

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03668

研究課題名(和文) 変異チューブリンによる重合 GTP加水分解の共役メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of the coupling mechanism between polymerization and GTP hydrolysis by using tubulin mutant

研究代表者

武藤 悦子 (Muto, Etsuko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90373373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：微小管のダイナミクスは細胞分裂や形態形成に重要な役割を果たしている。GTPチューブリンからどのように重合核が作られ微小管になるか、その仕組みはこれまでほとんど明らかにされていなかった。我々はラピッドフラッシュネガティブ染色電子顕微鏡法と反応速度論的解析を組み合わせることにより、微小管の核生成には、GTPチューブリンが集合して直線型oligomerが作られる必要があることを見出した。直線型oligomerが伸びて一定の長さ(臨界核)に達すると、ラテラルな相互作用によりmulti-stranded oligomerとなり、そこからプロトフィラメントが安定に重合するようになることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管の重合ダイナミクスは細胞が正常に機能する上で重要であり、その制御が失われると、癌や神経変性疾患など様々な疾病の原因となる。重合の第一段階である核生成の仕組みは、これまで40年以上もの間謎に包まれており、長年の難問を解決したことの意義は大きい。我々は、重合初期に出現する中間体の曲率や長さを統計的に解析することにより、これまでの研究者が見逃してきた直線形オリゴマーの発見に成功した。微小管のダイナミクスを考える上で、構造ゆらぎの統計的解析が、今後重要になることが予想される。

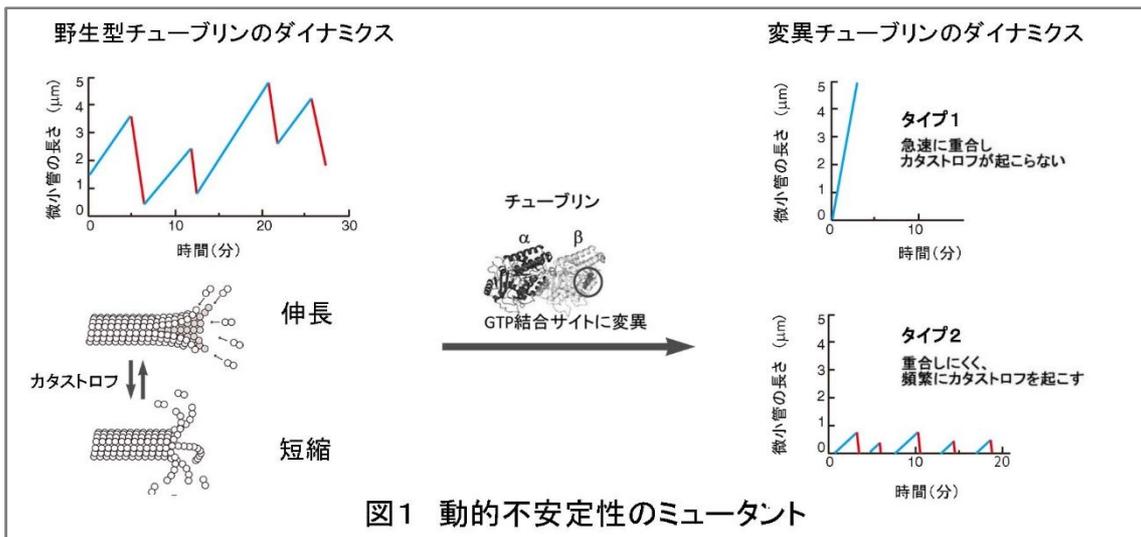
研究成果の概要(英文)：Nucleation of microtubule is essential for cellular activities, but its mechanism is unknown because of the difficulty involved in capturing rare stochastic events in the early stage of polymerization. Combining the rapid flush negative stain electron microscopy and kinetic analysis, we demonstrated that the formation of straight oligomers with critical size is essential for nucleation. Both GDP- and GTP-tubulin assemble the single-stranded oligomers with a broad range of curvature, but upon nucleation of GTP-tubulin, the distribution of curvature is shifted to produce a minor population of straight oligomer. Our results support a model in which GTP binding generates a minor population of straight oligomers compatible with lateral association and further growth to microtubules. Our study suggests that cellular factors involved in nucleation promote it via stabilization of straight oligomers.

研究分野：生物物理

キーワード：微小管 GTPチューブリン 臨界核 重合キネティクス ネガティブ染色電子顕微鏡法 核生成

1. 研究開始当初の背景

微小管の重合は、GTP の加水分解反応を伴う非平衡現象で、微小管の先端では、多数のダイマーが連続して結合する「伸長」と、多数のダイマーが次々解離する「短縮」が、交互に繰り返し出現する。この二相性の現象をMitchison らは「動的不安定性」と名づけた。その分子メカニズムとして、Carlier らは、先端にGTP チューブリンがある限り伸長が続くが、加水分解により端のチューブリンがGDP-チューブリンになると、伸長から短縮への切り替え（カタストロフ）が起こると説明した。この“GTP キャップモデル”は教科書にも掲載されているが、端のチューブリンのヌクレオチド種を直接測ることは難しく、動的不安定性の分子基盤は依然として不明であり、モデル発表から30年以上経った今も専門家の間では論争が続いている。議論が長期化した背景には、組替体チューブリンの大量発現・精製が技術的に難しく、機能 構造関係を調べる際の常套手段である変異解析の手法が適用できなかったことがあげられる。このような状況の中、申請者は世界にさきがけて、効率よくチューブリン組替え体を大量発現・精製する方法の開発に成功した (Minoura *et al.*, 2013, *FEBS Lett.*)。この発現系を利用して β -チューブリンのGTP 結合サイトに変異を導入し、重合における二相性の挙動が、どちらか一方に偏った2つのタイプのミュータントの作成に成功した (図1)。ミュータントのデザインは、結晶構造解析の専門家であるUniversite Paris-SaclayのBenoit Gigant博士に協力を仰ぎ、タイプ1の変異ではGTP結合に伴うT5ループの構造変化を強化するように、タイプ2の変異ではT5ループの構造変化を阻害するように、変異を入れた。これらのミュータントの重合キネティクス、加水分解反応を比較分析することにより、次章に述べる2点の解明を目指した。



2. 研究の目的

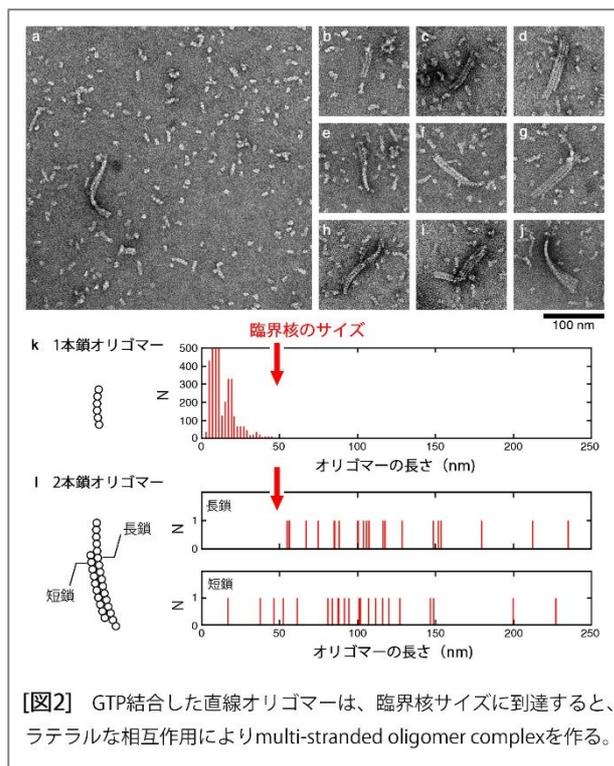
Carlier らのGTP キャップモデルは、微小管重合初期における重合とGTP 加水分解の時間的乖離の現象に基づいている。彼らは、重合初期には微小管の重合がGTP 加水分解に先行するが、時間経過に伴いGTP の加水分解は微小管の成長に追いつき、ついに先端のチューブリンがGTP からGDP に変化した時、カタストロフが起こると説明した。本研究では、前述の変異微小管を材料に、(1)重合開始時、GTP 結合に伴い、溶液中のチューブリンは構造変化しているか、(2)平衡に達した時の微小管の成長端が、伸長からカタストロフに切り替わる原因は、本来、GTPキャップが外れることによるのか？ この2つのことを明らかにしたい。(1)について解説を補うと、1990年代に行われた構造の仕事からは、チューブリンダイマーはGTPの結合に伴い曲率の高いcurvedの構造からstraightな構造へと変化していることが予想される。しかしこれまでの溶液実験ではそのような構造変化は検出されず、微小管研究者の間で最大のミステリーとされてきた。

3. 研究の方法

ショウジョウバエの組み替え体チューブリン(野生型、タイプ1ミュータント)溶液を、温度4度から25度の環境に移動し、濁度変化を蛍光分光光度計で追うことにより、重合キネティクスを調べた。濁度測定に用いたサンプルの一部を、rapid flush negative stain electron microscopy 法で観察し、重合初期に出現する構造中間体の構造を解析した。

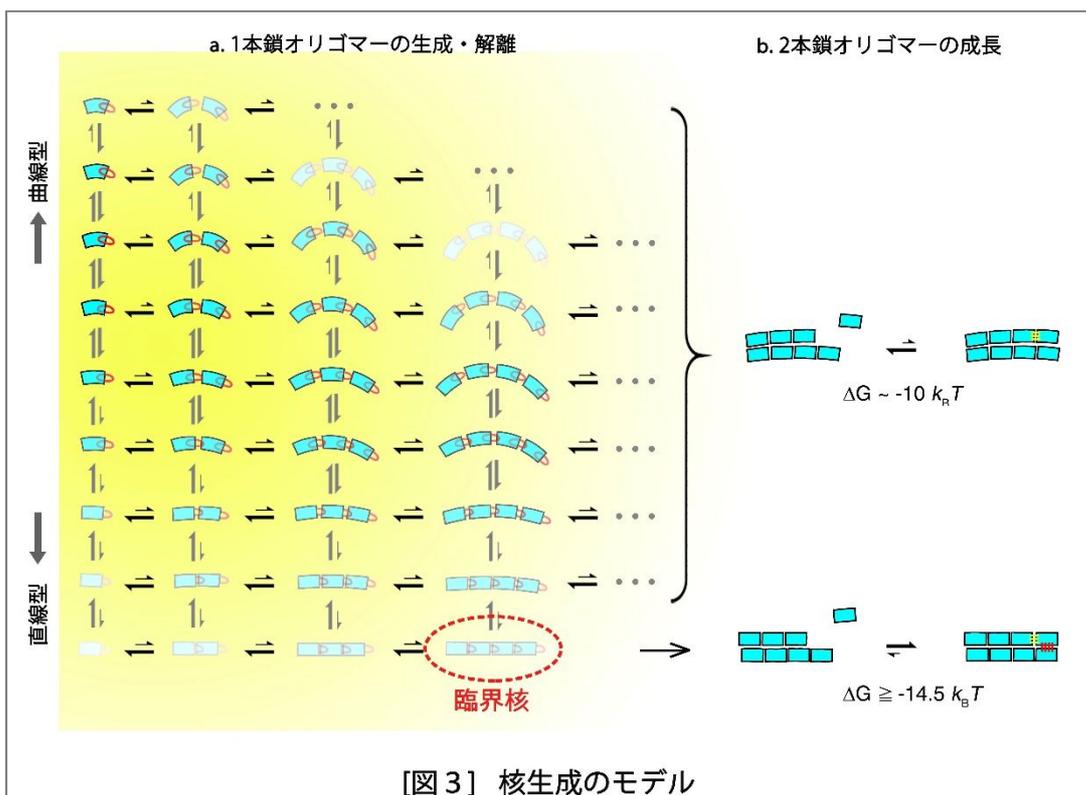
4. 研究成果

- (1) 溶液中のチューブリンは、結合ヌクレオチドによらず、縦方向に重合して、様々な長さや曲率のオリゴマーを作る。
- (2) GTP を結合したオリゴマーでは、GDP オリゴマーに比べ曲率分布が小さいほうにシフトし、非常に稀に直線オリゴマーが出現する(ここまでの記述は野生型チューブリンに関する観察)。
- (3) タイプ1ミュータントでは野生型に比べ、直線オリゴマーの確率がさらに増加し、核生成の加速が見られることから、直線オリゴマーは核生成に必要な中間体であると考えられる。
- (4) 直線オリゴマーは一定サイズ(臨界核)に到達すると、ラテラルに相互作用し、複数のオリゴマーから成る複合体を形成した(図



【図2】 GTP結合した直線オリゴマーは、臨界核サイズに到達すると、ラテラルな相互作用によりmulti-stranded oligomer complexを作る。

- 2)。キネティクス、サーモディナミクス解析から、直線オリゴマーは熱力学的に不安定で解離しやすいのに対し、複合体は安定に成長できることがわかった。
- (5) 以上の結果に基づき、我々は図3に示すような核形成のモデルを提案した。
- (6) 直線オリゴマーの存在は、核生成だけでなく、微小管の成長とも強い相関があった。



Preprint: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.05.979989v1>

本研究は、GTP チューブリンはいかにして核生成するか、という長年の謎を解明することに成功した。「研究目的」の項で述べた2点について、現在の到達点は以下の通り。

- (1) 重合開始時、GTP 結合に伴い、溶液中のチューブリンは構造変化しているか？

Yes, ただし単純な2状態モデルは棄却。

本研究により、オリゴマーにおける多様な構造の重要性が明らかになり、チューブリンのコンフォメーションとして単純な2状態(curved and straight)を想定したこれまでのモデルは覆された。

- (2) 平衡に達した時の微小管の成長端が、伸長からカタストロフに切り替わる原因は、GTP キャップが外れることによるのか？

not sure

我々の観察からは、チューブリンの構造多様性は、核生成だけでなく、成長微小管の先端におけるカタストロフの発生とも深く関係している可能性が示唆される。微小管に結合するチューブリンの多様なコンフォメーションを考慮して、カタストロフの仕組みを再考する必要

がある。

- (3) 目的外の成果： 細胞内の核生成は、 チューブリンリングコンプレックスを template として必要とすることから、これまで、in vitro の核生成とは分子機構が異なると考えられてきた。しかし今回我々の分析からは、in vivo の templated な核生成も、in vitro の チューブリンによらない spontaneous な核生成も、どちらもチューブリン臨界核の形成を必要とする共通の分子機構によることがわかった。我々が開発した分析法は、細胞内核生成の分析にも活用できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamimura S	4. 巻 2016
2. 論文標題 X-ray fiber diffraction: a tool for understanding the structural dynamics of tubulin dimers in native microtubules.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Spring-8/SACLA Research Frontiers 2016	6. 最初と最後の頁 32-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） www.spring8.or.jp/pdf/en/res_fro/16/Research_Frontiers_2016_web.pdf	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 Ayukawa R, Iwata S, Imai H, Kamimura S, Hayashi M, Kien Xuan Ngo, Minoura I, Uchimura S, Makino T, Shirouzu M, Shigematsu H, Sekimoto K, Gigant B, Muto E	4. 巻 -
2. 論文標題 GTP-dependent formation of straight oligomers leads to nucleation of microtubules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） なし	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 武藤悦子
2. 発表標題 Key molecular mechanism for the variable-sized steps of dynein
3. 学会等名 International Wordkshop of Dynein 2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武藤悦子
2. 発表標題 How microtubules activate kinesin & dynein ATPase activity
3. 学会等名 62nd Annual meeting of Biophysical Society, USA（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井洋
2. 発表標題 How does cytoplasmic dynein stepping along microtubules look like?
3. 学会等名 International Wordkshop of Dynein 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kamimura S, Imai H, Yagi T & Iwamoto H
2. 発表標題 Dynamic changes in microtubule structure observed on a time scale of seconds by X-ray fiber diffraction
3. 学会等名 EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Estevez-Gallego J, Kamimura S, Balaguer-Perez, F, Lucena-Agell D & Diaz J-F
2. 発表標題 Biochemical and structural characterization of taxoid microtubule-stabilizing agents
3. 学会等名 EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Imai, E. Muto, T. Kon.
2. 発表標題 A new negative staining EM method at high protein concentration for sample evaluation of cryo-EM single particle analysis.
3. 学会等名 生理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井洋, 中桐 侑平, Gerle, C, 武藤悦子, 栗栖源嗣, 昆隆英
2. 発表標題 高タンパク質濃度条件下のタンパク質複合体の構造を観察するための新規のネガティブ染色電子顕微鏡法
3. 学会等名 2019年生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村慎治, 今井洋, 八木俊樹, 岩本裕之, Estevez-Galego, J., Lucena-Agell, D., Diaz, J.-F. & Hermida-Merino, D.
2. 発表標題 微小管のX線繊維回折: チューブリン格子ラセン角の計測
3. 学会等名 2019年生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Imai, Takayuki Kato, Gerle Christoph, Etsuko Muto, Kaoru Mitsuoka, Genji Kurisu, Keiichi Namba Takahide Kon
2. 発表標題 A newly developed negative stain EM method for protein complexes at high protein concentration.
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Kamimura, Hiroshi Imai, Toshiki Yagi, Hiroyuki Iwamoto
2. 発表標題 Dynamic changes of tubulin dimer configurations on a scale of sub-second revealed by high flux X-ray fiber diffraction
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村慎治、今井洋、八木俊樹、岩本裕之
2. 発表標題 微小管内のチューブリン分子の安定性・可塑性・柔軟性を目安にした微細動態解析
3. 学会等名 日本動物学会・関東支部 第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rie Ayukawa, Seigo Iwata, Hiroshi Imai, Shinji Kamimura, Masahito Hayashi, Kien Xuan Ngo, Itsushi Minoura, Seiichi Uchimura, Tsukasa Makino, Mikako Shirouzu, Hideki Shigematsu, Ken Sekimoto, Benoit Gigant, Etsuko Muto
2. 発表標題 GTP-dependent formation of straight oligomers leads to nucleation of microtubules
3. 学会等名 EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems (国際学会)
4. 発表年 2020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	今井 洋 (Imai Hiroshi) (60391869)	大阪大学・理学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	上村 慎治 (Kamimura Shinji) (90177585)	中央大学・理工学部・教授 (32641)	
研究協力者	ブノア ジャイジヤント (Gigant Benoit)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	関本 謙 (Sekimoto Ken)		
研究協力者	岩田 聖悟 (Iwata Seigo)		
研究協力者	鮎川 理恵 (Ayukawa Rie)		