

X 線構造解析研究チーム

X-ray Structural Analysis Research Team

チームリーダー 小田 俊郎

ODA, Toshiro

アクチンフィラメントを中心に細胞機能を担う細胞内骨格装置の構造とそのダイナミクスを構造生物学の視点から研究しています。蛋白質構造の解明には SPring-8 の高輝度ビームラインを用いて、X 線繊維回折法、小角散乱法、結晶構造解析法の長所を生かし複合的に進めています。また、蛋白質の構造ダイナミクスの研究は、ILL や物性研 NSE を使用して中性子非弾性散乱法により実験的に解明する一方、実験により測定できない時間領域の運動性については計算機実験を用い相補的に進めています。蛋白質複合体のダイナミクスを通して、アクチンの構造から機能の理解を目指しています。

アクチンは真核細胞に最も豊富に存在する蛋白質の一つで、遺伝から細胞運動まで広範囲の機能に関わっている。このアクチンの構造から機能を理解することは、生物学研究において重要なことであると思われる。

(1) F-アクチンの高分解能構造解析 (小田、^{1*2*}前田(雄))

現在の F-アクチンのモデルは 1/8 Å までの X 線繊維回折データを用いて作られている。しかし、この分解能のデータを用いて得られるモデルに一意性はない。そこで使用するデータを 1/3.3 Å まで拡張し、また、結晶学で free *R*-factor と呼ばれるものに相当する *R*-factor-non-fit を導入し、モデルの精密化をおこなった。このモデリングは、はじめに、アクチン分子の基準振動解析を行い、分子が容易に変形する方向を決めた。その方向に分子を変形させ、1/8 Å の低分解能 Data に逆空間でフィットさせることにより、重合に伴う大きな構造変化を抽出した。つぎに、FX-plor を用いて分子動力学精密化を行った。分解能 1/3.3 Å までの反射強度とモデルから計算される反射強度の差で定義される反射項とフィラメント内のサブユニット間の相互作用項とを便宜的なエネルギー項に追加した。その際、6.5-5.5 Å の領域を *R*-factor-non-fit として使用し、この *R*-factor をモデルの信頼性の尺度とした。アクチンはヌクレオチドを結合するクレフトを囲む 2 つの大きなドメインを持つ。G-アクチンの場合、この 2 つのドメインは約 20 度ねじれている。このモデリングは、重合に伴いねじれは解消し分子は平らになることを示した。今後この構造変化の生理的意義について検討を加える。

(2) アクチン ATPase のメカニズム(小田、^{1*3*}前田(佳)、^{1*3*}岩佐)

旧前田構造生物化学研究室で開発された、バキロウイルスと昆虫細胞とを用いたアクチン発現系を利用し、Q137 の側鎖の機能について検討した。G-アクチンの結晶構造から、この Q137 の側鎖は水分子を結合し、その水分子が ATP を攻撃すると推察される。Gln を Ala に変異させたアクチン(Q137A)を調整し、この側鎖の機能を検討した。この Q137A の変異体では、重合は速いがそれに伴う ATPase は遅いこ

とがわかった。重合に伴う ADP 生産量を測定し、この ATPase の変化は生成物 Pi の放出が遅いのではなく、ATP の分解反応自体が遅いことがわかった。したがって、このアミノ酸残基は、重合と ATP の加水分解反応とのそのカップリングに重要であることがわかった。

(3) アクチン分子の多型性(小田、^{1*3*}相原)

フィラメント内でアクチン分子は少なくとも 2 種類のコンホメーションを取ることが蛍光顕微鏡を用いて示されている。この構造変化が ADP・ATP-アクチンに相当するか検討するため、Cys-10 にスピンラベルを導入し運動性から ADP・ATP-アクチンの違いについて検討するための予備実験を行った。

(4) Spir によるアクチン重合核の大きさについて(小田、^{1*4*}伊藤)

アクチンの重合は核形成、伸長の順で起こる。この核形成反応が重合の律速段階である。この核形成を制御することで、生体内ではアクチンフィラメントの生成消滅・アクチンネットワークの生成消滅をコントロールしている。この核形成を制御する因子として、Arp2/3 複合体と formin が有名である。

Mullins のグループは 2005 年に Spir がアクチンの核形成因子であると報告した。このメカニズムを知るためには、その核の構造等を知る必要がある。そのため、重合核を単離し結晶構造解析などによりその構造を解明することが重要である。その前段階として、大腸菌を用いた Spir の発現条件、1965 年に発表された葛西・大沢の方法を用いて重合核に含まれるアクチンの分子数を検討した。これは、アクチン濃度に対する重合の最大速度を対数でプロットし、その傾きから分子数を見積もる方法である。Spir が無いとき 3 分子が重合核に含まれ、Spir 存在下で 2 分子が重合核に含まれることがわかった。

(5) アクチン分子の柔らかさ(小田、^{5*}藤原)

ラウエ-ランジュバン研究所の IN5 実験ステーション(チョッパーにより単色化し、time-of-flight で中性子の速度分布の変化を測定する)において、中性子非弾性散乱方法を用

いて、G-アクチン(単量体)と F-アクチン(複合体)の水素原子の平均 2 乗変位をピコ秒オーダーで測定した。我々のグループとしては中性子非弾性散乱方法による測定は初めてでありその条件検討等(dry なサンプルで測定を行うがその dry の方法等)が主であった。このファーストトライアルで、F-アクチンより G-アクチンで揺動が大きく G-アクチンの方が柔らかいことがわかった。原子力研究所の藤原悟博士のグループと協力してアクチン分子のダイナミックス(ピコからナノ秒)を中性子非弾性散乱方法により解明することとした。

^{*1}ERATO 前田プロジェクト、JST、^{*2}客員主管研究員(宮野生物物理研究室)、^{*3}客員研究員(宮野生物物理研究室)、^{*4}研修生(宮野構造生物物理研究室、名古屋大学)、^{*5}客員研究員(城生体金属科学研究室)

Actin is one of the most abundant proteins in eukaryotic cell and work in many cell activities, ranging from genetics to cell motility. Understanding of the function from the structure is important in today's cell biology.

1. Structural analysis of F-actin

In the previous work, we reported atomic model for F-actin structure by using the X-ray fiber diffraction at 1/8Å. However, the resolution is not sufficient to discuss the interaction between F-actin and actin-binding proteins such as myosin, gelsolin and Arp2/3 complex. I extended the used data to 1/3.3Å, and I introduced the *R*-factor-non-fit, an equivalent of free *R*-factor in crystallography, to confirm the model. Modeling was done in the two following steps. First, I searched plausible conformations of actin molecule in the filament using potential conformational changes deduced by the normal-mode analysis. I used 12 normal modes. Second, molecular dynamics refinement of actin molecule in F-actin was done by using FX-plor. The resolution used for the refinement is 1/3.3Å. Finally, I checked the *R*-factor-non-fit and I obtained an atomic model for F-actin structure.

Actin has two major domains enclosing the ATP-binding cleft. In G-actin, the two major domains are in a proper-like twist. On the other hands, in F-actin, the two major domain is untwisted and the molecule is flat. The flattening of actin molecule is a unique characteristic of G-to-F-actin transition.

2. Mechanism of Actin ATPase

In the crystal structure of G-actin structure, the side-chain of Q137A anchors a water molecule that must attack the bound ATP. To make clear the function of the side-chain of Gln at 137, we expressed the several single actin mutants of Q137E, Q137K, Q137P, and Q137A as well as the WT. The expression was performed using the baculovirus-based expression system developed by K. Maeda and M.Iwasa. Q137A and the WT were purified to homogeneity. We found that Q137A polymerized rapidly but cleaved gamma-phosphate group of bound ATP slowly. These results suggest that Q137 has dual roles upon polymerization.

3. ESR-detection of several conformations of actin molecule

Yanagida group in Osaka University showed at least two actin conformations in the filament using FRET of single molecule in

the TARF-microscopy. To examine whether the two conformation correspond the ATP- and ADP-actin, we started the measurement on the mobility of Spin-label at Cys-10 in actin by ESR. However, we have not obtained the clear result on the point yet.

4. Actin nucleation factor – spir

The actin polymerization is initiated by nucleation, which is followed by the rapid elongation of filament. The nucleation is a rate-limiting step at the actin polymerization. In cell, the nucleation is regulated by actin nucleation factor, resulting in the control of appearance and disappearance of F-actin and F-actin networks. Arp2/3 complex and formin are famous nucleation factors.

Mullins reported the new nucleation factor, spir, at 2005. The purpose of the project is to elucidate the mechanism of nucleation by spir and its regulation. To analyze it, structure of spire-actin nucleation complex should be solved by X-ray crystallography or the other method. As a first step, we studied the condition of expression of spir in E.Coli and measured the nucleation size in the presence of spir. We used the old method developed by M.Kasai & F.Oosawa. We measured the maximal polymerization rate for various actin concentration and log-log-plotted the rate against the actin concentration. From the slop, we deduced the nucleation size; three in the absence of spir and two in the presence of spir.

5. Dynamics of actin molecule at pico-second range.

We measured the mean square displacement of hydrogen in monomeric G-actin and in polymeric F-actin by the use of neutron inelastic scattering at IN5 in Laue-Langivan Institute (France). In the experimental station, monochromatic neutron was made by four choppers and velocities of the scattering neutrons were measured by time-of-flight. This experiment is the first trial and we also studied how to dry G-actin and F-actin to obtain the actin samples. The result showed that the mean square displacement of hydrogen in monomeric G-actin is larger than in F-actin and that G-actin is "softer". Together with Dr Fujiwara' group (JAIRI), we will study the dynamics of actin molecule at pico- and nano-second range.

Staff

Head

Dr. Toshiro ODA

Visiting Members

Dr. Kayo Maeda (ERATO Project, JST)

SRRN X線構造解析研究チーム

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Popp D., Yamamoto A., Iwasa M., Narita A., Maeda K., and Maeda Y.: "Concerning the dynamic instability of actin homolog ParM", Biochem. Biophys. Res. Commun. 353, 109--114 (2007).

*

(総説)

小田 俊郎 : "アクチンの比較生物学", 生体の科学 57, No. 5, pp.484--485 (2006).

[単行本]

(総説)

Maeda Y., Nitnai Y., and Oda T. : "From the crystal structure of troponin to the mechanism of calcium regulation of muscle contraction ", Regulatory Mechanisms of Striated Muscle Contraction , Springer, Tokyo, pp.37--46 (2007).

Nitnai Y., Minakata S., Maeda K., Oda N., and Maeda Y. : "Crystal structures of tropomyosin: flexible coiled-coil", Regulatory Mechanisms of Striated Muscle Contraction , Springer, Tokyo, pp.137--151 (2007).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Iwasa M., Sano K., Maeda K., Oda T., and Maeda Y. : "An establishment and analysis of recombinant wild-type and mutant human cardiac actins", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).

Oda T. and Maeda Y. : "Modeling of F-actin", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Japan, Nov. (2006).

Narita A., Oda T., and Maeda Y. : "Pointed end structure of Actin-Filament", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).

Iwasa M., Maeda K., Narita A., Maeda Y., and Oda T. : "Dual roles of Q137 of actin revealed by use of recombinant human cardiac β -actin", 51st Annual Meeting of Biophysical Society, Baltimore, USA, Mar. (2007).

(国内会議)

南方 志帆, 似内 靖, 前田 佳代, 小田 直子, 若林 克三, 前田 雄一郎: "ウサギ骨格筋トロポミオシンC末端フラグメントの結晶構造解析と結晶構造から見るトロポミオシンの柔軟性", 2007年生体運動研究合同班会議, 金沢, 1月 (2007).