

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03228

研究課題名(和文) MTCLタンパク質群による微小管集合構造制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on the regulatory mechanisms of microtubule organization by MTCL proteins.

研究代表者

鈴木 厚 (Atsushi, Suzuki)

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの身体を構成する細胞は、それぞれ固有の働きを果たすために、多様な形態を示している。これは、物質の運搬のレールとして働いたり形を支えたりしている細胞内の線維構造・細胞骨格の働きに大きく依存している。本研究においては、そうした細胞骨格の一つ、微小管の集合構造を制御する新しいタンパク質群、MTCLタンパク質群の研究を発展させた。特に本研究ではMTCL2の研究を進め、この分子がゴルジ体という細胞小器官を足場にしながら微小管の架橋・束化に働くことを通じて、細胞運動の方向性の維持に必要な微小管の非対称な組織化に働いていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで微小管の架橋に働くタンパク質はほとんど知られていなかった。こうした働きを有する、かつ、全く新しいタイプの微小管制御タンパク質ファミリーの存在を明らかにした学術的意義は非常に大きい。すでに我々は、MTCL1が小脳ブルキンエ細胞の軸索の形成・機能に必須であり、その欠損が運動失調を引き起こすことを示している。一方、本研究に付随しては、MTCL2が小脳顆粒細胞の樹状突起の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。このように、本研究の成果は、神経変性疾患をはじめとした多様なヒト疾患の原因解明にもつながる重要な社会的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：We have previously found the coiled-coil protein MTCL1, which stabilizes microtubules nucleated from the Golgi membrane. In this study, we newly analyzed an MTCL1 paralog, MTCL2, which preferentially acts on the perinuclear microtubules accumulated around the Golgi. MTCL2 associates with the Golgi membrane through the N-terminal coiled-coil region and directly binds microtubules through the conserved C-terminal domain without promoting microtubule stabilization. Knockdown of MTCL2 significantly impaired microtubule accumulation around the Golgi as well as the compactness of the Golgi ribbon assembly structure. Together with several additional results, we concluded that MTCL2 promotes asymmetric microtubule organization by crosslinking microtubules on the Golgi membrane. We also suggested that this function of MTCL2 enables integration of the centrosomal and Golgi-associated microtubules on the Golgi membrane, supporting directional migration.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：微小管 ゴルジ体 架橋 細胞運動 方向性 極性

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮、神経、筋肉細胞の微小管は多くが安定しており、それらが、束や網目といった集合構造をとりながら、個々の細胞の極性化した機能に必須な役割を果たしている。また培養細胞に見られるゴルジ体微小管も、特異的に安定化され、中心体の近傍でネットワーク構造を形成している。こうした微小管の集合構造の異常はがんや脳・神経疾患の発症原因ともなるが、その形成を制御する機構については、まだほとんど解明が進んでいなかった。

(2) 本研究を始めるまでに我々は、細胞極性制御キナーゼ PAR-1 の結合タンパク質として全く新しい微小管制御タンパク質、MTCL1 を発見し、これが上皮細胞のラテラル微小管束の形成や培養細胞のゴルジ微小管の安定化に働いていること、さらには小脳プルキンエ細胞の軸索起始部を貫通する安定化微小管束の形成に働き、その欠損が運動失調を引き起こすことを明らかにしていた。ただ MTCL1 がその C 末端微小管結合領域を介して微小管を協同的に安定化する機構や、ゴルジ体に特異的に集積する機構については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では下記の3点を目的として実験を進めた。(1) MTCL1 の CMTB が古典的 MAPs とは異なるメカニズムで微小管を安定化しており、その結果として、微小管の2次の束化が協同的に誘導されることを証明する。(2) MTCL1 とゴルジ体との結合とその制御が、神経細胞や上皮細胞における微小管集合構造制御にも重要な役割を果たしていることを明らかとする。さらに、(3) 細胞極性制御キナーゼ PAR-1 が MTCL1 のパラログ分子、MTCL2 の微小管結合領域をリン酸化し、そのことを介して微小管集合構造の制御に関わっていることを明らかとする。

3. 研究の方法

(1) MTCL1 の C 末端微小管領域の精製タンパク質を調整し、微小管と結合した状態のクライオ電子顕微鏡鏡像を解析する。また、*in vitro* における微小管の一分子蛍光イメージング系に応用し、この領域が GTP-tubulin に選択的に結合していることを実証する。

(2) MTCL1 の欠失変異体を作成し、ゴルジ体結合領域を絞り込んだうえで、ゴルジ体に結合できない変異体を設計する。この変異体を用いて MTCL1 の生理機能にゴルジ体結合が必須であることを示すとともに、標的としているゴルジ体タンパク質を同定する。

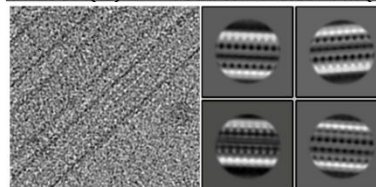
(3) PAR-1 リン酸化部位として同定している MTCL2 のセリン 1454 およびセリン 1454 の二重変異体を作成し、微小管結合能や、MTCL2 の生理的機能に対する影響を解析し、このことを通じて、これら部位のリン酸化の重要性を明らかとする。

4. 研究成果

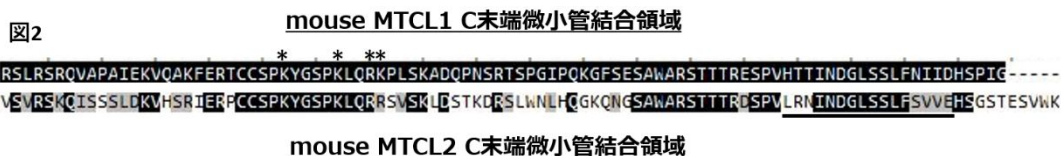
当初想定しなかった結果を得たり、コロナ禍に由来する研究状況の変化などにより、目的の(1)、(3)については当初予定していた到達点には至らなかった。しかし、(1)については予定外の実験の展開が大きく進み、当初予定していた以上の興味深い結果が得られた。(2)についても、研究対象を途中から MTCL2 のゴルジ局在機構の解明に切り替えたことが功を奏して、本研究課題の目的である MTCL タンパク質群に関する知見が大きく深まり、成果を論文として国際誌に発表することができた(参考文献 1)。

(1) 共同研究者である神戸大の仁田教授のところまで進めていた電子顕微鏡解析は、当初、MTCL1 の C 末端微小管領域の精製が難航した。しかし最終的にはこの点を克服し、まずこの領域が微小管安定化活性を示すことを電子顕微鏡レベルで確認した。ついで、図 1 に示すように、この領域と結合した微小管に関するクライオ電子顕微鏡 初期画像を得ることに成功した。MTCL1 領域が予想以上に小さく、微小管のプロトフィラメント単位の精密化に課題を残したが、今後、より電圧を上げ倍率を高めた像をとることによって最終的な成果を生み出しうる段階までには到達した。

図1. MTCL1 C-MTBDが結合した微小管のクライオ電子顕微鏡写真(左)と、そこから抽出して平均化した画像(右)



微小管の一分子解析実験については予定通りに進まなかったが、本研究期間中に、MTCL1のC末端微小管領域の活性とアミノ酸配列の関係に関する研究が大きく進んだ。まず、中央付近の間で保存された塩基性アミノ酸4つ(KRKK)(図2 *印)をグルタミン酸に置換するだけで、微小管活性が消失することが判明した。

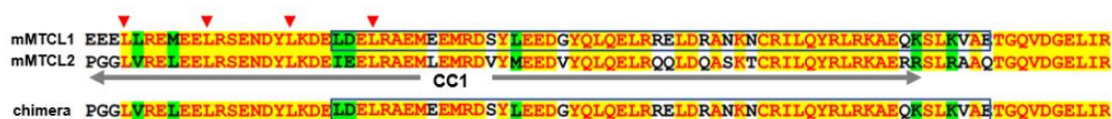


一方、N末端微小管領域についても、2か所のクラスターに分かれて集中している12個の塩基性アミノ酸をすべてグルタミン酸に変えると微小管結合活性が消失することが明らかになった。そして、これらN末端、C末端両方の微小管結合領域に変異を導入することで、微小管結合活性を失った全長MTCL1を作成することにも成功し、今後のMTCL1の機能解析に利用することができる不可欠なツールを得ることができた。

さらに本研究期間では、MTCL1と高い相同性を示すMTCL2のC末端微小管領域の研究を進めることで、MTCL1とは異なり、このパラログの微小管安定化活性は非常に弱いことが明らかとなった。この知見を利用して、MTCL1、2のC末端微小管結合領域の各種キメラタンパク質を作成することによって、MTCL1のC末端微小管領域の示す微小管安定化活性はC末端側に存在するMTCL1特有の7アミノ酸(図2 下線部)に大きく依存していることが明らかとなった。またこの活性は、中央部の塩基性アミノ酸に依存する微小管結合活性をある程度分離できることも判明した。今後クライオ電子顕微鏡解析から得られる構造的情報と組み合わせることによって、MTCL1 C末端微小管領域の作用メカニズムの解明が大きく進むことが期待できる。

(2) 本研究計画では、MTCL1のゴルジ体結合領域の絞り込みを目指したが、この分子に関しては微小管結合領域以外を少しでも除くと本来の細胞内局在が見られなくなることが明らかとなった。実際、アミノ酸の保存性が非常に高いMTCL2のゴルジ結合領域内430アミノ酸の一部、56

図3 MTCL2 ゴルジ体結合領域(一部)のMTCL1との比較と作成したキメラ変異体の配列



アミノ酸にわたる領域をMTCL1と交換し、結果として16アミノ酸を置換したものに变化させただけで、MTCL2のゴルジ結合が消失することが判明した(図3)。

そこで、研究対象をMTCL2に切り替え、このMTCL1パラログ分子も微小管結合タンパク質であり、細胞機能にとって不可欠な役割を果たしていることを明らかにすることに集中した。その中では、4アミノ酸置換によってゴルジ体局在を阻害する変異体を設計することに成功し、これを活用することによって、MTCL2がゴルジ体上で微小管を架橋する機能を有することを明らかとした。そして、この機能を介して、MTCK2が、ゴルジ体周辺への微小管の集積 = 細胞内の微小管配向の非対称化を促し(図4、5)、細胞運動の極性維持に必須な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、CLASP2、およびGiantinがMTCL2のゴルジ体局在を担う分子の候補であることを示し、これらの分子との複雑な相互作用を通じてMTCL2の核の片側への特異的な集積が引き起こされていることを明らかとした。

また、MTCL1と2の微小管側面への結合様式が既知のMAPsとは異なり、間歇的であるという特徴を有することを明らかにし、これらが全く新しい微小管結合タンパク質ファミリーを形成していることを提唱するに至った(図6)。

(3) PAR-1のリン酸化部位であるセリン1454、およびセリン1454を、ともにアラニンあるいはアスパラギン酸に変えた二重変異体を用いてMTCL2ノックダウンHeLa-K細胞のレスキュー実験を進めたが、間期における微小管の配向やゴルジリボンの形成、および、分裂期における紡錘体の形成、いずれの表現型においても、野生型と大きく異なるレスキュー能を確認することはでき

図4. MTCL2の消失は、ゴルジ体領域への微小管の集積を劇的に低下させる

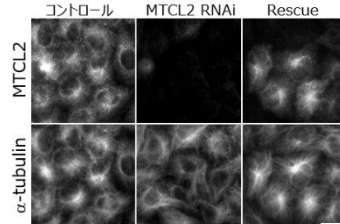


図5. MTCL2はゴルジ膜上で微小管を架橋する

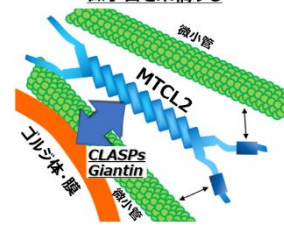
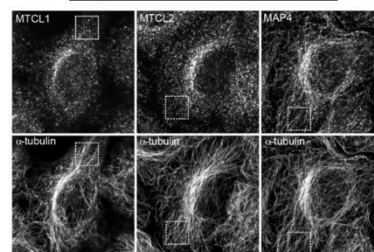


図6. MTCL1, 2は、既知の微小管結合タンパク質とは異なり、微小管側面に間歇的に結合する特徴を有する



なかった。これらの部位のリン酸化は、MTCL2 の微小管結合を阻害することが予想され、PAR-1 が上皮細胞極性制御に働くことを考えると、今後、培養上皮細胞を用いることでこの点の解明が進む可能性が示唆された。

<参考文献>

1. Matsuoka R, Miki M, Mizuno S, Ito Y, Yamada C, Suzuki A. MTCL2 promotes asymmetric microtubule organization by crosslinking microtubules on the Golgi membrane. *Journal of Cell Science* 135: jcs259374, 2022

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Risa Matsuoka, Masateru Miki, Sonoko Mizuno, Yurina Ito, Chihiro Yamada and Atsushi Suzuki	4. 巻 135
2. 論文標題 MTCL2 promotes asymmetric microtubule organization by crosslinking microtubules on the Golgi membrane	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.259374	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 峯川麻里、鈴木厚
2. 発表標題 微小管制御タンパク質、MTCL2は、小脳顆粒細胞の樹状突起形成に重要な役割を果たす
3. 学会等名 第73回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木厚、松岡理沙
2. 発表標題 ゴルジ膜上で非対称な微小管ネットワークの組織化に働く新しい微小管制御タンパク質、MTCL2の研究
3. 学会等名 第73回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤野慈乃、鈴木厚
2. 発表標題 ゴルジ体近傍に集積する微小管ネットワークはER-Golgi初期輸送を負に制御している
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峯川麻里、鈴木厚
2. 発表標題 ゴルジ結合性微小管制御タンパク質MTCL2は、小脳顆粒細胞の樹状突起形成を制御している
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木厚
2. 発表標題 MTCL2はゴルジ膜上で微小管を非対称に組織化することを通じて、細胞極性に働く
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡理沙、小林菜月、鈴木厚
2. 発表標題 微小管架橋因子、MTCL 2 のゴルジ体局在化機構の解析
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡理沙、水野苑子、鈴木厚
2. 発表標題 微小管架橋因子、MTCL2のゴルジ膜局在化機構の研究
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峯川麻里、鈴木厚
2. 発表標題 微小管制御タンパク質、MTCL2の小脳顆粒細胞における発現と局在
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Suzuki, Risa Matsuoka, Sonoko Mizuno
2. 発表標題 MTCL2 is a new Golgi-resident microtubule-regulating protein, essential for organizing asymmetric microtubule network
3. 学会等名 米国細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 厚
2. 発表標題 新規MTCLタンパク質パラログ、MTCL3の機能解析
3. 学会等名 日本細胞生物学会 第71回年会
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担者	仁田 亮 (Nitta Ryo) (40345038)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------