

研 究 報 告 書

「革新的低温電顕単粒子像解析法による筋収縮制御機構の解明」

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: 藤井 高志

1. 研究のねらい

心筋・骨格筋は蛋白質分子モーターが精巧に組み合わされた柔らかな機械である。この高機能で柔らかな機械の作動原理を、原子レベルの視点で解き明かすことが本研究のねらいである。筋肉は多数の筋原繊維の束からなり、筋原繊維はサルコメアと呼ばれる単位構造が繊維方向に連結したものである。サルコメア内には”細いフィラメント”と”太いフィラメント”と呼ばれる2種類の繊維がお互い重なり合うように規則正しく並んでいる(図1)。細いフィラメントは、アクチン繊維上にアクチン7分子に対してトロポニンとトロポミオシンが1分子ずつ取り巻くように結合したものである。太いフィラメントは主にミオシンが繊維状の束を形成したものである。筋収縮は、ミオシン頭部とアクチン分子との間に起こる、ATP 加水分解エネルギーを利用した滑り運動の巨視的現象である。この滑り運動の開始は細胞内中のカルシウムイオンによって制御されており、カルシウムイオンが細いフィラメント上のトロポニン C に結合することにより、構造変化が誘起されアクチンとミオシンが力発生を行うと考えられている。このカルシウム制御のメカニズムこそが筋弛緩・収縮のミクロな視点での本質的な現象である。低温電子顕微鏡法を用いてカルシウムイオンの存在下・非存在下において細いフィラメントを構造解析し、筋収縮カルシウム調節メカニズムの原子レベルでの解明を目指した。また、本研究課題を実現するための相補的課題と言える低温電子顕微鏡法の高度化を行った。世界的にこの数年の低温電子顕微鏡法の進展および成果は目覚ましいものであり、2～4 オングストロームでの構造解析例が急増している。これにより、X 線結晶構造解析を必要とすることなくリボソームや膜蛋白質の構造解明が進められている。我々も、試料作成の最適化や画像解析法の厳密化・改良をおこない、さきがけ期間中に3 オングストロームを超える高分解能構造解析に取り組んだ。

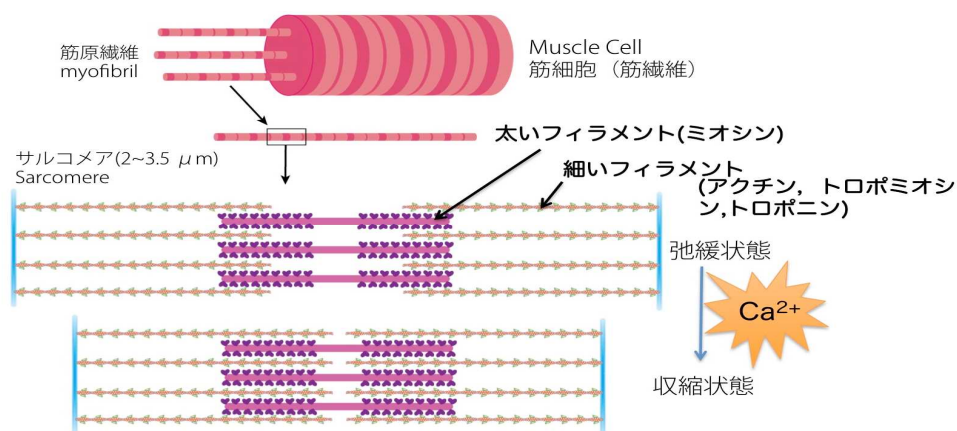


図 1 筋収縮・弛緩制御機構の模式図

2. 研究成果

(1) 概要

細いフィラメントはアクチン繊維状に非常に細長いトロポミオシンとアクチン 14 個に2つ周期的に結合するトロポニンからなる分子複合体である。アクチン繊維の構造やトロポミオシン・トロポニンのそれぞれの単体 X 線結晶構造は明らかになっている(図2)。しかしながら、機能体である複合体構造については明らかになっていない。これまでも、電子顕微鏡像の解析による細いフィラメントの立体構造の報告はあったが、多くは、重金属を使った染色によるものであり乾燥や重金属による変形により自然状態のモノでない(そのため分解能も限られる)。また、低温電子顕微鏡による構造解析例も 1 例あるが(Narita et al., 2001, *J. Mol. Biol.*)、分解能が極めて低いものであった。その結果、Ca²⁺存在下・非存在下におけるその構造変化については未だにその詳細は解明されてこなかった。

本研究において、カルシウム制御機構を明らかにするべく、低温電子顕微鏡法による細いフィラメントの高分解能構造解析を目指した。ワタリガニからネィティブな細いフィラメントを単離精製する方法を開発し、その方法を改良することにより、最終的にアクチン・トロポミオシン・トロポニンの成分のみの精製産物を得る事に成功した(図3)。低温電子顕微鏡法ではサンプルを薄い氷の薄膜に閉じ込め観察する。その際に結合力が弱い分子が解離する傾向はこれまでも観察されていたが、細いフィラメントにおいても氷薄膜に細いフィラメントを包埋する際に、トロポミオシンが解離することが明らかになった。画像解析により分類した結果約75%ものフィラメントからトロポミオシンが解離していた。しかし、生化学的な遠心による沈殿実験では、トロポミオシンの解離は見られない。氷薄膜包埋中に、解離したものと考えられた。グルタルアルデヒドにより、アクチン・トロポミオシン・トロポニンを架橋することにより氷薄膜中での解離を防ぐことができることを見いだした。架橋により、100%のフィラメントにトロポミオシンが結合していることを確認した。

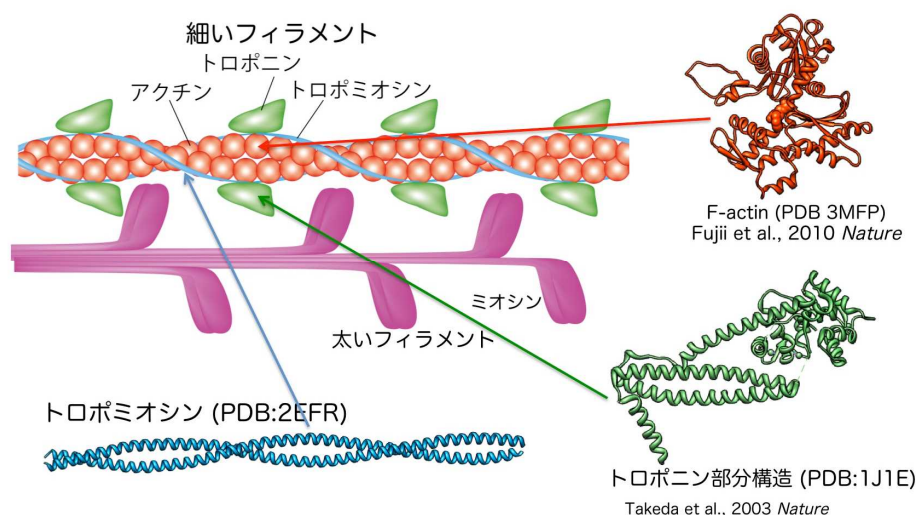


図2 アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体(細いフィラメント)の模式図
制御機構を明らかにするためには部分構造ではなく機能体としての全体構造を明らかにする必要がある

トロポニン はアクチン 14 分子に 2 分子、細いフィラメント上に周期的にぽつぽつと存在する特異な立体配置をしているため、従来のらせん対称を仮定した画像解析法では解析できず、新たな画像解析法の開発が必要であった。また、従来の負染色像で適用されている 2 次元画像を 1 次元投影する方法では、水とタンパク質のコントラストを使う氷包埋像では高いノイズレベルにより、トロポニン密度の位置でのセンタリングは不可能であった。主成分分析法を用いることにより先にリファレンスフリーで画像を分類・平均化し、S/N 比が上がった平均像をセンタリングに用いることにより、その位置情報を原画像に割り当てることにより、トロポニンの位置でのセンタリングを可能にした。この粗い整列情報を使い、ローカルでの精密化をうまく行う事ができた。

これらの開発・改良により、カルシウム非存在下で、3次元立体構造を得る事ができた。

今後は、カルシウム存在下での構造解析を行うことにより、2状態の構造を得て、メカニカルな構造変化を明らかにする。また、現在、低温電子顕微鏡技術はダイレクトディテクターなどの要素技術の発展により急速に分解能を伸ばしている。我々も細いフィラメントと似たような直径 7 nm の赤痢菌毒素タンパク質輸送装置ニードル複合体のニードル繊維構造を 2.9Å 分解能で構造解析し、ニードル繊維の原子構造を構築した。細いフィラメントのような比較的取り扱い・画像解析の難しいサンプルにおいてもアミノ酸側鎖を解像できるような高分解能解析を実現すべく、技術革新を進めていく。

また、さがけ期間中に、MRC 研究所の Jan Löwe グループとの国際共同研究、Francis Crick 研究所の Caetano Reis e Soursa グループとの国際共同研究等を含む計5報の論文を出版した。

(2) 詳細

研究テーマ A 筋繊維からのアクチン・トロポニン・トロポミオシン 3 者複合体状態での単離

ワタリガニからのアクチン・トロポニン・トロポミオシン 3 者複合体の単離・精製を行った。遠心条件や溶液条件をワンステップずつ電子顕微鏡で確認することにより精製方法をリファインした。それにより当初、かなり多くの粗雑物が存在していたが、これを大幅に減らすことができた。最後まで取り除くことが難しかったミオシンについても、Reactive Red と呼ばれるミオシンに結合する色素をアガロースゲルに結合したレジンを使用することにより、特異的にミオシン成分のみを吸着し、減らすことができた。最終的には SDS-PAGE レベルでは細いフィラメントの成分 (actin, tropomyosin, troponin T, troponin I, troponin C) のみの精製物を得る事ができるようになった(図3)。このサンプルを用い氷包埋を行い観察およびデータ収集を行った。得られた画像を切り出し、トロポニンの存在は無視し、アクチンのらせん対称性を用いて画像解析した。トロポミオシンが約 25% の画像にのみ結合していることが明らかになった。サンプルを 10,000g の遠心にかけてペレットと上清に分ける生化学的実験ではトロポミオシン・トロポニンの解離は見られなかったため、氷包埋作製時に解離が起きていると考えられた。ろ紙によりサンプル溶液を極限まで吸うことにより数十 nm の氷の薄膜にサンプルタンパク質を閉じ込める。最も考えられる影響は表面張力である。また、気液界面に近い場合、変性などが引き起こされる可能性がある。この現象はアクチン・ミオシン複合体 ATP 無しの強結合状態においても起きており、生化学的に

かなり強い結合のものでも氷包埋による解離が起きる(アクトミオシン強結合状態の解離定数は 0.5 nM~10 nM である(T.Katoh et al., 1996, *J.Biochem*))。トロポミオシンはカルシウム有り無しでダイナミックにアクチン上を動く構造体であり、アクチンとのメカニカルな結合が強くないことが予想される(生化学的な解離定数は 0.2 μ M である。(Urbancikova et al., 1994))。我々はこの問題を解決するために低濃度 0.15%のグルタルアルデヒドで細いフィラメントを架橋し、この 3 次元構造を解析した。画像解析によりほぼ 100%の画像においてトロポミオシンが結合していることが明らかになった。このサンプルを用いて、EGTA でキレートとしたバッファー条件でカルシウム非存在下の細いフィラメントの低温電子顕微鏡解析をおこなった。

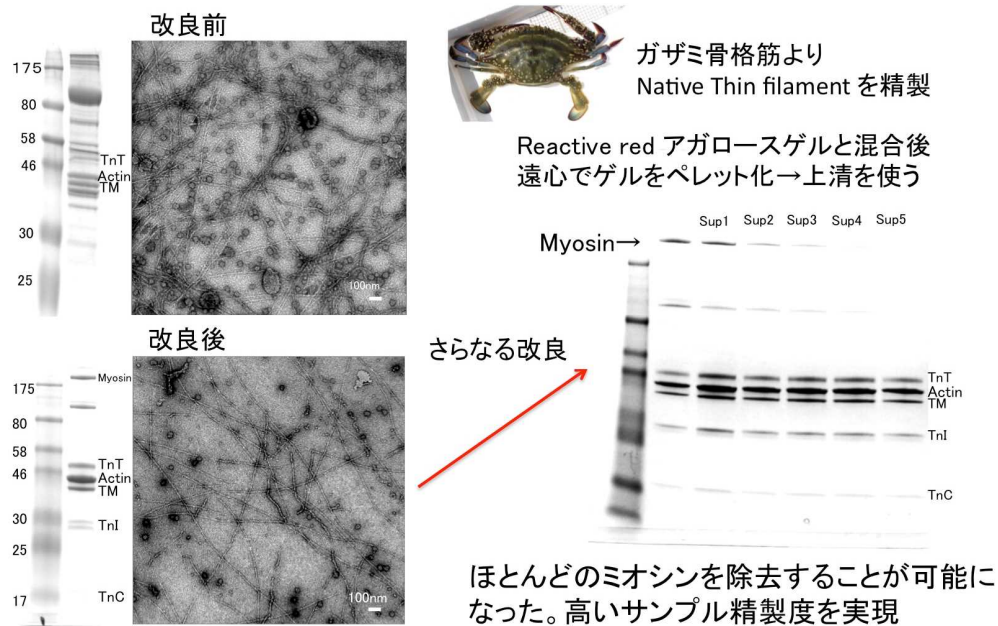


図3 ガザミ骨格筋からの細いフィラメント精製法の改良

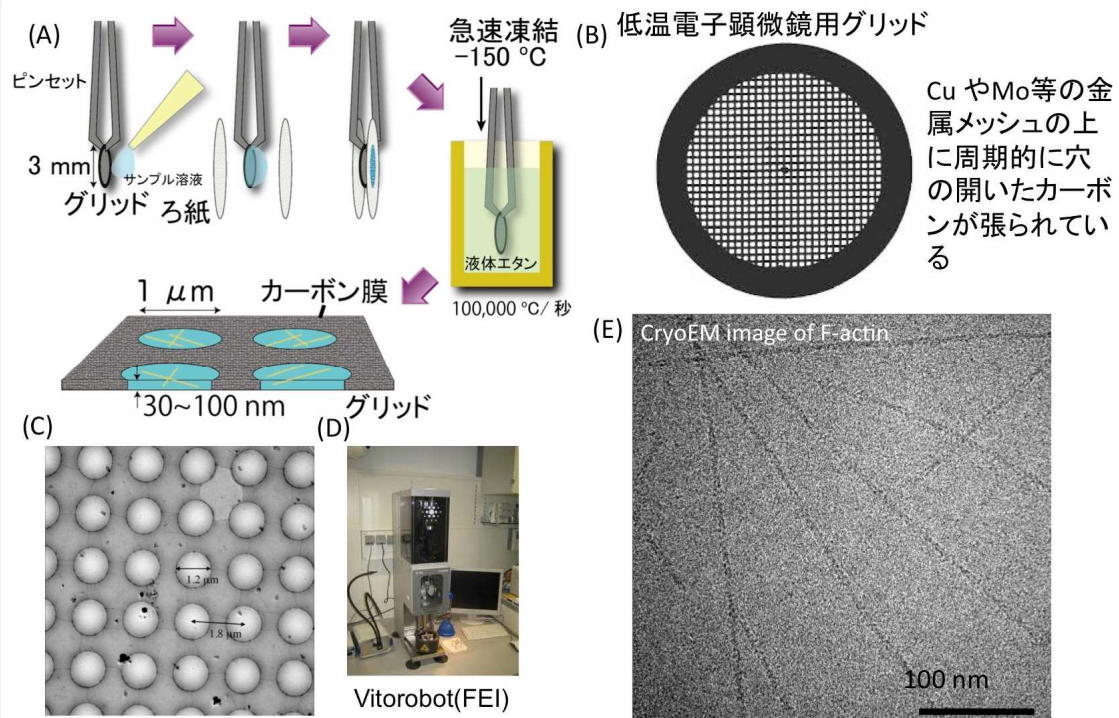
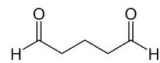


図4 氷包埋試料作製。(A) 氷包埋試料作製法の模式図 (B) 低温電子顕微鏡用グリッド。直径3 mm で Cu や Mo 等でできている。(C) グリッドに張られている穴あきカーボン膜。1.2 μm のサイズの穴が1.8 μm 間隔で開いている。(D) 氷包埋試料作製装置 Vitrobot (FEI 社) (E) 氷包埋像の典型例

細いフィラメントは精製できていると判断
氷包埋時にはずれている？

グルタルアルデヒドによるNH₂基間での架橋
(リジンやN-末のアミノ基を架橋)



単純に非常に希薄なグルタルアルデヒドを添加することで固定を行った。



ほぼ100%の繊維にトロポミオシンが結合している！

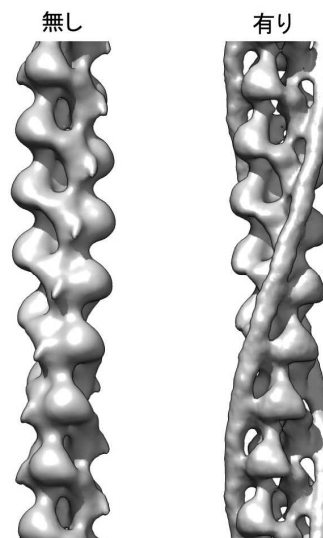


図5 細いフィラメントのグルタルアルデヒドによる架橋。100%の繊維像でトロポミオシンが結合している

研究テーマ B 自動技術を用いた低温電子顕微鏡による大規模データ収集

細いフィラメントに結合するトロポニン・トロポミオシンはアクチンとの量比が1:7であるため、アクチン繊維の構造解析で使用したデータ量の7倍データを集める必要がある。大量データ収集が必須であり、自動化する必要がある。自動化自体は電子顕微鏡メーカーが行ったが、実際上の運用や、その運用面でのフィードバックなどにより、完全自動化を目指している。現時点では、撮影する試料の状態が最終的な分解能に大きく影響するため、自動化は非効率であり、实际的ではない。単純にデータを膨大に撮影することは可能になっているが、電子顕微鏡の場合、得られる画像は非常に S/N が低く、その画像から単純にクオリティを判定することが容易ではない。また、マシンタイムも限られるため、自動化により無駄なデータを撮影する余裕が現実的ではないという観点もある。現在、氷の厚さや、試料の密度、氷の張り方など判断基準を自動判定に落とし込むべく検討中である。

研究テーマ C 新規画像解析プログラムの開発

トロポニン T, I, C 複合体はアクチン14分子ごとに2つ結合するという特異な構造をしている。トロポニン複合体は分子量10万であり、2分子を1セットとして解析するとしてもその分子量はわずか20万である。これは現在、低温電子顕微鏡法における下限ぎりぎりの分子量である。アクチン繊維状にトロポニンが結合しているため、トロポニンを除くと、全く同じ画像が並んでいることになる。そのため、ノイズレベルの高い画像を分類する際にローカルミニマムに落ちやすくなってしまう。これを避けるためには、データ取得に関しても薄い氷を作製してコントラストを上げる必要があるが、画像解析についてもロバストな方法が必要であった。図6に概略図を示しているが、一枚一枚リファレンスと比較するプロジェクションマッチング法は広範囲について計算するには計算リソースの観点から向いていない。またこの方法では、リファレンスが必要であり、何を初期構造にするかにより、結果が大きく変わる恐れがある。特に分子量20万程度の小さい分子の場合その懸念はより増大する。一方で、リファレンス無しの主成分分析をベースとした方法では、情報を低次元化することにより、計算スピードの点で非常に有利である。また、ローカルミニマムにも落ちにくくなる。加えて、初期構造に依存的でなくなり、高信頼性を確保できる。そこで、リファレンス無しの方法により、似ている画像を平均化した。その平均像にはトロポニンの密度がはっきり見て取ることができる。この S/N 比の上がった平均像を用いてセンタリングを行った。当然、S/N 比の高い平均像を使っているため、センタリングは非常にうまくいった。平均像を作成するために使った原画像は平均像に対して x-sift 値、y-shift 値をそれぞれ持つ、この値と、平均像をセンタリングした際の x-sift 値、y-shift 値を組み合わせることにより、原画像をセンタリングした。これによりノイズレベルが格段に高い原画像を精度良くセンタリングすることができ、狭い範囲で分類・整列を行うだけでよくなり、分類・整列精度が飛躍的に向上した。

解析方法の概略図

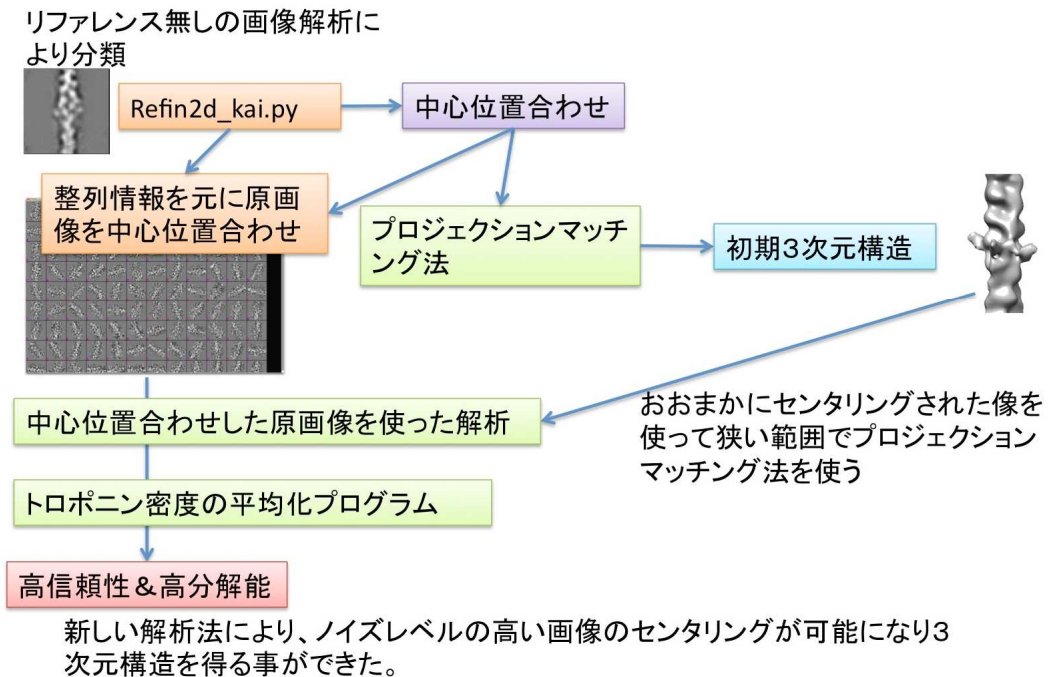


図 6 解析方法の概略図

細いフィラメントの構造

これまでに、負染色像による細いフィラメントの構造が数例(Pirani et al., 2005 *J. Mol. Biol.*, Paul et al., 2010 *J. Struct. Biol.*, Yang et al., 2014 *Biophysical J.*), 低温電子顕微鏡法による低分解能構造が 1 例(Narita et al., 2001 *J. Mol. Biol.*)が報告されている。今回我々が立体構造解析した CryoEM マップはそのいずれよりも分解能が高い。アクチンおよびトロポミオシンの構造は明らかになっているため、それらを差し引いた図7の緑の密度がトロポニンの密度であると考えられる。トロポニンの密度がはっきりと見えており、解析の段階で、ミスアライメントに帰因するアベレージアウトの影響をほとんど受けていないことがわかる(図7)。トロポニンはトロポミオシンに沿って板状の密度が存在しそこから塊がつきだした特徴的な構造をしている。これは X 線結晶構造解析で解かれたヒト心筋およびウサギ骨格筋由来のトロポニン構造と一致する。図8B に見られるように、トロポニンはトロポニン T、トロポニン I の α ヘリックスのバンドルとそれに埋まるように存在するトロポニン C の C 端ドメインの板状の構造からトロポニン I のヘリックスおよびトロポニン C の N 端が板から突き出すように出ており、さらにその先に結晶構造解析では見えていないトロポニン I の ~20 残基が存在する。図8AB は同じ縮尺で低温電子顕微鏡像と結晶構造を比較したものであり、両者がよく似た特徴をしていることがわかる。また、トロポニンの構造は 2 種類解かれており、トロポニン C の 2 つのドメインの間の角度がよく動く事が示されている。つまりその部分がカルシウムに応答して可変する可能性が高い。

細いフィラメントの構造 続き

また、図8A に見られる通り、トロポニンの直下に存在するアクチンはドメインが回転しているように見える。アクチンは単量体アクチン(G-アクチン)から繊維型アクチン(F-アクチン)に構造変化する際にドメインが回転しそれを実現している。今回の構造はトロポニン直下のアクチンはさらにそのドメインが回転しトロポニンとアクチン D-loop が相互作用する可能性を示唆している。もちろん、現在のマップは分解能が十分ではなく、トロポニンの他の密度がそこに存在していることも考え得る。今後、高分解能化にともないこの点は明らかになる。

カルシウムイオンによる細いフィラメントの構造変化は次のように考えられる。カルシウムによりトロポニン C の構造が変化し、トロポニン I, C の角度が変わり、アクチンとの相互作用がなくなる。それに伴いアクチンは T_n-アクチン構造から F-アクチン構造に変わる(図 8C, D)。アクチンと相互作用していたトロポミオシンはその相互作用を失い、ミオシン結合部位を露出するように移動する。

この仮説を明らかにするために、今後、収集データ数をさらに増やし高分解能化を行う。また、カルシウム存在下での立体構造解析を行う。

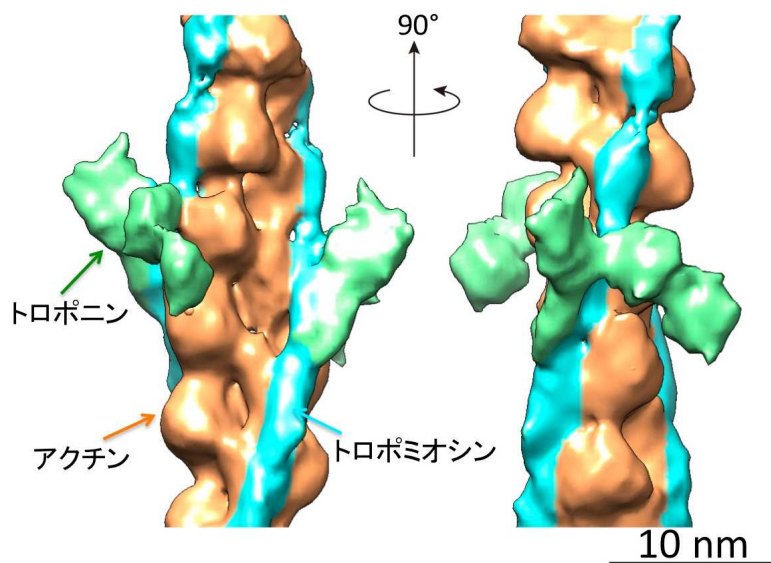


図7 細いフィラメントの3次元低温電子顕微鏡マップ
オレンジがアクチン繊維，水色がトロポミオシン，緑がトロポニンの密度に相当する。

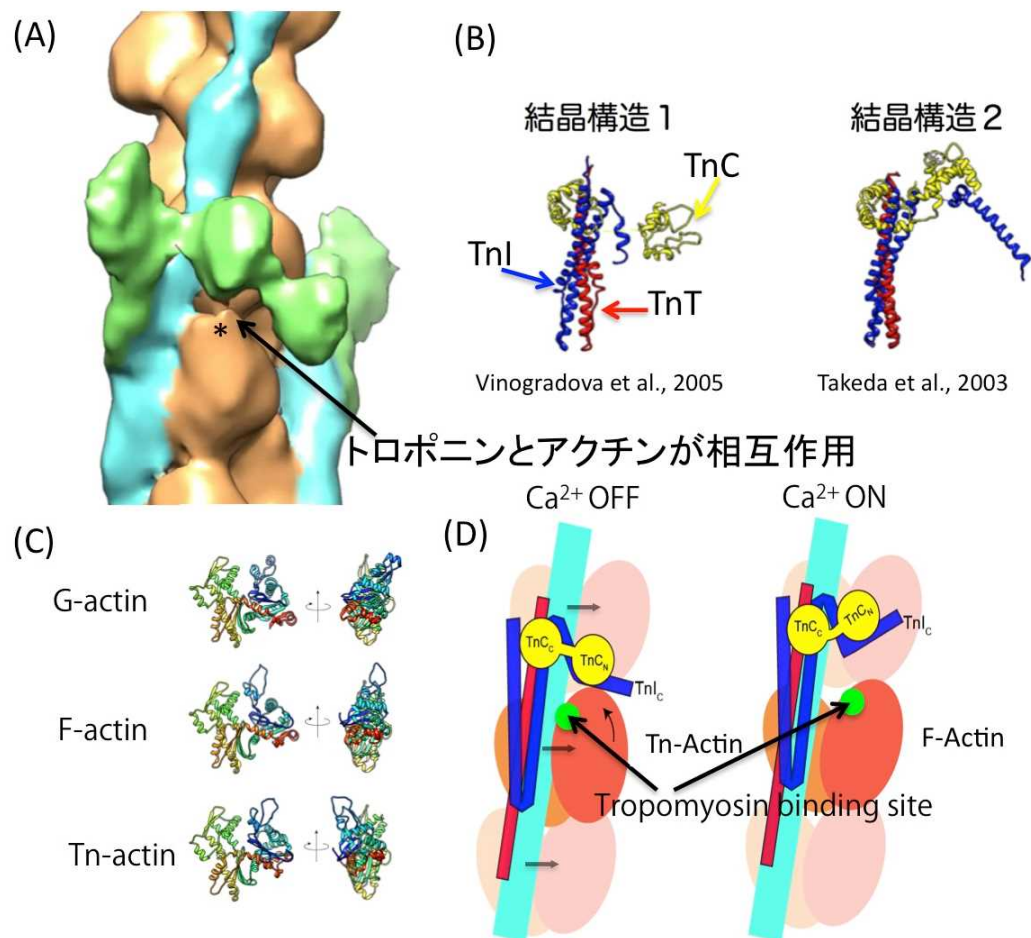


図8 細いフィラメントの低温電子顕微鏡マップと結晶構造の比較。低温電子顕微鏡マップより考えられるトロポニン・トロポミオシンによるカルシウム制御機構。

(A) * はアクチン D-loop の位置を示す。

3. 今後の展開

ワタリガニ骨格筋の細いフィラメントの高分解能構造解析から筋収縮・弛緩の原子レベルでの動作原理を明らかにする一方で、将来的には、ヒト心筋細いフィラメントの再構成系の高分解能構造解析により医学・創薬につながるような知見を得ることができると考えられる。組換え発現系はほぼ確立できており、再構成条件などの最適化などにより、より良い系を確立できる。様々な変異体などを用いることで、構造解析のみならず、一分子蛍光観察法などの方法を用い、*in vitro* での解析を行う事ができる。拡張型心筋症の変異部はトロポニンに多く存在しており、その知見をもとに、詳細な分子シミュレーションなどを通じ、医薬創薬等の社会実装に役立てることができると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的は、低温電子顕微鏡の技術開発とともにそれを適用し筋収縮・弛緩を担う細いフィラメントの構造を高分解能で解析するというものである。低温電子顕微鏡法の高度化については赤痢菌ニードル繊維において 2.9Å 分解能を達成し、国際的に見ても最高レベルに到達した。細いフィラメントの構造解析については、当初から対称性の低さ、分子の小ささ等、多くの困難が予想された。また、研究を遂行する途上で、複合体が氷薄膜中で解離するなど様々な困難に直面した。氷薄膜中での解離はグルタルアルデヒドによる架橋により防止することができるようになった。また、新規に開発した画像解析法によりトロポニン分子の低分解能での立体構造を得ることが可能になった。現在、高分解能化を目指して、鋭意データ収集・解析中である。低温電子顕微鏡法はダイレクトディテクターの登場などにより、分解能が飛躍的に向上している。このため、主に製薬などの産業界からも新たな高分解能構造解析法として、注目を浴びようになっている。低温電子顕微鏡法による高分解能構造解析法の技術移転により、社会や経済への貢献が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)

種々の技術開発により、重金属を使った染色なしで、氷包埋した細いフィラメントの低温電子顕微鏡法による解析を行い、Ca 非存在下のみではあるが、フィラメント上のトロポミオシン、トロポニンの構造を得ることに成功した点は評価できる。

今後は、直接検出器の利点を生かし、ソフトウェアの開発、導入を積極的に行ってさらに分解能を上げて構造解析を完了し、トロポニンによる筋収縮の阻害機構を原子分解能レベルで解明してほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishimura, M.*, **Fujii, T.***, Hiyoshi, H., Makino, F., Inoue, H., Motooka, D., Kodama, T., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Namba, K., Iida, T. “A repeat unit of Vibrio diarrheal T3S effector subverts cytoskeletal actin homeostasis via binding to interstrand region of actin filaments.” Sci. Reports, 5, 10870, (2015) *Co-first author
2. Hanč, P.*, **Fujii, T.***, Iborra, S., Yamada, Y., Huotari, J., Schulz, O., Ahrens, S., Kjær, S., Way, M., Sancho, D., Namba, K., Reis e Sousa, C. “Structure of the Complex of F-Actin and DNGR-1, a C-Type Lectin Receptor Involved in Dendritic Cell Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens.” Immunity, 42, 839-849, (2015) *Co-first author
3. Uchimura, S., **Fujii, T.**, Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y., Kurisu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K., Muto, E. “A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation.” J. Cell Biol., 208, 211-222,

(2015)

4. Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, Y.S., Kageyama, S., Hoshino, M., **Fujii, T.**, Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M. "The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates." Nature Communication, 6, 6116, (2015)

5. Gayathri, P.*, **Fujii, T.***, Namba, K., Löwe, J. "Structure of the ParM filament at 8.5 Å resolution" Journal of Structural Biology 184, 33-42. (2013) *Co-first author

(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)

1. 藤井高志「低温電子顕微鏡法による繊維複合体の高分解能構造解析」第14回日本蛋白質科学会、横浜
2. 藤井高志「複雑な生命機能を理解するための構造解析の最先端」第87回日本生化学会大会、京都
3. 藤井高志「低温電子顕微鏡法による赤痢菌ニードル繊維の高分解能構造解析」第86回日本生化学会大会
4. 藤井高志「低温電子顕微鏡によるらせん複合体の高分解能構造解析」第50回日本生物物理学会 シンポジウム『若手オーガナイズシンポジウム:生命科学の新しい地平を切り開く若手研究者たち』シンポジスト兼オーガナイザー