

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03396

研究課題名(和文)細胞の形態・極性制御を司る微小管ネットワーク形成の構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis of CAMSAP-induced microtubule network formation

研究代表者

仁田 亮(Nitta, Ryo)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40345038

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)：細胞の形づくり、細胞骨格の微小管ネットワークがどのように形成されるのかに依存する。 γ -tubulin複合体が中心体を形成して、微小管ネットワーク形成を誘導することが知られていたが、中心体とは関係なく重合する非中心体性微小管の重要性が明らかになってきている。我々は、微小管マイナス端結合タンパク質CAMSAP2が微小管の重合核形成を促進し、星状体様微小管ネットワークを誘導することを発見した。この過程は、液-液相分離を介して行われ、重合中心では多数のリングやシート状の微小管重合の中間体が形成される。そして溶液中の遊離CAMSAP2が、重合中心からの微小管放射状伸長を支持し、星状体が形成される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAMSAPファミリータンパク質群が非中心体微小管ネットワークの形成を誘導することができるという発見は、神経細胞、上皮細胞、筋細胞、線維芽細胞など、高度な極性を持つ細胞における形づくりの基本的なメカニズムを理解する上で、画期的な発見である。この知見は、神経科学、細胞生物学、発生生物学、構造生物学など、様々な分野の研究の進展に大きく貢献するものである。また、微小管形成過程における多くの中間体の観察に成功し、チューブリンから微小管への重合過程の分子機構の理解に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Cell polarity formation depends on how the microtubule network of the cytoskeleton distributes. The γ -tubulin ring complex forms centrosome, inducing microtubule network formation. However, the importance of non-centrosomal microtubules, which polymerize independently of centrosomes, is becoming clear. We found that the microtubule minus-end-associated protein CAMSAP2 promotes microtubule nucleation and polymerization. CAMSAP2 induces a stellate-like microtubule network, the Cam2-aster. This process is mediated by liquid-liquid phase separation (LLPS), forming numerous rings and sheets of microtubule polymerization intermediates at the polymerization centers. Free CAMSAP2 in solution then supports the radial elongation of microtubules from the polymerization center, forming the Cam2-aster.

研究分野：構造生物学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格 非中心体性微小管 極性形成 CAMSAP クライオ電子顕微鏡 TIRF

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中心体に依存しない非中心体性微小管ネットワークは、生体内の様々な細胞における形態・極性形成を牽引する。この非中心体性微小管ネットワーク形成に重要な微小管結合タンパク質として、CAMSAP ファミリータンパク質と Tau ファミリータンパク質が知られている。前者は、非中心体性微小管のマイナス端に結合し、その安定化と局在に関連することが報告されていた。後者については Tau や MAP4 などが知られ、微小管を安定化し、また微小管同士を架橋して平行に整列させ、またその過剰発現や過度なリン酸化は病態に直結することも知られている。

2. 研究の目的

非中心体性微小管ネットワーク形成の構造基盤を明らかにし、細胞の極性形成を制御する分子機構を解明する。そのために、1. 微小管重合開始の起点形成、2. 微小管重合～重合後の安定化・微小管ネットワーク形成の2つの過程に分けて構造解析を行う。1は CAMSAP ファミリータンパク質、2は Tau ファミリータンパク質により主に制御される。本研究ではまず、各々に関わるタンパク質群を *in vitro* で再構築し、高分解能構造をクライオ電子顕微鏡法や X 線結晶解析法を用いて解析する。CAMSAP が微小管の重合核を形成し、微小管の伸長方向を規定する過程、微小管重合後に MAP4 が微小管を安定化し、複数の微小管を束ねて平行に整然と配列させる過程を、原子レベルの立体構造から明らかにする。これによりあらゆる細胞に通じる形態・極性形成の制御機構を解明するとともに、その結果をモデル細胞を用いて *in vivo* で検証し、様々な細胞における特異的な機能の制御を明らかにする。

3. 研究の方法

当初の予定では、Tau ファミリーと CAMSAP ファミリーを同時並行に進める予定であったが、微小管ネットワーク形成に対する CAMSAP ファミリーの重要な機能がわかってきたため、以下の通り CAMSAP ファミリーの解析に特化して研究を推進することとした。

1. 生化学的解析：CAMSAP2 による微小管の重合活性を評価する。
2. 蛍光を用いた生物物理学的・細胞生物学的解析：蛍光顕微鏡、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)、共焦点蛍光顕微鏡により、*in vitro* で CAMSAP が tubulin、微小管へどのような作用を及ぼすのか、また HeLa 細胞内における微小管形成時の CAMSAP の局在や作用を評価する。
3. 電子顕微鏡解析：電子顕微鏡、クライオ電子顕微鏡を用いて、CAMSAP の作用を分子レベルで可視化し、CAMSAP の機能を評価する。

4. 研究成果

微小管マイナス端結合活性を有するタンパク質群 CAMSAP ファミリータンパク質は、すでにできあがった微小管のマイナス端を安定化し、細胞局所に繫留するタンパク質群として報告されていた。しかし、本研究により CAMSAP は、微小管重合・微小管ネットワーク形成の初期段階から制御に関わることが明らかになった。CAMSAP ファミリータンパク質は、中心体に依存せず微小管重合を制御し、中心体以外で唯一の MTOC となり得ることを証明し、非中心体性微小管ネットワーク形成の中心分子として、その重要性が明らかとなった(Imasaki et al., *bioRxiv*, 2021)。

1. 生化学的解析：CAMSAP2 は、細胞内と同等の濃度の α, β -tubulin と共存することにより、微小管の重合核形成を著しく促進 (=重合核形成因子 nucleator) する。
2. 蛍光を用いた生物物理学的・細胞生物学的解析：CAMSAP2 が単独で液-液相分離 (LLPS) を作ることで、LLPS 内部に tubulin を効率よく取り込むことで、LLPS 内で tubulin が濃縮され多数の微小管重合の中間体 (tubulin リング、tubulin シート) を形成され充満すること、遊離 CAMSAP2 存在下では LLPS から放射状に微小管が伸長し、星状体様構造 Cam2-aster が形成されることを示した。
3. 電子顕微鏡解析：ネガティブ染色およびクライオ電子顕微鏡法を用いて、まずは Cam2-aster が同様に観察できることを確認し、aster 中央 (LLPS) から放射状に微小管が伸び出し、隣り同士の Cam2-aster が密な微小管ネットワークを形成していることを確認した。さらに、aster の形成過程をタイムラプス的に観察することにより、LLPS 内では tubulin リング、シートが多数形成され、時間経過とともに微小管へ重合していくことも確認された。

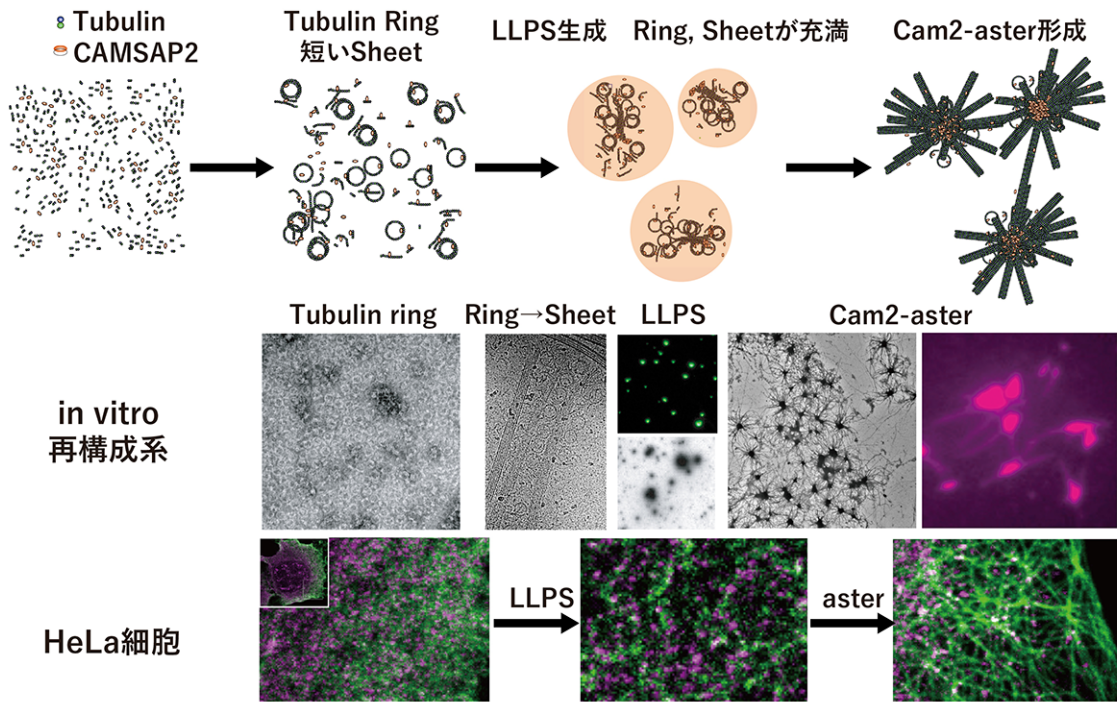


図. CAMSAP2による微小管重合制御。上) CAMSAP2による微小管重合モデル。中) in vitro 再構成系 (電子顕微鏡負像、クライオ電子顕微鏡像、TIRF 像)。下) HeLa細胞内非中心体性微小管ネットワーク形成。緑: tubulin、マゼンタ: CAMSAP。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Imasaki Tsuyoshi, Nitta Ryo et al.	4. 巻 1
2. 論文標題 CAMSAP2 organizes a γ -tubulin-independent microtubule nucleation centre	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.03.01.433304	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 吉川知志, 仁田英里子, 今崎剛, 仁田 亮	4. 巻 71
2. 論文標題 微小管結合タンパク質	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 298, 303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Saijo-Hamano Yumiko, Sherif Aalaa Alrahman, Pradipta Ariel, Sasai Miwa, Sakai Naoki, Sakihama Yoshiaki, Yamamoto Masahiro, Standley Daron M, Nitta Ryo	4. 巻 5
2. 論文標題 Structural basis of membrane recognition of <i>Toxoplasma gondii</i> vacuole by Irgb6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202101149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 仁田亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で见たいもの：医学・生物学応用
3. 学会等名 第1回クライオ電子顕微鏡画像からの高度情報処理研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁田亮
2. 発表標題 解剖学教室において基礎医学研究を推進する：私なりのスタンスを探して
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Imasaki T, Kikkawa S, Niwa S, Shigematsu H, Aoyama K, Mitsuoka K, Shirouzu M, Takeichi M, Nitta R
2. 発表標題 The mechanism of microtubule nucleating center formation by CAMSAP2
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電顕で見る細胞骨格ネットワーク構築の分子構造基盤
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で見る医学・生命科学
3. 学会等名 横浜市立大学大学院医学研究科 大学院医学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Nitta
2. 発表標題 Challenges of cryo-EM applications for medical and biological science
3. 学会等名 RIKEN-BDR Online Retreat (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で見る医学・生命科学
3. 学会等名 京都大学大学院理学研究科 大学院セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小室一成 (今崎剛, 仁田英里子, 仁田亮 (分担執筆))	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 210
3. 書名 Cutting Edge of Molecular Cardiology 新しい臨床を開拓するための分子循環器病学	

1. 著者名 田中啓二, 若槻壮市 (仁田亮, 今崎剛 (分担執筆))	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 248
3. 書名 イメージング時代の構造生命科学	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------