

「研究テーマ名」

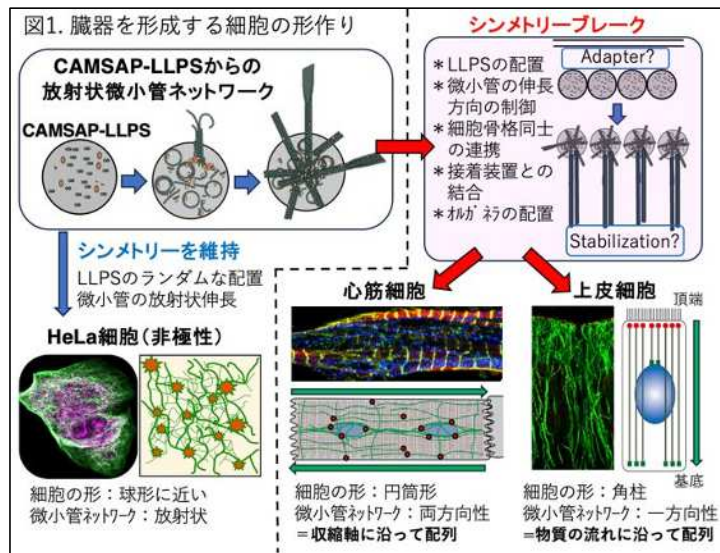
CAMSAP ファミリータンパク質による心筋細胞の形づくりの分子機構の解明

神戸大学大学院医学系研究科

仁田 亮

1 研究の背景と目的

生体内で特定の生理機能を持つ臓器を形成する細胞は、それぞれ特有の形状を必要とする。この形状は、微小管ネットワークの特徴的な配列によって形成される(図1)。例えば、心筋細胞では拍動方向に沿って微小管が両方向性に配列され円筒形を形成し、上皮細胞では物質の流れに沿って微小管が一方向性に整列し(六)角柱形を呈する。我々は、微小管結合タンパク質 CAMSAPs が生成する液-液相分離(LLPS)が微小管形成中心(MTOC)として機能し、新たな微小管を効率的に生成することによってこのような特徴的な配列が形成されることを発見した(Imasaki et al., *eLife*, 2022; ひょうご科技協会 2018 年度助成対象課題)(図1左上)。このプロセスでは、LLPS の位置と微小管の伸長方向の制御が重要であり、HeLa 細胞ではランダムに微小管が伸長して球形となる(図1左下)一方、上皮細胞では LLPS を頂端側に配置し微小管の伸長方向を一方向に制御することで形成される(図1右下)と予想される。しかし、この配列制御の分子機構は未解明である。本課題では、1) LLPS から微小管を生成する分子機構の解明と、特に 2) 心筋細胞の微小管ネットワーク形成機構の解明を目指す。



2 研究方法・研究内容

本研究では、以下の A)、B) の二項目に分けて解析を行った。両者は異なる時空間スケールでの構造動態解析であるが、相互にフィードバックを行うことで、細胞レベルの現象を原子・分子レベルの構造動態として統合的に理解することを目的とする。

A) in vitro 再構成系：LLPS 内で起こる精細な構造動態の解明

in vitro において CAMSAP2 を発現・精製し、tubulin はブタ脳由来精製タンパク質を用いた。CAMSAP2 による LLPS の形成、tubulin の LLPS への取り込み、さらに微小管への重合および Cam2-Aster 形成に至る過程を解析した。これらの動態は、全反射蛍光顕微鏡(TIRF)によるライブイメージングおよびタイムラプス Cryo 電子顕微鏡(Cryo-EM)により観察した。加えて、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いて、重合中間体から Cam2-Aster 形成に至る過程の高速分子動画を取得した。さらに、CAMSAP2-微小管複合体の cryo-EM による原子分解能構造解析を行い、

その構造を初期モデルとして全原子分子動力学(MD)シミュレーションを実施した。これにより、cryo-EM の構造情報と高速 AFM による動態情報を統合し、提唱する分子機構モデルの妥当性を検証した。

B) 心筋細胞の構造動態解析：心筋細胞分化の精細な構造動態の解明

生理的な蛋白質発現量を維持するため、心筋細胞に CAMSAP2-mStayGold を内因性遺伝子領域へノックインした細胞を構築した。また、極性を持たないコントロール細胞として、HeLa 細胞に CAMSAP2-mStayGold および β -tubulin-miRFP を、それぞれの内因性遺伝子領域へノックインした細胞を作製した。

現在、心筋細胞分化過程の時系列局在情報を、共焦点/超解像顕微鏡で解析するとともに、制御分子のノックダウンによる機能検証を計画している。また CAMSAP2 のノックアウトマウスの作製に成功し、表現型の解析を行なっている。

3 研究成果

項目 B) の心筋細胞については、現在解析中であるため、本報告書では項目 A) に関する成果および HeLa 細胞を利用した成果を記載する。なお、本成果は現在投稿中である。

1) Cryo 電子線トモグラフィー解析 (Cryo-ET) により、CAMSAP2-LLPS は中心体とは異なる分子機構により微小管形成中心 (MTOC) として機能することが明らかとなった (図 2)。

2) Cryo-EM 構造解析により、CAMSAP の微小管結合には、CKK ドメインおよび同ドメインの N 末端側のループ構造 (N-hook) が関与し、前者はプロトフィラメント間の横方向結合、後者は縦方向結合を安定化することが示された (図 3)。

3) 高速 AFM 解析により、tubulin はリング構造を形成するが、CAMSAP2 の存在下ではこれが直線化し、プロトフィラメント様構造へと変換されることが明らかとなった (図 4 上)。MD シミュレーションから、この過程には主に N-hook が関与することが示された (図 4 下)。

4) さらに、直線化したプロトフィラメント様構造は側面同士で結合しシ

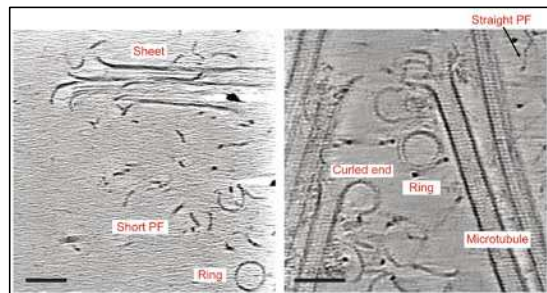


図 2. LLPS 内の Cryo-ET 像

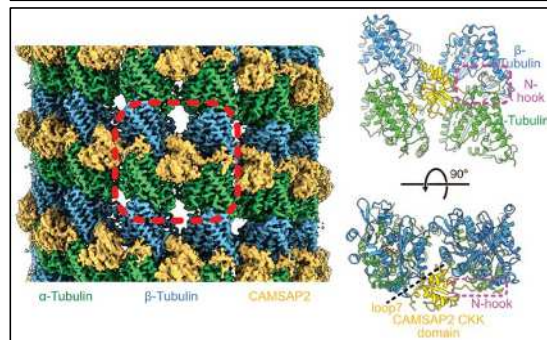


図 3. CAMSAP2-微小管複合体の Cryo-EM 構造

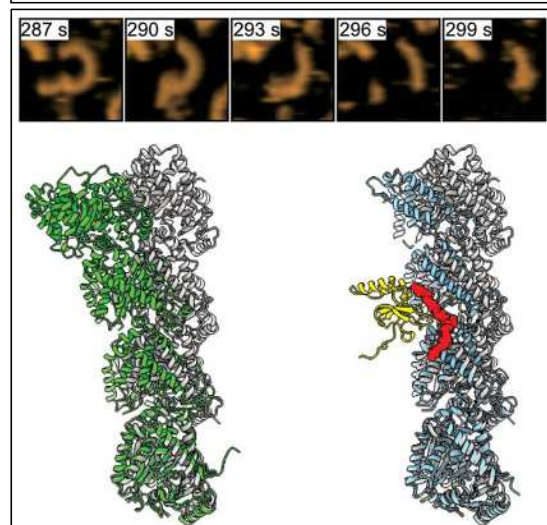


図 4. Tubulin リングの直線化の高速 AFM 解析 (上) と MD シミュレーション (下)

ート構造を形成し、13 本に達すると管状構造（微小管）へと閉じることが明らかとなった。この過程には CKK ドメインが寄与する。

- 5) CAMSAP2-LLPS からは微小管が動的に伸長・収縮し、隣接する LLPS に到達すると安定化することが示された。また、複数の LLPS 由来の微小管が結合することで、mixed polarity の微小管束が形成されることが明らかとなった (図 5)。

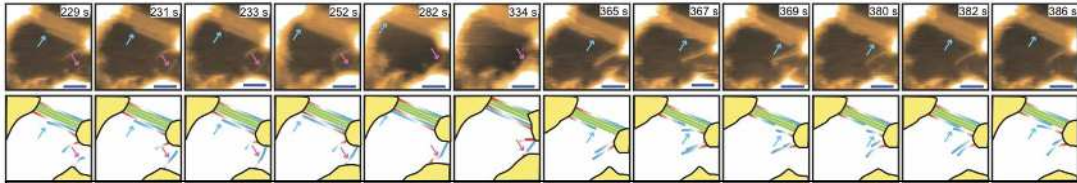


図 5. 高速 AFM による Cam2-aster 形成の分子動画

- 6) HeLa 細胞において微小管脱重合後の再重合過程を観察したところ、中心体に加えて細胞辺縁に CAMSAP2-LLPS が分布し、そこから細網状微小管ネットワークが形成されることが確認された。さらに γ -tubulin 機能阻害条件では、このネットワークが細胞全体に広がることを示された (図 6)。

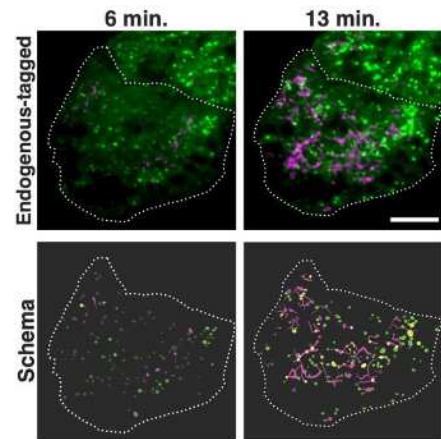


図 6. HeLa 細胞における微小管再重合過程の TIRF 計測。CAMSAP2= 緑。微小管=マゼンタ。

総括)

- 1) Cryo-EM、TIRF、hsAFM を組み合わせることで、分子集合体が生み出す一連の現象を多角的に捉え、微小管重合過程を高分解能の「構造動画」として世界で初めて可視化した。これにより、微小管の自発的核形成過程 (spontaneous nucleation) の分子機構を解明した (図 7)。

- 2) 構造解析、AFM 観察、MD シミュレーションおよび変異解析により、CAMSAP2 が tubulin オリゴマーを直接再構成する分子機構を明らかにした (図 7)。N-hook はプロトフィラメントを直線化し、CKK ドメインは側面結合を安定化することでシート形成を促進し、最終的に微小管への閉鎖を誘導する。

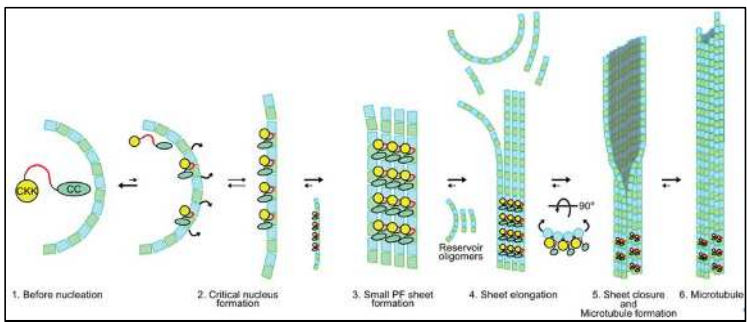


図 7. CAMSAP2 誘導下の Spontaneous nucleation の分子モデル

- 3) 細胞は、 γ -TuRC 依存型と非依存型の 2 つの核形成機構を使い分けることで、異なる微小管ネットワーク構造を形成している可能性を示した。前者は中心体を基盤とし、鋳型を利用した核形成 (templated nucleation) により、細胞全体に広がる 1 つの大きな放射状ネットワークを形成する。一方、後者では CAMSAP2 が凝集体 (LLPS) を形成し、自発的核形成 (spontaneous nucleation) により、多数の核形成点からなる細網状ネットワークを構築する。この多点核形成型ネットワークは、構

造的に均一で力学的に安定かつ柔軟であり、局所的な損傷に対しても高い修復能力を持つと考えられる。また、LLPS を基盤とした核形成は、シグナルや細胞骨格相互作用と連動することで、多様な細胞形態形成やリモデリングを可能にする。

CAMSAP による微小管ネットワークは、心筋細胞や上皮細胞の形態形成の基盤となる現象であることが示されつつあり、今後は、細胞種・発生段階・疾患状態に応じて、これら 2 つの核形成機構がどのように制御・切り替えられるかを解明する必要がある。

4 生活や産業への貢献および波及効果

CAMSAP-LLPS により構築される微小管ネットワークは、神経細胞（脳）、心筋細胞（心臓）、骨格筋細胞（骨格筋）、消化管上皮細胞（消化管）、表皮細胞（皮膚）、尿細管上皮細胞（腎臓）、生殖細胞（卵巣・精巣）など、多様な臓器を構成する細胞の形態形成と機能発現を支える基盤的制御機構である。本研究は、この細胞構築原理の分子基盤を明らかにすることで、細胞生物学および生理学の根幹に関わる生命現象の理解を大きく前進させる。

特に本研究は、微小管核形成は中心体および γ -TuRC に依存するという従来の教科書的パラダイムに対し、CAMSAP-LLPS を基盤とした γ -TuRC 非依存的な核形成機構の存在を提示するものである。すなわち、細胞は単一の核形成機構に依存するのではなく、複数の核形成戦略を使い分けることで、細胞種や機能に応じた多様な微小管ネットワークを構築している可能性が示された。この概念は、細胞構造形成の理解に新たな枠組みを与えるものであり、今後の生命科学の教科書的理解を更新する基盤となる。

さらに、本研究で得られる構造情報と動態解析の統合により、微小管ネットワーク異常に起因する疾患の分子病態の理解が進み、新たな治療戦略の創出につながる事が期待される。特に心筋細胞においては、CAMSAP2 を中心とした微小管ネットワークがサルコメア形成および細胞形態維持に重要な役割を果たし、その破綻が心肥大や心不全の発症に関与する。本研究では、原子レベルの構造解析に基づき、これらの構造制御機構を精密に制御する創薬標的の同定を目指しており、心肥大・心不全の予防および治療に資する新規分子標的治療の開発へと展開する。

また、LLPS を基盤とした分子集合体の設計原理は、細胞機能の制御のみならず、再生医療、細胞工学、さらにはバイオマテリアル開発への応用も期待される。すなわち、本研究は基礎生命科学の革新にとどまらず、医療・創薬・バイオ産業に広く波及する基盤技術の創出につながるものである。