

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08168

研究課題名(和文) CRMP2による微小管ダイナミクス制御の相関構造解析

研究課題名(英文) Correlative Structural Analysis of Microtubule Dynamics Regulation by CRMP2

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、微小管結合タンパク質CRMP2の微小管ダイナミクス制御の分子機構解明を通じて神経細胞軸索伸長の制御機構を明らかにする事を目的とし、以下の結果を得た。CRMP2は神経細胞の発段階において、将来の軸索突起の先端に局在して軸索特有の「軸索型微小管」の重合を促し、効率良く軸索伸長を誘導することで神経細胞極性形成に大きく寄与する。分子モーターキネシンは、CRMP2が誘導した「軸索型微小管」を道標として、軸索突起に選択的に物質輸送を行う。CRMP2のC末端部がリン酸化を受けると、CRMP2と微小管との静電的反発により軸索型微小管の誘導効果が消失し、軸索誘導から反発へとシグナルが切り替わる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to elucidate the molecular and structural mechanisms of CRMP2-regulated axon induction/repulsion. During the neuronal cell development, CRMP2 localizes the tips of the future axon in which CRMP2 forms the hetero-trimer with GTP-tubulin to add tubulins to the plus-ends of microtubules. This effectively induces the axonal microtubule formation, and thus the axon is effectively elongated. On the other hand, phosphorylation of CRMP2 decreases the affinity between CRMP2 and microtubule. It is driven by the small conformational changes at the C-terminal tail of CRMP2 with shifting the surface charges, which not only alter the interactions within the CRMP2 tetramer but also alter the interactions with GTP-tubulin. Consequently, phosphorylated CRMP2 fails to form a hetero-trimer with GTP-tubulin, thus losing the ability to establish and maintain the axonal microtubules.

研究分野：構造生物学・細胞生物学

キーワード：微小管 CRMP2 Kinesin 軸索誘導 軸索反発 X線結晶構造解析 X線小角散乱 クライオ電子顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経細胞の発生段階において、多数ある突起の中から一本だけが選択的に伸長し、それが軸索突起となることが知られている。海馬培養神経細胞では、CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) が軸索突起伸長時に突起の先端に局在すること、また CRMP2 を過剰発現すると、軸索様の突起が多数できることが報告されていた。一方で CRMP2 は、Semaphorin シグナル伝達系の下流に位置し、CDK5 および GSK3 によりその C 末端がリン酸化を受けることを知られており、CRMP2 の C 末端がリン酸化を受けると、リン酸化前とは反対に、軸索の退縮を促すことが報告されていた。

(2) 神経細胞軸索内で微小管に沿った物質輸送を司るキネシン型分子モーター Kinesin-1 は、軸索突起伸長前はあらゆる突起に出たり入ったりを繰り返しているが、軸索伸長後は軸索のみに向かうようになる。この細胞内物質輸送の振分け機構に関して、Kinesin-1 が軸索突起に特有の微小管の形態を認識することにより、軸索突起のみに向かうのではないかと仮説が提唱されていた。

### 2. 研究の目的

(1) CRMP2 が、どのように神経細胞の軸索形成に関わり、またそのリン酸化により何故軸索が退縮するのか、神経細胞の分化・極性形成における根本的な生命原理を解明することを目的とする。そのために、CRMP2 の直接の相互作用部位である微小管(またはその構成単位である tubulin)に対する CRMP2 の作用を生化学的および細胞生物学的手法を用いて解明し、さらにその結果をもとに、原子レベルから細胞レベルまでの複数の構造解析手法を駆使し(相関構造解析法) その構造基盤を明らかにする。

(2) さらに、分子モーター Kinesin-1 がどのように軸索突起を識別して軸索突起のみに物質を輸送するのか、その構造基盤を解明する。

### 3. 研究の方法

in vitro, 細胞内 (COS7 細胞、培養神経細胞) 線虫個体内において、CRMP2 が微小管の重合・脱重合にどのような影響を及ぼすのかについて観察するとともに、その機能ドメインを明らかにする。またリン酸化 CRMP2 による変化も同様に観察する。続いて、CRMP2 の機能ドメインを用いた構造解析に移行する。野生型および擬似リン酸化型の CRMP2 を用いる。構造解析では、X 線結晶解析を用いた原子レベルの構造解析、X 線小角散乱を用いた分子レベルの溶液構造解析、そして相関顕微鏡観察法にて蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を併用した超分子複合体の構造解析を併用して、統合的な理解を目指す。具体的には、以下の様に研究を推進した。

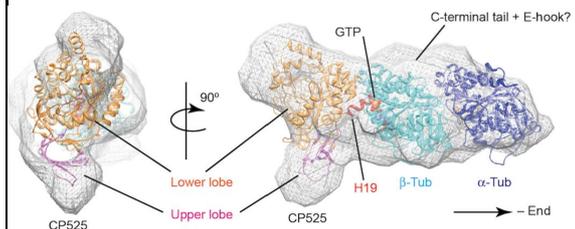
1. in vitro で CRMP2 が微小管の重合に及ぼ

す影響を生化学的に解析し、また全反射蛍光顕微鏡を用いて、微小管の重合量・重合速度を定量した。リン酸化 CRMP2 についても同様に観察した。

2. COS7 細胞内で CRMP2 および微小管に蛍光ラベルを施し、CRMP2 が微小管の重合に及ぼす影響を解析した。
3. CRMP2 と tubulin の相互作用を、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび静的多角度光散乱法により観察した。
4. 野生型およびリン酸化型 CRMP2 の X 線結晶構造解析を施行した。
5. tubulin-CRMP2 複合体の X 線小角散乱による溶液構造解析を施行した。
6. CRMP2 誘導下で微小管を重合させ、クライオ電子顕微鏡を用いて観察した。
7. Tubulin-CRMP2 の立体構造をもとに CRMP2 の結合面の点変異体を作成し、in vitro から細胞内、さらに線虫個体において微小管の重合への影響を観察した。さらに、CRMP2 の野生型および変異体を導入した線虫を用いて、Kinesin-1 による物質輸送についても解析した。

### 4. 研究成果

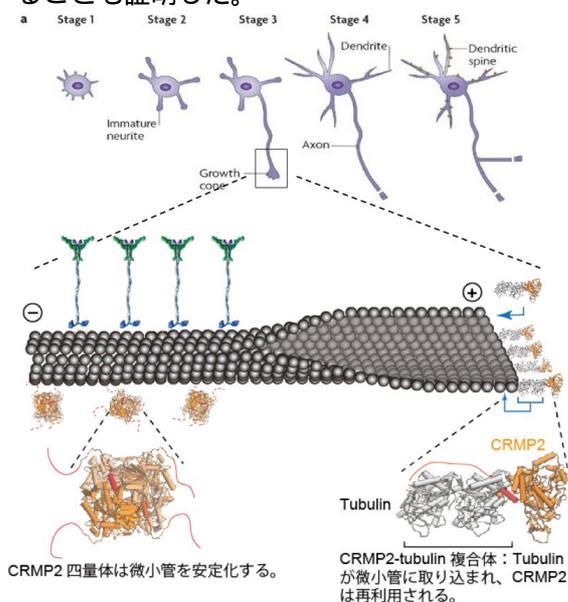
1. In vitro において CRMP2 が微小管の重合量・速度ともに、1.5 倍程度促進することを示した。リン酸化 CRMP2 では、この作用がキャンセルされることも確認した。
2. COS7 内において、CRMP2 が微小管に沿った結合パターンを示すこと、CRMP2 が微小管重合を促進すること、微小管重合時の CRMP2 は微小管の重合端 (プラス端) に選択的に局在することを示した。
3. CRMP2 は tubulin-dimer と相互作用をして、CRMP2 の単体と tubulin-dimer とのヘテロ三量体を形成することを示した。リン酸化 CRMP2 では、tubulin との相互作用が非常に弱いことを示した。
4. 野生型およびリン酸化型 CRMP2 の X 線結晶構造解析を施行し、各々の原子分解能の立体構造を解明した。リン酸化 CRMP2 でも野生型と非常に類似した立体構造を呈するが、リン酸化される C 末端部分を中心に軽微な構造変化を認めた。
5. X 線小角散乱では、CRMP2 と tubulin がヘテロ三量体を形成することを示し、下图の如く CRMP2 が tubulin のプラス端側に結合して縦に並んだ構造をしていることを示した。



6. CRMP2 存在化に微小管を重合すると、微小管は軸索特有の微小管の形状 (軸索型微小管) を呈することを示した。

7. CRMP2 の tubulin 結合面のアミノ酸に点変異を導入したところ、この変異体は *in vitro* で微小管伸長を遅延し、上述の軸索型微小管を誘導できなくなった。細胞レベルでも微小管伸長が遅延して細胞寿命が短縮した。さらに線虫個体内では、Kinesin-1 により軸索に運ばれるべき物質が、樹状突起に誤輸送される現象が観察された。

これらの結果から、下図のように CRMP2 は神経細胞軸索内で微小管の先端部分に集積し、軸索特有の形態を持つ「軸索型微小管」の重合を促す事により、効率良く軸索伸長を誘導し、神経細胞極性形成に大きく寄与する事を明らかにした。そして、Kinesin-1 はこの「軸索型微小管」の形態を認識することで、軸索のみに進入することを明らかにした。さらに CRMP2 の結合面のアミノ酸点変異により、これらの CRMP2 の機能が全てキャンセルされることも証明した。



CRMP2 の C 末端のリン酸化により、CRMP2 と微小管との結合が阻害されること、上記の重合促進効果が見られない事を生化学的に示した。さらにリン酸化 CRMP2 の原子構造から、CRMP2 のリン酸化が微小管との結合の静電的反発を引き起こすことによる、軸索誘導から反発へとシグナルを切り替えることを示した。

#### 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 6 件)

1. \*Ryo Nitta, Tsuyoshi Imasaki, Eriko Nitta. Recent Progress of Structural Biology: Lessons from Our Research History. *Microscopy*, in press, 2018
2. Takuya Sumi, Tsuyoshi Imasaki, Mari Aoki, Naoki Sakai, Eriko Nitta, Mikako

Shirouzu, & \*Ryo Nitta. Structural Insights into the Altering Function of CRMP2 by Phosphorylation. *Cell Struct. Funct.* 43:15-23. doi: 10.1247/csf.17025, 2018.

3. Shinsuke Niwa, Fumio Nakamura, Yuri Tomabechi, Mari Aoki, Hideki Shigematsu, Takeshi Matsumoto, Atsushi Yamagata, Shuya Fukai, Nobutaka Hirokawa, Yoshio Goshima, Mikako Shirouzu M, \*Ryo Nitta. Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation. *Sci. Rep.* 7: 10681. doi:10.1038/s41598-017-11031-4, 2017.
4. Doudou Wang, Ryo Nitta, Manatsu Morikawa, Hiroaki Yajima, Shigeyuki Inoue, Hideki Shigematsu, Masahide Kikkawa & Nobutaka Hirokawa. Motility and Microtubule Depolymerization Mechanisms of the Kinesin-8 motor, KIF19A. *ELife*, 5: e18101. doi: 10.7554/eLife.18101, 2016.
5. Masahiko Yamagishi, Hideki Shigematsu, Takeshi Yokoyama, Masahide Kikkawa, Mitsuhiro Sugawa, Mari Aoki, Mikako Shirouzu, Junichiro Yajima and \*Ryo Nitta. Structural basis of backwards motion in kinesin-1 - kinesin-14 chimera: implication for kinesin-14 motility. *Structure* Vol. 24, pp. 1322-1334, 2016.
6. Manatsu Morikawa, Hiroaki Yajima, Ryo Nitta, Shigeyuki Inoue, Toshihiko Ogura, Chikara Sato and Nobutaka Hirokawa. X-ray and Cryo-EM Structures Reveal Mutual Conformational Changes of Kinesin and GTP-Microtubule upon binding. *EMBO J.* Vol. 34, pp. 1270-1286, 2015.

[学会発表](計 14 件)

1. 仁田亮 Research PlaNet 2015」指定演題 (2015 年 6 月 20 日)(梅田スカイビルタワーウエスト)最先端の X 線および電子顕微鏡構造解析:階層を超えた理解を目指して
2. 仁田亮 東京大学 MD 研究者育成プログラムリトリート (2016 年 3 月 27 日) (KKR ホテル熱海)臨床から基礎へ転身して 15 年、考えること
3. 山岸雅彦, 重松秀樹, 横山武司, 吉川雅英, 青木真理, 白水美香子, 矢島潤一郎, 仁田亮 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会 (2016 年 3 月 28 日)(ビッグパレットふくしま)分子モーターキネシンの運動方向性決定の分子機構
4. 仁田亮 第 16 回日本蛋白質科学会年会 (ワークショップ)(2016 年 6 月 7 日) (福岡国際会議場)クライオ電子顕微鏡

- で捉える微小管モーターキネシンの運動方向性逆転の分子機構
5. Shigematsu H, Yokoyama T, Kikkawa M, Shirouzu M, **Nitta R**. Gordon Research Conference, Three Dimensional Electron Microscopy. (2016年6月21日)(The Chinese University of Hong Kong) Structural basis of backwards motion in kinesin-14.
  6. **仁田亮** 第26回日本解剖学会関東支部懇話会(2016年7月9日)(東京大学医学部)クライオ電子顕微鏡で捉える微小管モーターキネシンの運動方向性逆転の分子機構
  7. **仁田亮** 第21回バイオメディカル研究会(2016年9月6日)(グランフロント大阪)クライオ電子顕微鏡で観る細胞骨格微小管と分子モーター
  8. **仁田亮** 理研シンポジウム - クライオ電子顕微鏡が拓く未来(2016年11月8日)(理研横浜キャンパス)クライオ電子顕微鏡で解明する微小管モーターの動作機構
  9. Wang, D, **Nitta, R**, Morikawa, M, Yajima H, Inoue, S, Shigematsu, H, Kikkawa, M, Hirokawa .N 米国細胞生物学会年会(2016年12月6日)(Moscone Center, San Francisco) Motility and Microtubule Depolymerization Mechanisms of the Kinesin-8 motor, KIF19A.
  10. **仁田亮** 第122回日本解剖学会総会(シンポジウム)(2017年3月28日)(長崎大学坂本キャンパス)X線および電子顕微鏡で捉える分子モーターキネシンの多彩な運動機構
  11. **仁田亮** イメージング数理研究会 2017夏(2017年7月26日)(神戸大学六甲台キャンパス)X線とクライオ電子顕微鏡で観る世界:ナノメートルレベルの形態学
  12. **仁田亮** Advans 研究会 2017(2017年12月17日)(ホテルグランドパレス)X線・クライオ電子顕微鏡による細胞骨格研究と循環器科学応用への展望
  13. **仁田亮** イメージング技術の融合による医学・生命科学の新たな地平の開拓(2018年2月9日)(神戸大学大学院医学研究科シスメックスホール)X線とクライオ電子顕微鏡でみる高分解能三次元形態学研究
  14. **仁田亮** 第123回日本解剖学会総会(シンポジウム)(2018年3月28日)(日本医科大学武蔵境校舎)X線および電子顕微鏡で捉える分子モーターキネシンの多彩な運動機構

〔図書〕(計1件)

15. **仁田 亮** 実験医学(2018年5月号)

Vol.36 No.8 クライオ電子顕微鏡による構造解析が拓く次世代の生命科学・創薬: X線とクライオ電顕で微小管モーターの動きに迫る (pp.1323-1327)羊土社 ISBN 978-4-7581-2507-9

〔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.riken.jp/pr/press/2016/20160722\\_1/digest/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160722_1/digest/)

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160722\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160722_1/)

<https://bio.nikkeibp.co.jp/atcl/release/16/07/25/02277/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

仁田 亮(NITTA, Ryo)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40345038