「CAMSAP ファミリータンパク質に着目した微小管重合制御の分子機構の解明」 神戸大学大学院医学研究科 に田 亮

1 研究の背景と目的

微小管は重合状態と脱重合状態を遷移する動的な繊維状ポリマーである。その構造はα β-チューブリン(以下チューブリン)が縦方向に連なった繊維(プロトフィラメント) が13本、横に連なって筒状になったものである。試験管内では、一定濃度以上のチュー ブリンを37度に温めると微小管に重合する反応が起こる。細胞内のチューブリン濃度は、 チューブリンのみでは重合しない濃度に調節されており、チューブリンのみで勝手に重合 しないように制御されている。

細胞内でチューブリンの重合開始を制御するタンパク質として、y チューブリンが良く 知られている。y チューブリンは、染色体などで見られる中心体を形成し、そこから四方 に中心体性微小管が伸びて星状体 Aster を作る。しかし、中心体以外から伸長する非中心 体性微小管の存在が以前から知られていた。神経細胞、(心) 筋細胞、消化管上皮細胞な ど、身体中の様々な部位で非中心体性微小管が重要な役割を果たしている。しかし、非中 心体性微小管の重合開始がどのように制御されているのかは、ほとんどわかっていない。 そこで本研究は、この非中心体性微小管の重合開始の制御機構を解明することを目的と した。非中心体性微小管に局在することが知られている微小管結合タンパク質 CAMSAP2 に注目して、以下に概説する構造・機能研究を行った。

2 研究方法・研究内容

A. CAMSAP2 は微小管の重合開始・星状体形成を誘導する。

CAMSAP2 の機能を確かめるため、昆虫細胞-バキュロウイルスの組換えタンパク質発現

系を用いて CAMSAP2 タンパク質を作製 (a) 1.75 µM Tub した。CAMSAP2 の濃度を 0.3 µM に固定 し、豚脳から精製したチューブリン各 1.75、3.5、7.0 µM で混合し、37 度の 重合反応を行った。チューブリンのみ で重合反応を行った場合、7 µM で初め て微小管重合が見られたのに対し、 CAMSAP2 と共に反応を行うとチューブ リン濃度が 1.75 µM という低濃度にお いても微小管重合が確認された(図 1(a))。この濃度は、微小管重合が可能 な理論的限界とほぼ同等の値である。 CAMSAP2 を含んだ条件では、非常に興 味深いことに微小管上にはタンパク 質の塊の密度が点在し、微小管重合も その部分から始まっている様に見受 けられた。

次に我々はCAMSAP2 濃度が微小管重 合にどのような影響を与えるか調べ た。CAMSAP2 の濃度を変えて微小管重 合を行ったところ、先の実験で確認さ





図 1 CAMSAP2 により誘起された微小管の星状体様 構造(a) チューブリンのみ、もしくはチューブリンと 0.3 µM CAMSAP2、(b) 10µM チューブリンと1または 3µM CAMSAP2を37度で30分重合反応した。タン パク質の塊を赤い三角で示す(a)。 れたタンパク質の塊が肥大化し、そこから伸長した微小管同士が繋がり中心体における星 状体が微小管ネットワーク形成を行っているような構造が確認された(図 1(b))。我々は この CAMSAP2 により誘起された星状体様構造体を Cam2-Aster と命名した。これらのこと から CAMSAP2 はチューブリンの微小管重合開始を誘導し、その過程で星状体様構造がで き、最後に星状体様構造をつなぐ微小管ネットワーク形成を行うことが分かった。

B. Cam2-Aster は細胞において微小管ネットワーク形成初期に形成される

細胞内での CAM2-Aster 形成過 程を調べるため、HeLa 細胞の微 小管を nocodazole という微小管 の脱重合剤で処理し、nocodazole 除去後の微小管の形成過程を観 察した(図 2)。CAMSAP2 は、微小 管のマイナス端を保護する様に 結合することが報告されている。 はじめに nocodazole 処理前の HeLa 細胞を α -チューブリンと CAMSAP2の抗体それぞれを用いて 免疫染色を行った。その結果、過 去の報告と同様に微小管末端に CAMSAP2が分布していることが確 認できた。次に nocodazole で細 胞を処理したところ微小管の脱



Nocodazole 処理前、除去直後(0分)、除去後3、7、35分後。

重合が確認できた。脱重合した微小管は nocodazole 除去後、ふたたび重合し 30 分ほどで nocodazole 処理前と同様の微小管ネットワーク形成と CAMSAP2 の微小管末端への分布が 確認された。回復過程を詳細に観察すると 5-7 分の時点では微小管が形成されはじめる 一方、CASMSAP2 は微小管末端には分布せず in vitro の実験で見られた様に球状の塊となっていた。このことから CAMSAP2 は、細胞内でも微小管形成過程において星状体様構造を とること示唆された。

C. クライオ電子線トモグラフィー による CAM2-Aster 構造の解明

Cam2-Aster の詳細な構造を明ら かとするため、大阪大学超高圧電子 顕微鏡センターの Titan Kiros(サ ーモフィッシャーサイエンティフ

図 3 Cam2-Aster のクライオ電子線トモグ ラフィー (a) 37 度 30 分重合反応を行い 観察した Cam2-Aster。左にトモグラム再 構築像、右にセグメンテーションを示す。 (b) トモグラム中で観察された微小管先端 にあるリング構造。(c)37 度 1 分重合反応 を行い観察した幼弱な Cam2-Aster。微小 管(青)に加えリング(赤)、チューブリンシー ト(緑)、Aster(黄色)等種々の中間体が観測 された。



ィック)を用いてクライオ電子線トモグラフィー法により観察した。37度で30分反応を 行い形成した Cam2-Aster のトモグラム三次元構築像を得た結果、Cam2-Aster の大きさは 様々であること、Cam2-Aster は中心から微小管が伸びたような構造をしていることが明 らかとなった(図3(a))。Cam2-Aster では微小管は分岐せず、形成中心から外側に放射状 に伸長していた。その構造を詳細に観察すると、微小管のみならずリング状の構造体があ ることが確認できた。我々はリング構造が Cam2-Aster 形成時の中間体ではないかと考え、 Cam2-Aster 形成時の反応時間を1分に短縮しグリッドを作製、クライオ電子顕微鏡で測 定しトモグラム三次元構築を行った。構造解析の結果、リング構造に加えて微小管になる 前の中間体、すなわちリング構造やプロトフィラメントが横に数本連なり広がったシート 状となった構造が確認できた(図3(b))。これらプロトフィラメントのリングやシートは 微小管形成促進機構の一翼を担っていることが予想された。

D. CAMSAP2 は微小管核形成を誘導し微小管形成を促進する

Cam2-Aster 形成の分子機構を明らかとするため、Cam2-Aster 形成過程での CAMSAP2 の 局在をナノ金粒子でラベルした CAMSAP2 を用いて調べた。ナノ金粒子でラベルした CAMSAP2 とチューブリンを混合し氷上に 30 分静置し、電子顕微鏡ネガティブステイン法 で観察したところ、リング構造が多数確認された。リング内に金粒子も共局在していたこ と、チューブリンのみを氷上に静置してもリング構造は見られないことから、CAMSAP2 が リング構造を誘起したと結論づけた(図 4(a))。さらに氷上静置してから重合を行いその 過程を観察すると、反応1分程から微小管形成がはじまり 10 分で反応が完了した。この ときナノ金粒子は、図1(a)で示したタンパク質の塊部分に局在していた(図 4(b))。反応 過程でのリングの数に注目したところ、リングは氷上静置の状態が最も多く、1分、3分 と指数関数的に減少していき伸長反応が終了した 10 分の段階ではほぼ観測できなかった。 これらのことからリングは微小管形成の中間体であり、微小管形成に伴い微小管に取り込 まれたと考えた。



図4 Cam2-Aster 重合中間体の電子顕微鏡写真(a) ナノ金粒子を結合した CAMSAP2 とチューブリンを氷上 30 分混合静置したのち負染色法により電子顕微鏡観察した(中央)。右はリング(赤)と金粒子(黒丸)のセグメンテーション図。(b) 氷上 30 分混合静置したサンプルを 37 度で 1、3, 10 分重合反応し、電子顕微鏡観察した。金粒子が微小管端部分に凝集している。(c) CAMSAP2 とチューブリンを 1分 37 度で重合させた後凍結しクライオ電子顕微鏡で観察した写真。伸長過程にある微小管の拡大図(右上)とそのセグメンテーション(右下)。微小管:青、プロトフィラメントのシート:緑、リング:赤。

次に CAMSAP2 とチューブリンを 30 分間氷上で静置したのち、37 度 1 分間の伸長反応 をグリッド上で行いそのまま凍結、SPring8 のクライオ電子顕微鏡 Glacios(サーモフィ ッシャーサイエンティフィック)で測定を行い、Cam2-Aster 中間体を観察した。微小管中 間体であるリング、短いプロトフィラメント、シート状のプロトフィラメント、そしてリ ングがシートや微小管に取り込まれる途中の状態の観察に成功した(図 4(c))。これによ り CAMSAP2 による微小管形成は、リングや短いプロトフィラメントが寄り添いシートを 形成し、シートが円柱状に丸まって微小管となるメカニズムが明らかとなった。

3 研究成果

これまでの結果を踏まえて我々は、図5に示すようにCASMSAP2による微小管重合開始 誘導・星状体様構造の形成モデルを提案した。CAMSAP2は、チューブリンと相互作用して チューブリンの縦方向の結合を促進し、短いプロトフィラメントやプロトフィラメントの リング形成を誘導する。これら中間体がさらにチューブリンの横方向の相互作用を誘起し てシートを形成する。シートが微小管形成時の重合核となり、微小管重合へのエネルギー 障壁を低くし、微小管伸長を促進する。この反応と並行してCAMSAP2を中心とした星状体 様構造も形成される。反応が進むと、星状体様構造同士が微小管によりつながれた微小管 ネットワークが形成される。微小管ネットワーク形成後、CAMSAP2は微小管の末端へと再 配置され、微小管の末端を保護する。



4 生活や産業への貢献および波及効果

今回の研究により明らかになった CAMSAP2 による非中心体性微小管の重合開始および 微小管ネットワーク構築は、神経細胞・消化管上皮細胞・骨格筋細胞・心筋細胞の極性形 成・維持の根幹を成すものであり、基礎生物学、生化学、細胞生物学、神経科学、生物物 理学など、様々な分野にブレークスルーをもたらす可能性がある。また今後、CAMSAP フ ァミリータンパク質の異常に関連する疾患概念が構築される可能性が高く、本研究は、そ の病態解明・治療法開発の基礎となるものである。