

アクチンフィラメントの構造と動態による筋収縮・調節機構の解明

(1) 概要ポンチ絵

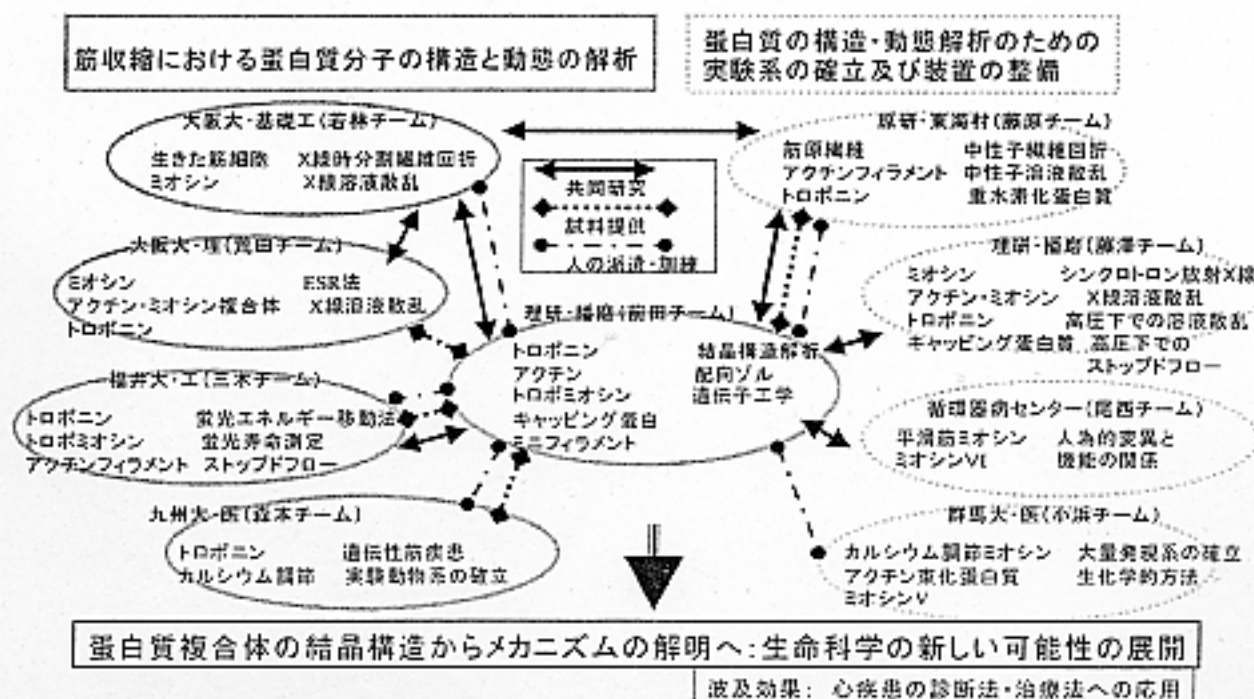
「アクチンフィラメントの構造と動態の解析による筋収縮・調節機構の解明」

(第I期) 1981年度～1983年度、第1期)
 1983年度予算額: 2,5億円(2,7億円)
 研究代表者: 斎藤 基一郎(理化学研究所) 船橋 謙

研究の概要・目標	諸外国の現状等	研究進展・成果がもたらす利点
<p>1. 何を目的しているか 筋肉の収縮とその調節に関する蛋白質分子間の相互作用のメカニズムを理解する。</p> <p>(第I期の目標) 蛋白質複合体の試料作成 (第II期の目標) 蛋白質の動態とその調節機構の解明</p> <p>2. 何を研究するか 筋収縮に係る蛋白質の構造解析と動態解析を行う。</p> <p>3. 何が新しいか 複数の蛋白質分子間相互作用のメカニズムの全容を構造解析をもとに解明する初めての試みである。</p> <p>※: アクチンフィラメントとは 筋肉を構成する繊維の一つ。アクチンフィラメントとミオシンフィラメントが束になって筋原繊維、筋原繊維が束になって筋繊維、筋繊維が束になって筋肉ができています。</p>	<p>1. 現状 欧米での筋収縮の研究はアクチンフィラメントの役割を過小評価してきた。その結果研究に不可欠な研究手段(蛋白質分子結晶の調製など)の開発が遅れている。</p> <p>2. 我が国の水準 アクチンフィラメントの研究は我が国から始まった。創設の研究グループが集積する方法論・研究手段は世界のトップが多い。ただし個々のグループが小さいのでグループ間の連携が特に重要である。</p>	<p>1. 世界との水準の関係 世界の研究でリードしている地歩をさらに固める。 また、蛋白質相互作用の全容を構造から解明する新しい研究分野を開拓する。</p> <p>2. 波及効果 現代生物学の最大の問題の一つである蛋白質相互作用の研究の突破口をつくる。 蛋白質複合体に作用する医薬品開発の方法論の開発・特許の取得。</p>

(2) 体制ポンチ絵

「アクチン・フィラメントの構造と動態の解析による筋収縮調節機構の解明」の第I期・研究体制



(3) 所用経費

科学技術振興調整費総合研究 所用経費 (第I期: H11-H13)

課題名: アクチンフィラメントの構造と動態の解析による筋収縮・調節機構の解明

(単位: 千円)

研究項目	実施機関	研究担当者	所用経費			
			11年度	12年度	13年度	【期合計】
1. 筋収縮における蛋白質分子の構造と動態の解析						
(1) アクチン・ミオシンの相互作用の構造と動態						
① X線繊維回折・散乱法による筋細胞中の細いフィラメントとアクチン・ミオシンの動的構造変化	大阪大学大学院 基礎工学研究科	若林 克三 (教授)	16,239	56,156	20,398	92,793
② アクチン-ミオシン複合体のESRとX線による構造解析	大阪大学大学院 理学研究科	荒田 敏昭 (助教授)	7,208	39,025	24,746	70,979
(2) アクチンフィラメント上での蛋白質分子相互作用の構造と動態						
① 細いフィラメント上での蛋白質分子相互作用の構造と動態	文部科学省 研究振興局 理化学研究所 (委託)	○前田雄一郎 (主任研究員)	97,485	118,833	97,420	313,738
② 時間分割蛍光エネルギー移動測定及び蛍光偏光測定による蛋白質分子相互作用の研究	福井大学 工学部	三木 正雄 (教授)	20,894	5,966	21,711	48,571
③ トロポニン分子突然変異による細いフィラメントの機能的変化に関する研究	九州大学大学院 医学研究院	森本 幸生 (助教授)	7,862	8,668	15,143	31,673
2. 蛋白質の構造・動態解析のための実験系の確立及び装置の整備						
(1) 蛋白質発現系及び分子配列実験系の確立						
① ミオシンの人工変異蛋白質を駆使した機能の研究	厚生労働省 国立循環器病センター研究所	尾西 裕文 (室長)	12,454	22,945	15,627	51,026
② カルシウム感受性のあるミオシン分子の構造と機能	群馬大学 医学部	小浜 一弘 (教授)	4,200	5,700	21,973	31,873
(2) 物理的測定法と装置の開発・整備						
① シンクロトロン放射光を用いたX線溶液小角散乱時分割システムの確立と筋蛋白質への応用	文部科学省 研究振興局 理化学研究所 (委託)	藤澤 哲郎 (前任研究員)	29,247	8,760	15,273	54,280
② 筋肉・筋蛋白質系への中性子散乱・回折法の適用	文部科学省 研究振興局 理化学研究所 (委託) 日本原子力研究所 (再委託)	藤原 悟 (副主任研究員)	6,981	3,506	13,776	24,263
3. 研究推進	文部科学省 研究振興局		248	248	248	744
		合 計	201,819	269,907	247,315	720,041

(注: ○は研究リーダー)

(4) 研究成果の概要

課題名：アクチンフィラメントの構造と動態の解析による筋収縮調節機構の解明
研究代表者：前田雄一郎（理化学研究所播磨研究所）

第一期の主な研究成果は以下の5つである：

(1) トロポニン分子の結晶構造を解いた：

トロポニン機能複合体 (TnC, TnI, TnT の3つのサブユニットから成る) の結晶構造を得た。トロポミオシンの部分でトロポニン結合部位を含むC端断片の結晶、およびトロポニン・トロポニンの複合体の結晶も得て解析中 (前田チーム、さきがけ研究員・武田北一と共同研究、進行中)。既に、TnI と TnT が coiled-coil を組む相互作用をしていること、TnC の N-ドメインの位置・方向が拘束されていないらしいことが解った。トロポニン分子の結晶構造の解明は30年来世界の多くの研究室で試みられ成功しなかった研究課題である。これが突破口となりトロポニン・トロポミオシンによるカルシウム調節メカニズムの理解が進むであろう。

(2) キャッピング蛋白質2つの結晶構造を解いた：

P端をキャッピングするトロポモジュリンC端半分 (アクチンと結合する部分) の結晶構造を得て、P端への結合のモデルを提唱した (前田チーム、投稿中)。また、B端をキャッピングするCapZの2量体 (全分子) の結晶構造を得た (前田チーム、進行中)。この構造を基にアクチンフィラメントのキャッピングのメカニズムの解明に取り組む。キャッピングを理解することは、短いアクチンフィラメントの調製のために不可欠であり、またアクチン・ダイナミクス (アクチンの重合・脱重合で駆動される細胞運動) の理解に資する。これらはいずれも国際的にこの分野をリードする成果である。

(3) 機能の発現に伴うミオシン分子とアクチンフィラメントの構造変化を観測した：

グリセリン処理筋では、筋の収縮に伴うミオシン頭部の首振り運動はないらしいことを確認した (荒田チーム、ESRスペクトル解析)。溶液中ではATP加水分解中のミオシン頭部 (S1) は伸展した構造をとることを観測した (若林チーム、pPDMでSH1とSH2を分子内架橋したS1-pPDM・ADPのX線溶液散乱)。

アクチンフィラメントがカルシウムイオンによって活性化されるとき、トロポミオシンの位置変化は観測されなかった。その代わりに、TnIがアクチン上で大きく移動し、生理的な3状態に対応してTnIも3つの位置をとることが判明した。(三木チーム、投稿中、再構成アクチンフィラメントを使っての蛍光エネルギー移動法)。カルシウム調節のメカニズムについては、従来、アクチン上でトロポミオシンが移動するとの説が反証がないまま生き残ってきたが、この結果は、TnIの移動こそが重要であるとの三木説を強めた。

生きた筋肉からのX線回折強度の変化を測定することによって、活性化に伴う細いフィラメント (アクチン・トロポミオシン・トロポニン) の構造変化が詳細に観測された。(若林、発表準備中)。これらの観測はこれまでになく詳細なもので、細いフィラメントの構造変化を疑問の余地なく、かつ多面的に確認した。結晶構造を基にして、何がどのように変化しているかを知ることが今後の課題である。

(4) ミオシンの機能部位を同定した：

ミオシン頭部に人工変異を導入した30種類の変異体ミオシンを作成して、その機能変化を系統的に調べた。その結果、ミオシンに重大な機能欠陥を起こす変異の位置は重鎖のGly468からLeu634のペプチド領域に集中すること、さらにこの領域は、ATP加水分解能力に不可欠な領域、アクチン結合に重要な2領域、ATP加水分解を力に変換する領域の合計4小領域に区分されることが解った (尾西)。ミオシン分子上での機能領域を同定できたことはメカニズムの理解へ大きな

進歩である、Heidelberg のグループを中心とした英独連合チームがこのような研究を展開しているが、本研究のようにまとまった知見が得られたのは最初である。

(5) 遺伝性筋疾患の原因を解明した：

肥大型心筋症 (HCM) と拡張型心筋症 (DCM) は互いに全く病型は異なる難治性心疾患である。前者は若年性突然死の原因であり、後者は心臓移植の第一原因である。最近の遺伝学的解析によって、この両者とも心筋トロポニン遺伝子の突然変異が原因であることが判明した。この研究では、患者が持つ変異蛋白質のすべてを研究室で人工的に調製し、それぞれを心筋筋原繊維 (ストロフィリン) あるいは単離心筋筋原線維に交換導入し、変異蛋白質の機能異変を定量的に計測した。この網羅的研究により、HCM の場合は、変異が cTnT であれ cTnI であれ、心筋収縮 Ca²⁺感受性の亢進が病態発生の最初のメカニズムであることが明らかになった。他方、DCM の場合 (cTnT の変異) には心筋収縮 Ca²⁺感受性の抑制が原因である (森本、投稿中)。この結果は、心筋でのトロポニンによる筋収縮調節機構を解明することが、病気の治療の面からも重要であることを示した。この研究は、競合する欧米の他の研究グループがなし得なかった病気の原因の全体像を解明した点で高い評価を受けている。それが可能であったのは、自前で開発し蓄積してきた基盤技術が優れていたために測定精度が高かったためである。

その他の研究、進行中の研究、および今後の研究に活用される基盤技術の開発・導入：

- (1) アクチン・ミオシン相互作用部位の構造の詳細を知るために、アクチンの 2-3 分子と 1 ミオシン頭部の複合体を調製した。現在、X 線溶液散乱法で試料の均一性を検討している (荒田・若林、進行中)。
- (2) カルシウム結合による TnC の構造変化を調べるためにスピララベルした TnC を筋細胞 (グリセリン筋) に置換導入し、ESR の予備的測定を実行した (荒田、進行中)。
- (3) ESR スペクトロメーターを新規購入し、改造・調整に取り組んでいる。また測定法の独自の開発も必要になっている (荒田)。
- (4) 蛋白質分子に対するラベルの揺動を最小限に押さえるため、二価のスピララベルの開発を進めている (荒田、京大・山本研との共同研究)。
- (5) 平滑筋ミオシンのリン酸化による調節に必要な構造を同定した。頭部 2 つが完全でなくても、調節領域 2 つが結合していれば十分であることを明らかにした (尾西)。
- (6) ミオシン分子に導入した人工的変異と機能の欠損の関係を、構造の変異として理解するため、平滑筋ミオシンモータードメイン部分 (MD) の発現と精製に成功し、結晶化を進めている (尾西)。
- (7) ガラス細管にアクチンフィラメントを高濃度・高配向に並べる方法を開発した (前田、ERATO 難波プロジェクトと共同)。この配向系を使って、アクチンのヘリックス定数を正確に測定できることを確認した。
- (8) 上記人工配向系からの X 線回折パターン (強度情報) とアクチンフィラメントの電子顕微鏡像からの位相情報を結合してアクチンフィラメントの構造モデルを構築中で、すでに 15Å 分解能の構造を得た (前田、Max-Planck-Institut, Heidelberg, の K. Holmes, R. Schroder との共同研究)。アクチンフィラメントが機能する時にはアクチン自体の構造変化を伴うはずであり、この方法で構造変化を観測する可能性を探っている。
- (9) トロポミオシン分子相互間の結合を、アクチンフィラメント上でと、溶液中で比較した。この結果、アクチンフィラメントに結合していないトロポミオシン単独での性質を調べても機能発現との関係は解明できないこと、また、機能発現には分子全体の柔らかさ重要であることが解った (前田)。この結果は、アクチンフィラメント上でのトロポミオシンの形態や性質を全面的に解明することが重要であることを示している。
- (10) Sf9 昆虫培養細胞を使っての蛋白質大量発現で、蛋白質発現量増強因子を発見した。これを使って、ミオシンの発現量を改善し、アクチン発現を可能にした。(前田、特許申請中、企業と商品化を検討中)。
- (11) トロポミオシンの結晶化その他のために使用する、トロポミオシンに対する立体特異的モノ

クローン抗体の調製法を導入（前田、Max-Planck-Institut, Frankfurt の Michel 研究室より）。

- (12) 短いアクチン（様）フィラメントの単離法として、Arp (actin-related protein)-mini-filament の調製法を導入した（前田、Johns Hopkins Univ. の Schroer 研より）。
- (13) 蛍光単分子の3次元空間での方向を精度よく測定する方法を導入し、これを使って蛋白質1分子の形態変化を直接観察する顕微鏡の開発を進めている（前田）。
- (14) 発現蛋白質の機能検定の効率を上げるには、微量化が要求される。HPLC を用いた ATPase 活性超高感度法を開発した（小浜）。
- (15) カルシウムで活性化するフィザルム・ミオシンの大量発現に成功した：ミオシン重鎖の一部と2つのミオシン軽鎖から構成される制御ドメインを大腸菌で発現し、それより大きなミオシン頭部 (S1) 全体、さらには2つの頭部を含む HMM を S9 細胞で発現した（小浜、進行中）。
- (16) トロポニン分子の各部に蛍光色素を導入し、アクチンとの位置関係を大きく変える部分を確認した。また各サブユニット中に2つの蛍光ラベルを位置を選んで導入する方法を確立した（三木）。
- (17) 蛍光測定のできるストップフローシステムを確立し、ナノ秒時間分割蛍光寿命測定装置を立上げている（三木）。
- (18) 心筋症を引き起こす TnT の変異が心臓の構造・機能に与える影響を明らかにするために遺伝子改変マウス（トランスジェニックマウス、ノックインマウス）の作製をおこなっている（森本）。
- (19) 中性子小角散乱装置の環境整備をおこない、温度制御可能な試料ホルダーや高濃度試料用試料セルを製作した（藤原）。
- (20) カエル骨格筋生筋の弛緩状態および硬直状態における筋肉の中性子回折実験を行い、赤道反射のそれぞれの反射の位相を決定した（藤原）。
- (21) 中性子回折実験、NMR 実験のために使用する重水化蛋白質を大量発現する方法を導入し（藤原・前田、Max-Planck-Institut, Martinsried の Oesterhelt の研究室より）重水素化率 94 % 以上の TnC を得た。
- (22) SPring-8 の X 線ビームラインの最適化をおこない、少量の試料からの精度の高い回折強度を得（藤澤）、それを基に蛋白質分子の大きさと形を仮定なしで求める計算法を導入（EMBL、Svergun より）。
- (23) 高圧下での X 線溶液散乱装置の立上げを行い、5000 気圧までの静水圧を非常に安定的にかけることに成功した。また X 線溶液散乱実験用高圧下ストップフロー装置を開発中（藤澤、進行中）。

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	3件	41件	168(+11)件	212(+11)件
国外	69(+4)件	25件	44件	138(+4)件
合計	72(+4)件	66件	212(+11)件	350(+15)件

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載)

【特許出願等】 3件 (国内 2件、国外 1件)

1. (国内) 特願2000-144518 「ポリペプチドの生産方法」 佐野健一、前田佳代、前田雄一郎
出願年月日 2000年5月17日
2. (国外) U.S. Patent, Docket No. 1490.004, [Method of Producing Polypeptides], K-I. Sano, K. Maeda & Y. Maeda, Filed May 17, 2000.
3. (国内) 特願2001-201122 「逆相高速液体クロマトグラフィーによる高感度ATPase測定法とその装置」 小浜一弘、石川良樹、中村彰男、佐満剛一、出願年月日 2001年7月5日

【受賞等】 0件 (国内 0件、国外 0件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテ-マ 1	サブテ-マ 2	サブテ-マ 3	合計
<i>Acta Crystallogr. D</i>	3.067	1			1
<i>Am. J. Physiol.-Cell Physiol.</i>	4.086	1			1
<i>Anal. Biochem.</i>	1.976		1		1
<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	3.055	4	2		6
<i>Biochemistry</i>	4.221		8		8
<i>Biochim. Biophys. Acta</i>	3.171		1		1
<i>Biomed. Res.</i>	0.569	2			2
<i>Biophys. J.</i>	4.462	3			3
<i>Biotechnol. Bioeng.</i>	2.081	1			1
<i>Cancer J.</i>	0.394		1		1
<i>Cell Transplant.</i>	2.959	1			1
<i>Chem. Phys. Lett.</i>	2.364		1		1
<i>Eur. J. Biochem.</i>	2.852	2			2
<i>FEBS Lett.</i>	3.440	1			1
<i>J. Appl. Cryst.</i>	1.752		1		1
<i>J. Biochem.</i>	2.116	10	4		14
<i>J. Biol. Chem.</i>	7.368	1	1		2
<i>J. Cell Biol.</i>	13.955		2		2
<i>J. Fluoresc.</i>	0.771	1			1
<i>J. Comput. Chem.</i>	2.990	1			1
<i>J. Mol. Biol.</i>	5.388		1		1
<i>J. Synchrotron Rad.</i>	0.924	2	1		3
<i>Mol. Cell Biol.</i>	9.666		1		1
<i>Nucl. Instrum. Methods</i>	0.964		1		1
<i>Proc. Japan Acad. B</i>	0.443		1		1
<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	10.789		3		3
主要雑誌小計		31	30		61
発表論文合計		34	38		72