

令和元年5月27日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04765

研究課題名(和文) 架橋、安定化された微小管の生物学

研究課題名(英文) Study of crosslinked and stabilized microtubules

研究代表者

鈴木 厚 (Suzuki, Atsushi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：00264606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：微小管は細胞の方向性・極性形成に重要な役割を果たしている細胞骨格線維である。本研究では、この微小管の重合状態が安定化され、線維が束化される分子機構を明らかにすることを目的とした。また、この機構の生理的意義の解明も目指した。3年間の研究の結果、我々が発見していた新規微小管制御タンパク質 MTCL1に関する下記の結果を得た。N末端領域は動的な微小管を柔軟に架橋しつる。C末端領域は、微小管内チューブリンのGTP結合型構造を誘導し、そのことを介して微小管の重合状態を安定化する。MTCL1は、これらの活性を通じて小脳の神経細胞の軸索極性の確立に必須な役割を果たしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管の制御機構の解明は、体内で働く細胞が機能する仕組みを解明する上で不可欠である。しかし、本来不安定な微小管の重合状態が多くの細胞で安定化され、固有の束構造を取る仕組みはまだまだほとんど明らかになっていなかった。今回の研究では、申請者自身が発見した微小管制御因子、MTCL1の機能の解明を進めることを通じて、上記の問いにこれまでにない答えを与えることができた。また今回、MTCL1遺伝子改変マウスが小脳の機能異常に起因する運動失調を示すことも明らかとなった。ヒト脊髄小脳変性症の原因となっているという報告も近年なされており、これら神経変性疾患の病因・病態解明に本研究が寄与する可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Microtubule is the essential cytoskeletal filament indispensable for cell polarity establishment. In this study, we have studied the molecular mechanisms by which microtubules are stabilized and crosslinked, and the physiological significance of such microtubule regulations. We have obtained the following results about the novel microtubule-regulating protein, MTCL1, which we had found previously. the N-terminal region of MTCL1 crosslinks dynamic microtubule flexibly. the C-terminal region of MTCL1 stabilizes microtubules by inducing the GTP-bound form of tubulin within the filament. through these activities, MTCL1 plays essential roles for the development of axon initial segment and axonal polarity of cerebellar Purkinje neurons.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 架橋 細胞極性 小脳 プルキンエ細胞 運動失調

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 微小管は紡錘体を形成を通じて細胞分裂に働くとともに、間期における細胞内小胞輸送のレールともなり、細胞の方向性、極性の確立、制御に重要な役割を果たしている。こうした微小管の間期の働きは、中心体から細胞辺縁部に伸長し、プラス端で重合・脱重合を繰り返すという、その独特の性質によって可能になっていると古くから考えられてきた。しかし近年の研究は、中心体とは結合せず、束状の配向を示し、かつ重合状態の安定した微小管が、多くの細胞の極性の確立に必須な働きをしていることを明らかにしてきている。ただ、これらの細胞において、いかにして微小管の重合状態が安定化し、束化させられているのか、その分子メカニズムの解明は遅れていた。

(2) 我々は細胞極性制御機構の解析を進める中で、これまでにない全く新しいタイプの微小管制御タンパク質を発見し、このタンパク質が非中心体性微小管の架橋・安定化に働いていることを、本研究開始時までに明らかとしていた。MTCL1(microtubule crosslinking factor)と命名したこのタンパク質は、中央部のコイルドコイル領域を介して会合したN末端微小管結合領域(NMTB)によって微小管を架橋するとともに、C末端微小管結合領域(CMTB)は独立に微小管の

2. 研究の目的

(1) MTCL1 の N 末端微小管結合部位による微小管架橋の分子機構をさらに明らかにするために、コイルドコイル領域を介した MTCL1 の会合状態を詳細に明らかとする。また、架橋された微小管の方向性や動的性質を明らかとする。

(2) MTCL1 の C 末端微小管結合部位は、「微小管内のチューブリンの構造を GTP 結合様に変化させ、ある閾値濃度以上で、この構造変化がアロステリックに微小管線維全体に広がることによって微小管の重合状態の安定化が進む」という仮説を検証する。

(3) MTCL1 が神経細胞の軸索起始部(AIS)を貫く微小管束の安定化を通じて、AIS 構造と軸索極性の発達に働いていることを証明する。

3. 研究の方法

(1)免疫沈降法による MTCL1 分子会合メカニズムの解析

マウス MTCL1 全長 cDNA をもとにして、さまざまな領域を含む MTCL1 欠失変異体の発現ベクターを作成し、種々の組み合わせで HEK293T に発現した。その後、細胞抽出液から一方の MTCL1 断片を免疫沈降し、同時に発現させた別の断片が共沈降するか否かをウエスタンブロット法で検討した。二種の断片の N 末端には、SBP(Streptoavidin-binding protein)-, V5-, GFP-などの中から異なるタグを融合させ、免疫沈降と沈降物の検出に利用した。

(2) MTCL1 CC1 領域 精製タンパク質の調整と会合状態の解析

マウス MTCL1 のコイルドコイルモチーフ 1 のみの領域を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現後、精製した。Precision protease により GST 部分を除去した後、CC1 領域の会合状態を SDS PAGE を利用して解析した(熱処理依存的な会合体相当領域のバンドの出現の有無。化学的架橋剤 disuccinimidyl tartrate 処理後の会合体相当領域のバンドの出現の有無)。

(3) HeLa-K 細胞を用いた免疫蛍光染色による解析

4 well plate 内に置いたカバーガラスをコラーゲンコート処理後、HeLa-K 細胞溶液を $\sim 4 \times 10^4$ cells/well で播種し、37 度で一晩培養した。翌日、各種発現ベクターをトランスフェクションし、その次の日に細胞を固定し実験に用いた。ノックダウン実験においては、同様に播種した HeLa-K 細胞に 2 日にわたり、同じ siRNA オリゴをトランスフェクションし、その 2 日後に細胞を固定し、実験に用いた。HeLa-K 細胞に 0.06% Triton X-100 を 2 分間添加し、すぐに洗浄し未固定の状態ですぐに抗 GTP-tubulin 抗体と二次抗体反応を行った。その後 4 分間 cold MeOH 固定し、ブロッキングの後、共染色する抗体による反応を進めた。

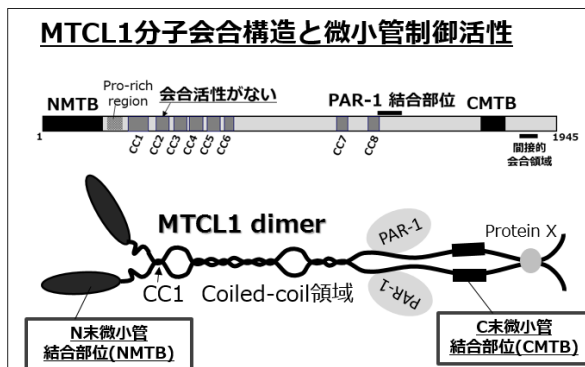
(4) 子宮穿孔法(in utero electroporation 法)による MTCL1 ノックダウン

胎生 11.5 日のマウス胎児の第 4 脳室に、マウス MTCL1 に対するノックダウン配列と GFP を同時に発現するプラスミド (2.5-5ug) を子宮外から注入し、子宮電子穿孔法によって小脳内に導入した。本方法による DNA の導入は、ほぼ PJ 細胞特異的に起こることはすでに報告されている。レスキュー実験を行う際には、上記プラスミドにさらに RNA 抵抗性のマウス MTCL1 野生型、あるいは変異体を発現するカセットを挿入した。

4. 研究成果

(1) MTCL1 の分子会合機構と、NMTB を介した微小管架橋活性の詳細な解析

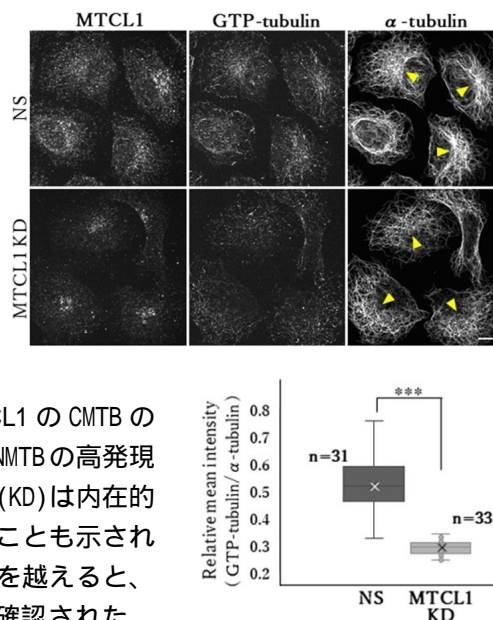
MTCL1 の様々な断片の相互の会合能力を免疫沈降法によって徹底的に調べることによって、MTCL1 の各コイルドコイルモチーフ (CC1 ~ CC8: 右図) のほとんどがホモ会合能を示すことを明らかとした。一方、精製タンパク質を用いた実験から、CC1 がホモ 2 量体を形成することが判明した。これらの結果を総合することにより、MTCL1 は右図に示すようなパラレルなホモ二量体を形成することを結論することができた。因みに、こうした研究を進める中で「明確なコイルドコイルモチーフを示すにも関わらず CC2 のみが会合活性を示さない」という予想もしなかった事実が明らかとなった(上図参照)。そして、CC1 を介した会合を阻害すると MTCL1 による微小管架橋角度が大きく開くという結果から、この事実が MTCL1 の生理的活性に重要な意味を持つことが示唆された。さらに、この研究では、「CMTB の下流の非コイルドコイル領域に、MTCL1 の間接的な会合領域が存在する」ことも判明した。このことから、MTCL1 会合体内においては CMTB が分子内にコンパクトにしまわれており、微小管との結合がかなり近接した状態でなければ CMTB と微小管の相互作用が起こらない可能性が示唆された(文献)。



一方、EB3-GFP を安定的に発現する HeLa-K 細胞を利用した微小管重合のライブイメージング実験から、NMTB によって架橋された微小管束内部の個々の微小管は動的な不安定性を維持しており、その方向性はランダムであることが示唆された。この結論は、同微小管束が細胞の低温処理によって容易に脱重合することからも確認された。以上から、MTCL1 の NMTB は微小管の表面の性質や動的不安定性に影響することなく微小管に結合しうる、非常に珍しい微小管結合領域であることが明らかとなった。

(2) MTCL1 の CMTB を介した微小管安定化機構の解析

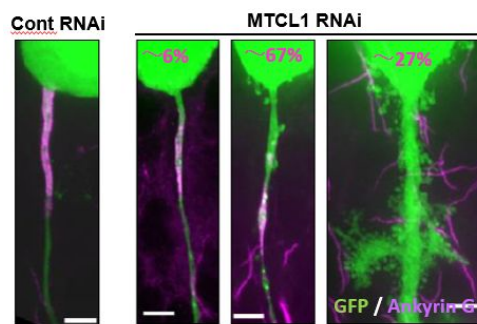
当初目的とした X 線線維回折による構造解析実験は予定通り進めることができなかったが、GTP-tubulin 抗体を駆使した実験によって、前述のモデルを支持する結果を多数得ることができた。まず、内在性 MTCL1 が細胞内微小管側面に示す散在的な局在は、GTP-tubulin 抗体のシグナルと近接して検出されることが明らかとなった。MTCL1 が結合する tubulin には抗体がアクセスできないが、その周りに GTP-tubulin 抗体反応性の構造変化が誘導されている可能性を示唆する結果と考えられる。実際、MTCL1 の CMTB の高発現は GTP-tubulin シグナルの増大を引き起こし (NMTB の高発現はそうした活性を示さない)、MTCL1 のノックダウン (KD) は内在的な GTP-tubulin シグナルの顕著な低下を引き起こすことも示された (右図参照)。さらに、MTCL1 の発現量がある閾値を越えると、微小管の安定化に付随した束化が急激に進むことも確認された。以上の結果は当初想定していた「MTCL1 の GTP-tubulin 構造誘導仮



説」を強く支持することから、さらにこの仮説を直接証明するために、微小管内 tubulin の構造をクライオ電子顕微鏡で解析する共同研究を本研究期間内に開始した。

(3) MTCL1 の神経細胞 AIS 形成促進機構の解析

MTCL1 遺伝子改変マウスにおける運動失調の発症が、小脳プルキンエ細胞 AIS の形成異常に起因している可能性を明らかとした。そして、それが MTCL1 の C 末微小管安定化機構の低下に大きく依存していることを明らかとして論文として発表した(文献)。特に、子宮内穿孔法によってマウス・プルキンエ(PJ)細胞内の MTCL1 を胎生 11 日からノックダウンし始めると、最も顕著な場合(約 30%)には AIS 構造が消失し、軸索極性が崩壊した結果、軸索が樹状突起様に変化し、多くのシナプスが形成されるようになるという非常に劇的な結果を得るに至った(右図)。また、こうした異常は、マウス PJ 細胞で AIS 構造が形成され始める生後 2 日目の小脳ですでに観察されることを明らかとし、MTCL1 が AIS の形成自身に関わっていることを証明した。さらに、培養細胞レベルの実験を進めることによって、MTCL1 が誘導する微小管束に AIS 形成を駆動する AnkyrinG の C 末端領域がリクルートされること、この MTCL1 の働きには CMTB が必要であることを示唆する結果を得た。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yahikozawa H, Miyake S, Sakai T, Uehara T, Yamada M, Hanyu N, Futatsugi Y, Doi H, Koyano S, Tanaka F, Suzuki A, Matsumoto N, Yoshida K. A Japanese family of spinocerebellar ataxia type21: clinical and neuropathological studies. *Cerebellum* 17: 525-530, 2018 (査読あり) doi: 10.1007/s12311-018-0941-6.

Kader M A, Satake T, Yoshida M, Hayashi I, Suzuki A. Molecular basis of the microtubule-regulating activity of microtubule crosslinking factor 1. *PLoS One* 12(8) e0182641, 2017 (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0182641.

Nishita M, Satake T, Minami Y, Suzuki A. Regulatory mechanism and cellular functions of non-centrosomal microtubules. *J. Biochem.* 162: 1-10, 2017 (査読あり) doi: 10.1093/jb/mvx018. Review.

Satake T, Yamashita K, Hayashi K, Miyatake S, Tamura-Nakano M, Doi H, Furuta Y, Shioi G, Miura E, Takeo YH, Yoshida K, Yahikozawa H, Matsumoto N, Yuzaki M, Suzuki A. MTCL1 plays an essential role in maintaining Purkinje neuron axon initial segment. *EMBO J.* 36(9):1227-1242, 2017 (査読あり) doi: 10.15252/embj.201695630.

〔学会発表〕(計 11 件)

伊東友理奈、鈴木厚 “MTCL1 C 末端領域による微小管安定化機構の解析” 第 41 回 日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 30 日

菅野愛也香、佐竹智子、鈴木厚 “軸索起始部の形成/維持における MTCL1 の機能の解析” 第 41 回 日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日

鈴木太基、鈴木厚 “CRISPR/Cas9 システムを利用した微小管制御因子 MTCL1 の機能解析” 第 41 回 日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日

Miki M, Mizuno S, Satake T, Suzuki A. “MTCL2 is a new member of microtubule

-crosslinking proteins” 第70回 日本細胞生物学会大会 2018年6月7日

Satake T, Suzuki A. “Uncovering the physiological function of MTCL2 in mouse cerebellar Purkinje cells” 第70回 日本細胞生物学会大会 2018年6月7日

Kobayashi N, Suzuki A. “Role of the coiled-coil region of MTCL1 for its microtubule-regulating activity” 第70回 日本細胞生物学会大会 2018年6月7日

佐竹智子、鈴木厚 “微小管束化・架橋因子 MTCL1 による細胞極性制御機構” 第95回 日本生理学会大会 2017年3月28日

佐竹智子、菅野愛也香、鈴木厚 “微小管制御因子 MTCL1 による軸索起始部 AIS の位置の制御” 第69回 日本細胞生物学会大会 2017年6月15日

佐竹智子、鈴木厚 微小管架橋/安定化因子 MTCL1 は、軸索起始部 AIS 形成に必須である 第68回 日本細胞生物学会年会 2016年6月17日 京都府民総合交流プラザ、京都府

佐竹智子、鈴木厚 軸索起始部 AIS の形成における微小管架橋/安定化因子 MTCL1 の役割 第39回 日本分子生物学会年会 2016年12月1日 パシフィコ横浜、神奈川県

Tomoko Satake, Atsushi Suzuki. Role of MTCL1, a microtubule crosslinking and stabilizing protein, in the formation of axon initial segment. 米国細胞生物学会年会 2016年12月4日 サンフランシスコ Moscow センター、米国

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP: <http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/mcbl/suzuki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：林 郁子

ローマ字氏名：(HAYASHI, Ikuko)

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：生命医科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80464527

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡田 康志

ローマ字氏名：(OKADA, Yasushi)

所属研究機関名：国立研究開発法人・理化学研究所

部局名：生命システム研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号(8桁)：50272430

研究協力者氏名：佐竹 智子

ローマ字氏名：(SATAKE, Tomoko)

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：生命医科学研究科

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：20635130

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。