

博士学位論文

(主論文)

組換え $\beta$ -アクチンの発現精製系の構築と

Dループ変異体(G42A/G46A)の発現及び構造・機能解析

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

松崎 瑞季

## 目次

要旨.....	3
第1章 組換え $\beta$ -アクチンの発現精製系の構築.....	6
1-1 序論.....	6
1-2 材料と方法.....	8
1-3 結果.....	13
1-4 考察.....	18
第2章 Dループ変異体(G42A/G46A)の発現及び構造・機能解析.....	19
2-1 序論.....	19
2-2 材料と方法.....	23
2-3 結果.....	26
2-4 考察.....	34
参考文献.....	35
謝辞.....	39

## 要旨

アクチンはすべての真核細胞で発現し、もっとも大量に存在する蛋白質の 1 つである。アクチンは、生理的な条件下で螺旋状に重合し、線維状の多量体 F-アクチンとなる。細胞はこのアクチンの重合・脱重合を制御することにより、細胞分裂や細胞運動などの動的変化の駆動力を生み出している。アクチンは単量体 G-アクチンと線維状の多量体 F-アクチンの 2 つの状態において、その構造が大きく異なる。大きな差異の 1 つに DNase I 結合ループ(D ループ)の構造の変化がある。D ループは結晶構造中では見えないことが多い。見えている少数の構造では、D-ループは他のアクチンサブユニットか他の蛋白質に結合した状態である。D-ループが観察される結晶構造や、標識アクチンを用いた実験から D ループは多様な構造をとっていることが知られており、その構造変化の自由度の高さから D ループは多くの局所エネルギーの最小状態を生むことができる高い conformational freedom を持っているとも表現できる。D ループは線維中のサブユニット間のインターフェイスの一部を担っていることから、切断・酸化すると線維中のサブユニット間の相互作用が影響を受け、アクチン線維の安定性が低下することが報告されている。しかし、D ループの conformational freedom がアクチンのダイナミクスにどのように寄与しているのかは明確に示されていない。本研究は D ループの conformational freedom とアクチンダイナミクスの関係について調べることを目指した。

蛋白質の機能発現機構について、残基レベルでその詳細を知る手法としては、機能に関与する領域に変異を導入した変異体の機能解析が有用である。高等生物アクチンについては、近年昆虫細胞を用いた発現系の構築が報告され、変異体による機能解析が進められてきている。本研究では始めに、筆者の所属する研究室で構築されたバキュロウイルス-昆虫細胞を用いたヒト心筋  $\alpha$ -アクチンの発現系を基に、非筋細胞  $\beta$ -アクチンの発現精製系を構築した。 $\alpha$ -アクチンは筋細胞で発現し筋収縮に関与する一方、 $\beta$ -アクチンはほとんどすべての非筋細胞で発現しており、細胞の細胞分裂や細胞運動など動的機能に関与している。本発現精製系の構築にあたって、上記心筋  $\alpha$ -アクチン発現精製系では N 末端に付加したままであった StrepTagII 配列とプロテアーゼ認識配列の切断を可能とするべく、プロテアーゼを Factor Xa から TEV プロテアーゼに変更し、タグとの間にスペーサ(SS)を挟むように設計を変更した。

20mM-Tris 条件にて発現アクチンの抽出を行い、同条件にてアフィニティータグを使用した精製を行うことによりコフィリンを含むアクチン結合蛋白質を除くことができた。設計を変更したことで、タグの切断が可能となった。精製段階において Native-Page を行うことにより TEV 処理とその後の精製によりタグの残ったアクチンを取り除けていることを精製段階で確認できた。今回得られた精製組換えアクチンは、アクチンの特徴である重合・脱重合能を備えている。また電子顕微鏡像による解析からも、組織から精製したアクチンの構造と遜色ない解析結果が得られたことから、この発現系で得られる組換えアクチンは機能解析に使用しうると判断した。

次いで、アクチン変異体を作製し、構造及び機能の解析を行った。D ループのアミノ酸配列は種間で高度に保存されており既知のアクチン配列全てに 3 つのグリシンが含まれている。グリシンは蛋白質に含まれる 20 種類のアミノ酸のうちで一番小さく、D ループの **conformational freedom** に大きく関わっている可能性が考えられたことから、D ループに位置する 42 番目と 46 番目のグリシンをアラニンに変異させた二重変異体の発現を試みた。この二重変異により、野生型アクチンのとりえた構造のいくつかをとることができなくなり、D ループがとりうる立体構造の範囲が抑制されると考えられる。発現に先立ち、現行のアクチンサブユニット間結合を示した構造(PDB ID: 6KP8)を基に、2つのグリシンをアラニンに変異させた変異体のモデルを構築すると、変異体のアラニン側鎖はアクチンサブユニットの他の領域と衝突しないことが確認できた。そのため、この変異体はサブユニット間の相互作用に影響せず、D ループの **conformational freedom** を抑制すると仮定した。

発現した変異体の構造及び機能解析の結果、変異体と野生型の臨界濃度(F-アクチンと G-アクチン間の自由エネルギーを直接反映している)に大きな差は認められず、線維構造にも違いは認められなかった。それにもかかわらず、変異体の B 端側の重合速度および脱重合速度は野生型に比べ低下していた。アクチン結合蛋白質であるコフィリンの結合を比較してみると、変異体ではアクチンに対し同濃度のコフィリンを加えた際にその結合は抑制されたが、過剰量のコフィリンを加えた際には野生型と同様にアクチン 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を形成した。これは、導入した変異が、コフィリン結合の様式を大きく変えずにコフィリン結合を弱めていることを示している。

アクチン単独での実験結果から、モデルで仮定した通り、導入した変異はアクチン線維のサブユニット間結合には影響を与えていないと考えられる。変異体の B 端における重合・脱重合速度の減少は、D-loop の **conformational freedom** が、アクチン分子の動態に直接影響を与えることを示唆する最初の証拠である。また、コフィリンを加えた際の実験結果は、近年のアクチン線維に対するコフィリンの結合モデルと矛盾しない。このモデルではアクチンに対するコフィリンの結合には、D ループがアクチン線維内で隣接するサブユニットから解離することが必要であるとしており、変異導入により D ループの **conformational freedom** が抑制された場合、コフィリンの結合速度は低下すると考えられる。それに対し D ループはコフィラクチンの線維中の他の箇所に接触していないことから、コフィラクチンからのコフィリンの解離速度については変異導入の影響を受けないと考えられるため、全体としてはコフィリンの結合は抑制される。

コフィリンはそのアクチン切断・分解効果により、細胞内のアクチンダイナミクスの加速に重要である。本研究において、変異体へのコフィリンの結合は熱力学的に低下した。変異導入の重合・脱重合への影響と合わせて、筆者は D ループの **conformational freedom** が細胞内のアクチンダイナミクスの速度を直接調整している可能性が高いと考えている。この仮説の検証には、他の D ループ変異体を作製し、導入した変異の影響を解析すること

が必要であるが、構造変化の自由度がアクチンダイナミクスに影響を与える可能性を示した本研究は、アクチンの構造動態の理解、conformational freedom の蛋白質機能への影響の理解に寄与すると信じている。

## 第 1 章 組換え $\beta$ -アクチンの発現精製系の構築

### 1-1 序論

アクチンはすべての真核細胞で発現し、もっとも大量に存在する蛋白質の 1 つである。細胞骨格と接着(たんぱく質核酸酵素 2006 年増刊 Vol.51 No.6)によれば、アクチンは骨格筋細胞では全蛋白質量の 20%以上、非筋細胞でも 1~5%を占めている。

単量体は G-アクチンと呼ばれる分子量約 42,000 の球状蛋白質であり、生理的な条件下で螺旋状に重合して線維状態となった多量体 F-アクチンとなる。F-アクチンには極性があり、B 端(Barbed end)はもう一方の P 端(Pointed end) に比べて重合も脱重合も速く起きる。アクチンの重合・脱重合という可逆的な過程を制御することにより、細胞は細胞分裂や細胞運動などの動的変化の原動力を生み出している<sup>1</sup>。

こうしたアクチンの動態は様々なアクチン結合蛋白質との相互作用、そしてアクチン分子自身の構造変化によって制御されている<sup>2</sup>。蛋白質のこうした機能発現機構について残基レベルでその詳細を知る手法としては、機能に関与する領域に変異を導入した変異体を作製し、その機能解析を行うことが有用である。しかしアクチンの場合、変異体作成において最も一般的な宿主である大腸菌を用いると封入体を形成し、発現アクチンの可溶化ができないため、大腸菌を用いた発現系の作製は困難である<sup>3</sup>。

アクチンの発現系は酵母<sup>4,5</sup>や粘菌<sup>6,7</sup>を用いた系が確立されている。アクチンは生物種間で非常に高度に保存されている蛋白質で、ヒト、マウス、ニワトリの骨格筋  $\alpha$ -アクチンのアミノ酸配列は同一である。しかし酵母アクチンとヒト骨格筋  $\alpha$ -アクチンを比較すると、375 アミノ酸のうち 50 アミノ酸が異なっている。これはアクチンとしては相同性が高いとは言えず、さらに両者の F-アクチン三次元再構成像が異なっているという報告もある<sup>8</sup>。長らく高等生物アクチンの研究には組織から精製したアクチンが用いられてきていたが、近年、昆虫細胞を用いた高等生物アクチン発現系の構築が報告され、変異体による機能解析が進められてきている<sup>9</sup>。筆者の所属する研究室でもバキュロウイルス-昆虫細胞を用いた組換え心筋  $\alpha$ -アクチンの発現系を構築し、それを利用した Q137 変異体の機能変調の解析を報告している<sup>10</sup>。昆虫細胞は大腸菌に存在しない高等生物シャペロン及び翻訳後修飾能力を有しているため、天然活性を保持した組換えアクチンを得ることが期待できる。

哺乳類と鳥類では、骨格筋  $\alpha$ -アクチン、心筋  $\alpha$ -アクチン、平滑筋  $\alpha$ -アクチン、非筋細胞  $\beta$ -アクチン、平滑筋  $\gamma$ -アクチン、非筋細胞  $\gamma$ -アクチンの 6 種類のアクチンアイソフォームが同定されている<sup>11</sup>。3 つの  $\alpha$ -アクチン間では 375 アミノ酸のうち 4~6 アミノ酸が異なるだけだが、骨格筋  $\alpha$ -アクチンと  $\beta$ -アクチンを比較すると 21 個のアミノ酸が異なっている。 $\alpha$ -アクチンは筋細胞で発現し筋収縮に関与する一方、 $\beta$ -アクチンはほとんどすべての非筋細胞で発現しており、細胞の細胞分裂や細胞運動など動的機能に関与している<sup>12</sup>。このように異なる細胞で発現し、担っている機能も違うと考えられている<sup>13,14</sup>にも関わらず、組織からの  $\beta$ -アクチンの精製は難しいため、 $\beta$ -アクチンの *in vitro* の研究結果は多くない。

本研究ではまず、当研究室にて過去に確立された組換えヒト心筋アクチン発現精製系を基に、高等生物非筋細胞 $\beta$ 型アクチン(以下 $\beta$ -アクチンと呼称)の発現精製系の構築を行った。上記組換えヒト心筋アクチン発現精製系では、得られた精製組換えアクチンのN末端側にはアフィニティータグである**StrepTagII**配列と**Factor Xa**プロテアーゼ認識配列が付加したままの状態であった。これは、組換えアクチンの精製途中もしくは精製後に**Factor Xa**プロテアーゼで処理するも、上記配列の切断することができなかつたためである。それを踏まえ本研究では、使用するプロテアーゼを**TEV**プロテアーゼに変更し、**StrepTagII**配列との間にスペーサ(SS)を挟むことにより、タグの切断が可能となるように試みた(図 1-1)。

## 1-2 材料と方法

### 組換えβ-アクチン遺伝子を挿入したトランスファーベクターの作製

組換えβ-アクチンを発現する組換えバキュロウイルスを作製するために、ヒトβ-アクチンの遺伝子を挿入したトランスファーベクターを作製した。アクチン遺伝子は、アフィニティータグである StrepTagII 配列(WSHPQFEK)とスペーサ(SS)、TEV プロテアーゼ認識配列(GRENLYFQ)を N 末端側に付加した組換えアクチンが発現するように設計した(図 1-1)。ベクターにおける挿入部位前後の配列をそれぞれ付加したプライマーを用いて、上記配列を付加した組換えアクチン遺伝子を PCR により増幅した。

トランスファーベクターには、Bac-to-Bac システム用ベクターである pFastBac (Invitrogen)を用いた。これを制限酵素 BamHI と EcoRI で処理し、精製した上記 PCR 産物と In-Fusion 反応させることによって組換えβ-アクチン遺伝子を挿入したトランスファーベクターを作製した。In-Fusion 反応に用いたプライマー配列を以下に示す。

Forward: 5'-CATCGGGCGCGGATCCATGGGATGGTCGCATCAGTTC-3'

Reverse: 5'-GTAGGCCTTTGAATTCTAGAAACACTTCCTGACG-3'

このトランスファーベクターの開始コドンの上流(Met の直前)に、蛋白質発現促進配列である L21 配列(aactcctaaaaaccgccacc)<sup>15</sup>を付加し、野生型(WT)用発現ベクターとした。

### 組換えバキュロウイルスの作製及び精製

組換えアクチンを発現する組換えバキュロウイルスは、Bac-to-Bac システム(Invitrogen)を用いて作製した。形質転換には元より菌体内にバキュロウイルス DNA を持つ大腸菌株 DH10Bac を用いた。

### 組換えβ-アクチンの発現

培養昆虫細胞は Sf9 細胞を用い、27 °C のインキュベーター内で回転数 90 rpm、スピナーフラスコによって培養した。培地は血清培地(Grace's Insect Medium supplemented (Invitrogen)、10 % FBS、50 U/ml penicillin G、50 µg/ml streptomycin、0.2 % Pluronic F-68(いずれも Thermo Fisher Scientific))を用いた。

上記条件で細胞の培養を行い、細胞密度が  $7.5 \times 10^5$  cells/ml の時点の sf9 細胞をシャーレに移し、組換えバキュロウイルスを添加した。27 °C にて約 72 h 培養することにより、組み替えアクチンを発現させた。一度に 200 mL 分の発現を行った。得られた組み替えアクチン発現細胞は遠心分離することにより沈殿画分として回収し、-20 °C で保存した。

### 組換えβ-アクチンの精製

以下の方法に従って精製組換えアクチンを得た(図 1-2)。

(1)得られた組換えアクチン発現細胞に氷冷した Lysis Buffer(20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.2 mM ATP、1mM DTT、プロテアーゼ阻害カクテル(complete EDTA-free,

Roche Applied Science))を加え懸濁した後、氷冷しながら超音波破碎した。

この懸濁液を 4 °C, 25,000 rpm, 30 分間遠心し、上清（可溶性画分）を回収した。

(2)可溶性画分は StrepTrap アフィニティーカラム(GE Healthcare)で精製した。可溶性画分をカラムに吸着させ、カラムを Lysis Buffer で洗浄を行い、Lysis Buffer からプロテアーゼ阻害カクテルを抜いた 20 mM-Tris 緩衝液で洗浄した後、2.5 mM desthiobiotin を含む 20 mM-Tris 緩衝液にて組換えアクチンを溶出させた。

(3) 得られた組み替えアクチン溶出画分は VIVASPIN20 (MWCO 30,000, Merck KGaA)遠心濃縮フィルターを用いて、G-Buffer (2 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>,0.2mM ATP, 0.2mM DTT)に置換しながら濃縮を行った。

濃縮後の発現アクチンは重合脱重合を行うことでさらに精製した。F-Buffer(2 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM ATP、0.2 mM DTT)条件下に溶出画分をおいた後、1 晩 F-Buffer 中で透析することによりタグ付き組換えアクチンを重合させた。透析後得られたタグ付き F-アクチンは 4°C, 100,000 rpm, 30 分間遠心することによって沈殿として回収した。

(4) 得られた F-アクチンを G-Buffer に懸濁し、G-Buffer 中で透析することによって脱重合させた。透析後の溶液を 4°C, 100,000 rpm, 30 分間遠心して得られた上清をタグ付き組換えアクチン溶液とした。

(5) TurboTEV プロテアーゼ(Accelagen)を加え、4°Cで一晩反応させた。この際、タグ付き組換えアクチンが終濃度 12μM になるよう G-Buffer で希釈した。

(6)反応後の溶液を StrepTrap アフィニティーカラムに流し、その素通り画分を組み替えアクチン溶液として回収した。組み替えアクチン溶液については、後述の native page により、タグ付き組換えアクチンが除けていることを確認した。

(7)アクチン溶液について F-Buffer 条件下で 1 晩重合を行った後、4°C, 100,000 rpm, 30 分間遠心することによって F-アクチンを沈殿として回収した。

(8)沈殿を G-Buffer に懸濁し、G-Buffer で透析することによって脱重合させた。透析後の溶液を 4°C, 100,000 rpm, 30 分間遠心して得られた上清を精製組換えアクチン溶液とした。

## Native Page

Native Page は、Lu J.X. *et al.* (2012)<sup>16</sup> を参考に行った。

分離ゲルの組成は 10% acrylamide, 375mM Tris-HCl(pH8.8), 0.2 mM ATP, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT、濃縮ゲルの組成は 4.8% acrylamide, 125mM Tris-HCl (pH6.8), 0.2 mM ATP, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT、泳動バッファーは、25mM Tris, 250mM glycine, 0.2 mM ATP, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM DTT の組成で行った。

サンプルには同量の 2x Loading buffer (4mM Tris-HCl (pH8.0), 0.4 mM ATP, 0.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 10%(w/v)sucrose)を加え、1 レーンにアクチンが 20 pmol 含まれるようにアプライ量を調整した。

BIO CRAFT BE-210 system(Bio Craft)を使用し、室温で 100V 30 分泳動したのちに、200V 30 分間泳動を行った。

## Western blotting

タグ付き組換えアクチン、TEV プロテアーゼ処理を行ったタグ付き組換えアクチン、精製組換えアクチン及びマーカーとしてニワトリ骨格筋から精製した  $\alpha$  骨格筋アクチンの Native-PAGE を行い、ミニトランスブロットセル(BIO-RAD)を使用して Hybond-ECL メンブレン (GE Healthcare)へ転写を行った(33 mA、3 時間)。ブロッキングにはスキムミルク(final 5%)を溶解した TBS-T を用い、一次抗体として Strep-tag Antibody (mouse monoclonal, Qiagen)、2 次抗体として、Anti-Mouse IgG ( $\gamma$ -chain specific)-Peroxidase antibody produced in goat (Sigma-Aldrich) を使用した。検出には Amersham ECL Western blotting Analysis system kit (GE Healthcare)を使用した。

## 重合アッセイ

アクチンを F-Buffer 条件下に 60 分間室温に置くことにより、重合させた。その後、451000 g、20°C、30 分間遠心することにより、重合したアクチンを沈殿させた。遠心後のサンプルの上清を分取、沈殿を遠心時の液量と同量の Buffer で懸濁しそれぞれをその分布を電気泳動により確認した。

## 電子顕微鏡観察試料作成

アクチンを F-Buffer 条件下(2 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP, 0.2 mM DTT)で 60 分室温に置き、重合させたものをアクチンサンプルとした。

試料観察用グリッドは#10-1012 ELS-C10(応研商事)を使用した。事前にイオンコーター IB-3(株式会社エイコー)により、約 10Pa にて 5mA のグロー放電を 30 秒行うことで、グリッドに親水化処理(グローディスチャージ)を施した。

上記サンプル 2 $\mu$ L とタバコモザイクウイルス(0.0548 $\mu$ g/grid)をグリッド上に添加し、酢酸ウランにて負染色を行った。

### 電子顕微鏡による観察・撮影

アクチン単独サンプルは H-7650 透過型電子顕微鏡(HITACHI) を用いて、加速電圧 100 kV で観察し、ELECTRON-MICROSCOPIC FILM FG (FUJIFILM) を用いて直接倍率 40,000 倍で撮影した。得られたフィルムは GT-X970 スキャナー(EPSON)でデジタル化した。

### 電子顕微鏡画像の解析

解析は EOS<sup>17</sup> を使用して行った。デジタル化したフィルムから線維像を切り出し、そのトレースを行い、コンピューター上でその曲りを補正し、真直ぐにした像を得た。この補正した線維からパワースペクトルを算出した。真直ぐにした線維に、回折パターン上のアクチンを特徴づける層線付近の情報を通すバンドパスフィルタをかけた<sup>18</sup>。



図 1-1 発現配列の N 端側模式図

アフィニティータグである StrepTag II を橙、スパーサ-を黒、TEV プロテアーゼ認識配列を青、βアクチンを赤で示した。

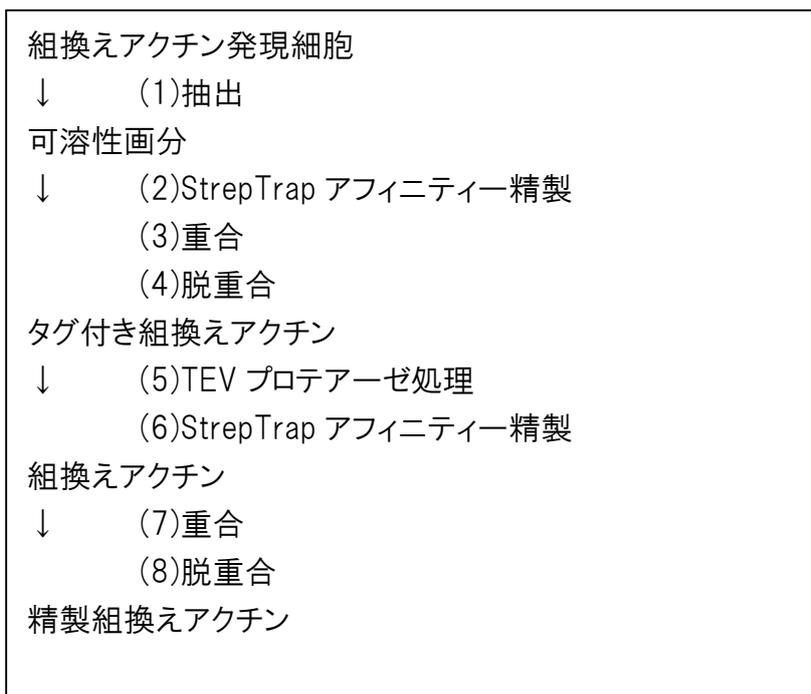


図 1-2 組換えアクチン精製細胞からの組換えアクチン精製方法

組換えアクチン発現細胞から組換えアクチンを抽出し、アフィニティーカラムによる精製、TEV プロテアーゼによるタグの切断、タグ付きアクチンの除去を行い、さらに重合・脱重合を経て精製組換えアクチンを得た。

### 1-3 結果

昆虫細胞-バキュロウイルスを用いた組換え $\beta$ -アクチン発現系の構築を試みた。組換えウイルスの作製には Bac-to-Bac システムを用い、蛋白質発現促進配列である L21 配列を付加したトランスファーベクターを用いた。その結果、N 末端側にアフィニティータグである StrepTagII 配列と TEV プロテアーゼ認識配列を付加した組換えアクチンを発現させることができた。

この発現系を用いて得られた組換えアクチン発現細胞を 20 mM-Tris を含む抽出緩衝液で処理した。この可溶性画分をアフィニティー精製し、SDS-PAGE によって溶出画分を確認した。組換えアクチンと、昆虫細胞由来コフィリンに相当する分子量約 20,000 のバンドを確認した(図 1-3A)。

このアクチン溶出画分を濃縮し重合・脱重合を行った。脱重合した後の遠心上清をタグ付き精製組換えアクチンとした。重合・脱重合を行うことにより、昆虫細胞由来コフィリンを除くことができ、得られた精製組換えアクチンは CBB 染色した SDS-PAGE 像からシングルバンドとして確認できるほどの純度であった(図 1-3A,B)。タグ付き精製組換えアクチンの収量は 100mL Culture あたり平均 0.27 mg(n=7)であった。この状態のタグ付きアクチンを F-buffer 条件下で重合させ、電子顕微鏡下で観察を行ったところ、タグ付きアクチンは強い束化傾向を示した(図 1-3C)。

タグ付き精製組換えアクチンを Turbo TEV プロテアーゼで処理することにより、タグの切断を行った。切断されたタグ及び TEV 処理によってタグが切断されなかったタグ付きアクチンを除くため、反応後の溶液を StrepTrap アフィニティーカラムに流し、得られた組換えアクチンをさらに精製するため、重合・脱重合を行った。脱重合した後の遠心上清を精製組換えアクチンとした。

StrepTagII 配列は 8 アミノ酸残基から成り、分子量が小さいため、SDS-PAGE ではアクチンのタグの有無を確認することはできない。そこで native-page により、TEV プロテアーゼによりタグの切断が行われていること及び精製サンプルに昆虫細胞由来のアクチンが含まれていないことの確認を行った。濃縮ゲルと分離ゲルの濃度をそれぞれ 4.8%と 10%とし、両ゲル、泳動バッファー及びサンプルバッファーに 0.2 mM ATP、0.3 mM CaCl<sub>2</sub>、さらに 1 mM DTT を加えた条件下で native-page を行うことにより、アクチンのタグの有無の識別を可能とした(図 1-3D)。Native-page による確認の結果、TEV プロテアーゼ処理前のタグ付き精製組換えアクチンに昆虫細胞由来のタグの無いアクチンのバンドは認められず、TEV 処理を行った段階ではサンプルに含まれていたタグの残った組換えアクチンをその後の精製で除けていることを確認することができた。タグを切断・除去した精製組換えアクチンとしての最終収量は元のタグ付き精製組換えアクチンの約 1/3-1/2 であった。得られた精製組換えアクチンは F-buffer 条件下で重合した(図 1-4A)。重合したアクチンの線維像を電子顕微鏡により観察した結果(図 1-4B)、タグを除いたことにより、タグ付きアクチンを重合した際に示されていた束化傾向(図 1-3C)は見られなくなった。

得られた電子顕微鏡像より線維像を切り出し、フーリエ変換することによって回折パターンを得た(図 1-4)。回折パターンには右巻き二重らせん、左巻き一重らせん、右巻き一重らせんに由来する層線が認められ、これらは全て典型的なアクチンフィラメントの周期と一致していた。

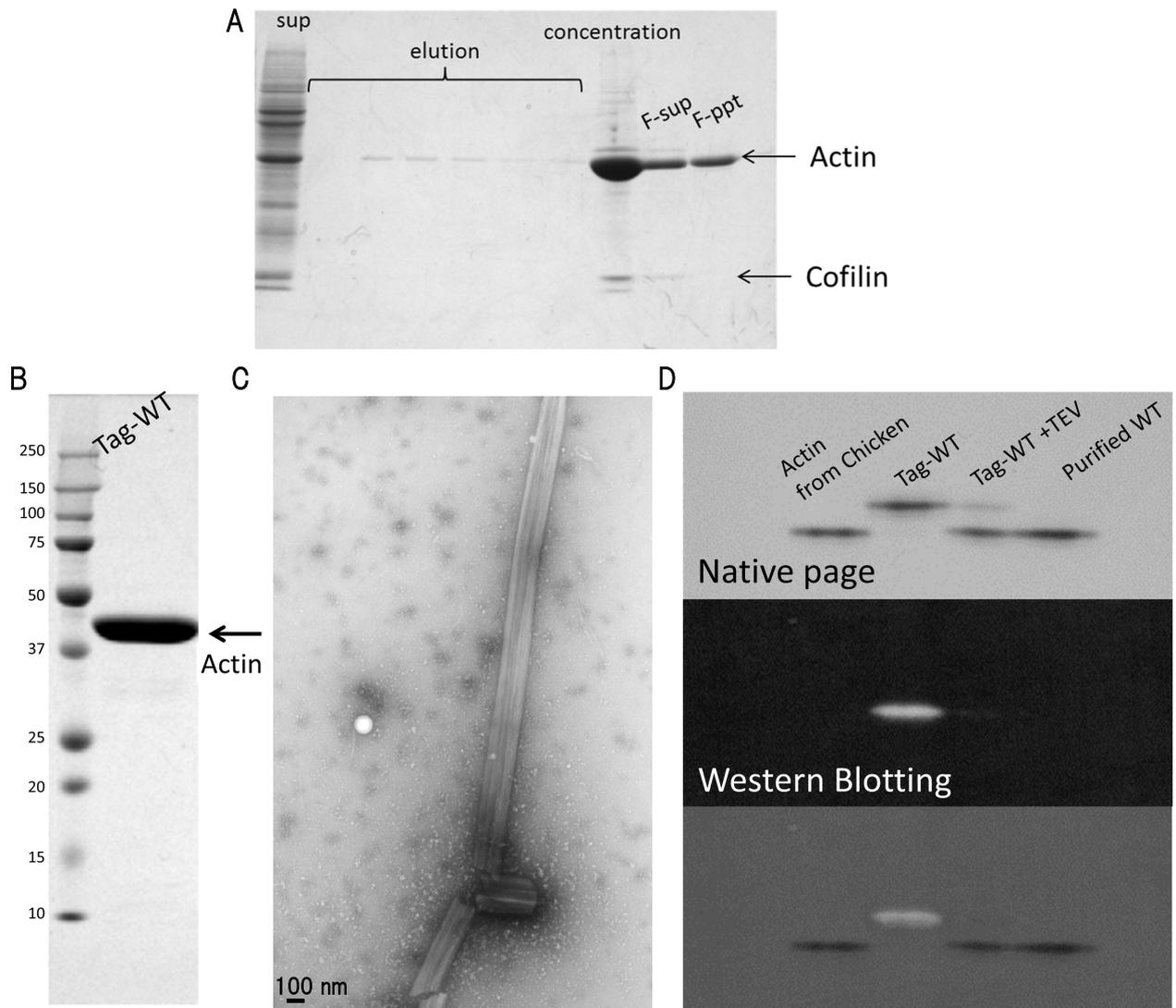


図 1-3 組換えアクチンの精製

A. 左から、組換えアクチン発現細胞を破碎した際の、可溶性画分(sup)、可溶性画分をアフィニティーカラムに通した際の組換えアクチンを含む溶出画分(elution)、溶出画分を濃縮した物(concentration)、それを重合させた上清画分(F-sup)と沈殿画分(F-ppt)。アフィニティー精製時には含まれていた昆虫細胞由来のコフィリンを含むアクチン結合蛋白質は重合時にはそのほとんどが除けている。

B, C. 精製後のタグ付きアクチンはシングルバンドとして確認できるほどの純度であった。タグ付きアクチンは重合させると強い束化傾向を示した(スケールバー:100nm)。

D. Native page 及び Western Blotting によるアフィニティータグの有無の確認。左からマーカーとしてのニワトリ骨格筋由来のアクチン(Actin from Chicken)、タグ付き組換えアクチン(Tag-WT)、タグ付き組換えアクチンに TEV プロテアーゼ処理を行ったもの(Tag-WT+TEV)、その後の精製を経た精製組換えアクチン(Purified WT)。Native page により、タグの有無を泳動度の違いとして可視化できた。タグのついていない昆虫細胞由来のアクチンが混入した場合、Tag-WT レーンにおいて、タグ無しアクチン(Actin from chicken 等)と同じ泳動度のバンドがみられるはずだが、Tag-WT がタグ付き、Purified WT

にタグ無しの泳動度のアクチンのみが認められたことから、精製アクチンに昆虫細胞由来のアクチンは含まれていないこと、タグの残った組換えアクチンを除けていることが確認できた。

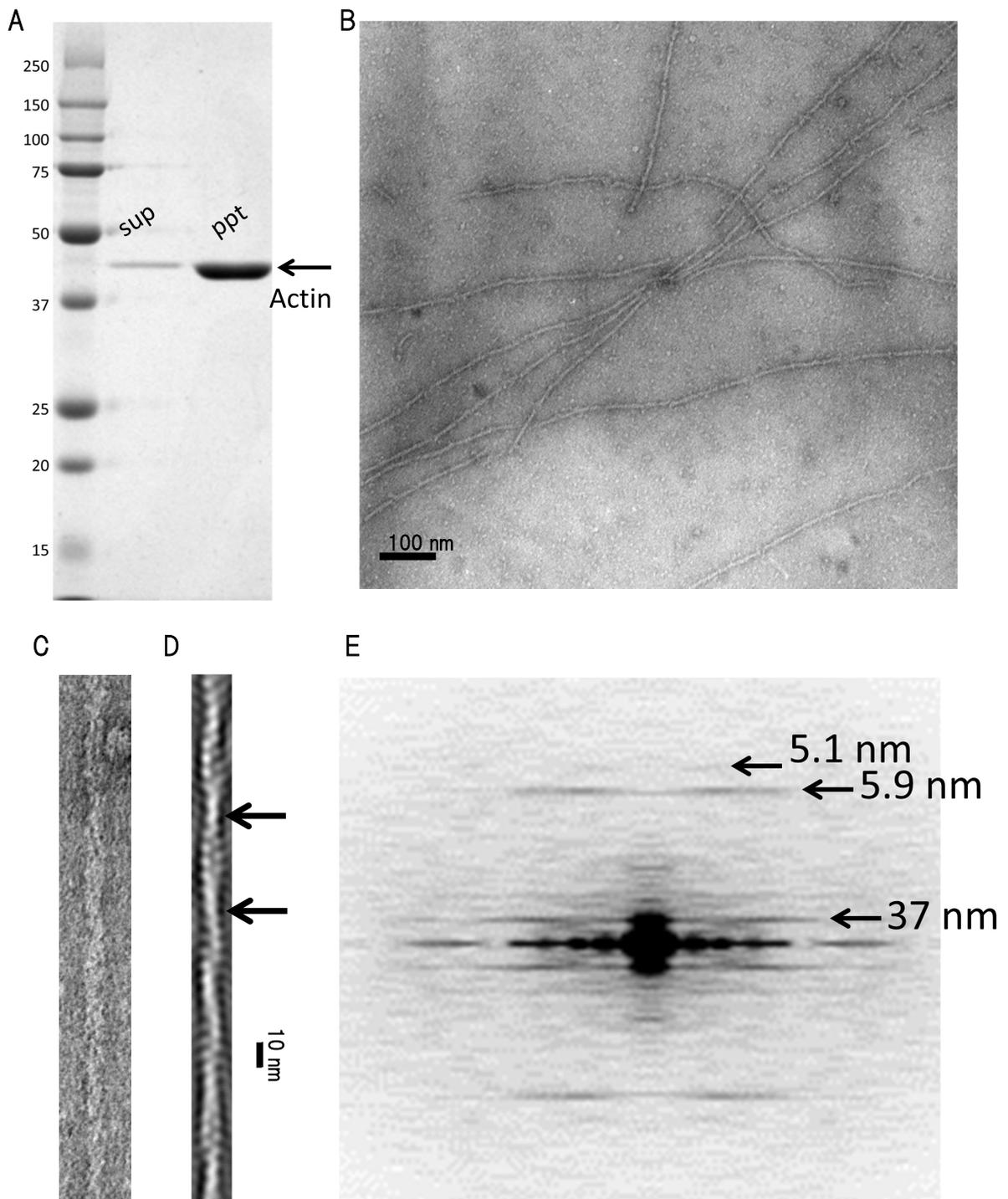


図 1-4 組換えアクチンの機能確認

A. 重合能の確認。左から分子量マーカー、超遠心後の上清画分(sup)と沈殿画分(ppt)。  
 B, C, D, E. 電子顕微鏡によるアクチン線維の観察・解析。電子顕微鏡にて撮影した像(B)から、アクチン線維を切り出し(C)、バンドパスフィルタをかけたものをDに示した。アクチン線維のらせん構造の1周期であるクロスオーバーリピートを矢印にて示した。Eに15本のアクチンフィラメントから得られたフーリエパターンを示した。矢印で示した層線は、組換えアクチン線維の右巻き2重らせん(37nm)、右巻きの1重らせん(5.9nm)、左巻きの1重らせん(5.1nm)の周期をそれぞれ表している。

## 1-4 考察

本研究では、バキュロウイルス-昆虫細胞を用いた組換え $\beta$ -アクチンの発現方法および高純度の $\beta$ -アクチンの精製方法を確立した。

基とした組換えヒト心筋 $\alpha$ -アクチン発現精製系では、蛋白質を変性させない程度の弱いカオトロピック試薬として働き、アクチンの可溶化に適しているとされる 191 mM-Tris を含んだ溶液で組換えアクチンの抽出を行い、その溶液条件下でゲル濾過クロマトグラフィーを行うことで昆虫細胞由来のコフィリンの分離を行っていた。本発現系では 1 M-Tris 溶液、あるいは 2 mM-Tris の条件では発現したアクチンのアフィニティーカラムへの結合が弱く、昆虫細胞由来のアクチンや他の蛋白質と分離することができなかつたことから、20mM-Tris 条件にて発現アクチンの抽出を行い、同条件にてアフィニティータグを使用した精製を行うことによりゲル濾過を経ずともコフィリンを含むアクチン結合蛋白質を除くことができた。

Strep Tag II は 8 残基からなる配列で、分子量も小さく精製された蛋白質から切断せずに用いられる場合がある。上記組換え心筋 $\alpha$ -アクチンは、同じく Strep Tag II を用いて精製されている。しかし Factor Xa プロテアーゼによる切断効率は悪く、タグの有無によってアクチンの動態に大きな差異は認められなかつたため、Strep Tag II 配列とプロテアーゼ認識配列が付加したままの状態での解析を行っている。今回、プロテアーゼ処理を行わないタグ付きの組換えアクチンは強く束化する様子が観察された。しかし、プロテアーゼ認識配列とスペーサーの残基を変更したことで、タグの切断が可能となった。精製段階において Native-Page を行うことにより TEV 処理とその後の精製によりタグの残ったアクチンを取り除けていることを精製段階で確認できた。

今回得られた精製組換えアクチンは、 $MgCl_2$  および KCl 存在下で重合するというアクチンの特徴を備えている。本発現系で発現したアクチンは、精製段階を含め複数回重合・脱重合のサイクルを繰り返すことが可能であった。また電子顕微鏡像による解析からも、組織から精製したアクチンの構造と遜色ない解析結果が得られたことから、この発現系で得られる組換えアクチンは機能解析に使用しうると考えられる。

## 第 2 章 D ループ変異体(G42A/G46A)の発現及び構造・機能解析

### 2-1 序論

本章では、構築した組換え  $\beta$ -アクチン発現及び精製系を用い、アクチンのサブドメイン 2 に存在する D ループに位置する 42 番目と 46 番目のグリシンをアラニンに変異させた G42A/G46A 変異体(以下 AA と呼称)の発現を試み、その機能解析を行った。

アクチンは単量体 G-アクチンと線維状の多量体 F-アクチンの 2 つの状態において、その構造が大きく異なっている<sup>20</sup>。アクチン分子は 2 つのドメインからなり、それぞれを 2 つのサブドメインに区別することができる。インナードメインの大部分と、アウトードメインのうちのサブドメイン 1 の大部分は異なるアクチン構造間であってもほぼ同じ構造をとっており、剛体とみなすことができる<sup>21,22</sup>。G-アクチンと F-アクチンには 2 つの大きな構造的差異がある。1 つは上記の剛体領域が回転し、剛体がねじれた位置にあった G-アクチンに比べて F-アクチン中のアクチン分子は平坦になっていることである。もう 1 つはサブドメイン 2 に存在する DNase I 結合ループ(以下 D ループと呼称)の構造の変化である<sup>23</sup>。

D ループは結晶構造中では見えないことが多く、観察される少数の構造においては、必ず他の蛋白質や他のアクチンサブユニットに結合している<sup>20, 24</sup>。結晶中に認められる構造であっても、D ループは多様な構造をとっており(図 2-1A)、その構造変化の自由度の高さから D ループは天然変性の範疇に含まれるループ領域であるとみなすことができる。また、より多くの局所エネルギーの最小状態を生むことができる高い conformational freedom を D ループは持っているとも表現できる。

D ループのアミノ酸配列は種間で高度に保存されており(図 2-1A)、D ループの conformational freedom の高さも高度に保存されていると言える。その高い保存性から、D ループの高い conformational freedom がアクチンダイナミクスへ寄与している可能性が考えられた。

D ループを切断<sup>25</sup>・酸化<sup>26</sup>すると、アクチン線維の安定性が低下することが報告されている。これは、D ループが線維中のサブユニット間のインターフェイスの一部を担っているためであると考えられる<sup>20, 27</sup>。スピンラベルや蛍光ラベルを用いた実験で、D ループはアクチン線維内でも複数の立体構造をとることも示されている<sup>9</sup>。しかしながら、D ループの conformational freedom がアクチンのダイナミクスにどのように寄与しているのかは明確に示されていない。

D ループのアミノ酸配置に着目すると既知のアクチン配列全てに 3 つのグリシンが含まれている(図 2-1A)。グリシンは蛋白質に含まれる 20 種類のアミノ酸のうちで一番小さく、最も二面角の自由度が高い。D ループの conformational freedom に大きく関わっている可能性が考えられた<sup>29, 30</sup>。

本章では、D ループに位置する 42 番目と 46 番目のグリシン(図 2-1A,B)をアラニンに変

異させた AA 変異体の発現を試みた。この二重変異により、野生型アクチンのとりえた構造のいくつかをとることができなくなり、D ループの構造変化の自由度が抑制されると考えられる。

現行のアクチンサブユニット間結合を示した構造(PDB ID: 6KP8, Takeda S *et al.* 論文執筆中)を基に 2 つのグリシンをアラニンに変異させた、AA 変異体のモデルを構築した結果、変異体のアラニン側鎖はアクチンサブユニットの他の領域と衝突しないことが確認できた(図 2-1D)。従って、この AA 変異体はサブユニット間のインタラクションに影響せず、D ループの **conformational freedom** を抑制すると仮定した。

発現した変異体の 臨界濃度(critical concentration,  $C_c$ )、アクチン線維の構造、重合、脱重合速度と、アクチン線維の分解を促し、細胞内のアクチン動態を加速するコフィリンのアクチン線維への結合を、前章で発現した野生型アクチンと比較した。

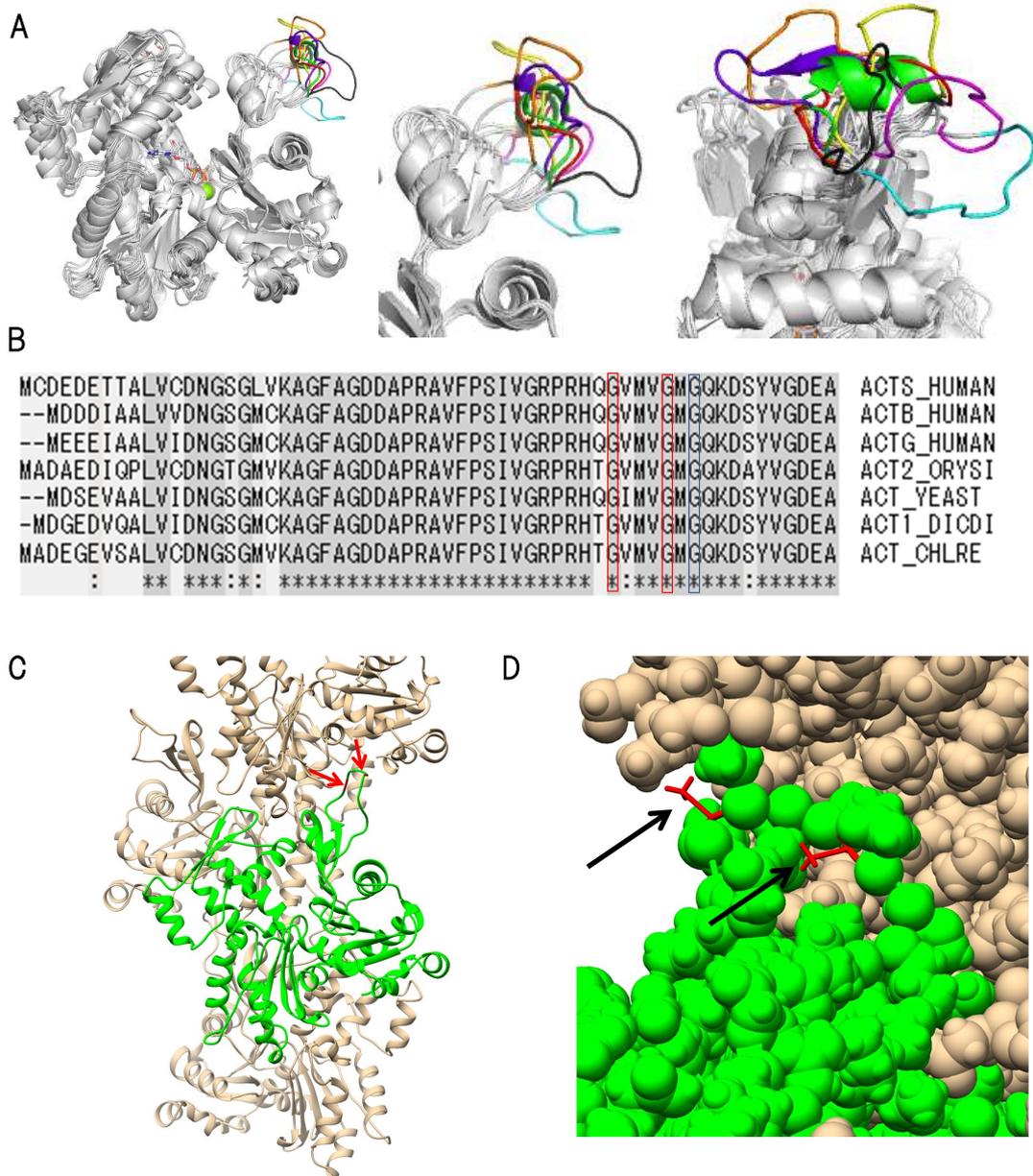


図 2-1 D ループ

A. アクチンの 7 つの結晶構造をサブドメイン 1 の剛体領域<sup>20,21</sup>を基準に重ね合わせた。左からアクチン分子全体、D ループ拡大とその 90 度回転像。D ループ(41-50)<sup>31</sup>を以下の 7 色で示した。PDB ID: 1J6Z<sup>32</sup>(緑)、6FM2<sup>33</sup>(シアン)、1IJJ<sup>34</sup>(マゼンダ)、4JHD<sup>35</sup>(黄)、4B1Z<sup>36</sup>(黒)、1ATN<sup>23</sup>(紫)、6KP8 (橙)、3DAW<sup>37</sup>(赤)。

B. アクチンの N 端領域。42 番目と 46 番目のグリシンを赤色、48 番目のグリシンを青色で示した。D ループのアミノ酸配列は種間で高度に保存されており、既知のアクチン配列全てに 3 つのグリシンが含まれている。(ACTS\_HUMAN: ヒト骨格筋  $\alpha$ -アクチン、ACTB\_HUMAN: ヒト非筋細胞  $\beta$ -アクチン、ACTG\_HUMAN: ヒト非筋細胞  $\gamma$ -アクチン、ACT2\_ORYSI: イネ(*Oryzasativa subsp. Indica*) actin-2、ACT\_YEAST: 酵母 actin 1、

ACT1\_DICDI: キイロタマホコリカビ(*Dictyostelium discoideum*) actin、ACT\_CHLRE:  
クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*) actin)

C. アクチン線維の1本のストランドの中のアクチンサブユニット間のインタラクションを示した<sup>31</sup>。1つのアクチン分子を緑色で示しその中の42番目と46番目のアミノ酸にあたるグリシンを赤色で示している。

D. 42番目と46番目の2つのグリシンをアラニンに変異させたAA変異体のバーチャルモデル。変異体のアラニン側鎖(赤色)はアクチンサブユニットの他の領域と立体的に衝突を起こさない。

## 2-2 材料と方法

### アクチン D ループ変異体(G42A/G46A)の作製

前章の組換えβ-アクチン(WT)のトランスファーベクターを鋳型として、KOD - Plus - Mutagenesis Kit (TOYOBO)を使用し変異を導入した。WTと同様の方法でトランスファーベクター、組換えバキュロウイルスを作製し、組換えアクチン変異体を発現させた。

変異体遺伝子作成のための変異導入反応に用いたプライマー配列は以下の通り(コーディング配列のみを示す)

5'-GCAGTGATGGTCGTCATGGGCCAAAAG-3'

5'-CTGGTGGCGTGGACGGCCAAC-3'

### 重合アッセイ

第1章と同様の方法で行った。

### コフィリン発現精製

コフィリンの発現・精製は Tanaka K *et al.*(2019)<sup>22</sup>に従った。

ニワトリ由来野生型コフィリンを大腸菌 BL21(DE3)株((Thermo Fisher Scientific)を用いて大量発現させた。大腸菌を破砕し、硫酸アンモニウム沈殿法により分画したコフィリンを陽イオン交換クロマトグラフィー及びゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて精製した。精製後のサンプルは 5 mM PIPES-NaOH (pH 6.6), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM DTT の溶液条件にて、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。

### コフィリン結合アッセイ

コフィリンは-80°Cで保存していたものを融解後、4°C, 451000 g, 30 分間遠心した上清を使用した。

アクチンを cofilactin buffer(15mM PIPES-KOH(pH6.6), 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM ATP)条件下で 90 分間、20°Cで重合し、目的の濃度になるように cofilactin buffer で希釈したコフィリンに重合したアクチンを加え、先を切ったチップで軽くピペッティングし、氷上で 10 分静置、4°C, 451000 g, 15 分間遠心を行った。遠心後のサンプルの上清を分取、沈殿を遠心時の液量と同量の Buffer で懸濁し電気泳動を行った。

泳動後のゲルの解析は Image-J にて行った。アプライしたコフィリン量とゲル上のバンドの濃さを基に検量線を作製し、各コフィリン濃度におけるアクチンに対するコフィリンの結合量を算出した。

### 電子顕微鏡観察試料作成

アクチンサンプルは以下のように第1章と同様に作成した。アクチンを F-Buffer 条件下 (2 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM ATP、0.2 mM DTT) で 60 分室温に置くことにより重合させたものをアクチンサンプルとした。

コフィリンがアクチン線維にモル比 1:1 で結合した構造であるコフィラクチンのサンプルは、上記コフィリン結合アッセイにて遠心にかけてのものと同様に作成した。

試料観察用グリッドは#10-1012 ELS-C10(応研商事)を使用した。上記サンプル 2 $\mu$ L とタバコモザイクウイルス(0.0548 $\mu$ g/grid)を親水化したグリッド上に添加し、酢酸ウランにて負染色を行った。

### 電子顕微鏡による観察・撮影

アクチン単独サンプルは第1章と同様に H-7650 透過型電子顕微鏡(HITACHI) を用いて、加速電圧 100 kV で観察し、ELECTRON-MICROSCOPIC FILM FG (FUJIFILM) を用いて直接倍率 40,000 倍で撮影した。得られたフィルムは GT-X970 スキャナー(EPSON) でデジタル化した。

コフィラクチンサンプルは SU9000 STEM (HITACHI)を用いて、加速電圧 30 kV、倍率 100,000 倍で観察・撮影した。

いずれも画像よりフィラメントを切り出し、フーリエ変換することによって回析パターンを得た。

### TIRF 観察用サンプルの調製

TIRF(Total Internal Reflection Fluorescence, 全反射照明蛍光顕微鏡)に使用したウサギ  $\alpha$ -骨格筋アクチンは、ウサギ骨格筋から作製したアセトンパウダーから、アクチンの重合、脱重合サイクルを利用して抽出・精製した。精製したアクチンは GTIRF バッファー(10 mM HEPES, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5)条件で、4 $^{\circ}$ Cで保管し、Alexa Fluor 488 succinimidyl ester (Thermo Fisher Scientific, #20100) で標識した<sup>38</sup>。アクチンおよび蛍光色素の濃度は、290nm(アクチン)と 491nm(Alexa Fluor 488)における吸光度を測定して、吸光係数 26600M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>、96900 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> を使用して算出した。本実験に使用したサンプルのラベル率は 98%以上と推定された。

上記の蛍光色素で標識したアクチンを GTIRF バッファー条件下の組替え精製アクチンに比率 1:4 で混ぜたものを、TIRF 観察用の標識アクチンとした。

TIRF 観察におけるアクチン重合は、50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10 mM imidazole, 100 mM DTT, 0.2 mM ATP, 0.5 % (wt/vol) メチルセルロース (1500 cP, Sigma-Aldrich)溶液条件下で、室温にて行った。

## TIRF

TIRFによる観察は、Fujiwara I *et al.*(2018)<sup>39</sup>に従った。アクチンを観察用チャンバーに固定するために 50 nM N-ethylmaleimide (NEM)処理した骨格筋ミオシンをチャンバーに塗布した。余分なミオシンは 1×KMEI バッファー (50 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM imidazole-HCl, pH 7.0)で洗い流した。

上記アクチン重合条件の溶液にアクチンをさらし、アクチン重合を開始した直後に、重合中のサンプルをチャンバーに入れ、観察を行った。個々のアクチン線維における両端の重合速度差から重合の早い B 端と遅い P 端の判別を行った。線維長が 10 $\mu$ m ほどになった段階で、1×KMEI バッファーを添加することにより遊離したアクチンモノマーを除去し、脱重合を開始した。

上記サンプルを Ti-2000 (Nikon)、EMCCD カメラ iXON3(Andor, Oxford instruments)を使用し観察した。露光時間は 500ms、15 秒間隔に設定し、撮影されているタイミング以外サンプルに光が当たらないようにした。

観察したアクチン線維の長さ変化は ImageJ およびそのプラグイン(developed by Jeffrey Kuhn (Massachusetts Institute of Technology, USA))を用いて測定した。重合および脱重合の平均速度はそれぞれの段階にある線維の 15 秒間隔の長さ変化量から見積もった。

## 2-3 結果

アクチン D ループに位置する、42 番目と 46 番目のグリシンをアラニンに変異させた G42A/G46A 変異体(以下 AA と呼称)の発現を試みた。変異体をコードした組替えウイルスを昆虫細胞に感染させたところ組換え蛋白質の発現が確認され、変異を導入しない野生型の組換え  $\beta$ -アクチン(WT)と同様の方法で精製を行うことができた。得られた精製組換え変異体アクチンは WT と同様に CBB 染色した SDS-PAGE 像からシングルバンドとして確認できるほどの純度であった(図 2-2A)。収量は 100mL Culture あたり、タグ付き精製組換えアクチンの状態で約 0.12 mg(n=6)であり、タグを切断・除去した精製組換えアクチンとしての最終収量は WT と同様に元のタグ付き精製組換えアクチンの約 1/3-1/2 であった。

導入した二重変異がアクチンサブユニット間の結合に影響を与えていないことを①F-アクチンと G-アクチン間の自由エネルギー差、②アクチン線維の構造の 2 点から確認した。

溶液中で F-アクチンと G-アクチンが平衡状態にあるとき、単量体である G アクチンの濃度はトータルのアクチン濃度に依存しない<sup>40</sup>。この単量体濃度のことを臨界濃度と呼び、F-アクチンと G-アクチン間の自由エネルギーを直接反映している。本研究では、得られた AA 変異体を F-buffer 条件下で重合し、超遠心にかけて、AA 変異体の重合能及び WT と AA の超遠心後の上清に含まれるアクチンのバンドの電気泳動ゲル上のバンドの濃さを比較することにより、臨界濃度の比較を行った(図 2-2B)。超遠心は 451000 g、20°C、30 分間の条件で行った。その結果、WT の上清に含まれるアクチンを 1 とした場合、AA のそれは 0,82(標準偏差 0.07)である(n=4)。

この結果について、t 検定を行ったところ、誤差が小さいため、この差は有意であると示された( $t=-5.29$ ,  $df=3$ ,  $p=0.013$ )が、大きな差とはいえない。

次に WT と同様に AA 変異体を重合させ、そのアクチン線維の構造(層線の位置)を確認した結果、その層線の位置は WT と変わらず一般的なアクチンのらせん構造<sup>1,14</sup>を示しており、AA 変異はサブユニット間結合にらせん周期レベルで影響を及ぼさないことが確認された(図 2-3)。

また、WTとAA変異体について、TIRFによる観察を行った。本研究で構築したアクチン発現・精製法では、多量のアクチンを得ることはできなかったため、精製組換えアクチンを直接標識するのではなく、Alexa488で標識した  $\alpha$  骨格筋アクチン(ニワトリ骨格筋から精製)を20%加えることで各アクチン線維の伸長を観察した(図2-4A-D)。WTとAA共に、0.3  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 0.7  $\mu$ Mの各濃度で10本以上のアクチン線維の長さ変化と遊離アクチンを重合バッファーによって洗い流した際(そのタイミングを図2-4C,Dに点線で示した。また、洗い流した後の状態を図2-4E,Fにおいて濃度0としている。)の線維の長さ変化を計測、プロットし(図2-4E,F)、線形回帰した傾きから重合速度を、y切片から脱重合速度を見積もった。標識した  $\alpha$ -アクチンを20%含んだアクチン線維は一樣には光らなかつた(図2-4A,B)ことから、標識されたアクチンは組換えアクチンによって形成された線維に組み込まれにくい可能性が考えられた。

AA変異体においても、WTと同様にB端ではP端に比べ重合・脱重合の両方が速く起きていることを確認した(図2-4C,D)。AA変異体のB端側の重合( $7.1 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )はWT( $11.0 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )に比べ遅い(図2-4E,F,表1)。このことは、D-ループに導入した変異はアクチンの迅速な会合に影響を及ぼしていることを示している。B端からの脱重合に関して、AA変異体( $0.6 \text{s}^{-1}$ )はWT( $1.8 \text{s}^{-1}$ )の約1/3の速度になっている。このことからD-ループはアクチンの解離についても機能的な役割を果たしていることが示された。B端の脱重合速度の低下により、AAの臨界濃度( $0.09 \mu\text{M}$ )は、WTのそれ( $0.17 \mu\text{M}$ )に比べ、低くなっていた。TIRFの観察結果から見積もったWTとAAの臨界濃度の比(AA/WT)は $0.5 \pm 0.2$ であり、その誤差を考慮すると重合アッセイにて測定した臨界濃度比( $\sim 0.8$ , 図2-2B)と統計的に異ならない( $P > 0.05$ , 正規分布に従うと仮定)。P端の重合・脱重合に関しては、いずれもWTに比べ遅くなっていた。P端におけるダイナミクスの測定は、その速度の遅さから難しく、重合については有意差が認められたものの、脱重合に関してはその差は統計的に有意とは言えなかった。

以上のTIRFによる観察結果をまとめると、Dループのグリシンを変異させることにより、アクチンの重合および脱重合は遅くなったと示された。

また、アクチン線維の切断分解を担うコフィリンのアクチン線維への結合が、変異によってどのような影響を受けるかを評価した。コフィリンの結合は協同的であり、アクチン線維上でコフィリンのクラスターが形成される<sup>41-44</sup>。アクチンと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、コフィラクチンと呼ばれるコフィリンで飽和したアクチン線維となる<sup>45</sup>。

まず、重合したアクチンに対し、コフィリンを過剰量(9倍量)加え、コフィラクチン化した線維像を電子顕微鏡にて観察した。WT・AA いずれも、アクチン単独の線維に比べらせんピッチの短い典型的なコフィラクチンフィラメントの周期<sup>22,45</sup>を示し、変異の導入により現在の解像度で認められるレベルの構造は変わらないことが示された(図2-5)。

各アクチンに対するコフィリンの結合の強さを評価するため、コフィリンをアクチンと同濃度加え、超遠心を行った。沈殿として現れたコフィリンの量を見積もることで、コフィリンの結合量を評価した(図2-5)。試行を3回行った結果、WTに対するコフィリンの結合量は平均 $1.5 \mu\text{M}$ である一方AAに対しては $0.5 \mu\text{M}$ であった。t検定により、当該結果に有意差が認められた( $t=4.97$ ,  $df=4$ ,  $p=0.008$ )。変異を導入したことにより、低濃度のコフィリン条件において、コフィリンの結合量が減少していることが示された。

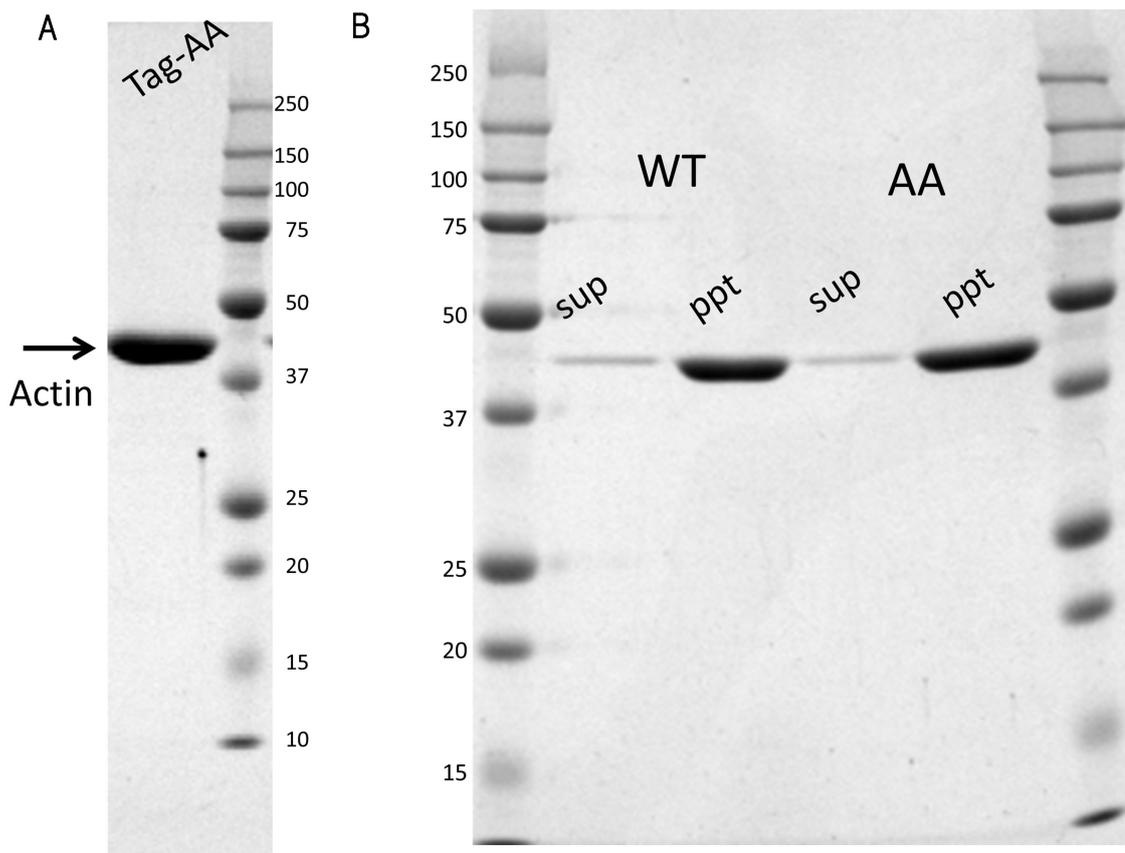


図 2-2 AA 変異体アクチンの精製・臨界濃度

A. 精製後のタグ付きアクチンはシングルバンドとして確認できるほどの純度であった。

B. 野生型(WT)と変異体(AA)をそれぞれ重合させたサンプルを超遠心にかけることにより、臨界濃度の比較を行った。両端は分子量マーカーであり、左から野生型(WT)の上清画分(sup)と沈殿画分(ppt)、変異体(AA)の上清画分(sup)と沈殿画分(ppt)。WT の上清に含まれるアクチンを 1 とした場合、AA のそれは 0,82(標準偏差 0.068)であり(n=4)、誤差が小さいため有意な差が認められたが、その差は大きくない( $t=-5.29$ ,  $df=3$ ,  $p=0.013$ )。

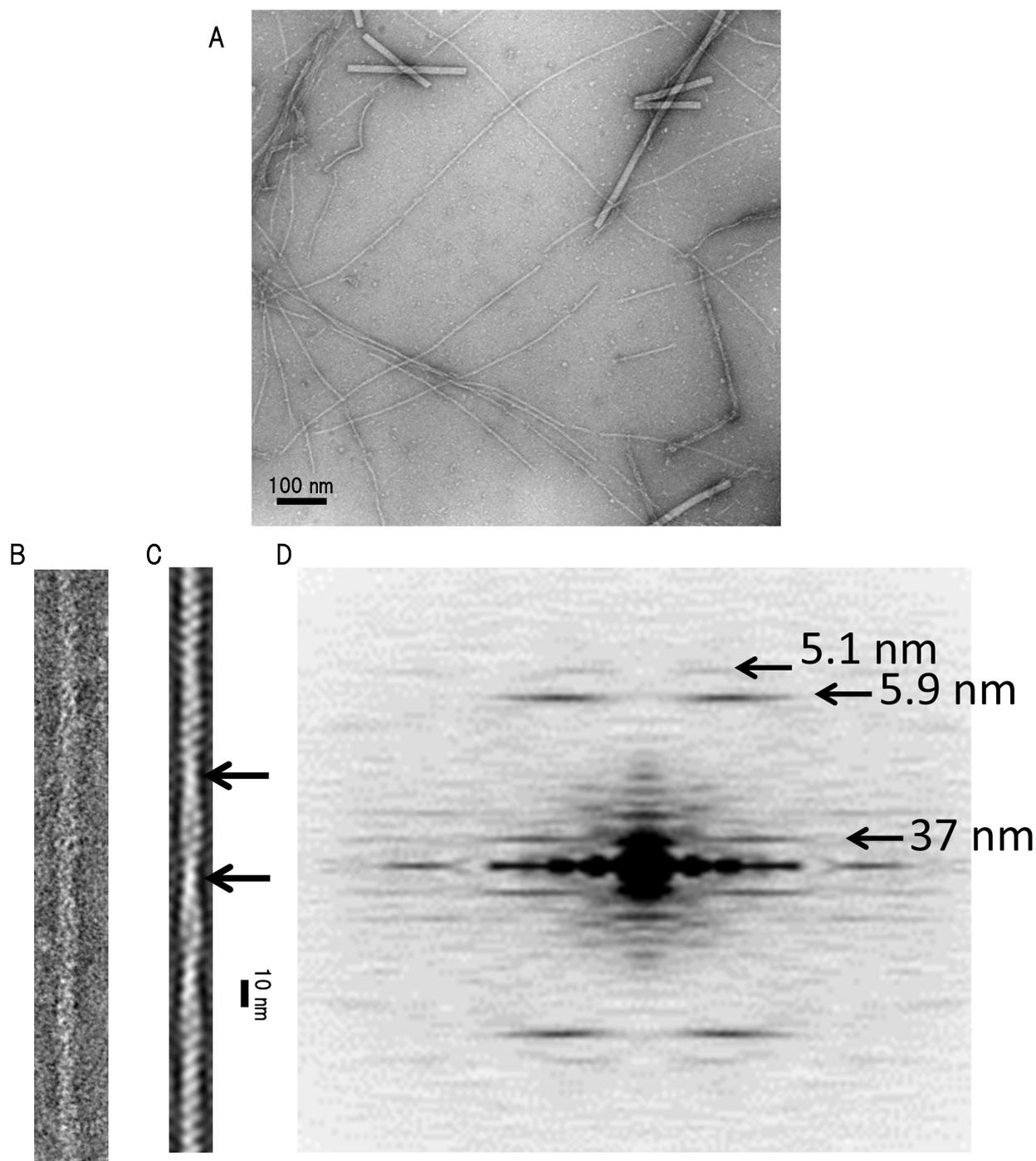


図 2-3 変異アクチンの構造解析

電子顕微鏡によるアクチン線維の観察・解析。電子顕微鏡にて撮影した像(A)から、アクチン線維を切り出し(B)、バンドパスフィルタをかけたものを C に示した。アクチン線維のらせん構造の 1 周期であるクロスオーバーリピートを矢印にて示した。D に 18 本のアクチンフィラメントから得られたフーリエパターンを示した。矢印で示した層線は、AA 変異体アクチン線維の右巻き 2 重らせん(37nm)、右巻きの 1 重らせん(5.9nm)、左巻きの 1 重らせん(5.1nm)の周期をそれぞれ表しており、野生型(図 1-4)と同様であった。

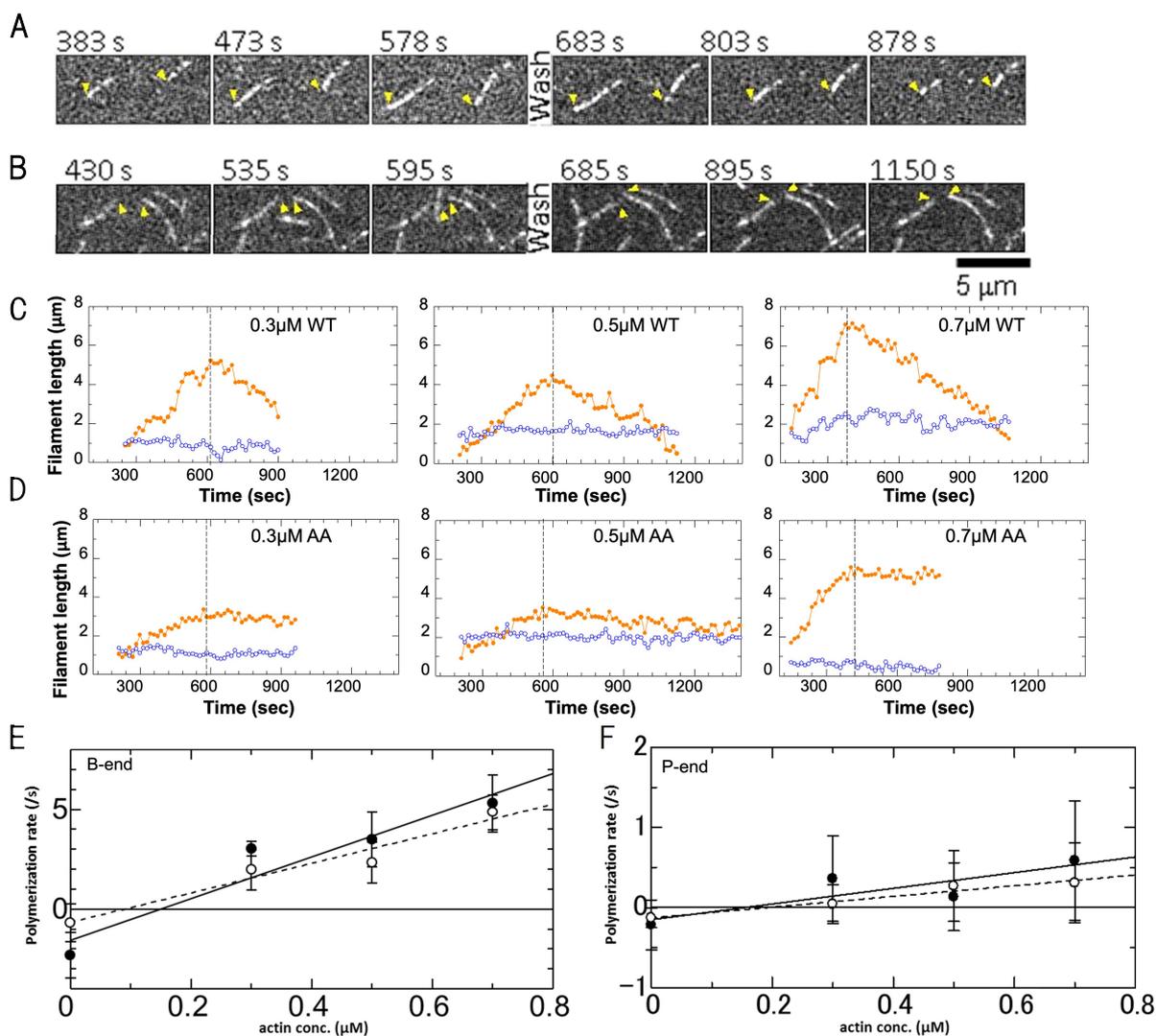


図 2-4 TIRF によるアクチン線維の重合脱重合直接測定

A,B アクチン濃度  $0.3\mu\text{M}$  における時間経過像(A:WT, B:AA)。黄色い鎌で B 端を示している。単量体アクチンの重合を開始したタイミングを 0 とした経過時間を各画像の上部に示し、遊離アクチンの除去を行った時点を”Wash”で示した。

C,D アクチン各濃度における重合・脱重合時のアクチン線維の長さ変化の代表例を示した(C: WT, D: AA)。右上の数字はそれぞれアクチン濃度を示し、赤で B 端、青で P 端を示している。遊離アクチンの洗い流しを行い、脱重合を開始させた時点を点線で示した。

E,F WT および AA の線維の B 端の重合・脱重合速度を E に、P 端の重合・脱重合速度を F に示した。濃度 0 は遊離アクチンを重合バッファーによって洗い流した際の線維の長さ変化を元としている。それぞれ WT を黒丸と実線で、AA を白丸と破線で示している。それぞれの値は各条件で 10 本以上のアクチン線維の長さ変化を平均して求めた(エラーバーは標準偏差)。

	WT		Mutant	
	B-end	P-end	B-end	P-end
$k^+$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$11.0 \pm 0.8$	$1.1 \pm 0.2$	$7.1 \pm 0.6$	$0.7 \pm 0.1$
$k^-$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$1.8 \pm 0.3$	$0.19 \pm 0.08$	$0.6 \pm 0.2$	$0.13 \pm 0.06$
$C_c$ ( $\mu\text{M}$ )	$0.17 \pm 0.03$	$0.18 \pm 0.09$	$0.09 \pm 0.03$	$0.2 \pm 0.1$
N	46	56	52	50

表 1 WT・AA の各線維端の重合・脱重合速度および臨界濃度

各アクチン濃度における伸長速度を計測し、線形回帰した傾きから重合速度( $k^+$ )を、y 切片から脱重合速度( $k^-$ )を見積もった(図 2-4 参照)。臨界濃度( $C_c$ )は同グラフの x 切片から算出した。各値には標準誤差を示した。計測数を N に示した。

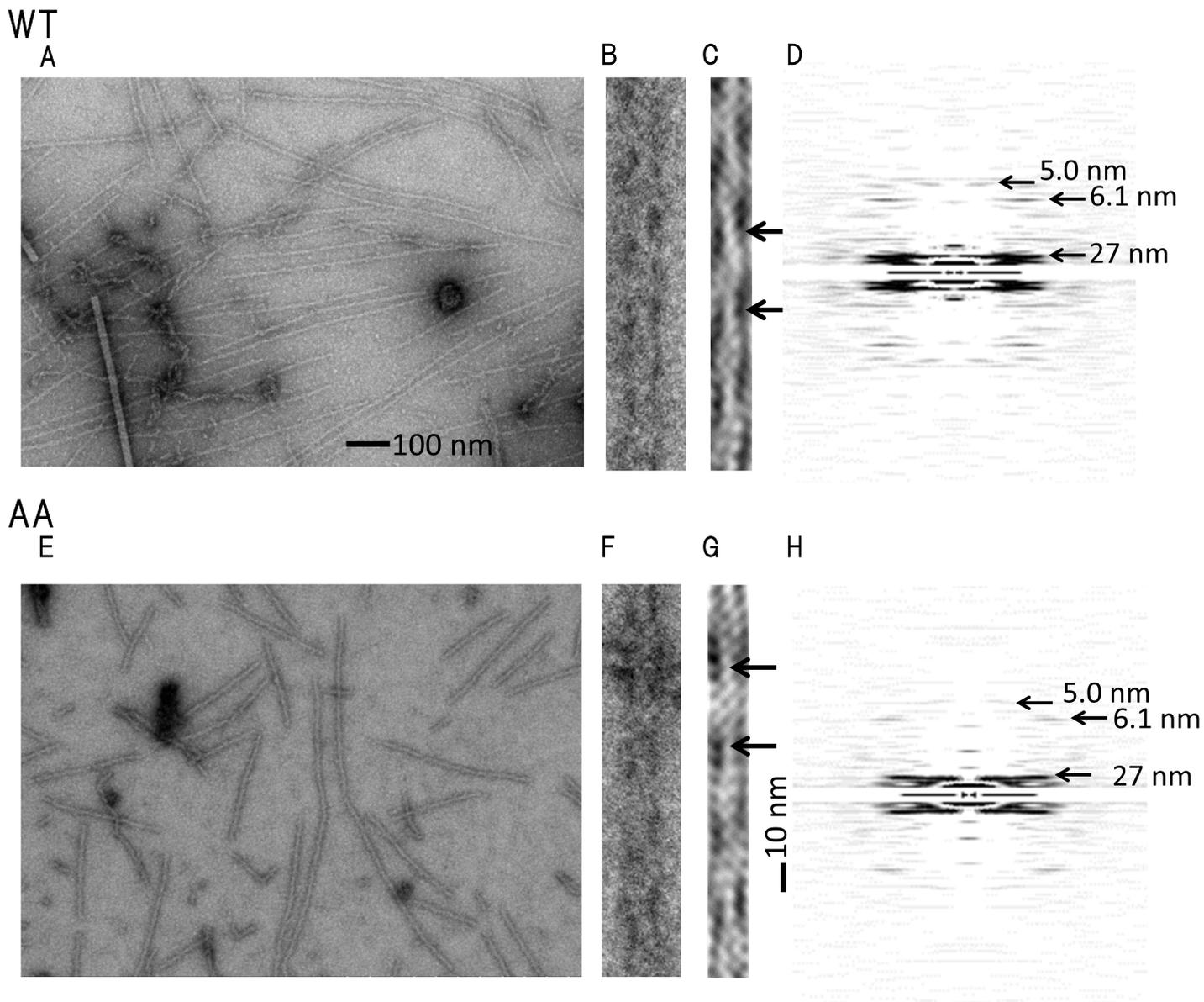


図 2-5, 電子顕微鏡によるコフィラクチン構造の解析

WT(A-D)、AA(E-H)のそれぞれについて、重合後の線維にコフィリンを結合、コフィラクチン化し、電子顕微鏡で観察を行った。撮影像(A,E)から、線維を切り出し(B,F)、バンドパスフィルタをかけたものを C,G に示した。クロスオーバーリピートを矢印にて示した。D に WT15 本、H に AA16 本から得られたフーリエパターンを示した。矢印で示した層線は、コフィラクチンの右巻き 2 重らせん、右巻きの 1 重らせん、左巻きの 1 重らせん周期をそれぞれ表している。両者に差は認められず、いずれも典型的なコフィラクチン周期を示していた。

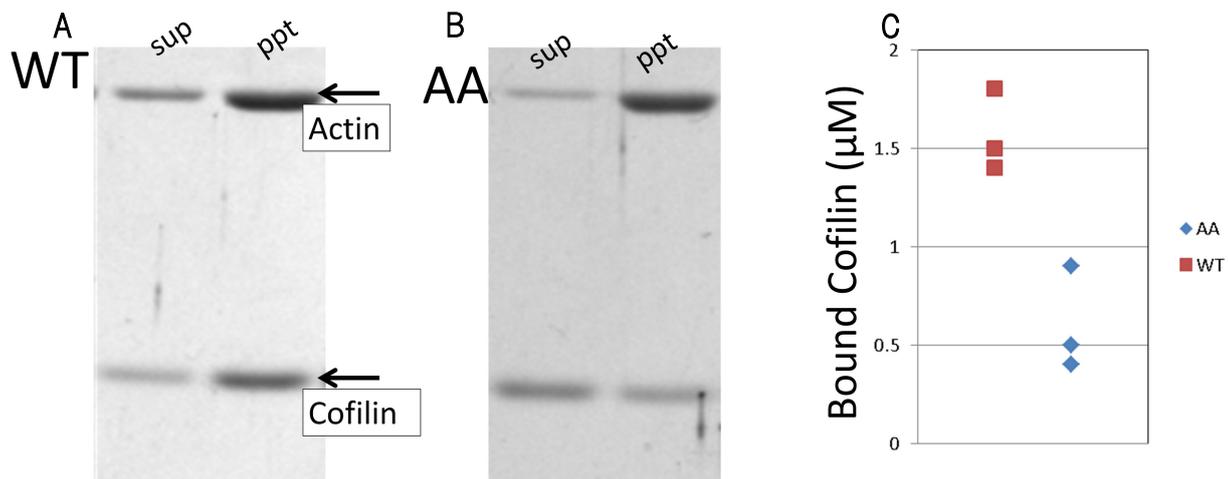


図 2-6 コフィリン結合アッセイ

重合させた  $2\mu\text{M}$  アクチンに対し同濃度のコフィリンを結合させ、超遠心することによりアクチン線維に対するコフィリンの結合量を調べた(A:WT, B:AA, いずれも左レーンが超遠心後の上清画分(sup)、右レーンが超遠心後の沈殿画分(ppt))。コフィリン分子単独では本遠心条件において沈殿しないが、アクチン線維に結合した場合、線維と共に沈殿する。

結果、WT に対するコフィリンの結合量は平均  $1.5\mu\text{M}$  である一方 AA に対しては  $0.5\mu\text{M}$  であった(C)。t 検定により、当該結果に有意差が認められた( $t=4.97$ ,  $df=4$ ,  $p=0.008$ )。

## 2-4 考察

本章では、第1章にて確立した発現系を用いて変異体の作製を試みた。

D ループに位置する 42 番目と 46 番目のグリシンをアラニンに変異させた変異体 AA アクチンは、WT に比べて重合・脱重合速度が低下した。また、アクチンに対し同濃度のコフィリンを加えた際、変異アクチンに対するコフィリンの結合が抑制された。コフィリンはそのアクチン切断・分解効果により、細胞内のアクチンダイナミクスの加速に重要であることは広く知られている<sup>47</sup>。以上の結果から、D ループの 2 つのグリシンが、線維の重合・脱重合速度およびコフィリンとの結合に重要で、この 2 つの現象を通じて、細胞内アクチンダイナミクスの速度を直接制御していることが示された。

一方で、WT と変異体の臨界濃度に大きな差は認められず(図 2-2B)、線維構造にも違いは認められなかった(図 2-3)。このことから、モデルで仮定した(図 2-1D)通り、変異はアクチン線維のサブユニット間結合には影響を与えていないと考えられる。また、過剰量のコフィリンを加えた際には AA アクチンは WT と同様にコフィラクチンを形成した。

筆者は、本研究において変異の導入によりダイナミクスが変化したメカニズムとして、D ループの conformational freedom の抑制を考える。つまり、変異導入により D ループの conformational freedom が抑制された結果、重合・脱重合に必要な D ループの構造変化が遅くなり、コフィリンが結合し辛くなったと考える。

この仮説は、近年のアクチン線維に対するコフィリンの結合モデル<sup>22,46</sup>と矛盾しない。近年の結合モデルではアクチンに対するコフィリンの結合には、D ループがアクチン線維内で隣接するサブユニットから解離することが必要であるとしており、D ループの conformational freedom が抑制された場合、コフィリンの結合速度は低下すると考えられる。それに対し D ループはコフィラクチンの線維中の他の箇所に接触していない<sup>22</sup>ことから、線維からのコフィリンの解離速度については変異導入の影響を受けないと考えられる。つまり全体として、コフィリンの結合は熱力学的に低下する。実際に、本研究において、D ループに導入した変異によりコフィリンの結合は熱力学的に低下した。

現在、細胞内のアクチンダイナミクスについては ATPase の文脈で議論されており<sup>48,49,50</sup>、D ループの寄与については明示されていない。筆者は D ループの 2 つのグリシンが細胞内のアクチンダイナミクスの速度に強い影響を与えることを示した。

しかしながら、本研究では 1 つの変異体についての解析に留まり、本変異体によるアクチン線維ダイナミクスの変化が Conformational freedom の抑制によるものであるという仮説については、実証するまでには至らなかった。この仮説を検証するためには、他の D ループ変異体を作製し、導入した変異の重合・脱重合への影響を解析することが必要であるが、構造変化の自由度がアクチンダイナミクスに影響を与える可能性を示した本研究は、アクチンの構造動態の理解、conformational freedom の蛋白質機能への影響の理解に寄与すると信じている。

## 参考文献

1. Sheterline P, Clayton J, Sparrow J. Actin. *Protein Profile*. **2** (1995)
2. Le Clainche, C. & Carlier, M.-F. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489–513 (2008).
3. Hitchcock-DeGregori, S. E. Structure-function analysis of thin filament proteins expressed in *Escherichia coli*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **14**, 12–20 (1989).
4. Karlsson, R. Expression of chicken beta-actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **68**, 249–257 (1988).
5. Chen X, Rubenstein PA. A mutation in an ATP-binding loop of *Saccharomyces cerevisiae* actin (S14A) causes a temperature-sensitive phenotype in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* **270**, 11406-14(1995)
6. Abe, A., Saeki, K., Yasunaga, T. & Wakabayashi, T. Acetylation at the N-terminus of actin strengthens weak interaction between actin and myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 14–19 (2000).
7. Noguchi, T. Q. P., Kanzaki, N., Ueno, H., Hirose, K. & Uyeda, T. Q. P. A novel system for expressing toxic actin mutants in *Dictyostelium* and purification and characterization of a dominant lethal yeast actin mutant. *J. Biol. Chem.* **282**, 27721–27727 (2007).
8. Orlova A, Chen X, Rubenstein PA, Egelman EH. Modulation of yeast F-actin structure by a mutation in the nucleotide-binding cleft. *J. Mol. Biol.* **271**,235-243 (1997)
9. Ohki, T., Mikhailenko, S. V., Arai, T., Ishii, S. & Ishiwata, S. Improvement of the yields of recombinant actin and myosin V-HMM in the insect cell/baculovirus system by the addition of nutrients to the high-density cell culture. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **33**, 351–358 (2012).
10. Iwasa, M., Maeda, K., Narita, A., Maéda, Y. & Oda, T. Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle  $\alpha$ -actin mutants. *J. Biol. Chem.* **283**, 21045–21053 (2008).
11. Vandekerckhove J, W. K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol.* 783–802 (1978).
12. Perrin, B. J. & Ervasti, J. M. The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton* **67**, 630–634 (2010).
13. Khaitlina, S. Y. Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* **202**, 35–

- 98 (2001).
14. Bergeron, S. E., Zhu, M., Thiem, S. M., Friderici, K. H. & Rubenstein, P. A. Ion-dependent polymerization differences between mammalian  $\beta$ - and  $\gamma$ -nonmuscle actin isoforms. *J. Biol. Chem.* **285**, 16087–16095 (2010).
  15. Sano, K. I., Maeda, K., Oki, M. & Maéda, Y. Enhancement of protein expression in insect cells by a lobster tropomyosin cDNA leader sequence. *FEBS Lett.* **532**, 143–146 (2002).
  16. Lu, J. X. *et al.* Cloning, soluble expression, rapid purification and characterization of human Cofilin1. *Protein Expr. Purif.* **82**, 186–191 (2012).
  17. Yasunaga, T. & Wakabayashi, T. Extensible and object-oriented system Eos supplies a new environment for image analysis of electron micrographs of macromolecules. *J. Struct. Biol.* **116**, 155–160 (1996).
  18. Mizuno, H., Tanaka, K., Yamashiro, S., Narita, A. & Watanabe, N. Helical rotation of the diaphanous-related formin mDia1 generates actin filaments resistant to cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E5000–E5007 (2018).
  19. Pinder JC, Sleep JA, Bennett PM, G. W. Concentrated Tris Solutions for the Preparation, Depolymerization, and Assay of Actin: Application to Erythroid Actin. *Anal. Biochem.* **225**, 291–295 (1995).
  20. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y. & Narita, A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441–5 (2009).
  21. Oda, T., Takeda, S., Narita, A. & Maéda, Y. Structural Polymorphism of Actin. *J. Mol. Biol.* **431**, 3217–3228 (2019).
  22. Tanaka, K. *et al.* Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nat. Commun.* **9**, 1–3 (2018).
  23. Holmes, K. C., Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D. & Pai, E. F. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**, 37–44 (1990).
  24. Narita, A., Oda, T. & Maéda, Y. Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. *EMBO J.* **30**, 1230–1237 (2011).
  25. Pivovarova, A. V., Khaitlina, S. Y. & Levitsky, D. I. Specific cleavage of the DNase-I binding loop dramatically decreases the thermal stability of actin. *FEBS J.* **277**, 3812–3822 (2010).
  26. Grintsevich, E. E. *et al.* Catastrophic disassembly of actin filaments via Mical-mediated oxidation. *Nat. Commun.* **8**, 1–10 (2017).
  27. von der Ecken J, Muller M, Lehman W, Manstein DJ, Penczek PA, R. S. Structure of the F-actin-tropomyosin complex. *Nature* **519**, 114–117 (2015).
  28. Durer, Z. A. O. *et al.* Structural states and dynamics of the D-Loop in actin.

- Biophys. J.* **103**, 930–939 (2012).
29. Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. Conformation of Polypeptides and Proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283–437 (1968).
  30. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7**, 95–99 (1963).
  31. Popp, D., Kabsch, W., Holmes, K. C. & Gebhard, W. Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44–49 (1990).
  32. Otterbein, L. R., Graceffa, P. & Dominguez, R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADR state. *Science (80-. )*. **293**, 708–711 (2001).
  33. Kotila, T. *et al.* Structural basis of actin monomer re-charging by cyclase-Associated protein. *Nat. Commun.* **9**, 1–12 (2018).
  34. Bubb, M. R. *et al.* Polylysine induces an antiparallel actin dimer that nucleates filament assembly: Crystal structure at 3.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **277**, 20999–21006 (2002).
  35. Chen, X. *et al.* Structural Basis of Actin Filament Nucleation by Tandem W Domains. *Cell Rep.* **3**, 1910–1920 (2013).
  36. Mouilleron, S., Wiezlak, M., O'Reilly, N., Treisman, R. & McDonald, N. Q. Structures of the phactr1 RPEL domain and RPEL motif complexes with G-actin reveal the molecular basis for actin binding cooperativity. *Structure* **20**, 1960–1970 (2012).
  37. Poukkula, M., Kremneva, E., Serlachius, M. & Lappalainen, P. Actin-depolymerizing factor homology domain: A conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. *Cytoskeleton* **68**, 471–490 (2011).
  38. Mahaffy, R. E. & Pollard, T. D. Kinetics of the formation and dissociation of actin filament branches mediated by Arp2/3 complex. *Biophys. J.* **91**, 3519–3528 (2006).
  39. Fujiwara, I., Zweifel, M. E., Courtemanche, N. & Pollard, T. D. Latrunculin A Accelerates Actin Filament Depolymerization in Addition to Sequestering Actin Monomers. *Curr. Biol.* **28**, 3183-3192.e2 (2018).
  40. Oosawa, F. & Kasai, M. A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J. Mol. Biol.* **4**, 10–21 (1962).
  41. 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).
  42. 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).

43. Ngo, K. X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T. & Uyeda, T. Q. Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *Elife* **4**, e04806 (2015).
44. 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).
45. McGough, A., Pope, B., Chiu, W. & Weeds, A. Cofilin changes the twist of F-actin: Implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* **138**, 771–781 (1997).
46. Narita, A. ADF/cofilin regulation from a structural viewpoint. *J. Muscle Res. Cell Motil.* (2019). doi:10.1007/s10974-019-09546-6
47. Kanellos, G. & Frame, M. C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 3211–3218 (2016).
48. Fujiwara, I. *et al.* Polymerization and depolymerization of actin with nucleotide states at filament ends. *Biophys. Rev.* **10**, 1513–1519 (2018).
49. Pollard, T.D. & Borisy, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* **112**, 453–465 (2003).
50. Carlier, M.F. & Pantaloni, D. Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J. Biol. Chem.* **282**, 23005–23009 (2007).

## 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導・ご支援を受け賜りました多くの方々に深く感謝を申し上げます。

成田哲博准教授には、電子顕微鏡の技術指導に始まり、本研究の全般においてご指導・ご助力いただき、いつまでもデータをまとめはじめない私に辛抱強くご鞭撻くださり、大学を離れた後も研究を再開できる環境を与えて続けていただきました。前田雄一郎博士には、学部4年時の研究室配属時よりご指導いただきました。しばしば隣の席に座ってはアクチンのこと・構造生物学のこと・研究のこと・人生のこと多くを学ばせていただき、議論させていただきました。武田修一博士には、研究室配属時より実験の技術指導・研究の進め方の根幹をご教授頂きました。大学院入試前、精製系の立ち上げに際しネガティブデータを見続けている私が研究を嫌いにならないようにとご自身の研究の実験の一部を任せて下さり、この結果・性質は今初めて観測されたのかもしれないという実感をわかせて下さらなければ私はここまで研究を続けていませんでした。

加島紗瑛さんと前田佳代博士のお二人によるベクターの作製、 $\beta$ -アクチンの発現・精製についてのトライ&エラーの蓄積がなければ本研究は存在しませんでした。またお二人にはそれぞれ研究もそれ以外のことも相談に乗っていただきました。前田研究室の先輩でもある岩佐充貞博士には $\alpha$ -アクチン発現系の構築時のお話を伺い、ご助言をいただきました。尾西博文博士には細胞培養についてご指導をいただき、何度も細胞をご提供いただきました。法政大学林真人助手には、**native-page**によるタグ有無の検出方法の開発についてご助力いただきました。菊本真人博士には様々な実験に際し実験装置の使い方をご指導いただきました。九州工業大学田中康太郎博士にはコフィリンの発現系をご提供いただき、その発現・精製方法をご指導いただきました。松本友治博士には画像処理・**western blotting**等ご指導いただきました。特に各種画像処理については、毎度唐突に質問する私に対し辛抱強く・丁寧に道を示していただきました。東海学院大学小田俊郎教授には変異導入によるアクチンへの影響について、**MD**シミュレーションを実施して頂き、構造的な考察・議論をして頂きました。大阪市立大学藤原郁子助教授には**TIRF**による観察を実施していただき、その結果についても幾度も議論していただきました。また、論文の**figure**デザインについてもご教示いただきました。滝口金吾講師には研究や趣味のことをいつも長々と議論していただき、レビュワーコメントの受け止め方についてもご助言いただきました。また、創薬科学研究科廣明秀一教授、天野剛志招聘教員、天野名都子博士をはじめ廣明研の皆さまにはミーティングに参加させていただき議論をする機会を頂いたほか、様々なことをご助言いただきました。研究室秘書の高見順子様には書類手続き・メールの文面等いつも助けられていました。それ以外にもここ書ききれない友人・後輩・研究や人生の先輩方多くの方に支えていただいた研生活でした。

最後に、納得するまで続けなさいと長きにわたる大学生活を支え続けてくれた両親・家族に心より感謝いたします。