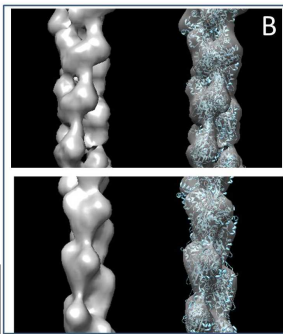


図 2: A 上:STEM によるアクチン線維像。矢印でアクチン分子の並びを示した。はっきりと個々のアクチン分子が見える。下:TEM によるアクチン線維像。低分解能成分のシグナルが弱いので、アクチン分子の並びが見えにくい。B 上:アクチン線維像4本から再構成したアクチン線維構造(左)。サブドメイン構造がはっきり見える。これにアクチン分子構造モデルをあてはめた(右)。ほぼ完全にフィットする。下:同じ条件の TEM から再構成した構造。アクチン分子構造はそれほどよくフィットしない。



る多重散乱や非弾性散乱もコントラストに寄与し、位相コントラスト結像による像のひずみも存在しない。また、加速電圧を通常 TEM の 80 kV 以上よりも低い 30 kV 程度に抑えることによってコントラ

ストを増強することができる。これを用いてアクチンフィラメント像を撮影したところ、歪みの無いコントラストが高い像を得ることができ(図 2 左上)、これを解析すると、従来よりもはるかに少ない 500 アクチン分子(フィラメント4本分の像)から、原子座標モデルが完全にフィットする三次元構造を得ることができた(図 2 右上)。この結果は、構造多型や小数しか像が

得られない場合の三次元構造解析に、負染色法と STEM の組み合わせが極めて有用であることを示しており、今後広い範囲で応用可能である。

フォルミンの解析そのものについては、ヒトフォルミンである mDia をこの STEM で解析した結果、ほとんど4量体であることがわかり、これ自体発見であるものの、結合状態の構造が当初予想より複雑であることが予想でき、構造解析には向かないことがわかった。現在酵母のフォルミンを発現、精製しており、こちらは二量体であることがわかり、電子顕微鏡解析を現在おこなっている。

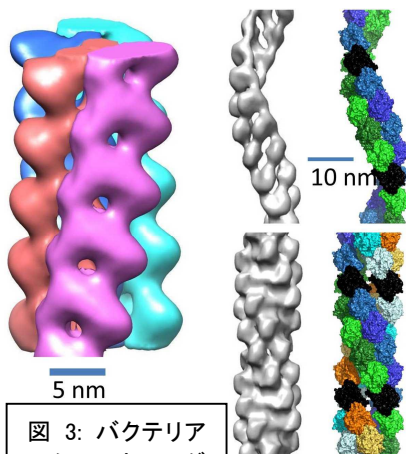


図 3: バクテリアアクチンホモログ ParM 構造

2: バクテリアアクチンホモログ ParM

シンガポールのグループと共同研究で、バクテリアアクチンホモログ ParM の三次元構造解析を行った。解析したのは、破傷風菌 ParM, バチルス・チューリゲンシス ParM, ボツリヌス菌 ParM の三種類である。破傷風菌のものは4本のストランドからなる線維で、ストランドの極性が二本ずつ反対を向いていて、全体として極性が無い線維をつくる(図 3 左)。バチルスの ParM は、単体ではバネのような独特な構造を作るが(図 3 右

上)、対応する ParR (ParM の線維形成因子)を混ぜて重合を開始すると、ちょうどそのバネの隙間にもう一本の ParM 線維が隙間を埋めるようにかみあって、4本ストランドの線維を作ることがわかった(図 3 右下)。ボツリヌス菌については、17 本ストランドの複雑で大きな構造を作ることがわかった(未公開データ)。同じ ParM でもそれぞれ構造が全くことなり、単量体構造がよく似ているにもかかわらず、少しの単量体構造の差でこのような大きな線維構造変化がどのようにして表れるのかを考察するのがこれからの課題である。

3: 細胞内アクチンフィラメント構造解析

細胞内のアクチンフィラメント構造解析のために様々な方法を試した。最初にオーストリアの

Victor Small 研究室と負染色した細胞の電子線トモグラフィーの解析を行い、ウィルスが細胞

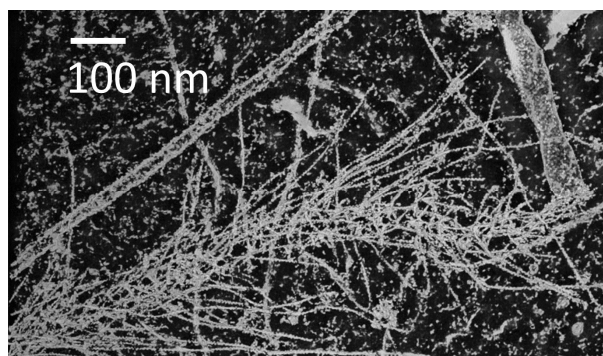
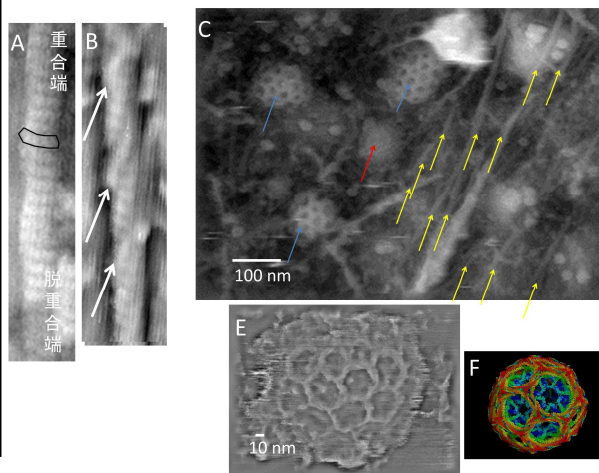


図 4: パキローウィルスが作る細胞内コメットテイルの電子線トモグラム。

内に作るコメットテイルの構造解析を行った(図 4)。しかし、この方法は細胞膜を溶かしてしまうこと、細胞のごく薄いところにしか適用できないなど、制約が大きかった。そのあと、細胞を糖包埋して凍結、クライオミクロームで切片を作成し、常温にもどして糖を抜いて再度急速凍結する手法(徳安法の修正)をおこなった。確かに膜やアクチン線維は見えるし、200 nm 程度の厚い切片の解析もできるのだが、残念ながら分子

レベルの構造解析ができるレベルまでは達しなかった。

図 5: 新型チップスキャン AFM による像。A: 精製アクチン線維像。アクチン分子間隔のストライプがはっきり見え、その1単位(黒線囲い)の形からどちらが重合端かわかる。これは、C 中のアクチン線維でも同様に観察される。B: A にトロポミオシンを結合させると、直径 2 nm のトロポミオシンがはっきり見える(矢印)。C: アンルーフィングされた細胞の観察例。アクチン線維(黄色矢印)、クラスリン(青矢印)、カベオラ(赤矢印)がはっきり観察される。E: クラスリン拡大図。F: クラスリン分子モデル。E の中にクラスリン分子構造(F)に存在する α ヘリックスバンドル構造が観察でき、この新型 AFM が、条件が良ければ 1 nm オーダーの分解能を持つことがわかる。



その中で、2014 年末からオリンパ

スとともに新型チップスキャン型原子間力顕微鏡(AFM)の評価を始めた。チップスキャン型 AFM は試料ステージが動かないため、容易に倒立型光学顕微鏡と結合でき、ステージの制約もほとんどないため、普通のスライドガラスやカバーガラスが使える一方、時間、空間分解能の制約が大きかった。この新型 AFM は従来のチップスキャン型よりも探針のサイズを大幅に小さくすることに成功し、分解能が大幅に向上していることが期待できた。これを実際に評価したところ、アクチンフィラメント内の分子間隔や、フィラメント極性(どちら側が重合端か、脱重合端か)がはっきり見え、アクチンフィラメント上の幅 2 nm のトロポミオシンが直接観察された(図 5)。これを細胞内アクチンフィラメント観察に応用するためには、試料調製のしかたが重要である。細胞膜の一部とそこに結合した細胞内構造を残すアンルーフィング法を用い、名古屋大学臼倉名誉教授と共同で、観察を行った。その結果、細胞膜上のアクチンフィラメントにおいても極性を決定でき、クラスリン、カベオラなど多くの構造を nm オーダー分解能で観察できた(図 5)。チップスキャン型 AFM は蛍光顕微鏡との結合が容易で、現在相関顕微鏡として用いるための手法開発を行っており、これが成功すれば、蛍光分子の位置の周りのタンパク質分子構造を明らかにするまったく新しい相関顕微鏡を実現できると考えている。

3. 今後の展開

本さがけにおいては、二つの重要な技術的進展があった。一つは STEM と負染色法の組み合わせが、歪みが無く、低分解能成分のシグナルが強い情報をもたらすことである。これを用いると、比較的少ない像から三次元構造解析ができ、タンパク質のローカルな構造変化や、構造多型の分類など、従来難しかった構造の解析が可能になる。私達はこれを少数構造生物学と呼びたいと考えており、実際に複数のターゲットに関して解析を始めている。

もう一つはチップスキャン型 AFM とアンルーフィング法の組み合わせである。初めて細胞内構造が AFM によって nm オーダー分解能で観察ができるようになった。現在このチップスキャン型 AFM の蛍光顕微鏡部分の改良を行っており、蛍光顕微鏡の性能が上がれば、AFM によって得られる細胞内構造を蛍光によって同定、解釈することができるようになる。これは、生物学に非常に有用な情報を与えるであろう。たとえば、細胞接着のアーキテクチャ、ウィルスの進入に伴う細胞骨格の変化、特定チャンネル周辺の分子構造など、多くのいままで得られなかった情報を得ることが期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

さがけの途中で研究室の責任者になり、いろいろ不慣れなところで時間をとられ、全体に研究、特に論文投稿が遅れているのは否めない。しかし、一方で今後の展開で述べたような予想しなかった新しい発展もあり、STEM と負染色法の組み合わせによる少数構造生物学や、チップスキャン型 AFM による新しい相関顕微鏡法など、近い将来の生物学の重要なツールになりそうな期待が持てる成果を挙げることができている。これらは是非次年度中に確立し、新しい世界を拓いていきたいと考えている。

また、アクチン-コフィリン、バクテリア ParM、チップスキャン AFM、STEM のそれぞれで年度内に論文を投稿する(AFM については 2 つ、ParM については 1 つ論文投稿済み)ことで、当初目標のレベルにはおおむね到達できるのではないかと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

初めの研究提案からやや分散し、研究が広く浅くなってしまったような感じを受けるが、クライオ電子顕微鏡観察、AFM および STEM 観察、膜剥離法と AFM の組み合わせなどにより、アクチン線維の様々な構造、細胞内のアクチンフィラメント構造を明らかにしたことは評価できる。

今後は、個々のフィラメントの高い分解能の像を得る努力をするとともにアクチンの全体像を明らかにする研究も推進してほしい。さらに、測定法のアプローチは興味深いので、他の試料に対する応用を進め、当該方法の汎用化と進展に尽力頂きたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Imai, H., <u>Narita, A.</u> , Maeda, Y. & Schroer, T. A. (2014). Dynactin 3D Structure: Implications for Assembly and Dynein Binding. <i>J Mol Biol</i> 426, 3262–71. 査読有り
2. Mueller, J., Pfanzelter, J., Winkler, C., <u>Narita, A.</u> , Le Clainche, C., Nemethova, M., Carlier, M. F., Maeda, Y., Welch, M. D., Ohkawa, T., Schmeiser, C., Resch, G. P. & Small, J. V. (2014). Electron tomography and simulation of baculovirus actin comet tails support a tethered filament model of pathogen propulsion. <i>PLoS Biol</i> 12, e1001765. 査読有り
3. 成田 哲博 (2013). 電子線トモグラフィーによる細胞内アクチンフィラメント構造解析 顕微鏡 48, 78–83 査読有り
4. Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, K., <u>Narita, A.</u> , Maeda, Y. & Oda, T. (2012). Role of the actin ala-108-pro-112 loop in actin polymerization and ATPase activities. <i>J Biol Chem</i> 287, 43270–6.
5. #Popp D, # <u>Narita A</u> , Lee LJ, Larsson M, Robinson RC. (2012) Microtubule-like properties of the bacterial actin homolog ParM-R1. <i>J. Biol. Chem.</i> , 287, 43270–6 査読有り (#は equally contributing authors)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・成田哲博 重合、脱重合によって駆動する分子モーター、アクチンフィラメントとその電子顕微鏡による解析 2015.10.03 日本顕微鏡学会関西支部平成 27 年度特別講演会 京都大学宇治キャンパス、招待講演
- ・Akihiro Narita, Structural analysis of the actin filament by various microscopy techniques 2015.09.15 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学、招待講演
- ・成田哲博 重合・脱重合によって駆動する分子モーター、アクチンフィラメントと、その電子顕微鏡による解析 2015.1.15 神戸大学先端融合科学シンポジウム「生体分子のダイナミクスを眺める」、招待講演
- ・Akihiro Narita Structural analysis of the actin filament in vitro and in vivo 2014.9.26 第 52 回日本生物物理学会年会、札幌、招待講演
- ・成田哲博 多機能生体線維アクチンフィラメントの電子顕微鏡による構造解析 2014. 5.11 日本顕微鏡学会第 70 回記念講演会、千葉幕張メッセ国際会議場、招待講演
- ・Akihiro Narita, Structural analysis for the actin filament, in vitro and in vivo, 2014. 1. 14 Cryo-EM 3D Image Analysis Symposium 2014 Granlibakken Coference Center Lake Tahoe, USA、招待講演