

博士学位論文

(主論文)

コフィリンが結合したアクチン線維の
クライオ電子顕微鏡法による近原子分解能構造決定

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

田中 康太郎

目次

1. 要旨	5
2. 序論	7
2.1. アクチン脱重合因子(ADF)/コフィリン	7
2.2. コフィラクチンの構造決定の先行研究	8
2.3. クライオ電子顕微鏡法の分解能革命	9
2.4. 本研究の目的	10
3. 材料と方法	11
3.1. 蛋白質アイソフォームの選択	11
3.2. 蛋白質の調製	11
3.2.1. アクチン	11
3.2.2. コフィリン	11
3.3. クライオ電子顕微鏡観察試料作成	12
3.3.1. コフィラクチンの試験管内再構成	12
3.3.2. 観察用グリッドの作成	12
3.4. クライオ電子顕微鏡による画像撮影	12
3.5. 単粒子解析	13
3.6. 原子モデル構築	14
3.6.1. 初期構造の準備	14
3.6.2. 分子動力学法による原子モデル構築	14
3.7. 剛体領域の決定	14
3.8. 剛体領域間の回転軸の決定	15
3.9. アクチン線維にコフィリンが結合した状態の原子モデル作成	15

3.10.	ハイブリッド線維の原子モデル作成	15
3.11.	分子間の相互作用部位と衝突部位の決定	15
3.12.	データの公開	15
4.	結果	16
4.1.	クライオ電子顕微鏡画像	16
4.2.	単粒子解析	16
4.3.	コフィラクチン構造の概要	16
4.4.	コフィリンの構造変化	17
4.5.	アクチンの構造変化	17
4.5.1.	外側ドメインと内側ドメインの相対回転運動	17
4.5.2.	アクチン分子の剛体領域	18
4.5.3.	ツインフィリン C 端ドメイン結合アクチンとの構造比較	18
4.6.	コフィラクチンにおける分子間相互作用	19
4.6.1.	アクチン-アクチン間相互作用	19
4.6.2.	アクチン-コフィリン間相互作用	20
5.	考察	22
5.1.	アクチンの構造制御	22
5.2.	コフィリンはどのようにしてアクチン線維に結合するか	22
5.3.	コフィリンはなぜ ADP 結合型アクチン線維に好んで結合するのか	24
5.4.	コフィリンはどのようにしてアクチン線維に対し協同的に結合するのか	24
5.5.	コフィリンクラスターの形成とアクチン線維切断の機構	25
5.6.	コフィリンが線維端アクチン分子の脱重合速度を制御する機構	27
6.	謝辞	29

7. 引用文献.....	30
8. 图表	37

1. 要旨

アクチン線維から作られるアクチン超分子構造は、筋収縮、細胞運動、細胞分裂等、真核細胞内において様々な役割を担う。アクチン超分子構造が必要に応じて構築され、機能を発揮し、やがて破壊される過程では、様々なアクチン結合蛋白質によってアクチンの重合と脱重合が制御されている。その中でもアクチン脱重合因子(ADF)/コフィリンファミリーの蛋白質は、主にアクチン線維の切断と脱重合の促進によってアクチンの重合と脱重合のサイクルを加速する。

本研究では、ADF/コフィリンの作用機構を蛋白質構造のレベルで理解するために、アクチン 1 分子に対しコフィリンが 1 分子の割合で結合したアクチン線維であるコフィラクチンの高分解能構造をクライオ電子顕微鏡法により決定することに取り組んだ。

電子直接検出器でコフィラクチンの氷包埋像を撮影し、ベイズ推定に基づく単粒子解析アルゴリズムを用いて 3 次元構造を再構成することにより、アミノ酸残基の側鎖の配向やマグネシウムイオンの存在まで確認できる近原子分解能(分解能 3.8Å)での構造決定に成功した。分解能約 9Å の先行研究と比較して著しい進歩であり、アクチンとコフィリンの構造と分子間相互作用部位をアミノ酸残基側鎖レベルで記述することができた。

アクチンはアウトードメイン(OD)とインナードメイン(ID)がヒンジを介して繋がった構造をしており、さらに OD はサブドメイン(SD)1 と SD2、ID は SD3 と SD4 に分けられる。本研究により、ID の大部分と SD1 の大部分は異なるアクチン構造間ではほぼ同じ構造であり、剛体と見なせることが分かった(ID 剛体領域と SD1 剛体領域)。アクチンの構造変化は、ID 剛体領域と SD1 剛体領域の相対的な位置変化により特徴づけられる。単量体アクチン(G アクチン)の構造(G 型)から、コフィリンが結合していないアクチン線維中のアクチンの構造(F 型)への変化では、SD1 と SD3 を貫く軸(G/F 軸)の周りで 2 つの剛体領域が回転し、ねじれの位置関係にある状態(G 型)から平らな状態(F 型)に変化する。一方 G 型からコフィラクチン中のアクチンへの構造変化は、G/F 軸と直行する軸の周りで SD2 と SD4 が近づく方向へ 2 つの剛体領域が回転するもので、G 型とも F 型とも異なる構造である(C 型)。コフィリンとアクチンの相互作用部位は大きくわけて G サイトと F サイトに分類でき、G サイトは ID 剛体領域と SD1 剛体領域の両方に、F サイトは SD1 剛体領域のみに存在する。重要なことに、ADF/コフィリンファミリーに属するツイーンフィリンの C 端ドメインが単量体アクチンに対し G サイトを介して結合した複合体中のアクチン構造が C 型であることを今回見出した。このことは、コフィリンがアクチンに対し G サイトを介して結合するだけで、2 つの剛体領域の相対位置関係を誘導、固定し、アクチンの構造を C 型に変化させられることを示唆する。以上の知見はコフィリン

の作用機構を理解するための鍵となるだけでなく、アクチンの構造多形、構造動態の理解に対しても進歩と言える。

また、本研究の結果を元にして、コフィリンに関する次の事柄を説明できるモデルを提唱した。1) コフィリンはどのようにしてアクチン線維に結合するか。2) コフィリンはなぜ ADP 結合型アクチン線維に好んで結合するのか。3) コフィリンはどのようにしてアクチン線維に対し協同的に結合するのか。4) コフィリンクラスターの形成とアクチン線維切断の機構。5) コフィリンが線維端アクチン分子の脱重合速度を制御する機構。

本論文で提唱したモデルは一部仮定に基づくため今後実験的な検証が必要であるが、これまで蛋白質構造レベルでの説明がなされていなかったことに対して近原子分解能構造を含む一定の根拠を元に説明できたことは重要な進歩であり、今後のコフィリンおよびアクチンの研究において役立てられるものと信じている。

2. 序論

2.1. アクチン脱重合因子(ADF)/コフィリン

アクチン線維から作られるアクチン超分子構造は、真核細胞内で様々な役割を担う¹。アクチン超分子構造が必要に応じて構築され、機能を発揮し、やがて破壊される過程では、様々なアクチン結合蛋白質によってアクチンの重合と脱重合が制御されることが必要である¹。その中でも、アクチン脱重合因子(ADF)/コフィリンファミリーの蛋白質は、分子量 13-19 kDa の蛋白質で、主にアクチン線維の切断と脱重合の促進によってアクチンの重合と脱重合のサイクルを加速する²。

ADF はニワトリ胚の脳から初めて発見され³、その後コフィリンがブタの脳から発見された⁴。ADF はアクチン線維の脱重合能が、コフィリンはアクチン線維への結合能(co-filamentous)が当初注目されたため、その名が付いた。どちらも単一ドメインからなる蛋白質であり、配列相同性、3次構造、細胞内機能が類似していることから、ADF/コフィリンファミリーとしてまとめられている⁵。ADF/コフィリン様のドメイン構造は ADF-H(ADF-homology)ドメインと呼ばれており、ADF-H ドメインを持つ蛋白質はまとめて ADF-H 蛋白質ファミリーと呼ばれる。ADF-H 蛋白質ファミリーには ADF-H ドメインを複数持つような蛋白質や、ADF/コフィリン的な細胞内機能を持たないものも含まれる。また、ADF/コフィリンは ADF-H 蛋白質ファミリーの中では最も小型の蛋白質である⁵。

ADF/コフィリンは全ての真核生物で発現するとされており⁶、アクチンの重合と脱重合のサイクルを加速することで、特に細胞運動に関わるアクチン超分子構造の動態調節を担う。例として、宿主細胞内でのリステリア菌のコメット・テイル⁷、葉状仮足⁸、糸状仮足⁹、神経細胞の成長円錐¹⁰が挙げられる。ADF/コフィリンは、アクチン線維の量と長さを調節することにより、収縮力発生に関わるアクチン超分子構造の維持でも役割を果たす。例として、細胞分裂収縮環¹¹、ストレスファイバー¹²、筋肉¹³が挙げられる。以上の他にも、がん細胞の浸潤運動、神経細胞ネットワークの構築、動物の発生などの重要なイベントに必要である²。

ADF/コフィリンはアクチン線維の側面に結合する。またその中でも、ATP 結合型または ADP.Pi 結合型アクチン分子より、ADP 結合型アクチン分子に対して好んで結合する^{14,15}。コフィリンの結合は協同的であり、アクチン線維上で ADF/コフィリンのクラスターが形成される¹⁶⁻¹⁹。アクチンと ADF/コフィリンのモル比が 1:1 となったところで結合は飽和し、ADF/コフィリンで飽和したアクチン線維が出来上がる²⁰。この線維を、コフィラクチンと呼ぶ。

ADF/コフィリンがアクチン線維に結合すると、アクチン線維は切断される^{8,15}。アクチン線維には極性が有り、両端はそれぞれ B 端(反矢じり端、Barbed end、重合端)と P 端(矢じり端、Pointed end、脱重合端)と呼ばれるが、ADF/コフィリンによるアクチン線維の切断は主に ADF/コフィリンクラスターの P 端側で起きる^{19,21}。また ADF/コフィリンは、塩基性溶液中かつ特定の条件下でアクチン線維の脱重合を促進する^{19,22}。さらに、アクチン線維では P 端と比べて B 端の脱重合がより高速だが、コフィラクチンでは B 端の脱重合は抑制、P 端の脱重合は加速され、結果として両端での脱重合速度が等しくなることが知られている¹⁹。ATP 結合型の単量体アクチン(G アクチン)が溶液中で枯渇しているときには、ADF/コフィリンはアクチン線維 B 端のアクチン分子に結合し、その脱重合を促進することもわかっている¹⁹。

生理的条件下では、G アクチンは ATP 結合型の状態で重合してアクチン線維となる。重合に伴ってアクチン分子の構造は変化する²³。本論文では G アクチンの構造を G 型、重合後のアクチン分子の構造を F 型と呼ぶことにする。一般的には F 型アクチンからなるアクチン線維のことを F アクチン、あるいは単にアクチン線維と呼ぶが、本論文では次の通り用語を整理する。アクチン線維は、コフィリンが部分的に結合した状態の線維も含めた広義のアクチン線維の意味で用いる。特に F 型アクチンのみからなるアクチン線維は F 型アクチン線維と呼ぶことにする。G アクチンがアクチン線維に取り込まれた後、時間をおいて結合 ATP は加水分解され、ADP.Pi 中間体を経て ADP となる。これによって、1 本のアクチン線維の中でも、重合が起こる B 端側には ATP または ADP.Pi 結合型アクチン分子が豊富にあり、B 端から離れるほど重合してから時間が経過しているため、ADP 結合型アクチン分子が豊富になる。古くなったアクチン線維は ADP 結合型になっているとも言える²⁴。興味深いことに ADF/コフィリンは ADP 結合型アクチンに対し親和性が高いので、古くなったアクチン線維を選択的に切断、脱重合することになり、G アクチンのリサイクルに貢献する。結果として、ADF/コフィリンはアクチンの重合と脱重合のサイクルを加速することになる^{8,14}。

以上のように、分子レベルでの現象論としては ADF/コフィリンの研究は着実に進められてきた。しかしその作用機構については理解が乏しい。作用機構を理解するためには蛋白質構造レベルでの研究が不可欠であり、特に ADF/コフィリンがアクチン線維に結合した状態の構造を知ることは重要である。

2.2. コフィラクチンの構造決定の先行研究

アクチン線維を含め、線維状蛋白質とその結合蛋白質の複合体構造を知る上での問題点として、線維の一部にのみ蛋白質が結合したヘテロな線維構造を高分解能で決定することが難しい点が挙げられる。そのため一般的には、結合蛋白質で飽和した線維(すべて

の結合サイトが埋まった状態)の構造を決定するアプローチが採られる。ADF/コフィリンの場合それはコフィラクチンであり、本研究の以前にもコフィラクチンの構造決定はいくつか試みられた。

McGough ら²⁰と Galkin ら²⁵によるクライオ電子顕微鏡法を用いた先行研究において、コフィラクチンの構造が低～中分解能で決定され、コフィリンはアクチン線維のストランド内の2つの隣接アクチン分子にまたがって結合すること、コフィリンの結合によりアクチン線維のらせんピッチが短くなり、ストランド内およびストランド間のアクチン分子間相互作用が弱まることが明らかになった。特に Galkin らの研究²⁵は約 9Å 程度の分解能での構造決定により、コフィラクチン中のアクチン分子が G アクチンよりもより振れた構造を取ることを明らかにし注目を集めた。しかしそれらの先行研究の分解能では、ADF/コフィリンの作用機構を詳細に考察するに十分なだけの知見は得られなかった。

McGough ら²⁰と Galkin²⁵らによる報告年はそれぞれ 1997 年と 2011 年であり、当時使用されたクライオ電子顕微鏡および撮像装置の性能と解析手法からすれば低～中分解能に留まったことは妥当である。

筆者は電界放出型電子銃および電子エネルギー分光器搭載のクライオ電子顕微鏡と、高分解能構造解析で定評のある電子顕微鏡用写真フィルムおよびスキャナを用いてコフィラクチンの画像を収集し、らせん対称性を持つ線維の構造決定向けの単粒子解析プログラム²⁶を改良しつつコフィラクチンの構造決定に取り組んできた。Galkin らの先行研究²⁵では明らかにできなかった詳細を明らかにするため、ポリペプチドの主鎖がトレース可能でアミノ酸側鎖の密度も一部可視化可能な近原子分解能(分解能 4Å 以上程度)を目標としたが、最終的には 7.4Å 分解能に留まり、先行研究以上の知見はあまり得られなかった。撮像装置(フィルム、スキャナ)と単粒子解析プログラムの性能が主要因と考えられた。

2.3. クライオ電子顕微鏡法の分解能革命

2014 年以降、クライオ電子顕微鏡法による近原子分解能構造決定の報告が急激に増加し、現在はいわばクライオ電子顕微鏡法の分解能革命の只中にある。

分解能革命の最大の立役者は、電子直接検出器の開発および普及である²⁷。電子直接検出器は CMOS イメージセンサにより入射電子を直接検出してデジタルシグナル化するカメラであり、既存の検出器(フィルム、CCD カメラ)と比べて高いシグナル対ノイズ比で像を記録できる²⁸。特に CMOS を薄く加工(Back-thinning)して後方散乱電子によるノイズを低減した電子直接検出器(Thermo Fisher 社の Falcon II、Gatan 社の K2 summit)

のシグナル対ノイズ比は高く²⁸、2014 年以降の多数の近原子分解能構造決定で使用されている。

電子直接検出器はシグナル対ノイズ比が高いだけでなく、CMOS センサの特性によりシグナルの読み出しが高速という特徴がある。そのため、フィルムや CCD カメラでは 1 枚の積算像として記録していた像を複数枚のフレームに分割して動画として記録可能になった。クライオ電子顕微鏡法での撮像過程では、試料ステージの不安定さや電子ビームのエネルギーに起因する像ドリフトが発生するため²⁹、そのまま像を記録すると像がぼけてしまう。動画として記録することで、像ドリフトによるフレーム間の位置ずれを画像処理により補正することが可能となり³⁰、高分解能化に大きく貢献している。

分解能革命のもう一つの要因として、RELION³¹等のベイズ推定に基づく単粒子解析アルゴリズムが利用できるようになったことが挙げられる。古典的な単粒子解析アルゴリズムは、画像から切り出された個々の単粒子毎に、参照像との類似度に基づいて投影方向や位置シフト量を推定するものであった。一方 RELION³¹では、ベイズの定理における事後確率（データ全体を観測したもとの、単粒子の投影方向などのパラメータの確率分布）を最大化するようなパラメータを求めるアプローチを取るため、データのノイズへの過適合が抑えられるという特徴がある。個々の単粒子のシグナル対ノイズ比が悪いクライオ電子顕微鏡においてこのアプローチは有効であり、多数の近原子分解能構造が報告されている。

コフィラクチンのようにらせん対称性を持つ線維状蛋白質の単粒子解析では、実際には線維軸方向に続いている線維を一部重複を許して細切れにして単粒子として扱うことや、らせん対称性を考慮に入れることなど、通常の単量体あるいは複合体蛋白質の単粒子解析とは異なる扱いが必要である。2016 年にリリースされた RELION のバージョン 2.0 以降では、そのような線維状蛋白質の単粒子解析もサポートされるようになった³²。

これまでのところ 7.4Å 分解能に留まったコフィラクチンの構造決定も、以上で説明した電子直接検出器と RELION を含めた state-of-the-art なクライオ電子顕微鏡技術を活用して改めて挑戦することにより、近原子分解能を達成する可能性は十分あると筆者は考えた。

2.4. 本研究の目的

以上のような背景から、本研究では state-of-the-art なクライオ電子顕微鏡技術を利用してコフィラクチンの構造を近原子分解能で決定することにより、コフィリンの作用機構の詳細を蛋白質構造の観点から説明することを目指した。

3. 材料と方法

3.1. 蛋白質アイソフォームの選択

本研究ではアクチンおよびコフィリンのアイソフォームとしてニワトリ由来の α 骨格筋アクチンおよびコフィリンを選択した。

ニワトリ由来コフィリンを選択した理由を3点挙げる。1) リコンビナント蛋白質として調製した場合と組織精製により調製した場合とで生化学的活性に差が無い³³。2) システイン残基が分子表面に露出していないためシステインの酸化が原因となるダイマー化が起こらない。例えば哺乳類のコフィリンは4つのシステイン残基が分子表面に露出しておりダイマー化する傾向がある³⁴。3) 弱酸性pH条件で安定なコフィラクチンを形成するため構造解析に適している。

ニワトリ由来 α 骨格筋アクチンを選択した理由を3点挙げる。1) ニワトリ由来コフィリンが生体内で相互作用している相手である。2) 試料調製が容易である。3) 既存の研究が蓄積されている哺乳類 α 骨格筋アクチンとアミノ酸配列が等しい。

3.2. 蛋白質の調製

3.2.1. アクチン

ニワトリ骨格筋を食肉処理場から購入し、骨格筋のアセトンパウダーを作成した³⁵。アクチンの重合、脱重合サイクルを利用してアセトンパウダーから α 骨格筋アクチンを抽出した後³⁵、ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephacryl S-200h, GE Healthcare)により精製した。精製したアクチンはGアクチンの状態で使用直前まで氷上で静置した。

3.2.2. コフィリン

千葉大学の阿部洋志博士より提供いただいたニワトリ由来野生型コフィリンの発現ベクター^{33,36}を用いて、大腸菌 BL21(DE3)株(Thermo fisher)を形質転換して培養し、コフィリンを大量発現させた。遠心により菌体を回収し、50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA, 1 mM DTT, cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) を含む緩衝液に懸濁した。菌体を破碎するため、懸濁液に Bug Buster Protein Extract Reagent(Novagen)および 1 mg/ml 卵白リゾチーム(Wako)を加えて室温で 15 分間静置し、その後氷冷しながら超音波破碎機(UD-201, TOMY)により破碎処理を行った。破碎後の溶液を $165,000 \times g$ で超遠心して清澄化した後、硫酸アンモニウム沈殿法によりコフィリンを分画した(60-80% 飽和)。コフィリン分画液を陽イオン交換クロマトグラフィーの開始緩衝液(20 mM MES(pH 6.2), 5 mM EDTA)内で一晩透析した後、陽イオン交換クロマトグラフィー

(HiTrapSP HP, GE Healthcare)で粗精製した。溶出は開始緩衝液に 1 M NaCl を加えた緩衝液で行った。コフィリン粗精製液をゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Superdex 75pg, GE healthcare)にかけ、コフィリンを精製した。ゲルろ過の緩衝液は 5 mM PIPES-NaOH (pH 6.6), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl を用いた。精製コフィリン溶液に 1 mM DTT を加えた後 1.5 mL チューブに少量ずつ分注して液体窒素で急速凍結し、アルゴンガス封入の後 -80°C 冷凍庫内で保存した。

3.3. クライオ電子顕微鏡観察試料作成

3.3.1. コフィラクチンの試験管内再構成

G アクチンを F バッファー(15 mM PIPES-NaOH (pH 6.6), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT)に懸濁し、室温で 90 分間重合させてアクチン線維溶液 (12 μ M アクチン) を作成した。50 μ M のコフィリンを ATP 無しの F バッファーに懸濁し、等量のアクチン線維溶液と混合した後、氷上で 30 分以上静置してコフィラクチン溶液 (6 μ M アクチン、25 μ M コフィリン) を作成した。弱酸性条件 (pH 6.6) によりコフィラクチンが安定化される^{37,38}。

3.3.2. 観察用グリッドの作成

試料観察用の穴あきカーボン膜付きグリッドは Quantifoil R1.2/1.3(Quantifoil Micro Tools)を用いた。安定した試料作成、観察のために、グリッドは剛性が高く試料作成の過程で変形しにくいモリブデン製を採用した。グリッドの製品製造過程で付着した残留有機高分子の除去のためグリッドはアセトンで洗浄し、その後超純水中に一晩浸したあと風乾させた³⁹。使用直前に、カーボン膜親水化のためグリッドを 5 mA のグロー放電中で 60 秒間静置した。

コフィラクチン溶液を 2.1-2.5 μ L とり、グリッド上に添加した。その後、自動凍結装置 Vitrobot Mark IV(Thermo Fisher)を用いて液体エタンでグリッドを瞬間凍結した。凍結時の条件はブロット時間 2 秒、湿度 100 %、4 °Cとした。凍結後、グリッドに付着した液体エタンの除去のためグリッドを液体窒素雰囲気中で常温の濾紙でブロットした。エタンが付着した状態で観察すると電子線が透過しないことがあり、またエタンの昇華により電子顕微鏡内の真空も悪くなるため、除去することが望ましい。

3.4. クライオ電子顕微鏡による画像撮影

電子顕微鏡は大阪大学超高压電子顕微鏡センターの Titan Krios (Thermo Fisher)を使用した。撮影条件を表 1 に示す。撮影効率化のため、EPU(Thermo Fisher)の機能を用いてカーボン膜穴 1 つあたり 3 箇所撮影した。また、画像のパワースペクトルのシグナル

対ノイズ比 (S/N 比) 向上のため、コントラストの高いカーボン膜を撮影視野内に意図的に含めた (撮影視野の 1/3~1/4)。パワースペクトルの S/N 比向上はコントラスト伝達関数を高精度でフィッティングするために役立った。像は電子直接検出器 Falcon II (Thermo Fisher)を用いて動画として記録した。動画は本来 17 フレームから構成されるが、装置システムの制約上そのうち 7 フレーム分からなる動画と、17 フレーム全てを積算した画像のみしか保存できない。そのため、単粒子解析用の動画として 17 フレームの内の最初の 2 フレームを電子ビーム誘起性のドリフトが大きいため捨て、続く 7 フレーム (累積電子線照射量 $24\text{ e}^-/\text{\AA}^2$)のみ保存した。17 フレーム全てを積算した画像 (累積電子線照射量 $45\text{ e}^-/\text{\AA}^2$)は、コフィラクチン線維の位置指定や試料の状態確認のために使用した。撮影は 2 回のセッションに分けて行い、それぞれ 414 動画と 697 動画、合計で 1,111 動画を収集した。

3.5. 単粒子解析

画像処理には主に単粒子解析ソフトウェア REION2.0^{31,32}を使用した。撮影した動画は MotionCorr³⁰によりドリフト補正を施した画像に変換し、続いて Gctf⁴⁰によりコントラスト伝達関数のフィッティングを行った。画像のパワースペクトルとコントラスト伝達関数のフィッティング結果を目視で確認し、対物非点収差の大きい画像、コントラスト伝達関数のフィッティングに明らかに失敗している画像 18 枚を捨て、1,093 枚の画像を得た。e2helixboxer⁴¹を利用して、全フレームの積算画像の中から目視でコフィラクチン線維の座標を指定し、その座標を使ってドリフト補正後の画像から 320×320 画素の大きさで線維像を細切れに切り出した。その結果、コフィラクチン線維の細切れ画像 (単粒子)を 245,236 枚得た。得られた単粒子を RELION の 2D classification にかけてクラスタ分類し、微細構造が見えないクラスタに属する単粒子は捨てた。その結果、202,217 枚の単粒子を得た。

3 次元再構成のための初期構造として、コフィラクチン構造決定の先行研究²⁵による原子構造モデル (PDB 3J0S)を sxpdb2em⁴²を用いて 3 次元密度マップ化し、 25 \AA をカットオフ周波数とするローパスフィルタを施したものを用意した。RELION の 3D refinement をらせん対称性探索有り、溶媒平滑化なしで実行し、 4.3 \AA 分解能の密度マップを得た。らせん対称性は、コフィラクチンを左巻き 1 重らせんとして見たとき、アクチン 1 分子あたり -162.1° 回転/ 27.6 \AA 上昇に収束した。その後、らせん対称性拘束付き、溶媒平滑化ありで 3D refinement を実行し、分解能は 4.0 \AA に改善された。続いて RELION の movie refinement と particle polishing により、単粒子レベルでのドリフト補正処理と累積電子線照射量に基づく B-factor 補正を行った。ここで画像撮影時の 2 回目のセッション由来の単粒子 86,388 枚のみを選別して 3D refinement を実行し、最終的に 3.8 \AA 分解能の密度マップを得た。

3.6. 原子モデル構築

3.6.1. 初期構造の準備

アクチンとコフィリンの初期構造として、G アクチンの原子モデル(PDB 1J6Z)⁴³とニワトリ由来コフィリンの原子モデル(PDB 1TVJ)を選択した。G アクチンの原子モデルには、次の改変を施した。まず、N 端領域(残基番号 1-7)、C 端領域(361-375)、サブドメイン 2 領域(36-67)を、F 型アクチンの原子モデル(PDB 2ZWH)²³の対応する箇所と置き換えた。また ADP に結合した Ca^{2+} は Mg^{2+} に置き換え、N 端アミンをアセチル化し、Methyl-His73 を通常の His に置き換えた。

両初期構造を 3 次元再構成により得た 3.8 Å 分解能密度マップへ剛体フィッティングし、アクチン 1 分子あたり -162.1° 回転/27.6 Å 上昇のらせん対称性に従い、アクチン 5 分子、コフィリン 3 分子からなるコフィラクチン原子モデルの初期構造を作成した。

3.6.2. 分子動力学法による原子モデル構築

原子モデル構築は、コフィラクチン原子モデルの初期構造を分子動力学法により密度マップへフィッティングする方法で行った。分子動力学ソフトウェアは NAMD 2.12⁴⁴を用い、手順は cascade-MDFF^{45,46}に則った。計算中はらせん対称性に基づく調和振動子ポテンシャルによる原子座標拘束⁴⁷を水素以外の全原子に適用した。また、溶媒の効果を取り入れるため拡張ボルン陰溶媒モデル⁴⁸を使用した。cascade-MDFF の収束後、phenix.real_space_refine⁴⁹を利用し、ペプチドの二面角が異常な残基の二面角を修正した。その後、COOT⁵⁰, MDFF, phenix.real_space_refine を利用して対話的に原子モデルの改善を行った。アクチンの N 端(1-6)、DNase I 結合ループ(D ループ、41-49)、コフィリンの N 端(1-2)の 3 領域は、対応する密度が不明瞭で構造を決定できなかったため、原子モデルから削除した。最後に His73 を Methyl-His に置き換え、最終的な原子モデルとした。

3.7. 剛体領域の決定

アクチン構造の中の剛体領域決定のため、表 2 に示した 8 種類の原子モデルを、そのインナードメイン(ID)(残基番号 138-336)に関してアラインメントした。アラインメント後、各原子モデル間に対応する $\text{C}\alpha$ 原子座標の標準偏差を求め、標準偏差が 1Å 未満の ID 内 $\text{C}\alpha$ 原子群を、ID 剛体領域候補とした。ID 剛体領域候補に関して再度アラインメントを行い、原子座標の標準偏差が 0.7Å 未満の $\text{C}\alpha$ 原子群を最終的な ID 剛体領域とした。同様の方法で、SD1(残基番号 7-35, 68-137, 337-372)剛体領域も求めた。

3.8. 剛体領域間の回転軸の決定

ID 剛体領域と SD1 剛体領域の相対運動の回転軸は、ドメイン運動解析ソフトウェアである DynDom⁵¹ の DomainSelect プログラムを利用して求めた。

3.9. アクチン線維にコフィリンが結合した状態の原子モデル作成

コフィリンがどのようにアクチン線維に結合するか考察するため、コフィリンが F 型アクチン線維に対して F サイト、Go サイト、Gi サイト(図 11b)を介して結合した原子モデルを作成した(図 10g-i)。コフィリンが F サイトを介して F 型アクチン線維に結合したモデルは、次の手順で作成した(図 17)。まず、コフィラクチン原子モデルから、F サイトで結合した状態のアクチンとコフィリンを 1 分子ずつ取り出した。次に、取り出したアクチンの SD1 剛体領域に、F 型アクチン線維をフィッティングして重ね合わせた。フィッティングされた F 型アクチン線維とコフィリンを合わせて、原子モデルとした。コフィリンが Go サイトまたは Gi サイトで F 型アクチン線維に結合したモデルも同様に作成した。作成した結果分子間衝突が発生しても、そのままにした。

3.10. ハイブリッド線維の原子モデル作成

F 型アクチン線維を構成する 2 本のストランドの内の一方のみにコフィリンが結合した場合に生じるストランド間衝突を調べるため、一方のストランドのみにコフィリンが結合したハイブリッド線維の原子モデルを作成した(図 14e-h)。まず、コフィラクチンの片方のストランドから、2~5 分子のアクチンを含む領域(コフィラクチン断片)を切り出した。次に、F 型アクチン線維の片方のストランドに対し、切り出したコフィラクチン断片をフィッティングした。フィッティングは、コフィラクチン断片の中心のアクチン分子の ID と、F 型アクチン線維の対応するアクチン分子の ID をアラインメントすることで行った。作成した結果分子間衝突が発生しても、そのままにした。

3.11. 分子間の相互作用部位と衝突部位の決定

2 つの分子間の相互作用部位および衝突部位は、原子間の距離に基づいて決定した。原子間の距離がファンデルワールス半径の和の 1.1 倍未満のとき、その原子同士は分子間の相互作用部位に属するとみなした。また、原子間の距離がファンデルワールス半径の和の 0.5 倍未満のとき、その原子同士は衝突しているとみなした。

3.12. データの公開

コフィラクチンの原子モデルはアクセッション番号 5YU8 で Protein Data Bank(PDB)に登録し、公開した。またコフィラクチンの密度マップはアクセッション番号 EMD-6844 で Electron Microscopy Data Bank(EMDB)に登録し、公開した。

4. 結果

4.1. クライオ電子顕微鏡画像

ニワトリ由来コフィリンとニワトリ骨格筋から調整したアクチンよりコフィラクチンを試験管内再構成し、クライオ電子顕微鏡法により 1,111 動画を撮影した。典型的な画像を図 1 に示す。観察試料の作成条件を十分最適化したため、観察の妨げとなる氷の混入等が少なく、かつコフィラクチンが互いに重なり合いすぎない程度の適当な密度で存在する、良い像を撮影できた。

4.2. 単粒子解析

単粒子解析法により、コフィラクチンの 3 次元密度マップを 3.8Å の分解能で再構成できた。再構成された密度マップを図 2、分解能の根拠となるフーリエシェッセル相関(FSC)のプロットを図 3 に示す。

4.3. コフィラクチン構造の概要

再構成された密度マップに対し、分子動力学法を利用してアクチンとコフィリンの原子モデルをフィッティングし、コフィラクチンの原子モデルを構築した (図 4)。一部を除いて、原子モデルの主鎖に相当する密度は一意にトレースできた(図 4a)。密度が見えず主鎖がトレースできなかった部位は (図 4b)、アクチンの N 端(1-6)、DNase I 結合ループ(D ループ、41-49)、コフィリンの N 端(1-2)の 3 領域で、溶液中では構造が不定であると考えられる。3.8Å という近原子分解能で再構成できたため、図 4c, d に示すように、多くのアミノ酸残基側鎖の密度まで可視化できており、アミノ酸側鎖のおおまかな配向まで信頼のおける原子モデルとなっている。また、図 4c に示すように、アクチンに結合したヌクレオチドおよび Mg^{2+} の密度も可視化できた。ATP を密度へ当てはめた場合は γ リン酸が密度マップからはみ出す(図 5c, f)のに対し、ADP を密度へ当てはめた場合は密度マップの中に ADP が良く収まる(図 5b, e)ため、結合ヌクレオチドは ADP である。

先行研究^{20,25} で得られた知見と同じく、コフィリンはコフィラクチンの 2 重らせんを構成する 2 本のストランドのうち、一方のストランド内の上下 2 つのアクチン分子にまたがるように結合し(図 4b)、F 型アクチン線維と比較してらせんピッチが短くなっていることが確認できた。F 型アクチン線維では 1 本のストランド内で隣接する上下 2 つのアクチン分子間のらせん軸周りの回転角は $\sim 27^\circ$ だが、コフィラクチンでは 36° である。また、コフィリン分子同士は互いに離れており、接触は無い。

Galkin らによる先行研究²⁵では、9Å 分解能の密度マップに基づく原子モデル(PDB 4J0S)が報告された。本研究の 3.8Å 分解能の密度マップに基づく原子モデルと構造を比較すると、C α 原子間距離が 1.5Å よりも大きい残基が分子構造の中の全般に渡って確認され(図 6a-b)、先行研究に比べ大きく構造が改善されているのがわかる。

Galkin らの先行研究²⁵による 9Å 分解能の密度マップでは、アクチンの D ループに相当する箇所に密度が確認できる。そのため、先行研究の原子モデルのアクチンの D ループは、その密度の形状に概ね対応するループ構造としてモデリングされた。一方で本研究の 3.8Å 分解能の密度マップでは、D ループの残基番号 41-49 の部位の密度は確認できない(図 6c)。先行研究の分解能と同程度の 8Å をカットオフ波長とするローパスフィルタを密度マップに対して適用すると、先行研究の D ループ領域密度と類似した密度が確認できる(図 6d)。以上のことから、アクチンの D ループは一定の構造をとらず、ローパスフィルタにより可視化された密度(図 6d)付近や、Galkin らの先行研究²⁵の密度マップの相当部位付近で揺らいでいることが示唆される。D ループがコフィラクチン中で一定の構造をとらずに揺らいでいることは、次の 2 つの先行研究で得られた知見と矛盾しない。1) コフィラクチンでは、F 型アクチン線維と比べ、アクチンの残基 47-48 間のサブティリシン(subtilisin)による開裂反応がより活発である⁵²。2) コフィリンの結合により、D ループに結合している stiffness カチオンが放出される⁵³。

4.4. コフィリンの構造変化

コフィリンの構造は、ヒト由来コフィリン 1 単体の結晶構造(PDB 4BEX⁵⁴)と全体的にはほぼ同様の構造であり(図 6e,f)、特筆すべき変化は見られない。最も構造変化の大きい部分は残基番号 19-30 の領域で、アクチンとの相互作用界面に存在するループ構造である。

4.5. アクチンの構造変化

4.5.1. 外側ドメインと内側ドメインの相対回転運動

コフィラクチン中のアクチン構造を既知のアクチン構造と比較すると、コフィラクチン中のアクチン構造は、外側ドメイン(OD)と内側ドメイン(ID)の相対位置関係が特徴的であるとわかった。

アクチン構造に関する先行研究²³により、G 型アクチンと F 型アクチンとで、OD と ID の相対位置関係が異なることはよく知られている。G 型アクチンにおける OD と ID は、ねじれの位置関係にある(図 7c,d)。G アクチンが重合してアクチン線維に取り込まれて F 型アクチンになると、SD1 と SD3 を貫く回転軸(図 7e,f の赤い棒)の周りで、OD が ID に近づく方向に 15.0° 回転し、結果としてアクチン分子が平らになる(F 型)²³。こ

れがいわゆるアクチンの G/F 変換である。以降 G/F 変換における OD と ID の相対回転運動の軸を G/F 軸と呼ぶことにする。

Galkin らのコフィラクチン構造決定の先行研究²⁵では、G 型または F 型アクチンからコフィラクチン中のアクチンへの構造変化もまた、G/F 軸の周りの OD と ID の相対回転運動で説明されていた。しかし本研究で明らかにしたコフィラクチン中のアクチン構造と G 型構造を比較すると、G 型からコフィラクチン中のアクチンへの構造変化は G/F 軸の周りではなく、G/F 軸とほぼ直行する別の軸の周りで起こることが明らかとなった(図 7e, f)。以降、コフィラクチン中のアクチンの構造を C 型アクチン、G 型から C 型への構造変化の軸を G/C 軸と呼ぶことにする。G 型から C 型への構造変化は、G/C 軸の周りに、OD が ID に近づく方向へ 6.0° 回転することで起こる。その結果、SD2 と SD4 の間の空隙が狭くなるが、意外にもヌクレオチド結合部位の構造は G 型アクチンから変化しない(図 8e)。これは、ヌクレオチドが G/C 軸上に位置するためである(図 7e, f)。

4.5.2. アクチン分子の剛体領域

アクチン分子の構造変化をより特徴づけるため、本研究の C 型アクチン構造を含む 8 種類のアクチン(表 2)の構造を比較した(図 8a-d)。各アクチン構造とも、ID と SD1 の構造は互いに類似している一方、ID と SD1 の相対的な位置関係にばらつきがある(図 8a-d)。このことから、アクチンの構造変化においては ID と SD1 がそれぞれ剛体のように振る舞い、構造変化は ID 剛体領域と SD1 剛体領域の相対的な位置関係変化により特徴づけられると考えた。そこで、これらの構造比較から、アクチンの剛体領域を決定することを試みた。決定方法は、SD1 と ID のそれぞれについて、C α 原子に関して各アクチン構造を重ね合わせ、C α 原子の座標の標準偏差が 0.7Å 未満の残基を剛体領域に属するものとした(第 3.7 節)。結果として剛体領域は表 3 の通り定まった。図で示すと図 7i のようになり、剛体領域がドメインのコア部分だけではなくドメイン全体にわたることがわかる。また、この比較の過程で、残基番号 137 と 336 は 2 つの剛体領域の相対位置変化におけるヒンジとして働くことがわかった(図 8a-d の赤矢印)。即ち、主に残基番号 137 と 336 のペプチド結合 2 面角が変化することで ID と SD1 の相対位置変化を起こすことが可能である。F 型、G 型、C 型アクチンの間の構造変化において ID と SD1 が剛体として動くというのは新奇な知見であるが、それだけでなく、この知見はコフィリンの作用機構を考察するための鍵の 1 つである(第 5 節)。

4.5.3. ツインフィリン C 端ドメイン結合アクチンとの構造比較

G アクチンの結晶構造はこれまでに多数報告されている⁵⁵。ID と SD1 の相対位置関係に着目すると、ほぼ全ての G アクチン構造で ID と SD1 の相対位置関係はほぼ同一である⁵⁵。それら典型的な G アクチン構造とは異なる構造を持つものとして、次の 3 種類が

知られている。1) プロフィリンが結合した G アクチン⁵⁶、2) チモシン $\beta 4$ が結合した G アクチン⁵⁷、3) ツインフィリン C 端ドメインが結合した G アクチン⁵⁸。これら 3 種の構造の ID 剛体領域と SD1 剛体領域の相対位置関係は互いに異なっている。

ツインフィリンは ADF-H 蛋白質ファミリーに属する蛋白質で、ADF-H ドメインがスパーサー配列を介して 2 つ繋がった構造をしており、それぞれ N 端ドメインと C 端ドメインと呼ばれる。先行研究⁵⁸において、ツインフィリンの C 端ドメイン(ツインフィリン C)と G アクチンの複合体(アクチン-ツインフィリン C 複合体)の結晶構造が解かれた。これはこれまでに報告された中で唯一の ADF-H ドメインと G アクチンの複合体結晶構造である。この複合体では、コフィラクチンにおけるコフィリンとアクチンの位置関係と似たような形で、ツインフィリン C がアクチンの B 端側(SD1 と SD3 側)に結合している(図 8h)。そのアクチンの構造自体はこれまで特に注目されて来なかったが、本研究で改めて構造を精査したところ、アクチン-ツインフィリン C 複合体中のアクチンの ID 剛体領域および SD1 剛体領域の相対位置関係が C 型アクチンと非常に良く一致することが明らかになった(図 8a, f-h)。このことから、ツインフィリン C がアクチンの B 端側へ結合することで、アクチンが C 型アクチンへと構造変化すると言える。ツインフィリン C は ADF-H ドメイン蛋白質であり、ADF/コフィリンと構造が類似している。ツインフィリン C がアクチンを C 型アクチンへと構造変化させる性質が ADF/コフィリンにも保存されていると仮定すれば、アクチンの B 端側に ADF/コフィリンが結合することでも、アクチンが C 型アクチンへと構造変化することが示唆される。この知見はコフィリンの作用機構を考える上での鍵となる(第 5 節)。

4.6. コフィラクチンにおける分子間相互作用

4.6.1. アクチン-アクチン間相互作用

本節では、コフィラクチンにおけるアクチン-アクチン間相互作用に関して説明する。

まず前提として、F 型アクチン線維におけるアクチン-アクチン間相互作用に関して説明する。アクチン線維は 2 つのストランドが捻りあった 2 重らせん線維のため、アクチン-アクチン間相互作用はまずストランド内相互作用とストランド間相互作用に大別される。F 型アクチン線維ではストランド間相互作用よりもストランド内相互作用の方が強固である²³。ストランド内相互作用のサイトは主に 2 箇所あり(図 9a-c)、1 つは ID-ID 間相互作用、もう 1 つは B 端側アクチン分子の OD と P 端側アクチン分子の ID の間の相互作用(OD-ID 間相互作用)である。他に微弱ながら OD-OD 間の相互作用も存在する。

ストランド内相互作用のうち、ID-ID 間相互作用は、F 型アクチン線維とコフィラクチンの間でほぼ変化が見られない(図 9a, b の青色部)。一方 OD-ID 間相互作用は、F 型ア

クチンから C 型アクチンへの構造変化に伴ってほぼ消失し(図 9a, b の赤色部)、OD の Arg62 のみが相互作用に寄与するのみとなる(図 9c の黄色の残基)。またストランド間相互作用も、コフィラクチンでは F 型アクチン線維と比べて減少する(図 9d, e)。総じて、コフィラクチンにおいてはアクチン-アクチン間相互作用が減少すると言える。

4.6.2. アクチン-コフィリン間相互作用

コフィラクチンにおけるアクチン-コフィリン間相互作用部位は、大きくわけて F サイトと G サイトの 2 つに大別される⁵⁹。コフィリン 1 分子とアクチン 2 分子が結合する状況を考える時(図 10a-c、図 11b)、F サイトはコフィリンと B 端側アクチンの主に SD1 との相互作用部位であり、G サイトはコフィリンと P 端側アクチンの主に SD1 および SD3 との相互作用部位である。本研究により、F サイトと G サイトについて詳細が明らかになった(表 4)。

アクチン上の F サイトは、SD1 剛体領域の表面残基の一部と、SD2 と SD3 の残基番号 57, 336 である(図 10a-f および図 11 の青色部位)。残基番号 57 と 336 は SD1 に属していないため SD1 剛体領域には含めていないが(第 3.7 節参照)、SD1 剛体領域算出時の標準偏差がそれぞれ 0.72Å と 0.62Å であることから、アクチンの構造変化において SD1 剛体領域と共に運動する残基である。そのため 57 と 336 は実質的には SD1 剛体領域に属するものとみなしてよく、従ってアクチン上の F サイトは SD1 剛体領域の表面上に位置すると考えて良い。アクチンの剛体領域はどのアクチン構造(C 型、G 型、F 型)でもその構造をほぼ変えないから、コフィリンは F サイトを介して、どのアクチン構造に対しても(F サイト以外の領域との衝突が生じない限りは)結合可能であると示唆される。実際に架橋剤による分子間架橋実験により、コフィリンが F サイトを介して、G アクチンに対し微弱ながら結合することが示されている⁵⁹。コフィリンが F サイトを介して F 型アクチン線維に結合する原子モデルを仮想的に作成してみると(第 3.9 節、図 10g、図 11c)、コフィリンとアクチンの間にいかなる原子間衝突も存在しない。このことから、コフィリンは F 型アクチン線維に対し、F サイトを介して、アクチン側のいかなる構造変化も必要とすることなく結合可能であると言える。先行研究⁶⁰により、ヒトのコフィリン(cofilin-1)の K96Q 変異体はアクチン線維への結合能が低下することが示されている。K96 は本研究で用いたニワトリのコフィリンでも保存されており、かつ F サイトに属する残基である。コフィラクチンのコフィリン K96 の近傍の構造を見ると(図 12)F サイトの残基側鎖同士が密にパッキングされていることがわかる。このことから、ヒトのコフィリンの K96Q は F サイトの密な側鎖間相互作用が擾乱されたことによりアクチン線維への結合能が低下したと説明できる。

次に、コフィリンと P 端側アクチンとの相互作用部位である G サイトは、大きくわけて 2 つの領域に分けられる。それぞれ Gi サイトおよび Go サイトと呼ぶことにする。Gi サイトはアクチンの主に ID 剛体領域との相互作用部位であり(図 10a-f、図 11b の黄色と茶色の部位)、Go サイトは主に SD1 剛体領域との相互作用部位である(図 10a-f、図 11b の赤色部位)。即ち G サイトは、アクチン上で SD1 剛体領域上のみ存在する F サイトとは違い、ID 剛体領域と SD1 剛体領域の両方にまたがって存在する。2 つの剛体領域の相対位置関係はアクチンの構造に応じて異なるから(第 4.5.2 節)、コフィリンが G サイトを介してアクチンと結合するためにはアクチンが C 型へ構造変化する必要がある。

Gi サイトはさらに 2 つに細分することができ、それぞれ Gi₁ サイト(図 10a-f、図 11b の茶色部位)と Gi_s サイト(図 10a-f、図 11b の黄色部位)と呼ぶことにする。Gi₁ サイトは 4 組の側鎖同士(表 4)による塩橋および水素結合で、長い側鎖による長距離の相互作用であり、各組の C α 原子は 10Å 以上離れている。Gi₁ サイトに属する残基に変異を導入するとコフィリンの活性が変化することが知られており¹³、残基数が少ないながらもアクチンとコフィリンの相互作用において重要なサイトである。

アクチンの Gi_s サイトおよび Go サイトの残基は、コフィリンの α ヘリックス(残基番号 111-119)を取り囲むように密にパッキングされており(図 10f)、コフィリンの残基番号 104-115 からなるペプチドとコフィリンとがアクチンへの結合において競合するという実験結果⁶¹と符合する。また *Dictyostelium* のアクチンの G146V 変異体にはコフィリンが結合しないことが知られている⁶²。G146 は本研究で用いた脊椎動物のアクチンでも保存されており、コフィリンの 111-119 周辺の密なパッキング(図 10f)の中心近くにあるため、G146V 変異によりパッキングが不可能となり結合能が失われると考えられる。

コフィリンが Gi サイトを介して F 型アクチン線維に結合する原子モデルを仮想的に作成してみると(図 10h)、多数の分子間衝突が発生する。Go サイトを介して結合する場合は(図 10i)さらに衝突が多くなる。このことからコフィリンは、アクチンが構造変化を起こさない限り、Gi サイトまたは Go サイトを介して F 型アクチン線維に結合できないことが示唆される。

5. 考察

5.1. アクチンの構造制御

本研究のコフィラクチン構造決定により、コフィラクチン中のアクチンはアクチン-ツインフィリン C 複合体中のアクチンと非常によく似た構造(C 型)を取ることが明らかとなった。また、C 型アクチンへの構造変化は、G 型から F 型への構造変化におけるドメイン間回転軸(G/F 軸)とは全く異なる新奇な回転軸(G/C 軸)周りでのドメイン間回転によるものであることがわかった。さらに、複数のアクチン構造の比較により、アクチンは ID 剛体領域と SD1 剛体領域の 2 つの剛体領域間の相対的な位置関係変化により構造を変化させることが示された。アクチン結合蛋白質は、この 2 つの剛体領域の相対位置関係を変化させることによりアクチンの構造を変え、アクチンの重合特性などを制御することが可能である。これらの知見はコフィリンの作用機構を理解するためだけでなく、アクチンの構造多形と構造動態の理解における重要な進歩である。

コフィリンが G サイトを介してアクチンに結合するとき、コフィリンはアクチンの 2 つの剛体領域と同時に相互作用し(図 11b)、その相対位置関係を C 型へと固定する。従ってコフィリンが線維中の F 型アクチンに結合する時、その G サイトのみに結合するだけで、アクチンを F 型から C 型へ構造変化させられると示唆される。アクチン-ツインフィリン C 複合体⁵⁸において、ツインフィリン C が G サイトに結合するだけでアクチンが C 型となっていることが(図 8f-h)、この仮説を支持する。

アクチン結合蛋白質のプロフィリンもまた、アクチンの 2 つの剛体領域に同時に結合して構造変化を誘起することが知られている^{56,57}。コフィリン、ツインフィリン C、プロフィリンは、2 つの剛体領域の相対位置関係を固定することによりアクチンの構造を制御する蛋白質の具体例と言える。

5.2. コフィリンはどのようにしてアクチン線維に結合するか

コフィリンの結合はアクチン線維に大きな構造変化を引き起こす。この構造変化においては、アクチン線維内のアクチン-アクチン分子間相互作用の変化、消滅を伴うため、ポテンシャルエネルギー障壁は高いと予想され、すべての構造変化が 1 つのステップで起こるとは考えにくい。そこで本論文では、既存の研究から得られた知見と本研究で新たに得られた知見をもとに、3 つのステップに分けたコフィリンのアクチン線維への結合モデルを提唱する。コフィリンの結合が複数ステップに分かれることは、速度論的研究の結果⁶³からも支持される。

ステップ1はFサイトを介した結合である(図 11c)。これは、Fサイトを介した結合が分子間衝突を伴わず(図 10g)、いかなる構造変化も必要としないので最もエネルギー障壁が低いためである。ただしFサイトを介した結合は弱い⁵⁹ため、この段階では結合状態(図 11c)と乖離状態(図 11d)の間の平衡状態にある。この結合はステップ2以降の結合のためにコフィリンをアクチンへつなげておく役割だけではなく、アクチン線維の周りのコフィリンの局所濃度を高めて結合の確率を上げる役割も果たす。

ここで結合のステップ2の前提として、アクチンのドメイン間揺らぎについて議論する。アクチン線維は熱や外力により局所的に屈曲したりねじれたりする柔らかい線維である⁶⁴ため、アクチン線維の中ではアクチンの構造が変化したり、分子間相互作用が切れたり繋がったりしていると考えられる⁶⁵。生化学的、分光学的な実験により、OD-ID間相互作用部位に属するDループの状態が一定ではないことが示されている⁶⁶ため、特にOD-ID間相互作用が切れたり繋がったりしやすいと考えられる。アクチン線維中のアクチンは基本的にF型だが、OD-ID間相互作用が切れている場合はODを固定する力が弱いため、F型よりも安定なG型様の構造(IDは変化せず、ODが反対側のストランドに向かって傾いた状態)となっているだろう。以上をまとめると、アクチン線維中のアクチンはIDに対してODが反対側のストランドに向かって傾いたりもとに戻ったりするドメイン間揺らぎを起こしていると考えられる(図 11d, g)。コフィリンがFサイトを介してアクチンに結合しているならば、コフィリンもODとともに揺らぐ(図 11c)。

結合のステップ2では、Fサイトを介して結合したコフィリンがアクチンのODの揺らぎに乗ってP端側アクチンのGサイトに接近する。このとき、長い側鎖による相互作用からなるGi₁サイトを介して、コフィリンがP端側アクチンに結合する(図 11e)。このとき、コフィリンはP端側アクチンのGi_sサイトおよびGoサイトに近い位置にあるため、アクチンの構造変化を誘起して完全なGサイト結合をしやすい状態にある。

ステップ3では、コフィリンが実際にGi_sサイトおよびGoサイト結合を介してP端側アクチンの構造をC型アクチンに変化させ、完全なGサイト結合を果たす(図 11f)。この結合に伴って、コフィリンが結合した2つのアクチン分子の間の線維軸周りの回転角度($\Delta\phi$)は、F型アクチン線維の $\Delta\phi=27^\circ$ からコフィラクチンの $\Delta\phi=35.8^\circ$ へと変化し、アクチンを2重らせんとみなしたときの捩れがよりきつくなる。

上記のステップ1からステップ3とは別の経路の結合も有り得る(図 11g, h)。コフィリンが結合していない状態で、ドメイン間揺らぎによってアクチンのOD-ID間相互作用が切れてODが傾いた時(図 11g)、コフィリンがFサイトを介さず、Gi₁サイトを介してP端側アクチンに直接結合し(図 11h)、ステップ2の結合状態(図 11e)またはステップ3の結合状態(図 11f)へ遷移する経路である。この経路ではFサイトは直接的な役割

を果たさないが、前述したようにアクチンの周りでのコフィリンの局所濃度を上げる役割は果たしている。

このモデルは、コフィリンのアクチン線維に対する強い結合(すべての結合サイトを介して結合した状態(図 11f)を指す)の初速度が、拡散律速過程の速度よりも遥かに遅い^{63,67}ことを説明できる。ステップ 1 でアクチン線維に対し初期的な結合をしたコフィリン(図 11c)が P 端側アクチンの G サイトと結合するためには、B 端側アクチンの OD ドメインゆらぎ乗って P 端側アクチンに接近するのを待たねばならないため、拡散律速過程より遅いのである。

5.3. コフィリンはなぜ ADP 結合型アクチン線維に好んで結合するのか

前節で提案したモデルは、コフィリンが ADP 結合型アクチンに対しより親和性が高いことを説明可能である。アクチン線維は ATP または ADP-Pi 結合型よりも ADP 結合型の方が臨界濃度が高く⁶⁸、屈曲およびねじれ揺らぎが大きい^{69,70}。従って ADP 結合型アクチンの方がアクチンの構造変化と分子間相互作用の切断が起こりやすいと考えられる。アクチン単量体の分子動力学シミュレーションによる研究⁷¹でも、G 型および F 型アクチンのドメイン間揺らぎは ATP 結合型よりも ADP 結合型でより起こりやすいことが示唆されている。本論文の結合モデルはアクチンのドメイン間揺らぎ、OD-ID 間相互作用の切断、アクチンの構造変化を必要とするから、それらが起こりやすい ADP 結合状態の方がよりコフィリンが結合しやすいのである。

5.4. コフィリンはどのようにしてアクチン線維に対し協同的に結合するのか

コフィリンはアクチン線維に対して協同的に結合し、コフィリンクラスターを形成する^{18,19}。本節では、まずアクチン線維を構成する 2 本のストランドの内の片方のストランドのみ考慮して、1 本のストランドにおける協同的結合の仕組みを考察する。2 本のストランドを考慮した場合の協同的結合(コフィリンクラスター形成、成長)については、第 5.5 節でアクチン線維の切断の仕組みとともに考察する。

まず、1 本のストランド内の隣接 4 分子のアクチン (図 13a、B 端側から順に Ac0~Ac3) を用いて、P 端方向への協同的結合について考察する。まず Ac1 と Ac2 の間にコフィリン(Cof1)が結合すると Ac1 と Ac2 は F 型から C 型へと変化する(図 13b)。この時 P 端側で新たなコフィリン(Cof2)が結合する可能性のある場所は、Ac2 の F サイト、Ac3 の Gi サイト、Go サイトの 3 つある。Cof2 が Ac3 の Gi サイトに結合する場合(図 14a)、Ac2 が既に C 型であるため、Cof2 と Ac2 の間で衝突する原子の数は *de novo* な結合(図 10h)と比較して 70%少なく済む。主な衝突は Cof2 の N 端と Ac3 の間で起きるが、コフィリンの N 端はフレキシブルであるため、構造変化により衝突が緩和されると期待さ

れる。その他の衝突はコフィリンとアクチンの側鎖原子間の衝突であり、側鎖の僅かな位置変化により衝突は解消可能と考えられる。一方で他の 2 つのサイト(Ac2 の F サイト、Ac3 の Go サイト)で結合する場合は多数の原子間衝突が発生するため(図 14b, c)、Cof2 が好んで結合することは無さそうである。以上のことから、Cof2 はまず Ac3 の Gi サイトに結合する。

この段階(図 13c)では Ac2 と Ac3 の位置関係(線維軸周りの回転角度 $\Delta \phi$)はコフィラクチン様ではないため、Cof2 がさらに F サイトを介して Ac2 に結合すると、Ac3 との間で多数の衝突が発生する(図 14b)。しかし Ac2 が C 型であることにより Ac2 と Ac3 の間の OD-ID 間相互作用は切断されているため(図 13b)、Ac2 と Ac3 の間の位置関係は変化しやすい状態にあり、そのため揺らぎの中で F サイトを介した結合が可能になる。F サイトを介して結合すると、Ac2 と Ac3 の位置関係がコフィラクチン様で固定される。さらにこのとき、Cof2 は Ac3 の Go サイトに近い位置となるため、G サイト全体で結合して Ac3 の構造を C 型へ変化させる確率も高い。*de novo* な結合(図 11c-f)と異なり、Cof2 は Ac2 の OD の揺らぎによる偶発的な G サイトへの結合を待たなくて良いため、Ac3 の G サイトへの結合および C 型への構造変化誘起は *de novo* な結合よりも速い。従って既存の結合コフィリンがあるとき、次なるコフィリンは *de novo* に結合するよりも、すでに結合したコフィリンの P 端側に対してより結合しやすく、そのため P 端側に向けての協同的結合が起こる。

次に、Cof2 が既存のコフィリン(Cof1)の B 端側、即ち Ac0 と Ac1 の間に結合する状況を考える。Cof2 が Ac1 の G サイトに結合する場合、*de novo* な結合と同様に多数の衝突が発生する(図 10h, i)。一方 Ac0 の F サイトに結合する場合は衝突は発生しない。従って Cof2 はまず Ac0 の F サイトに結合する。このとき Cof2 が Ac1 の G サイトに結合するためには、*de novo* な結合と同様 Ac0 の OD の揺らぎに乗って Ac1 の G サイトに接近する機会を待つ必要がある(図 11c)。ここで Ac1 は Cof1 の結合により既に C 型となっているため、ひとたび Cof2 が Ac1 の G サイトに接近すれば、Ac1 の C 型への構造変化を誘起する必要なく簡単に G サイトへ結合可能である。従って P 端側への協同的結合と同様、B 端側への協同的結合も *de novo* な結合より速い。P 端側と B 端側の協同的結合のどちらが速いかはこのモデルからは議論できず、実験により直接確かめねばならない。

5.5. コフィリンクラスターの形成とアクチン線維切断の機構

第 5.4 節では、コフィリンがアクチン線維に協同的に結合する機構を片方のストランドに関して考察した。本節ではそれを拡張して、両方のストランドを考慮した協同的結合、即ちコフィリンクラスター形成の機構について考察する。コフィリンクラスターの形成

とコフィリンによるアクチン線維の切断は密接に関連しており、切断はコフィリンクラスタの P 端側で起こることが光学顕微鏡を用いた先行研究^{19,21}により示されている。そこで本節ではクラスター形成の機構と共に、コフィリンによるアクチン線維切断の機構についても考察する。

本節では 2 つの仮定を設ける。(仮定 1) もし、あるアクチン分子間相互作用が、アクチン分子の相対位置変化、構造変化などで F 型アクチン線維のものと異なるなら、その相互作用は F 型アクチン線維における相互作用よりも弱い。(仮定 2) アクチン線維の切断は、両方のストランドにおいてストランド内相互作用が弱まった地点において起こる。

まず F 型アクチン線維の 2 本のストランドの内、一方のストランドにコフィリンが 1 分子結合した状況を考える(第 3.10 節、図 15b)。コフィリンが結合した 2 つのアクチン分子は C 型となり、分子の相対位置関係もコフィラクチン様となっている。この状態の原子モデルを仮想的に作成してみると(図 14e)、2 本のストランド間の衝突はほとんど存在せず、どちらかの(あるいは両方の)ストランドの局所的かつ僅かな構造変化だけで衝突は解消される。このことから、一方のストランドにコフィリンが 1 分子結合した状態でも、もう一方のストランドは F 型アクチン線維のストランドと同じ構造のままである(図 15b)。

コフィリンが結合したアクチン分子は C 型となっているため、その P 端側のアクチン分子との OD-ID 間相互作用は消失し、ID-ID 間相互作用のみを介した部分的な結合となる(図 13b、図 15b)。一方 B 端側の境界では、上側のアクチン分子が C 型となっても、その相互作用面がほぼ ID のみに集中しているために構造変化の影響が無く、OD-ID 間相互作用、ID-ID 間相互作用共に健在である(図 13b、図 15b)。

この段階では、コフィリンが結合したストランドにおいてストランド内相互作用が弱体化しているものの、もう一方のストランドが F 型アクチン線維のままでストランド内相互作用は弱体化していないため、仮定 2 より線維の切断は起きない。

1 つ目のコフィリンの隣にもう 1 分子のコフィリンが結合すると、1 本のストランドの中で C 型アクチンがコフィラクチン様のらせんパラメータで 3 つ連なった状態となる(図 15c)。それ以外の領域が F 型アクチン線維状態のままだとすると、コフィリンが結合した 3 分子のアクチンと、その反対側のストランドとの間で衝突が発生する。コフィリンの結合によるアクチン分子の位置変化、分子間衝突を補償するため、コフィリンが結合したアクチン分子に隣接するアクチン分子にはひずみが溜まっている(図 15c の灰色のアクチン分子)。さらに追加でコフィリンが結合するにつれ、そのひずみはより大きくなる。そのため、片方のストランドのみに対してコフィリンが多数結合し続けることはできない。

上記の状態(図 15c)では、ストランド間の相互作用は F 型アクチン線維における相互作用と異なるため、仮定 1 よりストランド間相互作用は弱まっている。そのため、コフィリンが結合していないストランドの構造は F 型アクチン線維と比較して自由に動きやすく、らせんパラメータのゆらぎが大きくなる。ゆらぎによって偶然コフィラクチン様のらせんパラメータをとったとすると(図 15d)、両方のストランドがコフィラクチン様のらせんパラメータで一致するため、コフィリンが結合したストランドに溜まっていたひずみが解消される。この状態では(図 15d)、コフィラクチン様の領域と F 型アクチン線維領域の P 端側境界において両方のストランドでストランド内相互作用が弱まるため(図 15d の赤矢印)、仮定 2 よりこの状態で線維の切断が起こりうる。実際、数分子のコフィリン結合により線維の切断が起こることが報告されている¹⁶。

図 15d の状態では、コフィリンが結合していないストランドはストランド内相互作用が弱体化しており、らせんパラメータもコフィラクチン様となっているため、コフィリンが優先的に結合しやすい。このようにしてコフィリンクラスターが形成される(図 15e)。コフィリンクラスターの P 端側では両方のストランドでストランド内相互作用が弱体化しているため、仮定 2 よりこの状態で線維の切断が起こりうる(図 15h)。また、切断が起こる前に次なるコフィリンが結合すれば、コフィリンクラスターが線維 P 端方向に向かって成長する(図 15f)。

以上のモデルにより、コフィリンによるアクチン線維の切断が主にコフィリンクラスターの P 端側で起きる^{19,21}理由を説明できた。また、コフィリン 1 分子だけでは効率的にアクチン線維を切断できない^{16,21}理由を説明できた。

5.6. コフィリンが線維端アクチン分子の脱重合速度を制御する機構

光学顕微鏡を用いた先行研究¹⁹により、塩基性条件下(pH 7.8)において、ADF/コフィリンがアクチン線維の B 端アクチン分子に結合して脱重合を加速することが示されている。また、F 型アクチン線維では B 端の脱重合速度の方が P 端の脱重合より速いが、すべてのアクチン分子にコフィリンが結合したアクチン線維(即ちコフィラクチン)の場合は、P 端での脱重合が加速される結果両端での脱重合速度が同程度となる。以下では、本研究のコフィリン結合モデルを用いて、この結果の説明を試みる。

F 型アクチン線維の B 端アクチン分子の脱重合加速は簡単に説明できる。まずコフィリンが B 端のアクチンの G サイトに結合し、アクチンの構造が C 型へ変化する(図 16b)。するとその C 型アクチンと隣接するアクチン分子の間の分子間相互作用が弱まり、結果として脱重合が加速される(図 16b)。

次にコフィラクチン線維の両端で脱重合の速度が等しくなることについて説明する。F型アクチン線維の場合、P 端のアクチン分子は相互作用の相手がおらず構造、配置が不安定となり、反対側のストランドのアクチン分子に向かって傾いて P 端特有の相互作用を作る⁵⁵(図 16a)。P 端のアクチン分子が脱重合するためにはこの相互作用を切る必要があり、そのため P 端のアクチン分子の脱重合は遅くなる⁵⁵。一方コフィラクチンでは、P 端のアクチン分子の構造、配置はコフィラクチンのそれで固定されると期待できるため、その場合 P 端特有の相互作用は存在しない。すると P 端と B 端でアクチン分子が脱重合するために切らなければならない相互作用（アクチンと ADF/コフィリンの相互作用、ストランド間相互作用、ストランド内相互作用それぞれ 1 つずつ）は等しくなるから、結果として両端での脱重合速度が等しくなる。

6. 謝辞

学部 3 年次の夏休みにコフィリンの発現、精製系構築のアルバイトとして前田研究室の門を叩いて以来、コフィリンが結合したアクチン線維の構造決定に向けた研究に取り組んで参りました。その間多数の方々に辛抱強くご指導、ご助力頂いたおかげで、近原子分解能での構造決定に成功しその成果を発表するに至りました。深く感謝申し上げます。

成田哲博准教授には、電子顕微鏡と画像処理の技術指導に始まり、データの収集、結果の分析、考察、論文執筆に渡る研究の全般に関して、私のペースに合わせて辛抱強くご指導、ご助力頂きました。前田雄一郎博士には、アクチンを中心とした構造生物学と生物物理学に対する深い知識と洞察に基づくご指導と議論を重ねて頂きました。研究という活動自体について幾度もご助言、ご助力頂き、研究生活をエンカレッジし続けて下さいました。武田修一博士には結晶学クオリティの非常に良質なアクチンを提供頂き、未発表の F 型アクチン結晶構造を共有して頂きました。また蛋白質精製や構造の解釈などに関しご助言頂きました。大阪大学超高压電子顕微鏡センターの光岡薫教授には、長きに渡りクライオ電子顕微鏡を使わせて頂き、試料の作成やデータ収集において多大なご助力を頂きました。東海学院大学健康福祉学部の小田俊郎教授は前田研究室の大先輩であり、アクチン分子の構造変化の分析でご助力頂き、またコフィリンの作用機構に関し議論を重ねて頂きました。崎山智恵子博士にはコフィリンの発現、精製において多大なご助力を頂き、蛋白質の発現精製や生化学実験全般について技術指導をして頂きました。松本友治博士には DNA 関連実験の技術や各種実験装置の使い方等の様々な事に関し、不精な私に対して辛抱強くご指導、ご助力頂きました。千葉大学の阿部洋志准教授にはコフィリンのアイソフォーム選定に関しご助言を頂き、ニワトリ由来コフィリンの発現系をご提供頂きました。名古屋大学情報科学研究科の太田元規教授と小池亮太郎助教には分子動力学計算に関する未発表のデータを共有して頂き、本研究に関して議論を重ねて頂きました。高見潤子様、菊本真人博士、前田佳代博士、尾西裕文博士を始めとして、分子第 3 講座の皆様には長きに渡り大変お世話になりました。以上の方々を含め、色々な方に支えて頂いた研究生活でした。深く感謝申し上げます。

また、本研究は JST さきがけ(10404)、日本学術振興会科学研究費助成事業(JP26251017, JP16H06280)、日本学術振興会特別研究員制度(13J02335)、武田科学振興財団、文部科学省先端バイオイメージングプラットフォームおよびナノテクノロジープラットフォーム(12024046)のご支援の元で行われました。感謝申し上げます。

最後に、紆余曲折あり大変長くに渡った私の学生生活を、最後まで支えて下さった両親に感謝します。本当にありがとうございました。

7. 引用文献

1. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol. Rev.* **94**, 235–263 (2014).
2. Kanellos, G. & Frame, M. C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 3211–3218 (2016).
3. Bamburg, J. R., Harris, H. E. & Weeds, A. G. Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett.* **121**, 178–182 (1980).
4. Nishida, E., Maekawa, S. & Sakai, H. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* **23**, 5307–5313 (1984).
5. Hild, G., Kalmár, L., Kardos, R., Nyitrai, M. & Bugyi, B. The other side of the coin: Functional and structural versatility of ADF/cofilins. *Eur. J. Cell Biol.* **93**, 238–251 (2014).
6. Ono, S. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int. Rev. Cytol.* **258**, 1–82 (2007).
7. Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M. F. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**, 613–616 (1999).
8. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–465 (2003).
9. Fass, J., Gehler, S., Sarmiere, P., Letourneau, P. & Bamburg, J. R. Regulating filopodial dynamics through actin-depolymerizing factor/cofilin. *Anat. Sci. Int.* **79**, 173–183 (2004).
10. Dumpich, M., Mannherz, H. G. & Theiss, C. VEGF Signaling Regulates Cofilin and the Arp2/3-complex within the Axonal Growth Cone. *Curr. Neurovasc. Res.* **12**, 293–307 (2015).
11. Nakano, K. & Mabuchi, I. Actin-depolymerizing protein Adf1 is required for formation and maintenance of the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1933–1945 (2006).

12. Tojkander, S., Gateva, G. & Lappalainen, P. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* **125**, 1855–1864 (2012).
13. Kremneva, E. *et al.* Cofilin-2 controls actin filament length in muscle sarcomeres. *Dev. Cell* **31**, 215–226 (2014).
14. Carrier, M. F. *et al.* Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* **136**, 1307–1322 (1997).
15. Maciver, S. K. Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* **115**, 1611–1620 (1991).
16. De La Cruz, E. M. Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* **346**, 557–564 (2005).
17. Hayden, S. M., Miller, P. S., Brauweiler, A. & Bamburg, J. R. Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin. *Biochemistry* **32**, 9994–10004 (1993).
18. Ngo, K. X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T. & Uyeda, T. Q. P. Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *Elife* **4**, e04806 (2015).
19. Wioland, H. *et al.* ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends. *Curr. Biol.* **27**, 1956–1967.e7 (2017).
20. McGough, A. Cofilin Changes the Twist of F-Actin: Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function. *J. Cell Biol.* **138**, 771–781 (1997).
21. Gressin, L., Guillotin, A., Guérin, C., Blanchoin, L. & Michelot, A. Architecture Dependence of Actin Filament Network Disassembly. *Curr. Biol.* **25**, 1437–1447 (2015).
22. Shekhar, S. & Carrier, M.-F. Enhanced Depolymerization of Actin Filaments by ADF/Cofilin and Monomer Funneling by Capping Protein Cooperate to Accelerate Barbed-End Growth. *Curr. Biol.* **27**, 1990–1998.e5 (2017).
23. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y. & Narita, A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441–445 (2009).

24. Korn, E. D., Carlier, M. F. & Pantaloni, D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* **238**, 638–644 (1987).
25. Galkin, V. E. *et al.* Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20568–20572 (2011).
26. Narita, A. & Maéda, Y. Molecular determination by electron microscopy of the actin filament end structure. *J. Mol. Biol.* **365**, 480–501 (2007).
27. McMullan, G., Faruqi, A. R. & Henderson, R. Direct Electron Detectors. *Methods Enzymol.* **579**, 1–17 (2016).
28. McMullan, G., Faruqi, A. R., Clare, D. & Henderson, R. Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy* **147**, 156–163 (2014).
29. Glaeser, R. M. Specimen Behavior in the Electron Beam. *Methods Enzymol.* **579**, 19–50 (2016).
30. Li, X. *et al.* Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* **10**, 584–590 (2013).
31. Scheres, S. H. W. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* **180**, 519–530 (2012).
32. He, S. & Scheres, S. H. W. Helical reconstruction in RELION. *J. Struct. Biol.* **198**, 163–176 (2017).
33. Kusano, K., Abe, H., Obinata, T. & Obinata, T. Detection of a sequence involved in actin-binding and phosphoinositide-binding in the N-terminal side of cofilin. *Mol. Cell. Biochem.* **190**, 133–141 (1999).
34. Bernstein, B. W. & Bamburg, J. R. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* **20**, 187–195 (2010).
35. Spudich, J. A. & Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866–4871 (1971).

36. Nagaoka, R., Kusano, K., Abe, H. & Obinata, T. Effects of cofilin on actin filamentous structures in cultured muscle cells. Intracellular regulation of cofilin action. *J Cell Sci* **108**, 581–593 (1995).
37. Yonezawa, N., Nishida, E. & Sakai, H. pH control of actin polymerization by cofilin. *J. Biol. Chem.* **260**, 14410–14412 (1985).
38. Yeoh, S., Pope, B., Mannherz, H. G. & Weeds, A. Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J. Mol. Biol.* **315**, 911–925 (2002).
39. Danev, R. & Baumeister, W. Cryo-EM single particle analysis with the Volta phase plate. *Elife* **5**, e13046 (2016).
40. Zhang, K. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* **193**, 1–12 (2016).
41. Tang, G. *et al.* EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **157**, 38–46 (2007).
42. Hohn, M. *et al.* SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing. *J. Struct. Biol.* **157**, 47–55 (2007).
43. Otterbein, L. R., Graceffa, P. & Dominguez, R. The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State. *Science*. **293**, 708–711 (2001).
44. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802 (2005).
45. Singharoy, A. *et al.* Molecular dynamics-based refinement and validation for sub-5 Å cryo-electron microscopy maps. *Elife* **5**, e16105 (2016).
46. Trabuco, L. G., Villa, E., Mitra, K., Frank, J. & Schulten, K. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure* **16**, 673–683 (2008).
47. Chan, K.-Y. *et al.* Symmetry-Restrained Flexible Fitting for Symmetric EM Maps. *Structure* **19**, 1211–1218 (2011).
48. Bashford, D. & Case, D. A. Generalized Born Models of Macromolecular Solvation Effects. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **51**, 129–152 (2000).

49. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
50. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
51. Hayward, S. & Berendsen, H. J. C. Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: New results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **30**, 144–154 (1998).
52. McCullough, B. R. *et al.* Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophys. J.* **101**, 151–159 (2011).
53. Kang, H. *et al.* Site-specific cation release drives actin filament severing by vertebrate cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17821–17826 (2014).
54. Klejnot, M. *et al.* Analysis of the human cofilin 1 structure reveals conformational changes required for actin binding. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1780–1788 (2013).
55. Narita, A., Oda, T. & Maéda, Y. Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. *EMBO J.* **30**, 1230–1237 (2011).
56. Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S. H. & Dominguez, R. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* **26**, 4597–4606 (2007).
57. Xue, B., Leyrat, C., Grimes, J. M. & Robinson, R. C. Structural basis of thymosin- 4/profilin exchange leading to actin filament polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E4596–E4605 (2014).
58. Paavilainen, V. O., Oksanen, E., Goldman, A. & Lappalainen, P. Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J. Cell Biol.* **182**, 51–59 (2008).
59. Mannherz, H. G. *et al.* Mapping the ADF/Cofilin Binding Site on Monomeric Actin by Competitive Cross-linking and Peptide Array: Evidence for a Second Binding Site on Monomeric Actin. *J. Mol. Biol.* **366**, 745–755 (2007).

60. Pope, B. J., Gonsior, S. M., Yeoh, S., McGough, A. & Weeds, A. G. Uncoupling actin filament fragmentation by cofilin from increased subunit turnover. *J. Mol. Biol.* **298**, 649–661 (2000).
61. Yonezawa, N., Homma, Y., Yahara, I., Sakai, H. & Nishida, E. A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J. Biol. Chem.* **266**, 17218–17221 (1991).
62. Noguchi, T. Q. P., Toya, R., Ueno, H., Tokuraku, K. & Uyeda, T. Q. P. Screening of novel dominant negative mutant actins using glycine targeted scanning identifies G146V actin that cooperatively inhibits cofilin binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 1006–1011 (2010).
63. De La Cruz, E. M. & Sept, D. The Kinetics of Cooperative Cofilin Binding Reveals Two States of the Cofilin-Actin Filament. *Biophys. J.* **98**, 1893–1901 (2010).
64. De La Cruz, E. M., Roland, J., McCullough, B. R., Blanchoin, L. & Martiel, J.-L. Origin of Twist-Bend Coupling in Actin Filaments. *Biophys. J.* **99**, 1852–1860 (2010).
65. Oda, T. & Maéda, Y. Multiple Conformations of F-actin. *Structure* **18**, 761–767 (2010).
66. Durer, Z. A. O. *et al.* Structural States and Dynamics of the D-Loop in Actin. *Biophys. J.* **103**, 930–939 (2012).
67. Cao, W., Goodarzi, J. P. & De La Cruz, E. M. Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *J. Mol. Biol.* **361**, 257–267 (2006).
68. Carlier, M.-F. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv. Biophys.* **26**, 51–73 (1990).
69. Isambert, H. *et al.* Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 11437–11444 (1995).
70. Rebello, C. A. & Ludescher, R. D. Influence of Tightly Bound Mg²⁺ and Ca²⁺, Nucleotides, and Phalloidin on the Microsecond Torsional Flexibility of F-Actin †. *Biochemistry* **37**, 14529–14538 (1998).
71. Saunders, M. G. *et al.* Nucleotide regulation of the structure and dynamics of G-actin. *Biophys. J.* **106**, 1710–1720 (2014).

72. Rao, J. N., Madasu, Y. & Dominguez, R. Mechanism of actin filament pointed-end capping by tropomodulin. *Science* (80-.). **345**, 463–467 (2014).
73. von der Ecken, J., Heissler, S. M., Pathan-Chhatbar, S., Manstein, D. J. & Raunser, S. Cryo-EM structure of a human cytoplasmic actomyosin complex at near-atomic resolution. *Nature* **534**, 724–728 (2016).

8. 図表

表 1 電子顕微鏡撮影条件一覧

電子顕微鏡	Titan Krios (Thermo Fisher)
使用ソフトウェア	EPU (Thermo Fisher)
カメラ	Falcon II (Thermo Fisher)
加速電圧	300 kV
撮影倍率	x 75,000
ピクセルサイズ	1.1 Å/pixel
撮影フレームレート	17 frames/sec
照射ビーム直径	0.67 μm
対物絞り直径	100 μm
デフォーカス量(実測)	1.0 - 3.0 μm
電子線照射速度	45 e ⁻ /Å ² /sec
電子線照射時間	1 sec

表 2 アクチンの剛体領域決定に使用したアクチン原子モデル一覧

PDB ID	説明
1J6Z	Tetramethylrhodamine(TMR)で化学修飾した G アクチンの結晶構造 ⁴³
4PKH	トロポモジュリンのアクチン結合ドメインとゲルゾリンのドメイン 1 と G アクチンの共結晶構造 ⁷²
3DAW	ツインフィリンの C 端ドメインとアクチンの共結晶構造 ⁵⁸
5JLF	クライオ電子顕微鏡法で決定されたアクチン線維構造 ⁷³
-	F 型アクチンの結晶構造(未発表データ、Takeda et al.)
2PAV	プロフィリン、VASP ペプチドとアクチンの共結晶構造 ⁵⁶
4PL7	アクチンとチモシン $\beta 4$ のキメラ蛋白質の結晶構造 ⁵⁷
5YU8	本研究で得られたコフィラクチン構造

表 3 アクチンの剛体領域の残基番号

ドメイン	剛体領域の残基番号
Inner domain(ID)	138-145, 147-166, 171-194, 200, 205-230, 236-242, 246-322, 326-336
Subdomain 1(SD1)	7-35, 68-71, 76-108, 115-137, 337-347, 355-364, 369-371

表 4 アクチン-コフィリン間相互作用に関わる残基

領域	残基番号
F サイト(アクチン)	26-28, 57, 91-93, 95-97, 100, 336-337
F サイト(コフィリン)	18-23, 86, 93-99, 130, 132
Gi サイト(アクチン)	140, 143-149, 291-292, 296, 326, 334
Go サイト(アクチン)	341-342, 345-346, 348-351, 355
G(Go + Gi)サイト(コフィリン)	3-5, 45, 103, 105, 107, 111-112, 114-116, 118-119, 121, 136, 138, 142, 151-152
Gi_l サイト	Ac291-Cof151, Ac292-Cof152, Ac326-Cof142, Ac296-Cof136

Gi_l サイトはアクチン上の残基番号に Ac、コフィリン上の残基番号に Cof をつけ、相互作用しているペアで示した。

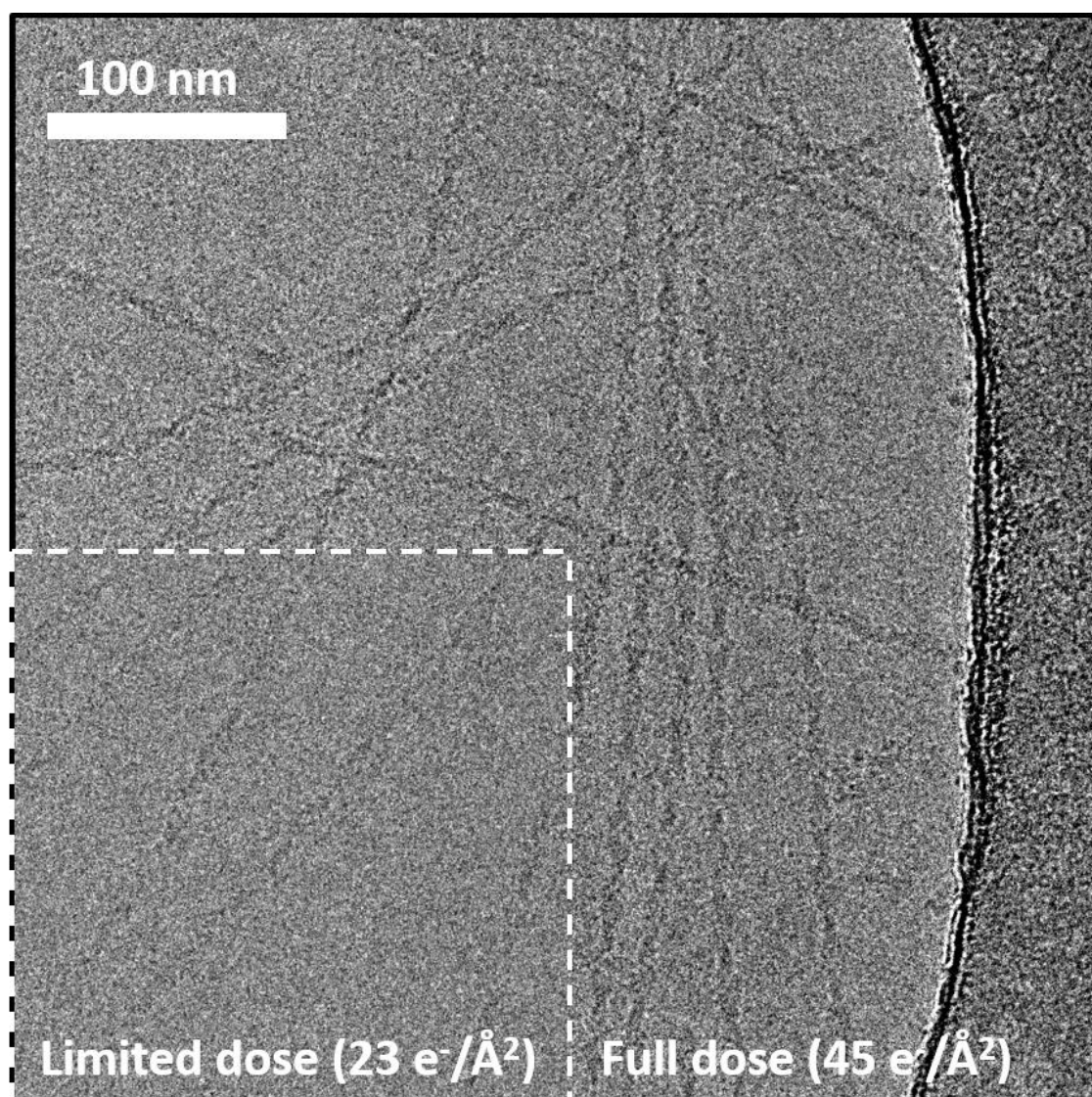


図 1 典型的なコフィラクチンのクライオ電子顕微鏡写真

クライオ電子顕微鏡法により撮影したコフィラクチンの透過電子顕微鏡像(4096×4096 画素、1.1Å/pixel)。右縁の暗い領域は電子顕微鏡グリッドのカーボン膜部分。その左側からの明るい領域がコフィラクチン溶液部分。溶液部分の中で暗い紐状に見えるものがコフィラクチン線維群。左下の白点線で囲った部分は実際に単粒子解析に使用したドリフト補正後の画像(累積電子線照射量 $23\text{e}^-/\text{\AA}^2$)で、それ以外の部分は1秒間電子線を照射し続けた全フレーム積算画像(累積電子線照射量 $45\text{e}^-/\text{\AA}^2$)。

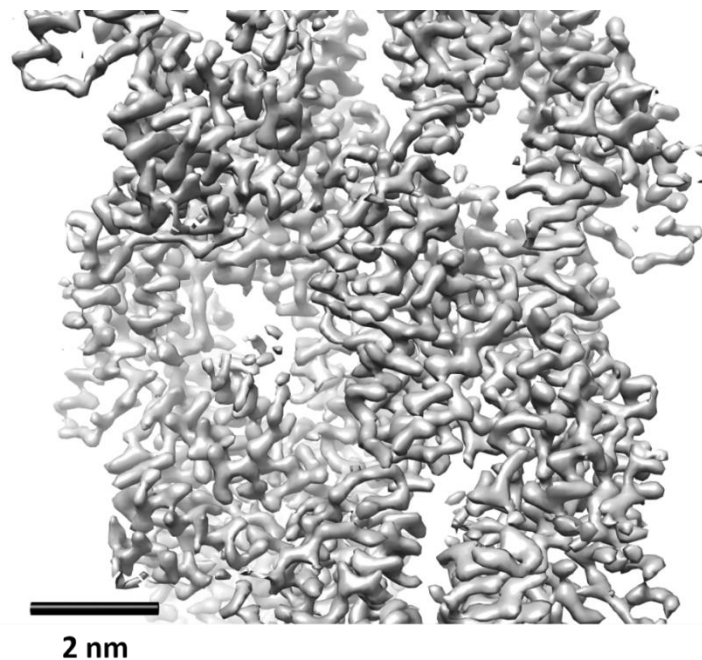


図 2 単粒子解析により再構成されたコフィラクチンの密度マップ

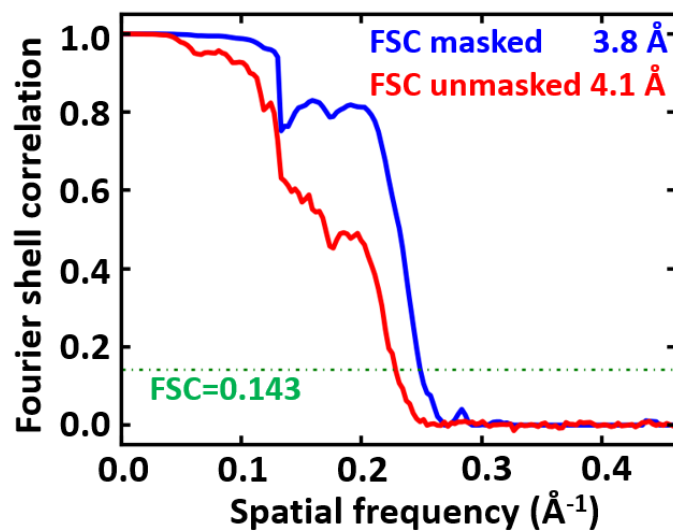


図 3 分解能の評価結果

赤は溶媒平滑化(solvent flattening)なし、青は溶媒平滑化有りで求めたフーリエシェル相関(FSC)プロット。溶媒平滑化有りの場合で分解能 3.8Å(FSC=0.143)となった。

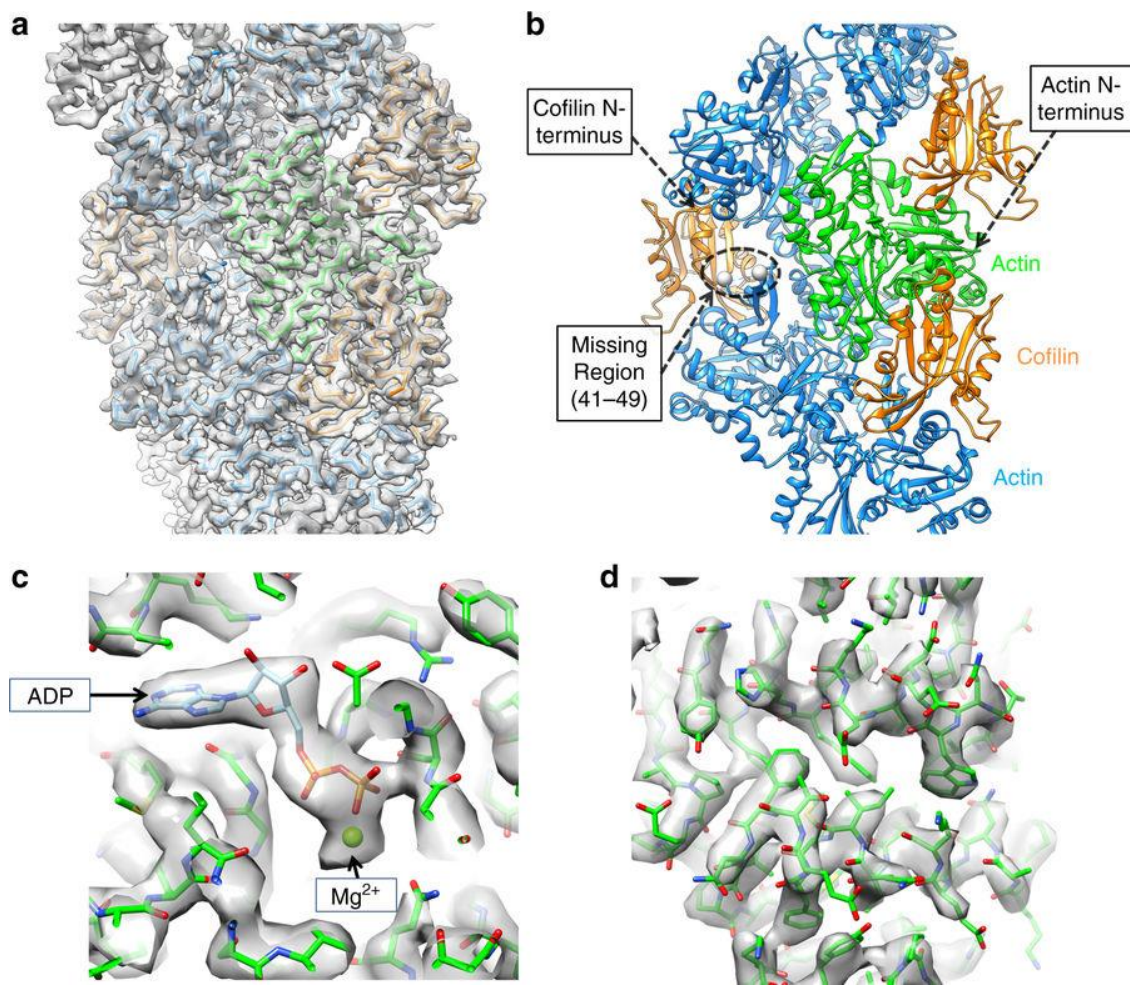


図 4 コフィラクチン原子モデル概観

(a) 3.8Å 分解能密度マップ（灰色）に、コフィラクチン原子モデルを $C\alpha$ 原子トレースで重ね合わせた図。アクチンを青と緑、コフィリンをオレンジで表示した。(b) コフィラクチン原子モデルをリボンモデルで表示した図。密度が不明瞭なため構造決定できなかったアクチン N 端、アクチン D ループ(41-49)、コフィリン N 端に相当する部分を矢印で示した。アクチン D ループの末端残基の $C\alpha$ 原子は白い球で示した。(c) アクチンのヌクレオチド結合部位周辺の密度マップと原子モデル。ADP および Mg^{2+} を矢印で示した。(d) アクチン分子の SD1 の側面領域の密度マップと原子モデル。

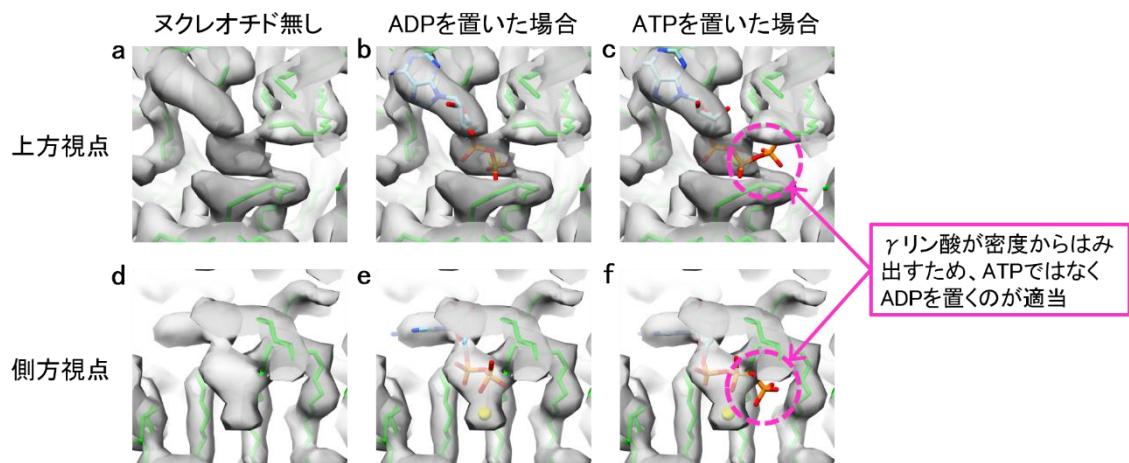


図 5 原子モデルにおいてアクチン結合ヌクレオチドを ADP とした根拠

密度マップの内のアクチン結合ヌクレオチド近傍を上方視点(a-c)および側方視点(d-f)から見た様子。アクチンはポリペプチド主鎖の C, N, O を緑色のスティックモデルで示した。(b, e)ADP を置いた場合は β リン酸までがよく密度内に収まる。(c, f)ATP を置くと γ リン酸が密度の極めて低い領域にはみ出すため、ATP を置くのは適当ではないことがわかる。

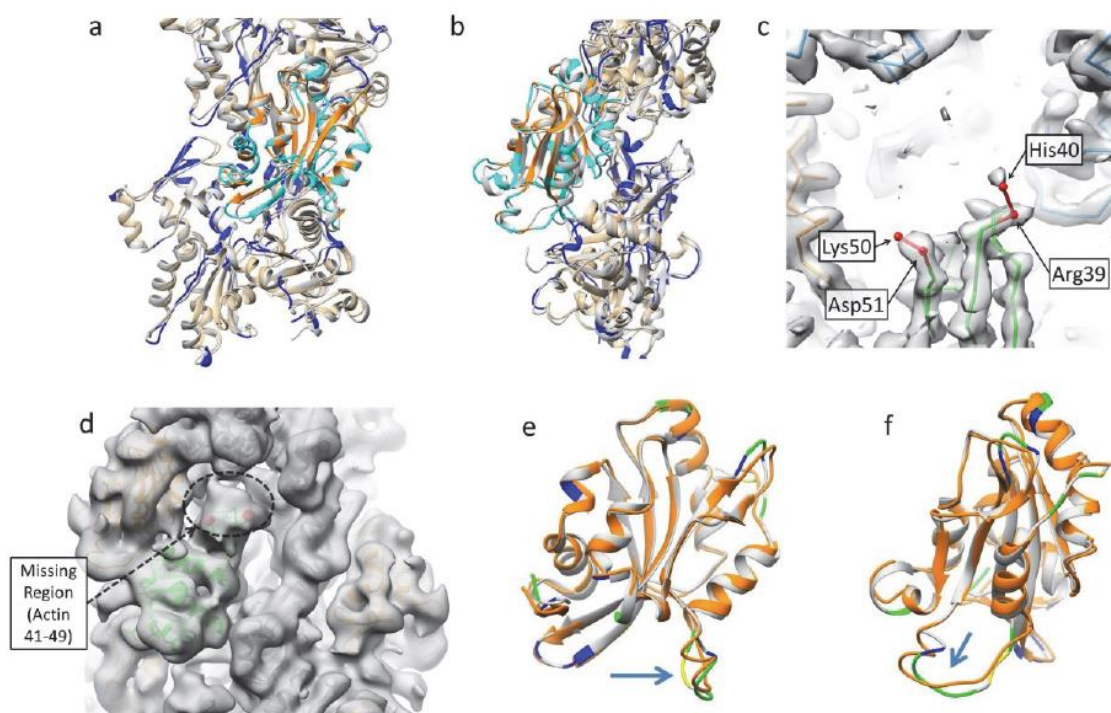


図 6 先行研究の原子モデルとの比較

(a) 本研究の 3.8Å 分解能に基づく原子モデルと先行研究²⁵の 9Å 分解能に基づく原子モデル(PDB 3J0S)をアラインメントした様子。本研究の原子モデルのアクチンをベージュ、コフィリンをオレンジ色で、先行研究の原子モデルのアクチンとコフィリンを灰色のリボンモデルで表示した。C α 原子間距離が 1.5Å を超える本研究の原子モデル中の残基は、青(アクチン)と水色(コフィリン)で塗った。(b) (a)を線維軸の周りに 90° 回転して表示した。(c) 本研究の密度マップのアクチン D ループ近傍の図。密度マップ(灰色)の表示等高面は 5 σ で、図 4c,d の表示等高面(6 σ)よりも低くしているにもかかわらず、D ループに相当する密度は確認できない(41-49 が欠損)。(d) 本研究の密度マップに対し、カットオフ波長 8Å のローパスフィルタを適用し、等高面 2 σ で表示した。この場合、D ループ領域(41-49)を包むようなブロブ状の密度が確認できる。D ループ領域を黒い点線で囲い、欠損領域末端の His40、Lys50 を赤い球体で表示した。(e) 本研究の原子モデルのコフィリン(オレンジ)と、ヒト由来コフィリン 1 の結晶構造(PDB 4BEX)をアラインメントした様子。2つの原子モデルの C α 原子間距離が 1.5Å、2Å、2.5Å を超える 4BEX 中の残基は、それぞれ青、緑、黄色で塗った。残基番号 19-30 の領域を青色の矢印で示した。(f) (e)を 90° 回転して表示した。

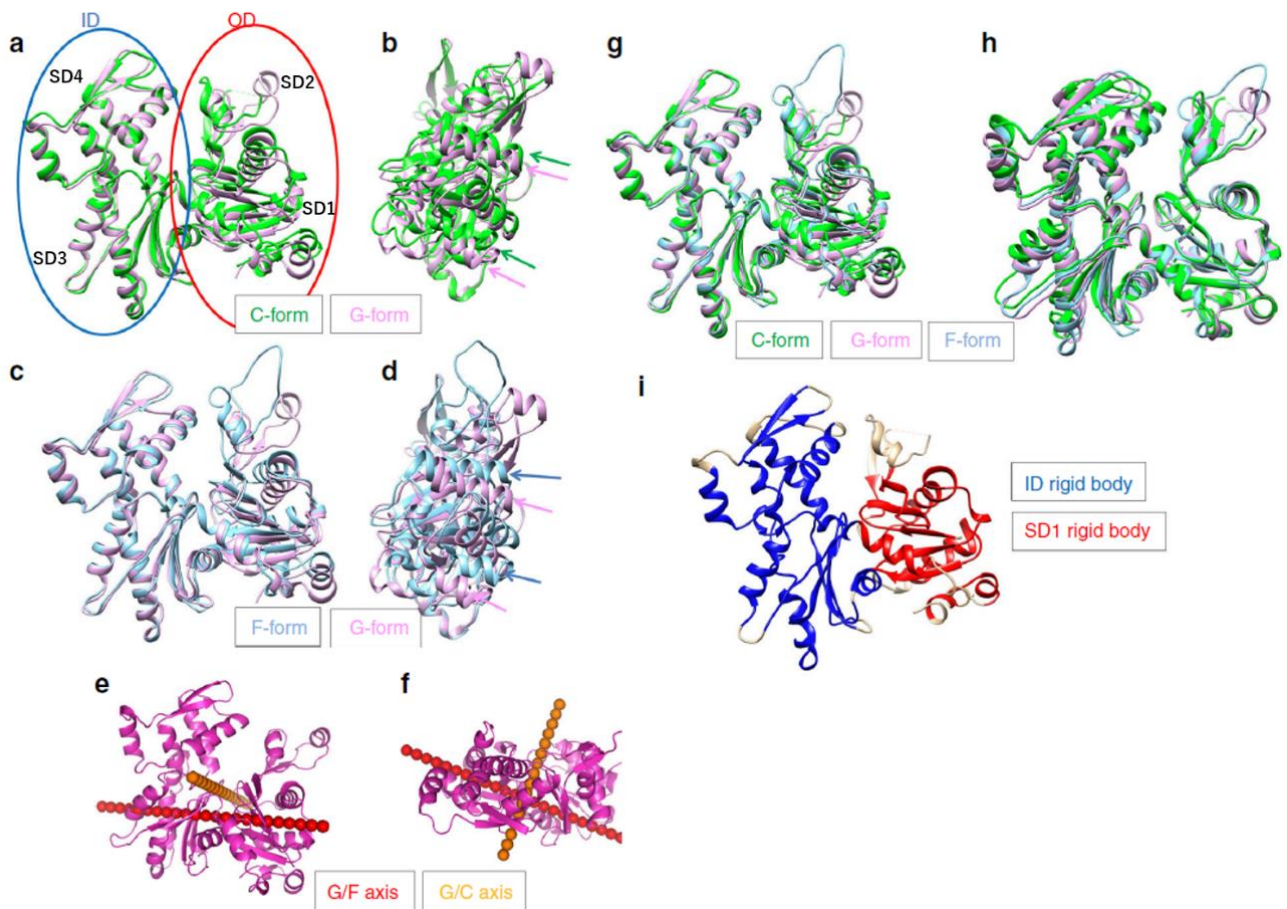


図 7 アクチンの構造変化に関する図

(a) G 型アクチン(PDB 1J6Z⁴³、マゼンタ)とコフィラクチン中の C 型アクチン(緑)の構造比較。アクチンの構造は内側ドメイン(ID)と外側ドメイン(OD)に大きく分けられ、さらに両ドメインはそれぞれ 2 つのサブドメイン(ID: SD3, SD4, OD: SD1, SD2)に分けられる。構造は ID で重ね合わせた。(b)(a)を OD の側方から見た様子。OD 側面の 2 つの α ヘリックス(79-95、359-365)の位置と傾きを矢印で示した。G 型から C 型への構造変化で、2 つの α ヘリックスは位置が変化するものの傾きは変化していないことがわかる。(c)G 型アクチンと F 型アクチン(PDB 5JLF、シアン)の構造比較。構造は ID で重ね合わせた。(d)(c)を OD の側方から見た様子。(b)に示した G 型と C 型の構造変化とは異なり、G 型と F 型の構造変化では OD 側面の 2 つの α ヘリックスの傾きが変化²³しており、G 型 \rightleftharpoons C 型と G 型 \rightleftharpoons F 型の構造変化は性質が異なることがわかる。(e)G 型 \rightleftharpoons F 型の構造変化と G 型 \rightleftharpoons C 型の構造変化における ID 剛体領域と SD1 剛体領域(i)の間の回転軸を、それぞれ赤色の棒とオレンジ色の棒で示した。(f)(e)を上方から見た様子。(g)G 型、F 型、C 型を ID 剛体領域に関して重ね合わせた図。(h)G 型、F 型、C 型を SD1 剛体領域に関して重ね合わせた図。(i)ID 剛体領域と SD1 剛体領域に属する残基をそれぞれ青と赤で示した。

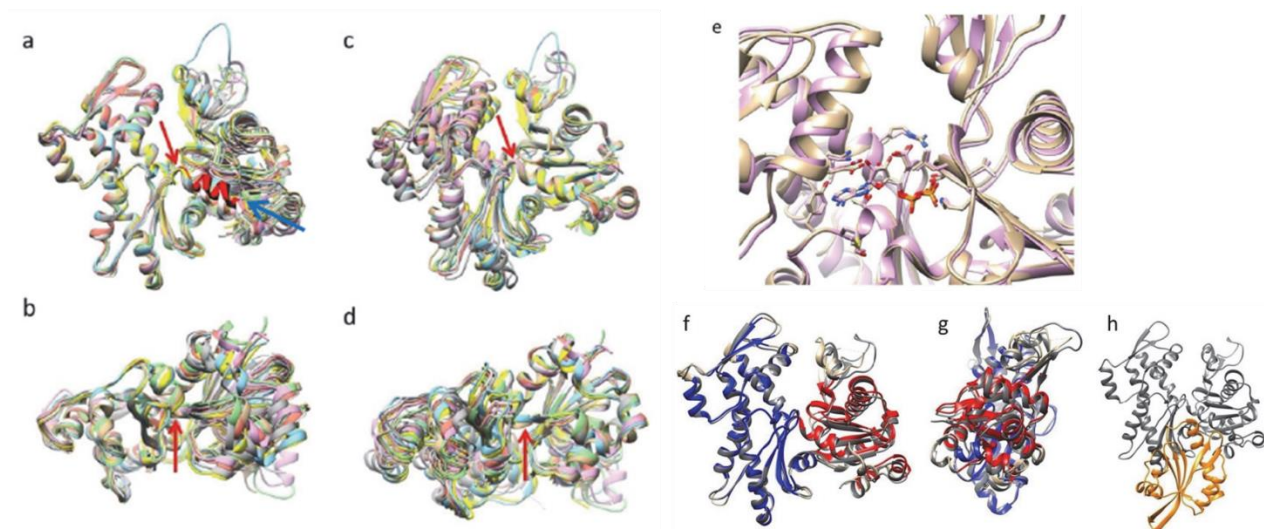


図 8 様々なアクチンの構造比較

(a-d) 8 種類のアクチンの構造比較。ID 剛体領域および SD1 剛体領域の相対位置変化のヒンジとして働く残基(137(a, c)および 336(b, d))を赤矢印で示した。コフィラクチン：ベージュ、G アクチン(1J6Z)⁴³：マゼンタ、F 型アクチン(5JLF)⁷³：シアン、アクチン-ツインフィリン C 複合体中のアクチン(3DAW)⁵⁸：緑、アクチンとゲルゾリン 1 およびトロポモジュリンのアクチン結合ドメインの複合体中のアクチン(4PKH)⁷²：オレンジ、F 型アクチンの結晶構造(未発表データ)：黄色、プロフィリンと VASP ペプチドとアクチンの複合体中のアクチン(2PAV)⁵⁶：灰色、アクチンとチモシン $\beta 4$ のキメラ蛋白質のアクチン部分(4PL7)⁵⁷：白色。(a) ID 剛体領域(図 7i の青色部)で重ね合わせた様子。コフィラクチンと、アクチン-ツインフィリン C 複合体の α ヘリックス(337-346)をそれぞれ赤と黒で塗り、青色の矢印で示した。その他のアクチンの α ヘリックスとは位置が異なっており、この 2 つのアクチン構造の剛体領域の相対位置関係は独特のものであると示唆される。(b) (a) を下から見た様子。(c) SD1 剛体領域(図 7i の赤色部)で重ね合わせた様子。(d) (c) を下から見た様子。(e) G アクチン(1J6Z、マゼンタ)とコフィラクチン(ベージュ)における ADP 結合部位周辺の構造比較。ADP 周辺残基(13-16, 156-158, 182-185, 213-214, 301-306)の C α 原子で重ね合わせた。重ね合わせに用いた残基の側鎖はスティックモデルで示した。(f) コフィラクチン(ベージュ)と、アクチン-ツインフィリン C 複合体(灰色)を ID 剛体領域に関して重ね合わせた。コフィラクチンの ID 剛体領域と SD1 剛体領域をそれぞれ青と赤で示した。2 つの構造で SD1 剛体領域の配向はよく一致している。(g) (f) を 90° 回転させて見た様子。(h) アクチン-ツインフィリン C 複合体の全体構造。ツインフィリン C(オレンジ)が G サイトを介してアクチン(灰色)に結合している。

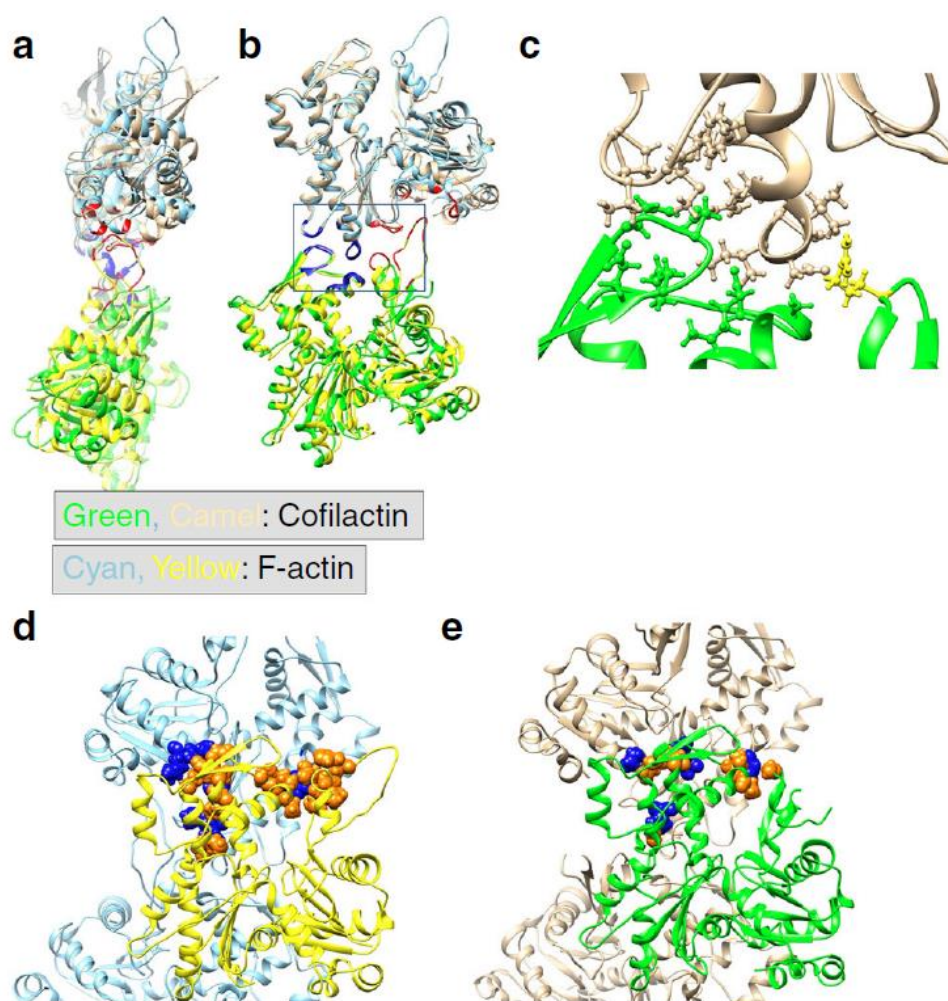


図 9 アクチン-アクチン間相互作用

いずれの図も P 端側が図の上側である。(a)F 型アクチン線維(シアンと黄色、5JLF)とコフィラクチン(緑色とベージュ)のストランド内相互作用の比較。ID に関して重ね合わせた。F 型アクチン線維とコフィラクチンで共通する相互作用残基を青色、F 型アクチン線維のみに存在する相互作用残基を赤色で示した。(b)(a)を 90° 回転させた図。(c)(b)の四角内のコフィラクチンの領域を拡大した図。相互作用に関わる残基を ball & stick モデルで示した。OD の中で唯一ストランド内相互作用に関わる Arg62 は黄色で示した。(d)F 型アクチン線維におけるストランド間相互作用。相互作用に関わる残基を空間充填モデルで示した。そのうち黄色で示したアクチン分子に属する残基はオレンジ、その他の残基は青で示した。(e)コフィラクチンにおけるストランド間相互作用。相互作用に関わる残基を空間充填モデルで示した。そのうち緑色で示したアクチン分子に属する残基はオレンジ、その他の残基は青で示した。

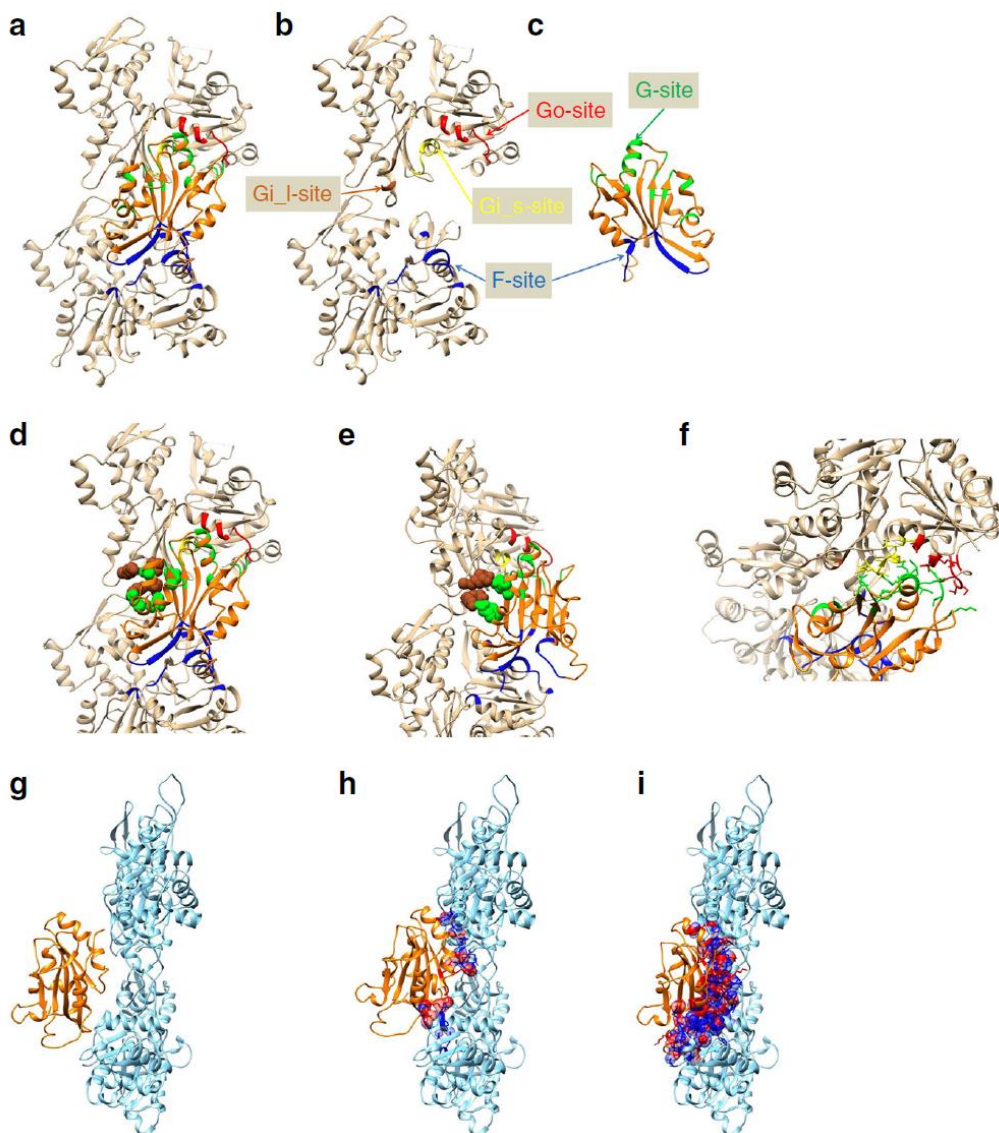


図 10 アクチン-コフィリン間相互作用

a-e, g-i では P 端側が図の上側。(a-f) アクチンをベージュ、コフィリンをオレンジ色で示した。アクチン上の F サイト(コフィリンと B 端側アクチン分子の相互作用領域)は青、Go サイト(コフィリンと P 端側アクチン分子の SD1 の相互作用領域)は赤、Gi_l サイト(コフィリンと P 端側アクチン分子の ID の相互作用領域の内、長距離の相互作用)は茶色、Gi_s サイト(コフィリンと P 端側アクチン分子の ID の相互作用領域の内、Gi_l サイトに含まれないもの)は黄色で示した。コフィリン上の F サイトおよび G サイトはそれぞれ青と緑で示した。(a) 2 つのアクチン分子(上が P 端側アクチン分子、下が B 端側アクチン分子)とコフィリン。(b) (a) からコフィリンを取り除いた図。(c) (a) のコフィリンのみを 180° 回転して示した図。(d) Gi_l サイトの残基を空間充填モデルで示した。(e) (d) を 50° 回転した図。(f) コフィリンの残基番号 111-119 の α ヘリックスの末端部を、 α ヘリックスの方向に沿った方向で見た様子。Gi_s サイトと

Go サイトの残基をスティックモデルで示した。**(g-i)**コフィリンがF型アクチン線維に結合した場合に発生する分子間衝突。衝突する原子を空間充填モデルで青(アクチン)および赤(コフィリン)で示した。衝突原子が属する残基はスティックモデルで示した。**(g)**B 端側アクチン分子の F サイトを介してコフィリンが結合する場合。分子間衝突は発生しない。**(h)**P 端側アクチン分子の Gi サイトを介してコフィリンが結合する場合。**(i)**P 端側アクチン分子の Go サイトを介してコフィリンが結合する場合。

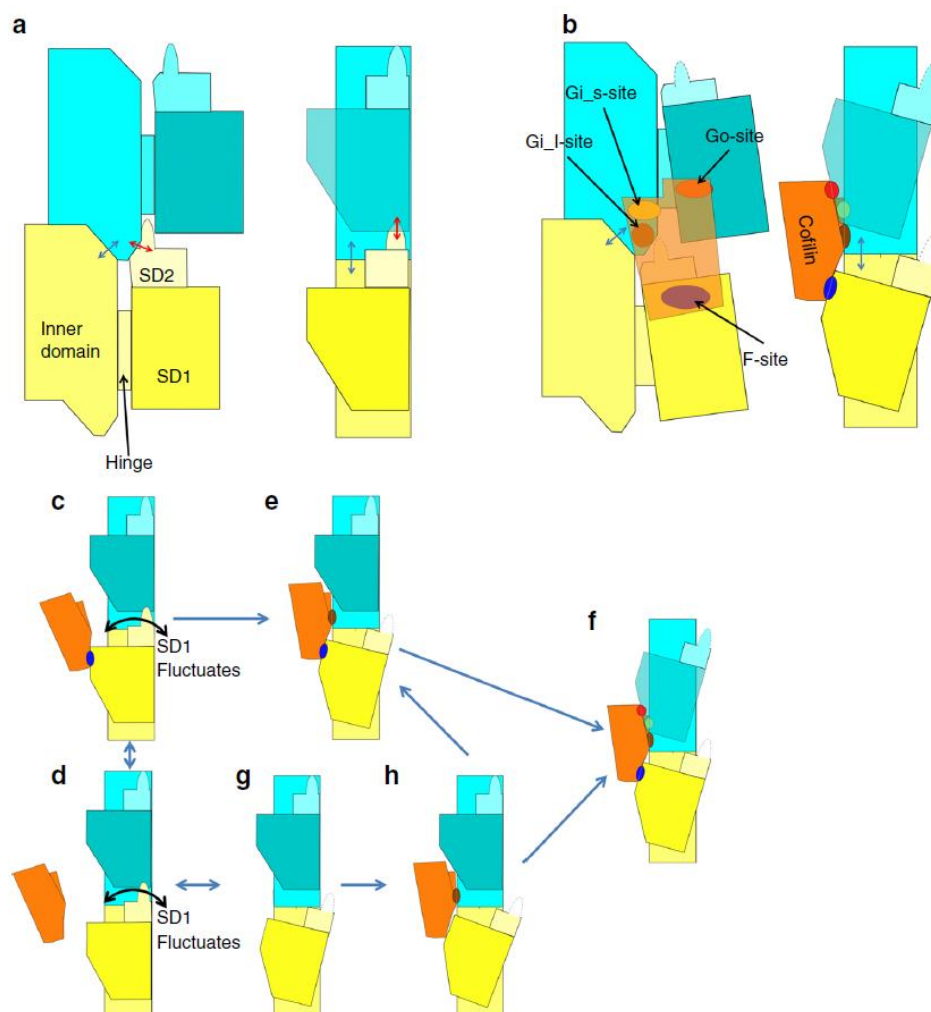


図 11 分子間相互作用の模式図

いずれの図も P 端側が図の上側である。F 型アクチン線維(a)およびコフィラクチン(b)の一方のストランド内の上下 2 分子のアクチン分子を示した(P 端側アクチン分子が水色、B 端側アクチン分子が黄色)。(a)と(b)では、左側がアクチンを正面から見た図、右側がアクチンを側面から見た図を表す。(a)F 型アクチン線維のストランド内アクチン分子間相互作用。アクチン分子は両方共 F 型である。ID-ID 間相互作用と OD-ID 間相互作用をそれぞれ青矢印と赤矢印で示した。(b)コフィラクチンのストランド内アクチン分子間相互作用。コフィリンをオレンジ色で示した。アクチンとコフィリンの相互作用領域はまず F サイト(青)、Gi サイト(黄色および茶色)、Go サイト(赤)の 3 つに分けられる。Gi サイトはさらに Gi_l サイト(茶色)と Gi_s サイト(黄色)に分けられる。SD2 の D-loop(41-49)は無秩序な構造を取る(点線部)。(c-h)複数ステップに渡るコフィリンの F 型アクチン線維への結合過程のモデル。(c, d)ステップ 1。コフィリンが B 端側アクチン分子の F サイト(青)を介してアクチン線維に結合する。この段階では結合状態(c)と乖離状態(d)の平衡状態にある。また、B 端側アクチン分子の OD は揺らいでいる。(e)ステップ 2。

F サイトを介して B 端側アクチン分子に結合したコフィリンが、OD のゆらぎに乗って P 端側アクチン分子の Gi₁ サイトに接近し、フレキシブルで長い側鎖を利用して結合する。(f)ステップ 3。P 端側アクチン分子の構造変化が誘起され、完全な G サイト結合が起こる。(g, h)コフィリンが F サイト結合を介さず、P 端側アクチン分子と Gi₁ サイトを介して直接結合する経路。

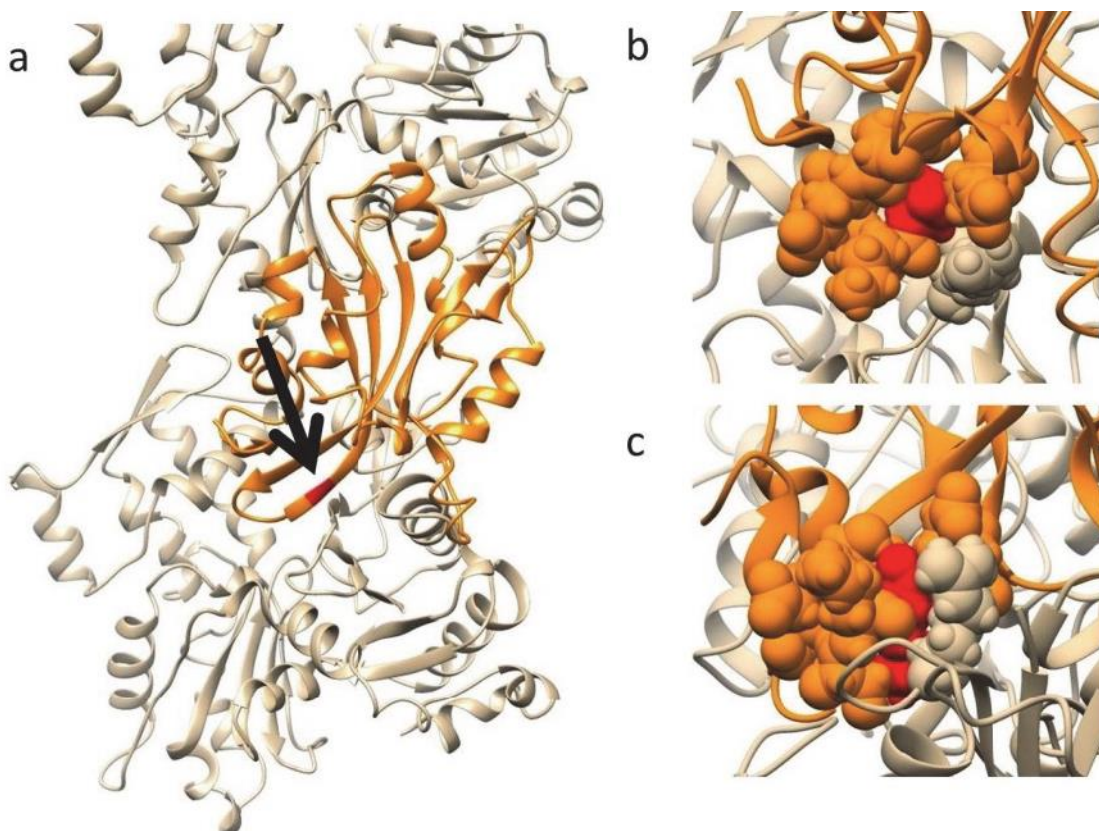


図 12 コフィリン K96 の近傍の図

アクチンをベージュ、コフィリンをオレンジ色で示した。(a)コフィリンの K96 を赤色と黒矢印で示した。
(b)コフィリンの K96 と周囲の側鎖を空間充填モデルで示した。

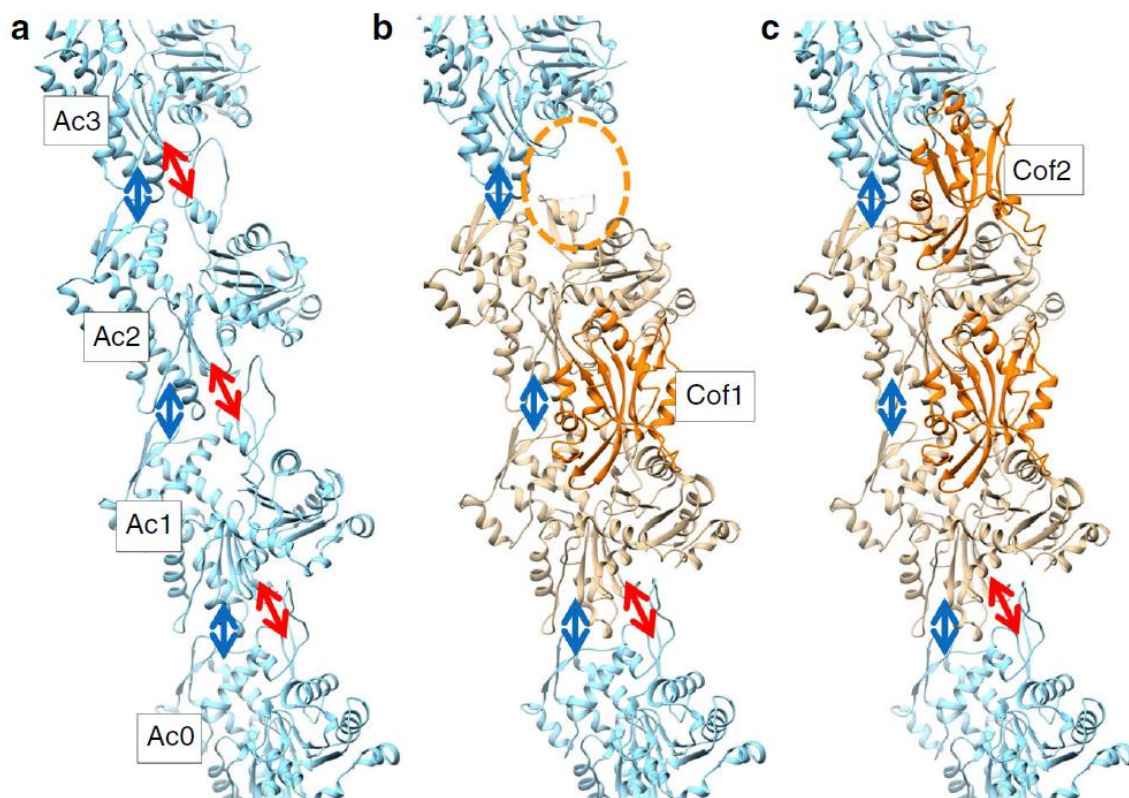


図 13 コフィリンの協同的結合過程のモデル

いずれの図も P 端側が図の上側である。F 型アクチンを水色、C 型アクチンをベージュで示した。(a)F 型アクチン線維の一方のストランドの隣接 4 分子のアクチン分子(B 端側から順に Ac0~Ac3)を示した。ID-ID 間相互作用および OD-ID 間相互作用をそれぞれ青矢印および赤矢印で示した。(b)(a)の Ac1 と Ac2 の間にコフィリン(Cof1)が結合した状態のモデル。(a)の Ac1 および Ac2 を C 型アクチンで置き換えた。置き換えは ID に関して重ね合わせることで行った。Ac2 が C 型になることで Ac2 と Ac3 の間の OD-ID 間相互作用が消失し、新たなコフィリンが結合しやすい隙間(オレンジ色の点線内)が生まれる。Ac1 と Ac0 の相互作用に関しては、Ac0 が F 型のままであることと、Ac1 が F 型から C 型へ変化しても Ac1 の ID の構造変化はほとんどなく、かつ Ac1 と Ac0 間の相互作用の Ac1 側サイトはほぼ ID に存在するため、Ac1 と Ac0 の間の相互作用は保たれる。(c)(b)の Ac2 と Ac3 の間の隙間にコフィリン(Cof2)が結合する。この際に生じる分子間衝突については図 14a-c を参照。

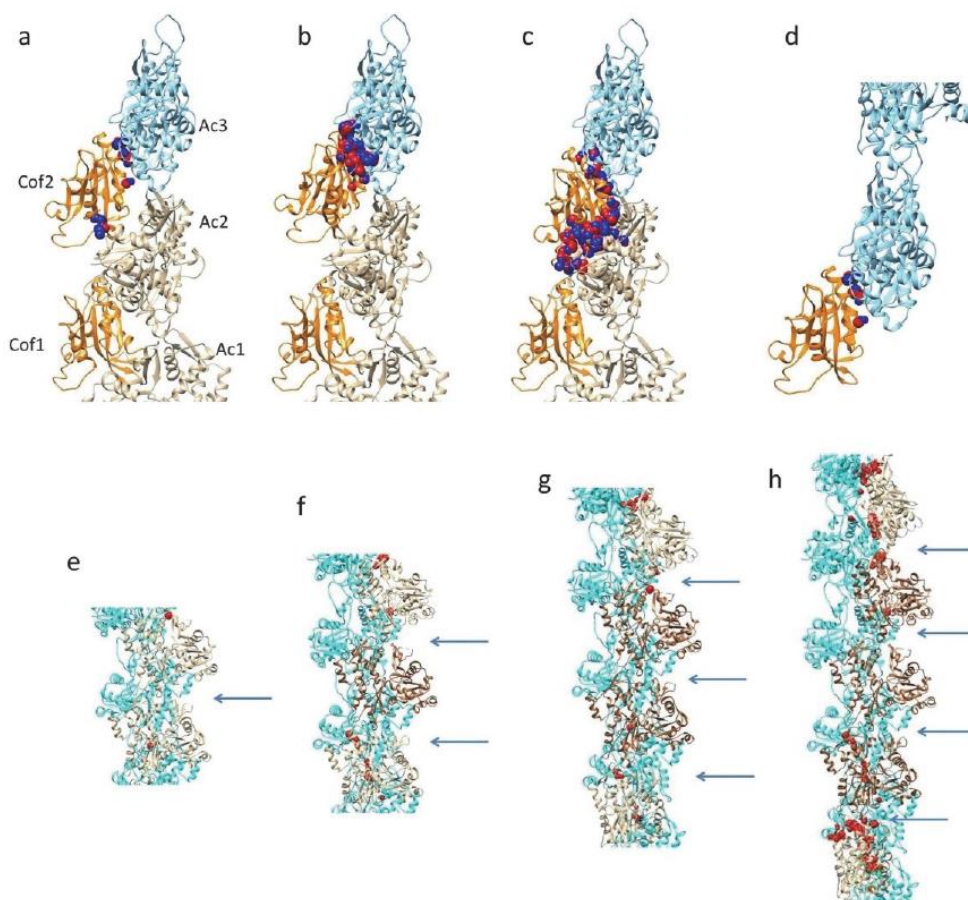


図 14 仮想原子モデルにおける分子間衝突

いずれの図も P 端側が図の上側である。(a-c)アクチン線維の一方のストランドの隣接 3 分子のアクチン分子(B 端側から順に Ac1~Ac3)があり、Ac1 と Ac2 の間にコフィリン(Cof1)が結合している前提で、その P 端側の Ac2 と Ac3 の間に新たなコフィリン(Cof2)が結合する場合の分子間衝突を示した。アクチンは水色が F 型、ベージュが C 型である。衝突する原子はアクチン側を青色、コフィリン側を赤色の空間充填モデルで示した。(a)Cof2 が Ac3 の Gi サイトを介して結合した場合に発生する分子間衝突。(b)Cof2 が Ac2 の F サイトを介して結合した場合に発生する分子間衝突。(c)Cof2 が Ac3 の Go サイトを介して結合した場合に発生する分子間衝突。(d)F 型アクチン線維の B 端アクチン分子に Gi サイトを介してコフィリンが結合する場合に発生する分子間衝突。(e-h)アクチン線維の 2 本のストランドの内、一方のストランドにコフィリンが 1~4 分子(e-h)結合した場合に生じるストランド間の衝突のモデル。衝突原子を赤で示した。アクチンは相互作用しているコフィリンの個数で色分けした(0 個：水色、1 個：ベージュ、2 個：茶色)。図を見やすくするためコフィリンは表示せず、結合位置のみ矢印で示した。コフィリンが結合したストランド(ベージュおよび茶色)の線維軸周りアクチン分子回転角($\Delta \phi$)は 35.8° 、コフィリンが結合していないストランド(水色)の回転角は 26.8° である。

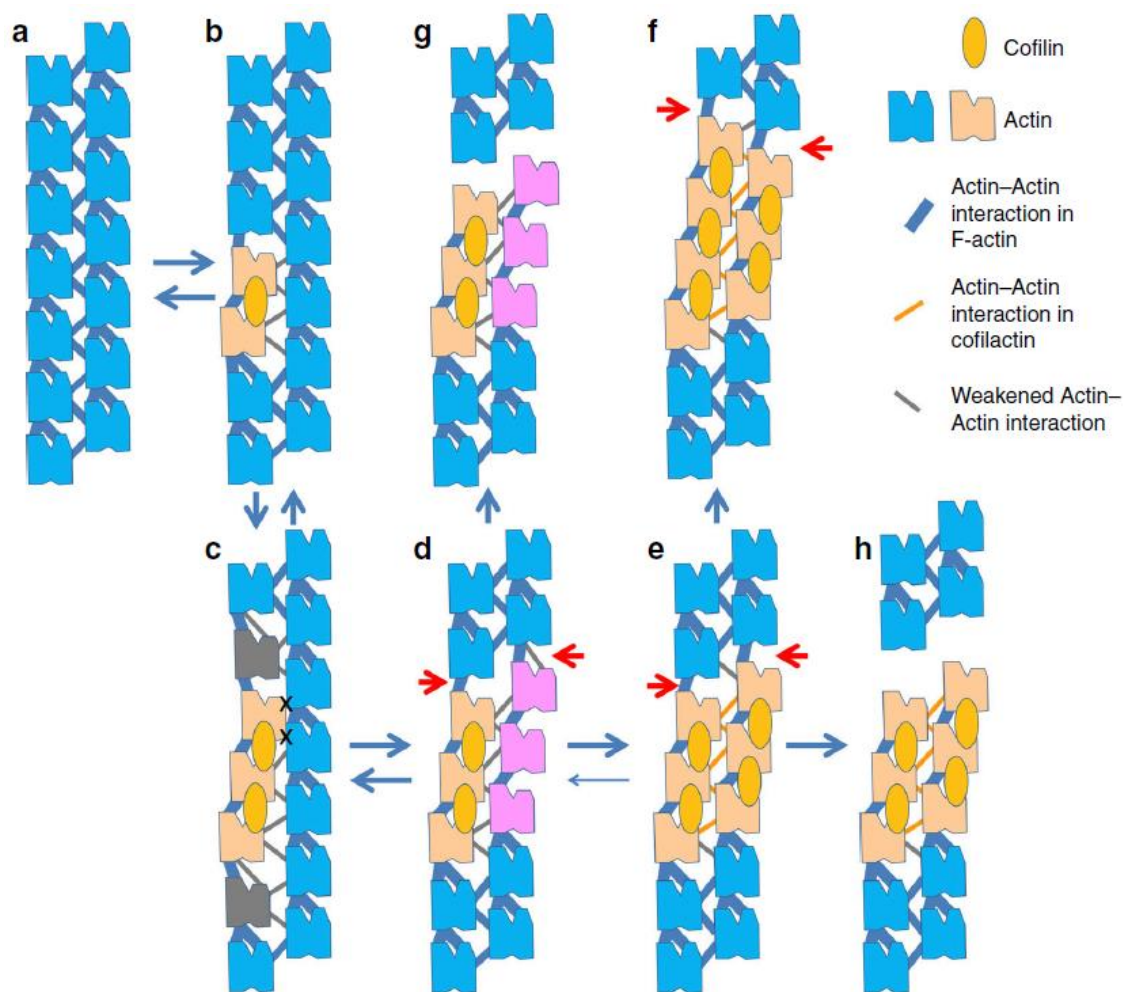


図 15 コフィリンのクラスター成長と線維切断過程のモデル

いずれの図も P 端側が図の上側である。(a)F 型アクチン線維。ストランド内アクチン-アクチン間相互作用(ID-ID 間および OD-ID 間)を太い青線で示した。ストランド間相互作用は細い青線で示した。(b)コフィリン(黄色の楕円)が 1 分子結合した状態。コフィリンが結合した 2 つのアクチン分子は F 型(青)から C 型(ベージュ)に変化し、らせんパラメータもコフィラクチンのそれへ変化する。そのためアクチン分子の位置がずれる。この構造変化と位置ずれにより OD-ID 間相互作用が消失し、かつストランド間の相互作用が弱体化する(灰色の細い線で示した)。(c)協同的結合により次なるコフィリンが結合する。このときストランド間にアクチン分子間衝突が生じる(×印)。アクチン分子の位置変化と衝突を補償するため、コフィリン結合アクチン分子に隣接するアクチン分子にはひずみが溜まっている(灰色)。コフィリンがより多く結合するにつれ、コフィリン結合ストランドに構造的ストレスが蓄積される。(d)構造ゆらぎによりコフィリン未結合ストランドのらせんパラメータがコフィラクチン様となり(マゼンタ)、コフィリン結合ストランドのそれと一致したとき、ストランド間の衝突が解消されるため、コフィリン結合ストランドの構造ストレスが解消される。コフィリンが結合した領域の P 端側(赤矢印)は両ストランドでストランド内相互

作用が弱体化するため、この時点が線維切断タイミングの 1 つと考えられる。(e)コフィリン未結合ストランドでらせんパラメータがコフィラクチン様となった領域(マゼンタ)はコフィリンが結合しやすくなっているため、両方のストランドにコフィリンが結合したコフィリンクラスターが形成される。(d)と同様、この時点も両ストランドでストランド内相互作用が弱体化しているため(赤矢印)、線維切断タイミングの 1 つと考えられる。(f)線維切断が起こる前に次なるコフィリンが結合すれば、コフィリンクラスターが成長する。(g, h)切断された線維。

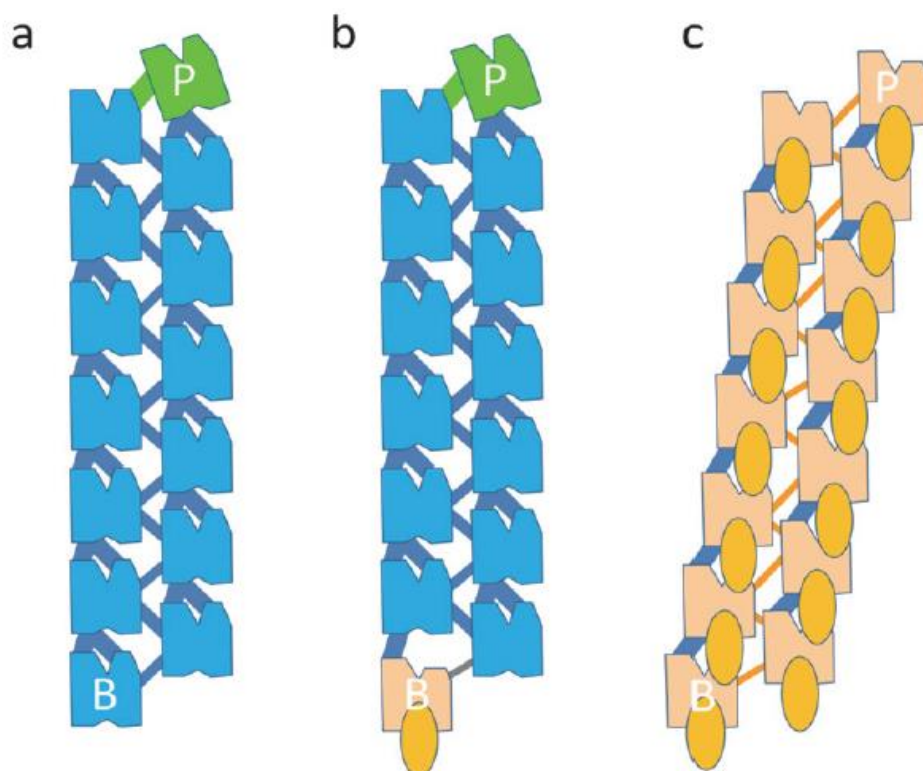


図 16 コフィリンによる線維端での脱重合速度変化のモデル

(a)F 型アクチン線維。B 端および P 端のアクチン分子を”B”と”P”でマークした。P 端アクチン分子(緑)は反対側のストランドに向かって傾き、P 端特有の相互作用を作る⁵⁵。(b)B 端アクチン分子の G サイトにコフィリンが結合した状態。コフィリン結合により B 端アクチン分子は F 型(青)から C 型(ベージュ)へ変化し、ストランド内の OD-ID 間相互作用が消失し、かつストランド間相互作用が弱体化する(灰色の細い線)。(c)コフィラクチン。B 端と P 端とでアクチン分子脱重合時に切るべき相互作用の数と種類が一致するため、脱重合速度が等しくなる。

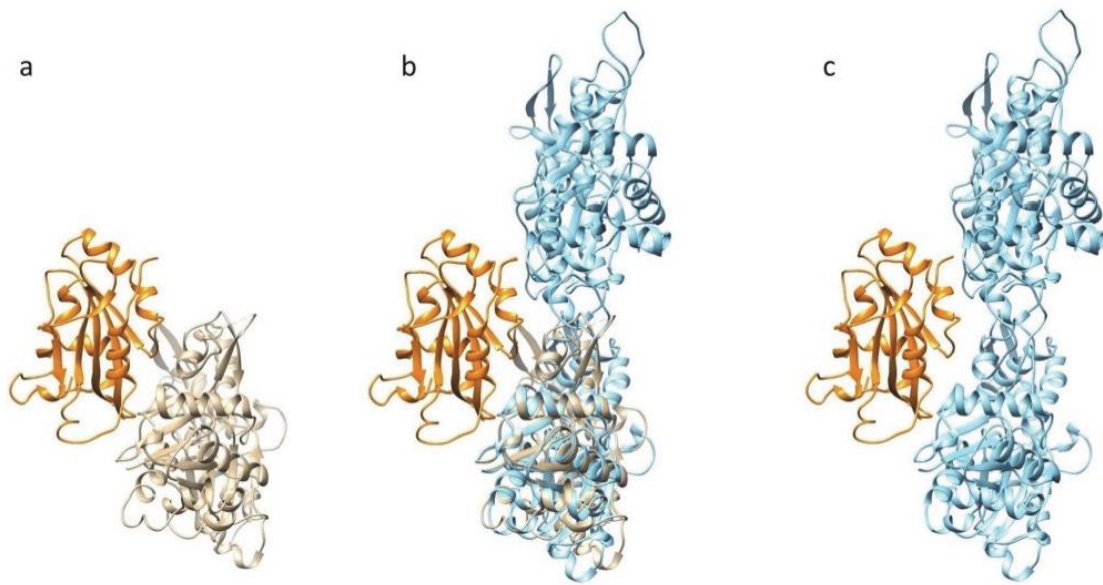


図 17 コフィリンがアクチン線維に対して F サイトを介して結合するモデルの構築過程

(a) コフィラクチンから取り出したアクチン(C 型)とコフィリン。F サイトで相互作用している。(b) (a) のアクチン(ベージュ)とコフィリンを、F 型アクチン線維(水色)に対してアクチンの SD1 剛体領域で重ね合わせた。(c) (b) から C 型アクチンを取り除いた。

以上