

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790176

研究課題名 (和文) クロライドイオンによる微小管の動態制御機構

研究課題名 (英文) Role of chloride ion in the dynamics of microtubule

研究代表者

中島 謙一 ( NAKAJIMA KEN-ICHI )

研究者番号：40398392

研究成果の概要 (和文)：本研究では、微小管の基本的な動態、およびtubulinのGTPase活性に対するクロライドイオンを始めとする様々な陰イオンの影響を検証し、以下のことを明らかにした。

1 微小管の重合に対する各種陰イオンの影響

試験管内においてtubulinを各種の陰イオン(Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、I<sup>-</sup>、gluconate)存在下で重合させると、Cl<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、gluconate存在下でよく重合し、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>、I<sup>-</sup>存在下では弱い重合が観察された。

2 tubulinのGTPase活性に対する陰イオンの影響

tubulinの持つGTPase活性を各種の陰イオン存在下で測定すると、盛んな重合が見られたCl<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、gluconate存在下で活性が低く、弱い重合しか見られなかったNO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Br<sup>-</sup>存在下で高い活性が見られた。

これらの結果から、Cl<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、gluconateなどによりtubulinのGTPase活性が抑制され、それを介して微小管の伸長が促進されていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Microtubules are fundamental cytoskeletal systems in eukaryotic cells. Microtubule, assembled from heterodimers of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, are cylindrical polymers whose *in vitro* assembly from subunits requires GTP (only GTP-bound form of  $\beta$ -tubulin can assembled into polymer and GTP is hydrolysed to GDP just after assembly). In this study, we investigated the role of various anions, especially chloride ion, in polymerization and GTPase activity of tubulin.

1. The effect of various anions on microtubule polymerization

In the presence of Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> and gluconate, effective *in vitro* microtubule polymerization was observed. In the presence of Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, or I<sup>-</sup>, weak polymerizaion was observed.

2. The effect of various anions on tubulin GTPase activiy

GTPase activiy of tubulin was measured, and found that high activity was observed in the presence of Br<sup>-</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and weak activiy was observed in the presence of Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> and gluconate.

These observations indicated that some anions such as Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> and gluconate promoted polymerization of microtubules, via suppression of GTPase activity of tubulin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞骨格・クロライドイオン

1. 研究開始当初の背景

微小管はすべての真核細胞に存在する細胞骨格系であり、 $\alpha$ -および $\beta$ -tubulin という二種類のグアニンヌクレオチド結合タンパク質どうしの非共有結合により形成される細長い重合体である。微小管は動的に不安定な構造体であり、その動的不安定性は、tubulin の持つ GTP 加水分解能に基づく。GTP 結合型 tubulin のみが重合可能であるが、重合した後に tubulin の GTP は微小管内で加水分解される。重合端には GTP 結合型 tubulin が存在することになるが、GTP 加水分解の速度が tubulin 重合速度より速くなると微小管は脱重合する。すなわち、重合端の tubulin の GTP 加水分解能が抑制されている方が、微小管の重合には促進的である。

一方、研究代表者らは、ラット副腎由来 PC12D 細胞において、神経成長因子 NGF 処理による神経突起伸長には  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体が必須であることを明らかにし、さらに、 $\text{Cl}^-$  濃度が低い培養液中では神経突起の伸長が有意に抑制されることを明らかにした。これらの知見は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  共輸送体を介した細胞内への  $\text{Cl}^-$  の取り込みと、神経突起伸長との間に関連があることを示唆している。神経突起の伸長には、細胞骨格系（微小管およびアクチン骨格系）のダイナミックな再編成が深く関与する。このうち微小管は神経突起の内部に束になって存在し、神経突起の伸長を促進する働きがある。すなわち、神経突起の伸長は、突起内部の微小管の重合に依存する。上述したように、微小管の重合・脱重合は tubulin の持つ GTPase 活性が深く関わっており、重合端の tubulin が GTP 結合型である方が、より微小管の伸長は促進される。すなわち、重合端の tubulin の GTPase 活性が抑制されている方が、微小管の重合には促進的であると考えられる。一方で、三量体 G タンパ

ク質の一種の GTPase 活性が  $\text{Cl}^-$  により阻害されるという先行報告もあり、 $\text{Cl}^-$  と GTPase との関連も示唆されている。これらの知見をふまえて、微小管の基本的な動態に及ぼす  $\text{Cl}^-$  の影響とその詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

微小管の動態に及ぼす陰イオン、特に  $\text{Cl}^-$  の影響とその詳細な分子機構を明らかにすることを目的とする。

特に、 $\text{Cl}^-$  により tubulin の GTPase 活性が抑制されるのか。また、それを介して微小管の重合が促進されるのかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

研究には精製ブタ tubulin を用いた（蛍光色素で標識した tubulin を混合しておき、蛍光顕微鏡下で観察できるようにしてある）。

(1) 微小管の重合に対する各種陰イオンの影響

試験管内において精製 tubulin タンパク質を GTP 存在下あるいは非加水分解アナログ GMPCPP 存在下、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートすると重合して微小管を形成する。この際、 $\text{KCl}$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{KBr}$ 、 $\text{KI}$ 、 $\text{KF}$ 、 $\text{K-gluconate}$  存在下で反応を行い、サンプルの一部を経時的に分取し、グルタルアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡で重合した微小管の長さおよび本数を計測した。

(2) tubulin GTPase 活性の測定

試験管内において精製 tubulin タンパク質を GTP 存在下、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし遊離した無機リン酸を比色法で定量した。この際、 $\text{KCl}$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{KBr}$ 、 $\text{KF}$ 、 $\text{K-gluconate}$  存在

下で反応を行い、各種陰イオンのGTPase活性への影響を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 微小管の重合に対する各種陰イオンの影響について

精製したブタ脳由来tubulinタンパク質 (Rhodamineで標識したtubulinを含む) を、1 mM GTPおよび 100 mM KCl、KNO<sub>3</sub>、KBr、KI、KF、K-gluconate存在下、37°Cでインキュベートし、0、10、20、60分後に一部を分取し 1% グルタルアルデヒドで固定したのち、一部を蛍光顕微鏡で観察した。重合した微小管の長さおよび単位反応液中の微小管の本数を計数した。

KCl、KF、K-gluconateを用いた際に、60分後に約 20μmの微小管が約 120x10<sup>6</sup>本/ml形成されたが、KBr、KNO<sub>3</sub>を用いた際は、長さが約半分 (約 10μm) の微小管が 20x10<sup>6</sup>本/ml形成された。また、KIを用いた際は全く重合が認められなかった (図 1-a、1-b)。

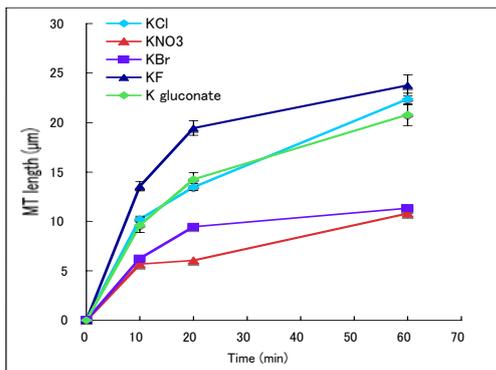


図 1-a 微小管の長さ

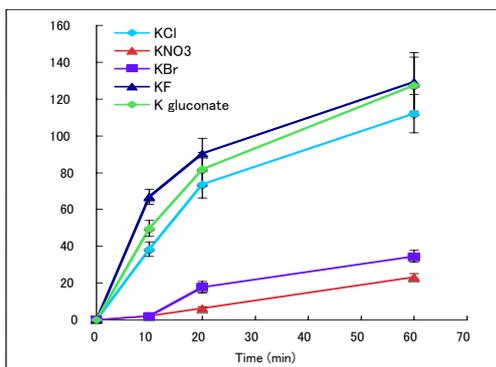


図 1-b 形成された微小管の本数

##### (2) tubulin GTPase 活性に対する各種陰イオンの影響

精製したブタ脳由来tubulinタンパク質を、1 mM GTPおよび 100 mM KCl、KNO<sub>3</sub>、KBr、KF、K-gluconate存在下 37°Cでインキュベートし、0、20、60、150分後に加水分解により遊離した無機リン酸を比色法で定量した。

KNO<sub>3</sub>、KBrを用いた際に高いGTPase活性が認められた (150分反応後に約 50 μMの無機リン酸Piの遊離)。一方、KCl、KF、K-gluconateを用いた際はKNO<sub>3</sub>、KBrの時よりも低いGTPase活性が認められた (KCl、K-gluconate: 約 30 μM無機リン酸の遊離、KF: 約 15 μM無機リン酸の遊離) (図 2)。

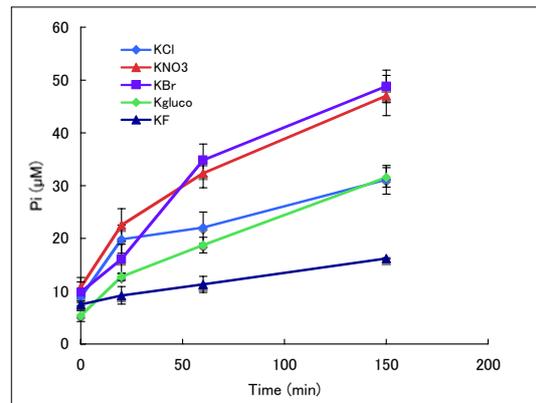


図 2 tubulin GTPase 活性

##### (3) 微小管の重合に対する各種陰イオンの影響について—非加水分解アナログを用いた場合—

(1)および(2)において、tubulinのGTPase活性と重合に関連性があることが示唆された。すなわち、GTPase活性が低いKCl、KF、K-gluconateを用いた際に活発な重合が見られ、それとは対照的にGTPase活性が高いKNO<sub>3</sub>、KBrを用いた際に弱い重合が見られた。そこで、GTPの非加水分解アナログ (GMPCPP) を用いた際の、微小管の重合に対する各種陰イオンの影響について調べた。

精製したブタ脳由来tubulinタンパク質 (Rhodamineで標識したtubulinを含む) を、0.1 mM GMPCPPおよび 100 mM KCl、KNO<sub>3</sub>、KBr存在下、37°Cでインキュベートし、0、10、20、60分後に一部を分取し 1% グルタルアルデヒドで固定したのち、一部を蛍光顕微鏡で観察した。重合した微小管の長さおよび単位反応液中の微小管の本数を計数した。

KCl、KNO<sub>3</sub>、KBrいずれを用いた場合においても、10 μm程度の長さの微小管が、非

常に数多く形成された (KCl: 1000x10<sup>6</sup>本/ml、KNO<sub>3</sub> およびKBr : 500-600x10<sup>6</sup>本/ml) (図 3-a、3-b)。

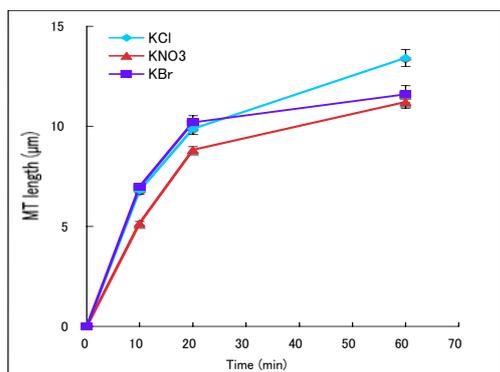


図 3-a アナログを用いた際の微小管の長さ

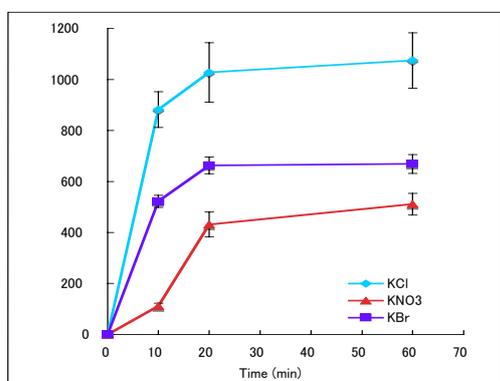


図 3-b アナログを用いた際に形成された微小管の本数

tubulinの重合には、tubulinがGTP結合型である必要があり、GDP結合型では重合は起こらない。また、結合したGTPはモノマーが微小管に取り込まれた少し後に加水分解されると考えられている。また、微小管に取り込まれた後のGTP加水分解は、その微小管の脱重合に必須であると考えられている。また、非加水分解アナログを用いると、重合が促進されることに加えて脱重合が阻害され、結果として微小管の形成には促進的に働くと考えられている。今回の研究において、GTPase活性が低いKCl、KF、K-gluconateを用いた際に活発な重合が見られ、GTPase活性が高いKNO<sub>3</sub>、KBrを用いた際に弱い重合が見られた。さらにGTPの非加水分解アナログを用いた際にはKCl、KNO<sub>3</sub>、KBrいずれを用いた場合でも、非常に活発な重合が見られた。これらの結果より、KNO<sub>3</sub>やKBrを用いた場合、モノマー状態でのGTPase活性が高い可能性や、重合してもすぐに脱重合してしまう可能性 (重合スピードよりも脱重合スピードの方が速い可能性) が考えられる。一方、KCl、

KF、K-gluconateを用いた場合、モノマー状態でのGTPaseが低い可能性や、重合スピード>脱重合スピードである可能性が考えられる。今後は、一本一本の微小管のリアルタイムでの動態や、モノマー状態におけるGTPase活性が各種陰イオンによりどのような影響を受けているのかの検証が望まれる。

また、細胞内における微小管の動態と、細胞内クロライドイオン濃度との間にどのような関連性があるのかを検証することが課題であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, Marunaka Y. NaCl flux between apical and basolateral side recruits claudin-1 to tight junction strands and regulates paracellular transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393:390-396 (2010) 査読あり

② Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, Marunaka Y. Hydrostatic pressure regulates tight junctions, actin cytoskeleton and transcellular ion transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390:1315-1321 (2009) 査読あり

③ Tokuda S, Niisato N, Nagai T, Taruno A, Nakajima K, Miyazaki H, Yamada T, Hosogi S, Ohta M, Nishio K, Iwasaki Y, Marunaka Y. Regulation of paracellular Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> conductances by the hydrostatic pressure. *Cell Biol. Int.* 33:949-956 (2009) 査読あり

④ Asano J, Niisato N, Nakajima K, Miyazaki H, Yasuda M, Iwasaki Y, Hama T, Dejima K, Hisa Y, Marunaka Y. Quercetin stimulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransport via PTK-dependent mechanisms in human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41:688-695 (2009) 査読あり

〔学会発表〕（計5件）

①

中島謙一、新里直美、丸中良典. 神経突起伸長におけるクロライドイオン輸送体NKCC1の役割 —フラボノイドによる神経再生の試み—. 生理研研究会「上皮組織における細胞外環境感受機構」 2009年11月9日 岡崎.

②

Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. The role of chloride ion in dynamics of microtubule. 第36回国際生理学会大会 (IUPS 2009) 2009年7月30日 京都.

③

Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. The role of chloride ion in dynamics of microtubule. Satellite symposium of IUPS 2009: Epithelial ion transport in health and disease 2009年7月23日-25日 京都.

④

中島謙一、新里直美、丸中良典. 神経突起伸長に対するクロライドイオン輸送体の役割. 膜シンポジウム 2008 2008年11月14日 大阪.

⑤

中島謙一、新里直美、丸中良典. 神経突起伸長に対するフラボノイドの影響. 第101回近畿生理談話会 2008年9月13日 大阪.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 謙一 (NAKAJIMA KEN-ICHI)

研究者番号：40398392

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：