

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 日現在

機関番号：22701  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22570190  
 研究課題名（和文） 細胞移動に影響を与える微小管伸長端結合蛋白質の微小管安定化機構の解析  
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of microtubule stabilization by plus-end tracking proteins  
 研究代表者  
 林 郁子（Hayashi Ikuko）  
 横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・准教授  
 研究者番号：80464527

研究成果の概要（和文）：染色体分配や細胞移動に重要と考えられている微小管結合蛋白質 CLASP2 について、2つの微小管結合ドメインの結晶構造を決定し TOG ドメインであることを示した。立体構造を基盤にした変異体解析により CLASP2 の微小管結合には TOG ドメインが必須であることを明らかにした。また CLASP2 は微小管結合蛋白質 EB1 と相互作用するが、TOG ドメインと EB1 両方が CLASP2 の微小管安定化能の発揮に必須であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Microtubule plus-end tracking protein CLASP proteins play a critical role in chromosomal segregation and cell migration. We determined the crystal structures of two microtubule-binding TOG domains in CLASP2. By mutational analysis, we showed that both TOG domains are essential for CLASP2 binding to microtubules and are able to stabilize microtubules to a maximum extent when CLASP2 forms a complex with another microtubule-binding protein EB1.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：x線結晶構造解析・電子顕微鏡解析・細胞骨格・細胞遊走

## 1. 研究開始当初の背景

細胞移動は発生胚における神経冠細胞の再配置や感染部位へのマクロファージの移動、転移性腫瘍細胞の分散などに見られるように、医学的に重要で非常に高度なプロセスが統合された現象である。これまで微小管の細胞移動への関与が示唆されており、微小管は細胞移動を司るアクチン細胞骨格のダイナミクスと密接に関わっていることも明らかになってきた。近年になって CLIP170、Adenomatous Polyposis Coli (APC) などの因

子が物理的に双方の細胞骨格因子と相互作用することで、細胞皮質にて微小管とアクチン細胞骨格のクロストークに関わっていることが示された。しかし Rho ファミリー G 蛋白質を介した情報伝達経路や細胞遊走に至るまでの分子機構などの詳細は未だ解明されていない。

微小管はモーター蛋白質や微小管結合蛋白質などの様々な因子によってダイナミクスの制御を受ける。1999年に微小管の伸長端に直接作用して微小管構造を安定化する微小

管伸長端集積蛋白質群 (+TIPs) が報告され、微小管が関わる様々な生命現象に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。+TIPs は微小管伸長端にて細胞内の他の因子と相互作用し、微小管を各組織にアンカーする役割を果たすと考えられている。さらに+TIPs のひとつである CLASP 蛋白質が移動中の細胞のトランスゴルジ網 (TGN) から微小管の核形成と移動方向への伸長を促すことが報告された (Efimov et al., 2007)。この発見は微小管の細胞移動における小胞輸送の寄与を直接支持するばかりでなく、中心体由来でない微小管による細胞分極が細胞移動に関わることを示す。また生体の発生や分化は細胞極性によって重要な影響を受けるが、CLASP はハエや植物において微小管を介した非対称細胞分裂や神経分化に必須であることもわかってきた。しかし 1000 アミノ酸を超える CLASP のなかで、CLASP1 の N 末端 TOG ドメインを除いた領域の分子構造情報は得られていない。本研究で対象とする CLASP2 は、微小管結合領域ばかりでなく+TIPs である EB1 や CLIP170 との結合領域を有し、特に EB1 結合領域が CLASP2 の伸長端への局在化に必要な十分である。またグリコーゲン合成酵素リン酸化酵素 (GSK3beta) のリン酸化によって CLASP2 の微小管、EB1、IQGAP1 への結合が制御されることが報告されている (Kumar et al., 2009; Watanabe et al., 2009)。すなわち GSK3beta の活性に応じて CLASP2 は細胞膜近傍で微小管に効率的に結合し、細胞皮質組織に微小管をアンカーさせると考えられる。しかしこれらの相互作用分子は TGN に局在化しないことから、CLASP2 の微小管核形成機構と伸長端局在化機構は独立の現象ととらえるべき、すなわち複数の様式で微小管と相互作用すると推測される。この分子機構を理解するためには、現行の細胞生物学的手法を利用するばかりでなく、立体構造を基盤とした夾雑物のない系での分子生物学的解析が必要である。

(参考文献)

Efimov A et al., *Dev. Cell*, **12**, 917-930 (2007).  
Kumar et al., *J Cell Biol*, **184**, 895-908 (2009).  
Watanabe et al., *J Cell Sci*, **122**, 2969-2979 (2009).

## 2. 研究の目的

TGN から微小管の核形成を促し、細胞極性については細胞移動に影響を及ぼす微小管伸長端結合蛋白質 CLASP2 について：

(1) それぞれの機能ドメインの立体構造を決定する。

(2) CLASP2 に 4 か所存在する保存領域が微小管安定化にいかに関わるかを試験管内で解析する。

(3) CLASP 結合分子 GCC185 について CLASP2 結合領域を解析し、複合体の立体構造を決定する。

(4) CLASP2 変異体を細胞内に導入することで、保存領域が細胞内でどのような機能を担い微小管安定化に寄与するかを解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 結晶構造解析

CLASP2 各保存領域について大腸菌による発現系を用いて蛋白質試料を調製、結晶化を行った。セレンメチオニンを用いた多波長異常分散法によって結晶構造を決定した。

### (2) 蛋白質間相互作用の解析

CLASP2 とその相互作用分子の結合定数は等温滴定型熱量測定 (ITC) によって決定した。また GCC185 における CLASP2 の相互作用領域は酵母を用いた Y2H 法によって決定した。微小管と+TIPs の相互作用解析は、超遠心分離機を用いた沈降分離法によって分析した。

### (3) 微小管安定化能の解析

+TIPs のような微小管安定化因子は試験管内で微小管の重合を促進する。この親和性は繊維状に変化したチューブリン分子を光散乱法で計測することにより数値化できる。また薄層クロマトグラフィーを用いたチューブリンの GTP 加水分解を測ることで微小管重合度を定量化することができる。本課題では上記の 2 つの手法を相補的に用いることで、CLASP2 やその変異体の微小管安定化能の解析を行った。さらにチューブリンへの CLASP2 添加後の微小管重合について電子顕微鏡を用いて解析を試みた。

### (4) 細胞内への遺伝子導入実験

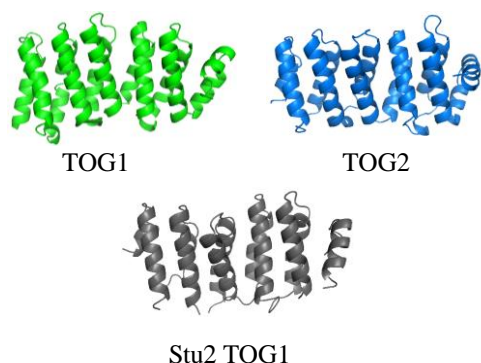
本課題では研究協力者である米国 Vanderbilt 大学の Irina Kaverina 博士との共同研究により、CLASP2 各種変異体のヒト細胞内への遺伝子導入実験を行い、細胞内での微小管の形状変化を観察した。

## 4. 研究成果

(1) CLASP2 の 2 つの微小管結合ドメインの立体構造の決定

CLASP2 には 2 つの保存された微小管結合ドメインが存在し、その配列から微小管ポリマーゼとして知られる XMAP215 の微小管結合性の TOG ドメインと相同性があると推定されてきた。私達は結晶構造解析によって CLASP2 の微小管結合ドメインがともに TOG ドメインであることを明らかにした (図 1)。TOG ドメインは 6 組のヘリックス-ループ-ヘリックスが繰り返される HEAT repeat 構造をもつ。XMAP215 における TOG ドメインの微

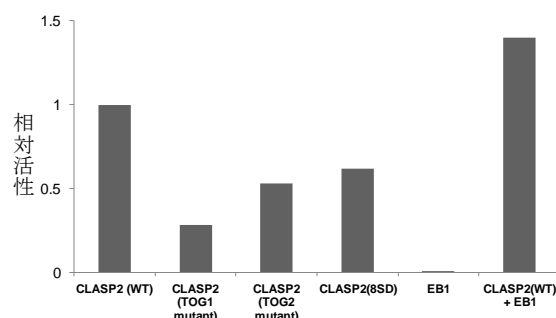
小管認識残基はループ領域に点在するが、同様の残基が CLASP2 の TOG ドメインにも保存されること、それらのアラニン変異によって CLASP2 の微小管結合能が失われることから微小管結合性の TOG ドメインであること、CLASP2 が XMAP215 ファミリーに属することを明らかにした。



(図1) TOG ドメインの結晶構造  
(上) CLASP2 における2つの TOG ドメイン (TOG1、TOG2)  
(下) 酵母の XMAP215 相同蛋白質 Stu2 における TOG ドメイン

## (2) CLASP2 の変異体解析

結晶構造を基にして CLASP2 の2つの TOG ドメインにそれぞれ変異を導入し、試験管内微小管重合能を光散乱法によって調べたところ、野生型と比べて50%以上活性が低下した(図2)。また CLASP2 には保存されたセリン領域が存在し、その中の8つのセリン残基が GSK3beta によってリン酸化されると考えられている。これらのセリン残基をアスパラギン酸に置換することで疑似リン酸化型 CLASP2 (CLASP2(8SD)) を調製し、微小管重合活性を調べたところ、50%程度低下した。これより CLASP2 は GSK3beta の活性に依存して微小管を安定化すると考えられる。また +TIPs の基軸分子である EB1 が CLASP2 と相互作用することが知られている。CLASP2 の微小管伸長端への局在は EB1 との相互作用領域が必須であることより、CLASP2 と EB1 の複合体の微小管安定化能を調べた。EB1 は単体では試験管内で微小管重合能を有しないが、CLASP2 の存在下で協同的に微小管を安定化できることがわかった。チューブリンの GTP 加水分解能の解析からも上記と同様の結果を得ている。



(図2) CLASP2 の試験管内微小管安定化能の解析

## (3) 蛋白質間相互作用の解析

CLASP2 と EB1 との相互作用を ITC によって決定した。Kd 値は EB1 や CLIP170、p150<sup>Glued</sup> などで解析されている値と近似していた。これより +TIPs 間が弱い相互作用によって過渡的複合体を形成し微小管を制御することで、細胞骨格のダイナミクスを獲得していることが示された。

また CLASP2 と TGN 分子 GCC185 の相互作用は Y2H で確認すると同時にそれぞれの相互作用領域を決定した。得られた結果は GST-pull down 法によって相互作用の裏付けを行った。

## (4) 細胞内への遺伝子導入実験

(2) で作成した変異体について、ヒト細胞に導入するため構築したプラスミドを細胞内に一過的に導入し蛋白質発現を行った。変異を導入した遺伝子導入は野生型に比べて微小管を安定化しにくという結果が得られた。これは試験管内での微小管安定化能の解析と同様のものであり、TOG ドメインが細胞内でも微小管安定化に寄与していることが明らかとなった。

## 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3件)

- ① Hoshino S, Maki T, Hayashi I (2012) Crystallization and preliminary X-ray data analysis of the pX01 plasmid-partitioning factor TubZ from *Bacillus cereus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **68**, 1550-3.
- ② Hoshino S, Hayashi I (2012) Filament formation of FtsZ/tubulin-like protein TubZ from the *Bacillus cereus* pX01 plasmid. *J Biol Chem*, **287**, 32103-12.
- ③ Iimori M, Ozaki K, Chikashige Y, Habu T, Hiraoka Y, Maki T, Hayashi I, Obuse

C, Matsumoto T (2012) A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules, *Exp Cell Res.* **318**, 262-75.

[学会発表] (計6件)

- ① T Maki, I Hayashi, "Molecular mechanism of cooperative microtubule stabilization by microtubule plus-end tracking proteins CLASP2 and EB1", Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2012年12月, 米国サンフランシスコ
- ② Y. Satoh, K. Hayashi, Y. Amano, M. Takahashi, I. Hayashi, S. Ohno, A. Suzuki, A Novel Microtubule Binding Protein, MARKAP1, Regulates Stability of the Golgi-Nucleated Microtubules and Directional Cell Migration. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2012年12月, 米国サンフランシスコ
- ③ T Maki, I Hayashi, "Molecular mechanism of cooperative microtubule stabilization by microtubule plus-end tracking proteins CLASP2 and EB1 complex", 日本分子生物学会, 2011年12月, 横浜
- ④ Y Satoh, M Akitsu, K Hayashi, Y Amano, I Hayashi, S Ohno, Atsushi Suzuki, 新規微小管結合タンパク質 p250 による細胞運動極性制御機構の解析日本分子生物学会, 2011年12月, 横浜
- ⑤ S Hoshino, I Hayashi, "Bacillus cereus 由来 pX01 様プラスミド分配因子 TubZ の結晶構造解析", 日本分子生物学会, 2011年12月, 横浜
- ⑥ S Hoshino, I Hayashi, "Structural analyses of pX01 plasmid partitioning factor TubZ from Bacillus cereus", Gordon Research Conference, 2011年7月, 米国ニューハンプシャー

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/mm/b/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 郁子 (HAYASHI IKUKO)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・准教授

研究者番号：80464527

### (3) 連携研究者

安永卓生 (YASUNAGA TAKUO)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：60251394