

## ERATO 前田アクチンフィラメント動態プロジェクト中間評価報告書

研究総括：

前田 雄一郎 【名古屋大学大学院理学研究科／教授 兼 理化学研究所播磨研究所／客員主管研究員】

研究体制：

アクチンフィラメントの構造と動態グループ（理化学研究所播磨研究所）

カルシウム調節のメカニズムグループ（理化学研究所播磨研究所）

細胞内アクチン制御システムの構造と機能グループ（名古屋大学）

評価委員（あいうえお順、○は主査）：

大岩 和弘 【情報通信研究機構未来 ICT 研究センター／研究リーダー】

木下 一彦 【早稲田大学理工学術院／教授】

豊島 陽子 【東京大学大学院総合文化研究科／教授】

永井 克孝 【東京大学名誉教授】

○若林 克三 【大阪大学名誉教授】

上記5名の評価委員は、事前にプロジェクトより配布された資料（評価資料）を精読し、2006年12月19日に理化学研究所播磨研究所において中間評価会を実施した。前田研究総括や研究員らが、プロジェクトの概要や研究成果、および今後の展望に関する発表を行い、さらに評価委員との間で質疑応答が行われた。これらをもとに、本報告書は作成されている。

総合評価：優（Very Good）

### 1. はじめに

アクチンフィラメントは、細胞に最も多量に含まれるたんぱく質であるアクチン分子によって構成され、その重合・脱重合による伸張や収縮に伴い、長さを変え、移動することで、筋収縮や細胞内制御といった、生体の生存に関わる重要な機能を果たす。前田雄一郎・名古屋大学大学院理学研究科教授を研究総括（以下、総括と略す）とする「ERATO前田アクチンフィラメント動態プロジェクト」は、筋のカルシウムイオン

(Ca<sup>2+</sup>) 調節メカニズムを解明することと、得られた知見や技術を多くの細胞内現象に適用することにより、これらの普遍化を実現することを全体の研究目標としている。プロジェクトが抱える個々の研究テーマにおける、生物物理学的・細胞生物学的知見を統合および融合することで、アクチンフィラメントの原子構造と動態に関する総合的理解を行い、さらにそれらを派生させて、たんぱく質機能発現メカニズムの本質を理解しようとする現在の研究枠組みは、戦略目標「遺伝子情報に基づくたんぱく質解析を通じた技術革新」にも資するものと考えられる。

本プロジェクトは、3つの研究グループ・総勢24名（2006年11月現在）から構成されるが、研究活動においてはグループ構成にとらわれることなく、研究員どうしの有機的連携により、次章で紹介する5つの大きな研究テーマに取り組んでいる。NMR測定のアキハタ正恒博士や中性子回折の藤原悟博士、ダイナクチン複合体の発見者であるTrina A. Shroer博士らとの協力関係もまた、同プロジェクトの運営に重要な位置づけとなっている。

次章以降は、プロジェクトが現在取り組んでいる5つの大きな研究テーマ、およびプロジェクト運営に関して、第三者に対してそれらの現状を報告するとともに、今後への提言を盛り込んだものである。約5年間のプロジェクト運営に貢献する前田総括や全ての研究員に対し、その中間時期を迎えるこの期において、単にこれまでの研究成果等を「批評する」ことは、容易であるが有益には作用しないのは明白である。ERATOが我が国でも有数の大型研究開発投資であることを考慮しつつ、本報告書が、残る研究期間での取り組みを、公平（そして、ある意味厳正な）目で「励ます」意味をより強く伴ったものであることを願い、評価委員から挙げた多くの提言を残さず盛り込んだ。今後のプロジェクト推進のうえで、本報告書における提言が少しでも参考となるようであれば、我々としても喜ばしい限りである。

## 2. 各研究テーマに対する評価

### (1) 複合体の原子構造解明

本テーマでは、アクチン・トロポミオシン・トロポニンからなる長さの揃ったミニフィラメントを調製し、これを結晶化し、原子構造を解明することを大きな研究目標に定めている。アクチンの多様な細胞内機能を考えれば、アクチン複合体の機能と構造との相関を理解することは、生命現象のさまざまな営みの本質を理解する上でも重要であり、こうした研究取り組みは高く評価されたい。本テーマの現在の具体的研究課題は、

#### (i) CapZ-アクチンフィラメント B 端複合体の構造解明

## (ii) ダイナクチン複合体全体の分子配置の解明

である。

(i) においては、クライオ電子顕微鏡写真の新しい解析方法を確立することによって、アクチンフィラメント自身の末端構造とアクチンフィラメント-CapZ 複合体の末端構造を 23.5 オングストロームの分解能で決定し、これをもとにして、CapZ によるアクチンフィラメントの伸張短縮の制御メカニズムを解明している。揺らぎをもつ構造の解析に、単粒子解析を適用可能にした点はユニークである。この方法でフィラメントのもう一端の構造とそこに結合する formin などの結合様式の解明を目指している。また本画像解析法は、ダイニン-微小管複合体に対しても適用可能であることが示され、ストーク部分が固くしかもその微小管に対する角度が決定するという示唆が得られている。これがより確かなものとなれば、現在解明の途についたばかりのダイニン運動機構の研究に一石を投じるであろうし、またこの解析技術自体がより普遍化していく可能性をもつ。従ってこれからの研究展開や、総括を中心とした戦略性には大きく期待したい。さらに提言を与えるとするなら、ミニフィラメントの作製においては、キャップたんぱく質だけで可能であろうかということを検討してもらいたい。長さを規定するためには、例えばダイナクチン p150 の C 末フラグメントに相当するようなツールを用いてごく短いミニフィラメントを作製し、その機能を評価した上で、短いミニフィラメントの結晶化につなげるということも考えられるのではないだろうか。

また (ii) においては、ダイナクチン複合体の 2 次元投影像を得ることに成功している。今後 3 次元解析が進めば、Arp1 ミニフィラメントの「長さ決定メカニズム」の詳細が解明されることとなり、本プロジェクトの大きな目標でもあるアクチンミニフィラメント形成にも寄与すると思われる。Arp1 の長さを規定する因子は p150 の C 末側の領域であることが知られているので、この領域をリコンビナントのフラグメントとして用い、精製 Arp1 と混ぜて、長さのそろった Arp1 フィラメントをつくり、構造解析（単粒子解析あるいは結晶化）を試みることも可能かも知れない。

さらに、単分子解析法の利点を生かした研究として、ミオシン頭部がアクチンフィラメントにランダムに結合しているときの結合部分のアクチンと、そうでない部分のアクチンとの構造的違い、あるいはミオシン結合によるアクチンの協同的構造変化の振る舞いなどの解析が考えられる。

これらの研究テーマに代表される、電子顕微鏡を中心とした構造解析は、研究対象の持つ生物学的重要性の高さも相まって、本プロジェクトからさまざまな発展を今後もたらさうと期待できる。国内外での波及効果も大きいので、是非とも特徴や強みを活かしながら、(人的配置も考慮して) 引き続き力強く推進してもらいたい。

## (2) 筋のカルシウム調節のメカニズムの研究：構造の解明

トロポニン・トロポミオシン・アクチン複合体の構造変化は、筋収縮制御の中心的役割を果たすものであり、長年未解決であった構造変化の解明は、本プロジェクトでも重要な位置づけを担っている。本テーマに関連した主要研究課題は、以下である。

- (i) トロポニン・トロポミオシン（・アクチン）複合体の結晶化と結晶構造解明
- (ii) トロポミオシンの結晶化
- (iii) クライオ電子顕微法によるアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の中間程度の分解能での構造解析
- (iv) フィラメント配向ゾルの X 線繊維回折法によるアクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体の構造解析
- (v) アクチンフィラメント上でのトロポミオシン・トロポニンの構造変化

(i) および (ii) に関しては、トロポミオシン分子自体の柔軟性に起因する結晶化の困難さという問題に直面しつつも、3段階の結晶化戦略を組みつつ研究を進めている（機能を考える上では、分子の柔軟性が重要な役割を持つこととなるが、構造決定ではこの柔軟性が障壁となる）。現在までに、トロポニンフラグメントによる結晶化を進め、その解析から構造多型が存在する可能性を示している他、分子の柔軟性の原因の一部を理解するなど、成果は徐々に挙がってきている。これらの知見は、トロポニン-トロポミオシン複合体結晶を得るために重要であると考えられる。なお、最終的な目的達成のためには、トロポミオシンの根本的な分子の再設計が必要となると担当者は結論しているが、この研究課題が本プロジェクトの中でも重要な位置づけを担っていることもあり、ここまで蓄積した知見を有効に活用しての結晶化に成功することを期待したい。細長く柔らかいたんぱく質は生体内にも多く存在し、様々な機能を担っているので、研究の波及効果も大きいだろう。

(iii) については、今後、トロポミオシン結晶化チームと電子顕微鏡チームとの密接な連携によって、構造解析が推進されていくことを期待する。アクチン・トロポミオシン・トロポニンの（細いフィラメント）複合体の解析に、独自に改良した電子顕微鏡観察法と単粒子解析法を適用して、中程度分解能の構造解明を並行させることは大変重要である。一方で、単粒子解析が成功してもカルシウム調節のメカニズム解明という大きな目標に到達するには、アミノ酸レベルでの構造変化を知る必要があることも付記しておきたい。

(iv) については、アクチンフィラメント配向ゾルの解析の進展を待つことになる。また (v) に関しては、中性子回折法を用いることによって、細いフィラメント複合体中の TnC の構造を解析している。カルシウムイオン結合によって TnC の中央ヘリックスが伸展することなど、その形態変化を解明している。X 線繊維解析や中性子線解析は、高分解能は期待できないが、部分構造が既知の場合などに威力を発揮する。とくに中性子線は、特定部分の重水素化によりコントラスト変調を可能とし、複合体の解析に有効である。TnC を重水素化して細いフィラメントに再構成し、フィラメント上での構造を

明らかにしたのは意義ある成果で、今後他のサブユニットの構造変化も引き続き調べるべきであろう。

本研究テーマのうち特に (i) および (ii) に関しては、トロポミオシンの結晶化という難題を備えているため、現状は試行錯誤の連続であろうが、課題の困難さは認めるところであるし、寧ろ ERATO の趣旨にもあった、歯ごたえのある課題に果敢に挑戦していると明言したい。このトロポミオシンの構造解析は、たんぱく質機能の本質的理解につながる研究と見ることができ、生物学的重要性からみても是非成功してほしい研究課題である。この進展に大きな鍵となるトロポミオシン結晶形成については、計画性や戦略性は高いので、担当研究者の力量に期待したいし、十分期待できるものである。またここまでの研究成果を吟味することで、トロポニン・トロポミオシン複合体を安定化する方法を是非発見し、これが結晶構造解明へ繋がることを期待する。

さらに2年間の研究期間を残すプロジェクトへ向けて提言を与えるとすると、トロポミオシン、トロポニンの柔軟性に対応するためにも、アクチン（改変アクチンないしアクチン類似たんぱく質を含む）との三者複合体、ミニフィラメントの作成・構造解析も考慮に入れて欲しいというところであろうか。計画されている電子顕微鏡による構造解析にも期待するが、三者複合体の高分解能結晶構造解析に成功した場合のインパクトは、計り知れない。

ちなみにトロポミオシンの原子構造から分子の柔軟性を議論できたことは、 $\alpha$ -helical coiled-coil を持つたんぱく質における分子の柔らかさのもつ意味を理解する上で、貴重な情報を与えているといえる。例えばミオシンモーターたんぱく質のレバーアームをはじめとして、他のモーターたんぱく質のダイニンでは、微小管結合と ATP 活性部位の分子内情報伝達機構において、 $\alpha$ -helical coiled-coil 領域の役割は重要であるとされている。キネシンの運動においても coiled-coil の構造やこの構造の melting の問題は、運動機能を理解する上で重要な研究テーマになっている。本研究で示された情報は、これらの運動機能に関わる $\alpha$ -helical coiled-coil の一般的かつ普遍的理解を大きく進める可能性を持っていて、その波及効果は極めて大きいと考えられる。

なお、本研究課題に関しては、これまで以上に外部との共同研究・情報交換を行い、さらなる人的投入も視野に入れた集中的投資も必要かも知れない。

### (3) 筋のカルシウム調節のメカニズムの研究：分子の動態の解明

本テーマでは、以下が主要な研究目標である。

- A. トロポニン分子を構成する原子の間の協動的な揺動(動態)の全貌を捉える。
- B. 健全な心筋トロポニンと心疾患を引き起こす変異トロポニン分子のそれぞれの動態を比較することによって、機能変調に対応する分子動態の異常を明らかにする。

### C. これらの知見をもとに、カルシウム調節メカニズムを解明する。

これらの目標を達成するために、現在はSAIL-NMR法（SAIL = Stereo-array isotope labeling：立体整列同位体標識）を用いた心筋トロポニンおよびトロポミオシンの動態の研究を行っている。心筋トロポニンは会合体形成を起こすが故にNMR測定には不向きとされてきたが、本プロジェクトでは、試料調製法を改良することによって、この問題を克服した。現在までに既に心筋トロポニン分子中のTnIのみを同位体標識し、そのNMRスペクトルの各原子団への帰属が終了している。またSAIL-TnCの調製にも成功し、今後は3量体のうち特定の1要素のみをSAILたんぱく質で置換した試料を用いることで、トロポニン全分子の動態を測定することを目指している。着眼点と発想のユニークさに鑑み、残る約2年間で、目標達成へ向けた良い成果が挙がることを期待したい。

本テーマにおいては、NMRにおいて先駆的技術を持つ甲斐荘正恒博士との協力関係が重要な役割を担っている。甲斐荘博士の開発した、SAIL-アミノ酸を利用するNMR測定は、通常に比べて高い感度を持つだけでなく、検出の分子量限界を大幅に改善する可能性を持ち、たんぱく質の動態を捉えるのに有効な手法であるとされており、揺らぎを特徴として持つ機能動態についての重要な知見が得られることが期待できる（甲斐荘博士が、研究顧問として本プロジェクトに参画したことは、今後の研究の進展に有益にはたらくであろう）。

但し、NMRによる動態測定がどのようなかたちでメカニズム解明に寄与しうるのかについては、何らかの作業仮説のようなものを持っておかないと、単に測定しただけに終わる危険性を無しとしない。また標識剤の選択も重要な課題であると思われ、その工夫や戦略性も見据えた研究推進が望まれるところである。心疾患治療への還元という医学面での重要性を考えると、原子集団の位置の揺らぎを特定し、その生物学的意義を明示することは、本プロジェクトの中核を成し、また大きな価値がある。残る2年間の取り組みには注目したい。

#### （4）アクチンフィラメントの原子モデルの構築と動態の解明

アクチンフィラメントの高分解能原子モデルの構築は、アクチンフィラメントの生体内での役割の多彩さや重要さから、多くの研究者に待ち望まれている。今のところは、ドイツのHolmesらのX線繊維解析に基づく構造が受け入れられているが、原子モデルとはいえ、G-アクチンの結晶構造を細かいところは変えずに当てはめたにすぎない。フィラメント丸ごとの結晶構造解析が成功すれば画期的なことであるが、そのためには長さの揃ったフィラメントが必要となり、本プロジェクトの提唱するミニフィラメント作成を待たねばならない。こうした背景の中で、本テーマでは、以下の主要研究課題に取り組んでいる。

- (i) F-アクチンの原子構造解明
- (ii) アクチンとその変異蛋白質の大量発現系の確立
- (iii) 親水性表面近く crowding な状態でのアクチンフィラメントの動態

(i) においては、X 線繊維解析における分解能向上を目指し、電子顕微鏡からの位相情報や分子動力学計算 (MD) の情報も合わせて、原子モデルの構築が試みられている。既に 8 オングストロームまでの回折データを利用した解析が終了しつつあり、また 3 オングストロームまでの回折強度データが得られているとのことである。繊維解析はあくまでも「当てはめ」の部分が強いので、当てはめ方のユニークさをいかに客観的に示すかが課題である (結晶構造解析も「当てはめ」ではあるが、分解能が高ければ信頼度は高い)。その意味で MD の導入は意義深い、逐次さまざまな研究フィードバックをかけながら、残る 2 年間での研究が加速度的に進むことを期待したい。

(ii) においては、構造解析のみならず、細胞内の重要かつ多彩なアクチンの役割の解明に大きな寄与をすることが期待される。現在までに、バキュロウイルスを用いた昆虫培養細胞系による心筋  $\alpha$ -アクチン、非筋細胞の  $\beta$ -アクチンについては、変異アクチンを調整することに成功しており、努力の跡と成果が見られる。今後これらの利用に基づいた成果を期待したい。一般論として、変異アクチンの大量調製成功例が少ないようであるが、Q137A に続き、機能・構造に有意の差をもたらすような、できれば新規な振る舞いを示すような、変異体が次々と作成できれば素晴らしい。

(iii) においては、プロジェクト発足当初の目標とは異なるものであるが、それには捉われず、思わぬ研究展開を見せている。現在までに、アクチンフィラメントは一般溶液中での挙動とは大きく異なり、親水性表面でかつ crowding agent 存在下で自己組織的な構造形成を行なうなど、細胞中の挙動と近いものを示すとの結果を得ている。大変興味深いものではあるが、アクチンの束化については、向きがコントロールされているとは考えにくく (平行と反平行の混じり)、生理的な束化 (おそらく束化たんぱく質の介在による) とは仕組みが異なる物理現象であろう。もちろん生理現象の基盤としての役割はあるが、アクチンの動態における意義や生理的な役割について検討を進めながら、研究が推進されることを望みたい。こうした研究は、細胞生物学への貢献やアクチンの動態解明に直ちにつながるものではないかも知れないが、非平衡系の科学として融合領域科学へと発展できるかも知れないので、積極的に外部との交流を行なうことを勧めたい。

## (5) アクチンが関与する分子メカニズムの解明

本テーマに関連した主要研究課題は、以下 2 つである。

- (i) アクチンとミオシンの相互作用の研究

(ii) 細胞成長の調節機構の中核を担うTOR (Target of rapamycin; ラパマイシン標的たんぱく質) 複合体の研究

(i) においては現在までに、ミオシン頭部側、特にアクチンとの結合部位に変異を入れて、その変異ミオシンの機能解析を通してアクチンとの相互作用に重要な残基を特定してきた。ミオシン変異体研究では、その多くがドメイン単位での変異導入が一般的である。本研究のように1残基置換によって、アミノ酸残基ひとつひとつの機能に着目した緻密な研究は、機構解明につながる重要な知見が得られるにもかかわらず、世界的に見ても多くは行なわれていない。従って特長のある研究として、高い価値を持っているといえる。その一方で、今後への提言を与えるとするならば、まず変異アクチンを用いた実験を行うこともまた、価値のあるものと考えられる。あるいは、ミオシンの結合状態によって、アクチンの構造が変わったり、アクチンフィラメント内のアクチン間で協同性が生じたりするというような、アクチン側の新たな姿を見いだす実験系を組むことはできないだろうか。さらに、アクチン-ミオシン複合体の結晶構造解析が行われれば理想であろう。「アクチン結合たんぱく質としてのミオシンから見たアクチン」という視点で、(人員増加も視野に入れながら) 後半の研究がさらに進展することを期待したい。

(ii) においては、細胞成長の調節メカニズムの解明を目標に、その中核を担う TOR 複合体に着目した研究を行おうとしている。現在はその研究基盤の整備が名古屋大学の研究サイトで終了した段階であり、残る約2年間の研究に期待するより他はない。現時点での考えを聞く限りでは、複合体全体のたんぱく質発現系の構築、部分複合体ないしは複合体全体の結晶構造の解明を目標とし、それはアクチンの動態に関連する研究とは必ずしも映らないが、生物物理学的視点から細胞生物学研究へ展開していく試みと波及効果としては期待できる。但し、たんぱく質複合体の構造解析に終わらないような、ある程度先を見通した狙いを定めておいて研究を進めるのが望ましかろう。大学研究機関の利点を生かせば、他の研究グループとの相互作用の機会も多かろうし、多くの新たな可能性を検証することができるであろう。ただ、大学での単なるアカデミック研究ではない、ERATO という時限付きの研究枠組みであることや、大学研究とは独立したひとつの「プロジェクト」としての存在意義、あるいは、残る研究期間での取り組みが、他の研究テーマや次の研究ターム・研究フェーズにどのように波及しうるのか、といったところを十分に意識しながら、研究が推進されることを勧めたい。

### 3. プロジェクトの運営状況に対して

研究テーマ・研究課題の一部は、本 ERATO プロジェクトの前駆的存在である、(株) 松下電器産業・国際研究所 (1993 年- 1999 年) および科学技術振興調整費総合研究「アクチンフィラメントの構造と動態の解析による筋収縮・調節機構の解明 (1999 年- 2003



年)」(いずれも前田総括がリーダー的存在)から、その都度問題意識や研究スタイルに修正を加えながら、発展・深化してきたものであり、現在の各研究テーマは、細胞生物学的および生物物理学的に重要性や目標性の高いものであると言える。各研究課題における成果を統合・融合して、アクチンの総合的理解につなげ、さらにたんぱく質機能の本質にまで言及しようとする構想は大変魅力的で、大きな技術発展や生命科学分野の研究テーマとしての発展が期待できるものである。大学研究室単位での研究(純粋基礎研究)と本 ERATO プロジェクトでの研究(目的達成型基礎研究)の双方を運営することは、研究サイト(理化学研究所播磨研究所および名古屋大学)の物理的距離感もあり、その運営の難しさは想像に難くない(双方向で良い影響をもたらし合えるという点では、ある意味「車の両輪」に例えられよう)。我々評価委員一同は(少なくとも今回は、ERATO プロジェクトに評価および提言を与える立場であるものとして)、是非ともそうした様障壁を乗り越え、残る2年間でさまざまな大きな果実や新たな学術・技術シーズを生み出し、(中長期的な観点での)次なる研究フェーズを世の中に打ち出して欲しいと願うところである。必要に応じては、大学研究に委譲することにも検討の余地があるのかも知れない。そのためには、本プロジェクトの主題としての研究テーマが、決して広く薄くならないようにする配慮が望ましい。

現在、研究員の大半は理化学研究所播磨研究所に常駐し、互いが常に議論を展開し情報を共有できる環境にあってか(前田総括の意向が遺憾なく反映されている)、非常に活気の良さを感じる。同じく前田総括の意向でもある「個々の研究者の自主性や自発性、やる気を重んじる。研究テーマを強制することは決してしない。」ということにも共感する部分はある。しかし、大学研究とは別に ERATO のプロジェクトを率いる総括としては、もう少し積極的に「大きな夢」をぶちあげ、研究者をそこに誘う姿勢を見せても良いような気がする。夢というか、「不可能を可能にしよう」というチャレンジングな姿勢である。大きな研究費を得たチームのリーダーは、通常のあるいは既存の研究を、大規模に推進するのではなく、また(研究者の自主性を発揮するための)インフラを整備する為だけの1パーソンであるのでもなく、乾坤一擲の「賭け」を打ち出し、そこに研究者の結集を望み、洞察力や指導力を発揮して、研究者の成長(成果)を望む姿勢が欲しい。

最後に、特に、前田総括の一番の「夢」とする(しかし非常に困難なこともよく分かる)、長さの揃ったミニフィラメント作成に向けて努力しているメンバーが、1、2名しかいないことが気にかかる。その他のグループにも、人的補強の必要性を感じる。

また、複数の人が、全く異なる何種ものアプローチに取り組んでも良いのではと感じる。我々も研究室を率いる経験を有する立場として、ポストクラスになってしまうと、業績が蓄えられて余裕のあるときでない限り、なかなか本当の「賭け」はできないということは理解し得る。そうした意味では、(プロジェクトに非常勤の立場として参画する)名古屋大学の学生・院生の中から、総括の「夢」に共鳴する若者が大勢出てくることを期待したい。彼らにとっても、一人前の研究者としての階段を上る際の、貴重

な糧となり、人材育成にも真に寄与しうるのではないだろうか。

以上