

アクチントレッドミリングによる細胞運動の 原子構造に基づく解明



わか ばやし たけ ゆき
若 林 健 之

アクチンフィラメントの高分解能クライオ電子顕像に基づき、高分解能でアクチンフィラメントの三次元構造を解き、原子モデルを構築し、(1)ATP分解がなぜ重合で促進されるのか、(2)分解されたリン酸がフィラメントから速やかに放出されないのはなぜか、(3)なぜリン酸がフィラメントを安定化するのか、(4)なぜ Mg^{2+} が最も効果的に重合を促進するのか等を構造に基づいて説明するアクチン重合の4段階ドミノ機構を提唱し、アクチンのトレッドミリング機構に対して分子レベルでのインサイトを与えた(Murakami et al. *Cell*, 143, 275-287, 2010; 生物物理 51(6), 256-259, 2011)。

本研究では構造解析を主軸とし、運動マシナリーとしてのアクチントレッドミリング機構を原子レベルで明らかにする。特にATP分解のトリガー機構(ドミノの第3段目)に注目している。

運動マシナリーとしてアクチン重合システムは最も構成要素が少なく、徹底的な構造研究のターゲットとして相応しい。アクチンのループやアミノ酸の役割、構造変化の原因と意義、水分子の関与などを(1)X線結晶解析、(2)変異を導入したアクチンの生化学的評価、(3)変異アクチンを発現している細胞性粘菌の細胞運動と細胞分化過程の観察を組み合わせて明らかにし、このマシンのメカニズムを原子レベルで明らかにしたい。

トレッドミリング機構はアクチンの重合と脱

重合に依っている。細胞先端の突出にはアクチン重合が重要である。アクチンの重合に関しては、申請者らが高分解能クライオ電子顕像法によって最近明らかにしたアクチンフィラメント構造の原子モデル(*Cell*, 143, 275-287, 2010)と細胞性粘菌アクチンのX線結晶構造(*J. Mol. Biol.*, 296, 579-595, 2000)に基づいてstructure-basedにデザインした変異を導入し、機能的変異株を下記の方法で選別する。変異アクチンプラスミドを導入した細胞性粘菌は自らの染色体遺伝子からも野生型アクチンを発現するが、その機能は変異型アクチンの発現によって、表現型が変化することがあり、この現象はdominant negativeと呼ばれる。この表現型はアメーバ運動や、飢餓誘導性細胞分化過程にも現れる。これを利用して、ハイスループットでアクチンの機能的変異株を選別する。機能変異株から変異アクチンを精製し、変異アクチンの重合能を微量蛍光測定により明らかにし、X線結晶解析で原子レベルの構造変化を明らかにする。機能性変異体の場合は、GFP融合変異アクチンを発現させて、細胞のアメーバ運動、飢餓誘導性細胞分化を蛍光顕微鏡により観察し、トレッドミリング機構を細胞レベルで追求し、X線結晶解析、重合能測定を総合して、原子レベルでのトレッドミリング機構に新たなインサイトを与える。

研究のキーワード：アクチン、アクチン重合、X線結晶解析、トレッドミリング 細胞運動
研究室HPのURL：<http://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/1163/156>