

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04047

研究課題名(和文)非定型微小管の構造と機能の解明

研究課題名(英文)Explore of unconventional microtubules

研究代表者

広常 真治 (Hirotsune, Shinji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80337526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：微小管は代表的な細胞骨格であり、キネシンや細胞質ダイニンのようなモータータンパク質のレールとなっている。我々はヒト坐骨神経の解析から、神経細胞における細胞骨格としての微小管は従来の概念と全く異なった形態をとっていることが分かり、非定型微小管と名づけた。ヒト脳組織からタンパク質を抽出し、微小管重合の際に共沈させた。次にマウス坐骨神経でも同様の実験を行い、ヒト坐骨神経に特異的に存在する微小管結合タンパク質を質量分析器で同定した。同定されたタンパク質の組み替えタンパク質を作製し、チューブリンと重合実験を行い濁度の変化からチューブリンの重合に与える影響を解析し候補タンパク質の同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非定型微小管の進化と神経機能の高度化の研究は高度な神経機能をもつヒトの中枢神経研究に多大な示唆を与えることが期待される。さらに非定型微小管が神経の部位によってどのような特殊性を持っているのかの解析、たとえば運動神経と感覚神経でどのように異なっているのかの解明はALSの病態生理の解明に資することが期待される。さらに中枢神経系の部位特異的なパターンの解析はその領域での軸索伸展やネットワーク形成の制御の解明につながるものが期待される一方、その機構の破綻は神経変性疾患や精神神経疾患の病態解明や新たな治療戦略の創出につながるものが期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Syn-bound tMTs carrying 14pfs, was confirmed by immuno-TEM analysis. This is the first evidence that shows the distinctive function of MTs with unconventional pfs numbers. Although in vitro tubulin polymerization yields MTs comprising 15pfs, the MTs in mammalian cells were previously thought to exclusively contain 13-pfs 6. MTs carrying 14pfs yield a helical arrangement 60 that is unsuitable for kinesin1 movement. However, tMTs would not be used for regular cytoskeletal MTs, as they are too small to provide a trafficking rail for motor proteins. Rather, tMTs are used as a transport platform to the periphery for proteins such as cytoplasmic dynein and the dynactin complex for which a helical pfs arrangement is not disadvantageous. It is worth exploring the distinctive functions of unconventional MTs through the identification of MAPs that can recognize MTs with unconventional pfs numbers.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞骨格 神経発生 神経変性疾患 細胞内物質輸送

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでヒト中枢神経系の形成不全である滑脳症の研究に取り組んできた。一連の研究で原因遺伝子・LIS1は微小管ネットワークや細胞質ダイニンの制御を行っていることを明らかにしたが、その過程で神経細胞内には従来の微小管とは異なった可動性微小管があることを発見した。さらにヒト坐骨神経における軸索内の微小管を電子顕微鏡で解析した結果、さらに複雑な形態を持つものが多く存在することが分かり、これらを非定型微小管と名づけた。興味深いことに非定型微小管はラットでは0.3%、イヌでは5%、ブタでは13%最後にヒトでは20%と高度な神経機能をもつ大型哺乳類になるにつれて法則性をもって増加しており、高度な神経機能の形成と維持に重要な役割を果たしていると考えた。

## 2. 研究の目的

微小管は代表的な細胞骨格であり、キネシンや細胞質ダイニンのようなモータータンパク質のレールとなっている。微小管はさらに中心小体や繊毛内の9+2構造の骨格としての役割以外についてはこれまで認知されていなかった。我々はヒト坐骨神経の解析から、神経細胞における細胞骨格としての微小管は従来の概念と全く異なった形態をとっていることが分かり、非定型微小管と名づけた。ヒトのような大型哺乳類の軸索は1メートルを超えるものがあるが、その中で物質輸送のメカニズムは多くが不明である。この申請課題では大型哺乳類の神経突起内の非定型微小管の構成に必要な因子の同定と役割を解明し、これまで不明であった実際の生体内の神経突起内での軸索輸送のメカニズムを明らかにする。

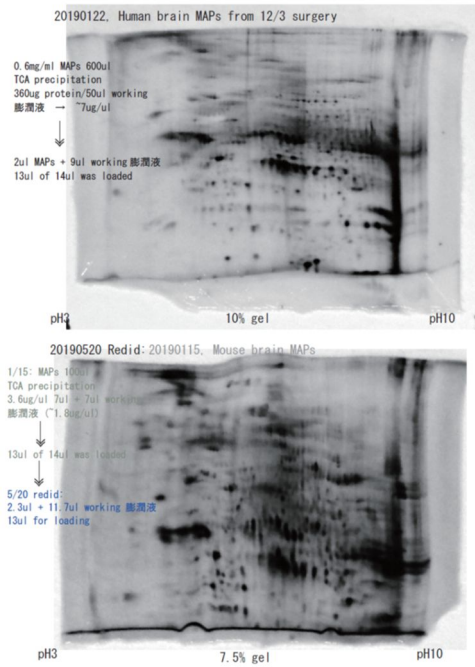
## 3. 研究の方法

非定型微小管がどのような機能を持つかについて明らかにするために、非定型微小管形成に必要と考えられる微小管結合タンパク質を同定する。具体的にはヒト坐骨神経からタンパク質を抽出し、微小管重合の際に共沈させる。次にマウス坐骨神経でも同様の実験を行い、ヒト坐骨神経に特異的に存在する微小管結合タンパク質を質量分析器で同定した。次に、同定されたタンパク質の組み替えタンパク質を作製し、ブタ脳から抽出してきたチューブリンと重合実験を行い濁度の変化からチューブリンの重合に与える影響を解析し候補タンパク質の同定を行った。次に、候補タンパク質を様々に組み合わせて同様の実験を行い候補タンパク質の相互作用を明らかにする。さらに微小管の形状に与える効果を解析するために重合後のチューブリンを包埋し電子顕微鏡で観察した。この再構成実験でヒト坐骨神経に見られる非定型微小管構造が再現できるかどうかを明らかにする。次に微小管結合タンパク質がどのように非定型微小管形成にかかわっているかを明らかにするために多数の均一な粒子を観察、撮影し、画像処理によって粒子の詳細な構造を得る手法である単粒子解析を行って結合部位を同定する。結合タンパク質の分子量が小さい場合はビオチン修飾シアビジン-ビオチン反応によって電子密度を高めることにより可視化する。これらの解析により微小管結合タンパク質がどのようなメカニズムで非定型微小管を形成するかを明らかにする。次に、非定型微小管に蛍光標識をつけて後根神経節細胞に発現させ、後根神経節細胞の軸索伸展に与える影響、ライブセルイメージングを行うことにより軸索内での細胞内物質輸送に果たす役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

ヒト坐骨神経を電子顕微鏡で解析した結果、非定型微小管を発見した。また、ヒトでは非定型微小管が25%ほどの割合を占めることがわかった。一方でラットでは非定型微小管の割合は0.3%にすぎない。興味あることにイヌ坐骨神経では5%、ブタ坐骨神経では15%と哺乳類の大型化、神経構造の複雑化と相関して増加することが分かった。

非定型微小管を形成するのに必要な微小管結合タンパク質を同定するために、マウス脳組織と比較してヒト脳組織に多く見られる微小管結合タンパク質を同定するために、SDS-PAGEによる解析、さらにタンパク質二次元電気泳動を行なった。その結果、ヒト特異的に多く発現している微小管結合タンパク質を見出した(図下)。



さらに、候補タンパク質を質量分析器で解析した結果、LC3、タウ、CRIMP2などのタンパク質を同定した。これらの候補タンパク質の組み替えタンパク質を作成し、ブタ脳から抽出したチューブリンと共存させ、重合実験を行なった結果、微小管重合の促進と安定化させる機能があることが分かった。さらに重合した微小管を電子顕微鏡で解析した結果、従来の微小管とは異なった形態を持つ微小管であることが分かった。

## 業績

1 Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends.

Hirotsune S, Kiyonari H, Jin M, Kumamoto K, Yoshida K, Shinohara M, Watanabe H, Wynshaw-Boris A, Matsuzaki F, Hirotsune S, et al. *Sci Rep.* 2020 Feb 13;10(1):2518. doi: 10.1038/s41598-020-58893-9.

2 Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport.

Toba S, Jin M, Yamada M, Kumamoto K, Matsumoto S, Yasunaga T, Fukunaga Y, Miyazawa A, Fujita S, Itoh K, Fushiki S, Kojima H, Wanibuchi H, Arai Y, Nagai T, Hirotsune S, Toba S, et al. *Sci Rep.* 2017 Nov 27;7(1):16386. doi: 10.1038/s41598-017-15575-3.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toba S, Jin M, Yamada M, Kumamoto K, Matsumoto S, Yasunaga T, Fukunaga Y, Miyazawa A, Fujita S, Itoh K, Fushiki S, Kojima H, Wanibuchi H, Arai Y, Nagai T, Hirotsune S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Alpha-synuclein facilitates to form short unconventional microtubules that have a unique function in the axonal transport.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 16386-16390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-15575-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kumamoto K, Iguchi T, Ishida R, Uemura T, Sato M, Hirotsune S.	4. 巻 6
2. 論文標題 Developmental downregulation of LIS1 expression limits axonal extension and allows axon pruning.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Open.	6. 最初と最後の頁 1041-1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.025999.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jin M, Pomp O, Shinoda T, Toba S, Torisawa T, Furuta K, Oiwa K, Yasunaga T, Kitagawa D, Matsumura S, Miyata T, Tan TT, Reversade B, Hirotsune S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Developmental downregulation of LIS1 expression limits axonal extension and allows axon pruning.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 39902-39910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep39902.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito A, Taniguchi Y, Kim SH, Selvakumar B, Perez G, Ballinger MD, Zhu X, Sabra J, Jallow M, Yan P, Ito K, Rajendran S, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Snyder SH, Sawa A, Kamiya A.	4. 巻 27
2. 論文標題 Developmental Alcohol Exposure Impairs Activity-Dependent S-Nitrosylation of NDEL1 for Neuronal Maturation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cereb Cortex.	6. 最初と最後の頁 3918-3929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep39902.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----