

令和元年6月24日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07328

研究課題名(和文) X線繊維回折法による微小管動態の高速追跡

研究課題名(英文) Dynamic changes of tubulin dimer configuration on a scale of sub-second revealed by high-flux X-ray fiber diffraction analysis

研究代表者

上村 慎治 (Kamimura, Shinji)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：90177585

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)：微小管内には、チューブリン二量体が結晶格子の様に高い規則性で配置されている。従って、チューブリン分子の形状変化やゆらぎは、微小管構造の安定性に直接影響を与えると予想されるが、このような構造特性を定量的に記述することは難しかった。本研究では、SPring-8の高輝度ビーム(BL40XU)を使い、流動配向させた微小管のX線繊維回折のパターンの経時変化を詳しく分析した。その結果、微小管安定化剤として知られるタキソールによって、微小管は0.2秒で軸方向へ急速な伸長、および構造上の柔軟性が増加することが明らかとなった。しかし、別の微小管安定化剤であるラウリマリドでは、非常に対照的な観察結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来は、電子顕微鏡でしか、微小管構造変化を追跡することしかできなかった。例えば、クライオ電顕で秒単位の変化を調べることで、タキソールの効果が30秒ほどの時間経過で現れること、それが主にプロトフィラメント数の減少で説明できることなどがわかっていただけである。X線繊維回折法の特徴は、凍結したり化学固定することなく、溶液中での構造変化を、サブ秒単位の高速で追跡できる点である。その実例を微小管の4 nm周期変化やゆらぎ幅の増減として捉えることに世界で初めて成功した。生体試料の流動配向法、繊維回折法、薬理効果の現れる速度を記述する新手法としての展開が今後期待できる。

研究成果の概要(英文)：Microtubules are assembled from tubulin dimers that are arranged in a semi-crystal lattice with high regularity. Dynamics of tubulin dimer within microtubules is thus expected to be directly affecting the stability of microtubules, however, it has been difficult to quantitatively describe such properties. By analyzing the time course of pattern changes in X-ray fiber diffractions from aligned microtubules with a high-flux synchrotron beam of BL40XU (SPring-8), we found microtubules showed rapid elongation in the axial tubulin repeat and the concomitant increase of structural flexibility with a time constant of about 0.2 s after applying paclitaxel, microtubule-stabilizer. Contrasting effects were found for laulimalide, another type of microtubules stabilizer.

研究分野：生物物理学

キーワード：X線繊維回折 流動配向法 高速構造変化追跡 微小管安定化剤 抗がん剤候補 構造安定性 タキソール ラウリマリド

1. 研究開始当初の背景

微小管は、真核生物の細胞分裂に必須の細胞内繊維構造である。チューブリンダイマーが管状の構造に会合して作られる。細胞分裂の他にも、細胞の形状維持に必須の構造である。特に神経細胞の軸索内部にある微小管が崩壊すると、神経繊維構造が維持できずに神経活動の維持に重篤な影響を及ぼす。これは乳がんの治療用に使われるパクリタクセルの副作用としても知られている症状であるが、適切な時期、適切な濃度で微小管安定化剤を使用することで、がん細胞の増殖を効果的に抑える薬剤ともなる。微小管安定化剤の適切な投与方法、および、他のタキソール誘導体のなかで、より治療薬として望ましい特性を持つものを発掘することを主たる目的とした、より長期的な構造解析プロジェクトの1つとして本研究は実施された。

本研究では、微小管の構造に対するパクリタクセル等の構造安定剤の効果を溶液中、37°Cの緩衝液中で調べることを目的にしていた。2016年までの予備実験により、チューブリン濃度に対して、十分な濃度のパクリタクセルがあれば、30秒以内に構造変化を引き起こすことが明らかとなっていた(Kamimura et al., 2016)が、実際の構造変化速度を調べた研究報告はなかった。クライオ電子顕微鏡法で、秒単位で追跡した研究(Diaz et al., 1998)からも、パクリタクセルの化学的な結合速度(Diaz et al., 2006)ほどの早い現象は観察できていない。そこで、秒単位、あるいは、サブ秒単位で構造変化を追跡することを目標にした。

2. 研究の目的

微小管は、整然とチューブリンダイマー分子が会合して形成される。微小管の管の壁となる部分は、チューブリンダイマーが格子状に結晶のように並んだ電子顕微鏡象が観察され、高輝度X線を照射すると縦方向の明確な周期構造を反映した回折信号を得ることができる。2016年までの申請者の研究から、この周期はチューブリンダイマー分子の縦方向の平均長を反映しているものと解釈でき、さらに、パクリタクセル添加によって、生理的な溶液中で約3%の伸張が起こることが明確になっていたため、その変化速度を解析する実験を企画した。

構造変化は、刻々と変化する回折信号の強度や位置から推測することが可能であるが、すでに報告のある蛍光パクリタクセルを使った結合速度解析から、1/1000秒~30秒のいずれかの範囲で起こるものと予測された。それを正確に求めることを目指した。

3. 研究の方法

回折信号は、申請者が用いてきたSPring-8のビームライン、BL45XU (3.6×10^{12} photons/s)では、最短でも10-20秒の露光が必要であることが明らかとなっていた(Kamimura et al., 2016)。そこで、波長精度は劣るが、より輝度の高いBL40XU (1×10^{15} photons/s)を用いることにした。実験上の問題点は、そのような高い輝度の微小管に与えるダメージが不明であった点、さらに、X線繊維回折の信号を記録しながら、同時にパクリタクセルなどの薬剤を試料に均等に添加するという実験技術上の課題であった。

Sugiyamaらが2009年に開発し、Kamimuraらが2016年に微小管に応用した流動配向装置を、本研究では、上の目的にあった改良を行ってもちいた。具体的には、流動配向に用いたモーターと周辺部品の改善により、より安定した剪断流を維持できるようにした点、試料開口部を設けて、そこに遠隔操作可能な電動ピペットを用いて1-5 μ Lの薬剤を添加できるようにした点である。

4. 研究成果

これまでわかっていなかった以下の3つの重要な発見があった。1つ目は、パクリタクセルの結合後の微小管構造変化、特に、長さ方向へのチューブリンダイマー分子の伸張が0.2秒程度で起こりうることである。これは、チューブリン分子が、整然と結晶の様に詰め込まれた微小管の構造を考えると、予想以上に早い現象であった。もちろん、結合そのものはDiazの計測通りに、より早く1/1000秒単位で起こっていると想像できるが、一斉にチューブリンダイマーの構造変化が起こる様子がうかがわれる。飽和結合濃度に達しない時、あるいは、低温条件時の変化を調べる研究は、微小管の構造特性を深く理解する上でも、今後、行われるべき研究と考えられる。2つ目は、パクリタクセルが微小管径を変化させないという点である。これは、微小管安定化作用が、プロトフィラメント間結合を高めるためと考えるならば、不思議な現象である。チューブリンダイマー分子の側面での相互作用には、見かけ上、構造変化は生じることなく、結合力のみが増加することになるが、この解釈の是非は、今後、綿密な解析が必要となるであろう。3つ目は、用いたもう一つの微小管安定化剤であるラウリマライド(京都薬科大学の上西潤一先生より寄贈)が、パクリタクセルとは全く異なる構造変化を引き起こすという発見である。長軸方向への変化はほとんどなく、微小管径が、約3秒ほどの時間経過で増加する点である。

手法上、微小管安定化剤の効果を様々な観点で評価できる点で、流動配向法とX線繊維回折を組み合わせる研究は有効であることが上の結果からもわかったが、平行して行っている、単一アイソマーチューブリンを用いる構造研究、他のタキソール誘導体や微小管結合タンパク質(Shima et al., 2018)の微小管構造変化へ与える影響を探る研究の成果が期待できる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- 1) Kamimura S (2017) X-ray fiber diffraction: a tool for understanding the structural dynamics of tubulin dimers in native microtubules. *Spring-8/SACLA Research Frontiers* 2016: 32-33. [査読無]
- 2) Shima D, Marikawa M, Kaneshiro J, Kambara T, Kamimura S, Yagi T, Iwamoto H, Uemura S, Shigematsu H, Shirouzu T, Watanabe TM, Nitta R, Okada Y & Hirokawa N (2018) Kinesin-binding-triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport. *J. Cell Biol.* DOI: 10.1083/jcb.201711178 | Published October 8, 2018 [査読有]
- 3) Ishigami, R., Kato-Minoura, T. (2018) Changes in the cell shape and actin organization accompanying primary ciliogenesis in *Xenopus* epithelial cells. *中央大学理工学研究所論文集* 24 1-11 2018 年[査読有]
- 4) Kamiya, R., Shiba, K., Inaba, K., Kato-Minoura, T. (2018) Release of sticky glycoproteins from *Chlamydomonas* flagella during microsphere translocation on the surface membrane. *Zoological Science* 35:299-305. [査読有]

[学会発表](計33件)

- 1) 王舒誠、中原美奈、上村慎治。タコノマクラの作る緑色素の分泌機構と役割。(社)日本動物学会第71回関東支部大会 2019年3月。
- 2) 加木下原自、奥野誠、上村慎治。キングョ精子の運動活性化について。(社)日本動物学会第71回関東支部大会 2019年3月。
- 3) 加藤佑亮、中村洋輝、鬼頭玲賀、河野美都子、中原美奈、上村慎治。タコノマクラの作る緑色素の分泌機構と役割。(社)日本動物学会第71回関東支部大会 2019年3月。
- 4) Shima Tomohiro et al. Conformational switching of microtubule and cooperative binding of kinesin-1 for polarized transport. *EMBO Symposium: Microtubules from Atom to Complex Systems*, 2018.5
- 5) Estevez-Gallego J, Kamimura S, Balaguer-Perez, F, Lucena-Agell D & Diaz J-F. Biochemical and structural characterization of taxoid microtubule-stabilizing agents. *EMBO Symposium: Microtubules from Atom to Complex Systems*, 2018.5
- 6) Kamimura S, Imai H, Yagi T & Iwamoto H. Diaz, Jose-Fernando, Structural basis for the GTP activation of tubulin. *EMBO Symposium: Microtubules from Atom to Complex Systems*, 2018.5
- 7) Shima T, Morikawa, M, Kaneshiro J, Kambara T, Kamimura S, Yagi T, Iwamoto H, Uemura S, Shigematsu H, Ichimura T, Watanabe TM, Nitta R, Okada Y & Hirokawa N, Shima T, Morikawa, M, Kaneshiro J, Kambara T, Kamimura S, Yagi T, Iwamoto H, Uemura S, Shigematsu H, Ichimura T, Watanabe TM, Nitta R, Okada Y & Hirokawa N, Conformational switching of microtubule and cooperative binding of kinesin 1 as a base for polarized transport (B115) *ASCB-EMBO Meeting* 2017.
- 8) 和田祐子、最上善広、上村慎治。高粘度海水中のマダコ精子鞭毛で顕著な"double wave"の解析。日本動物学会 2017年9月
- 9) 中原美奈、成田大樹、和田祐子、鈴木雄大、田中昂輝、今井洋、上村慎治。ラフィド藻シャトネラの遊泳停止と赤潮発生機構。(社)日本動物学会第71回関東支部大会 2019年3月。
- 10) 上村慎治、今井洋、八木俊樹、岩本裕之。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。(社)日本動物学会第71回関東支部大会 2019年3月
- 11) Wada, Y. Kamimura, S. Flagellar wave form of *Octopus vulgaris* sperm in high viscosity medium *The 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan*. 2016.
- 12) Imai, H. Nishiyama, H. Harada, Y., Kamimura, S. Effects of high pressure on the motility of sea urchin sperm flagella *The 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan*. 2016
- 13) Yagi, T., Kamimura, S., Iwamoto, H. 軸糸直径サイズ変化による鞭毛繊毛の屈曲運動の制御 *日本生物物理学会 第54回年会*, 2016.
- 14) Nishiyama, M., Kato, C., Imai, H., Kamimura, S., Harada, S. 高圧力顕微鏡法による深海微生物の遊泳運動観察 *日本生物物理学会 第54回年会*, 2016.
- 15) 上村慎治、今井洋、八木俊樹、島知弘、岡田康志、岩本裕之。微小管内 GDP-チューブリンの精密な周期決定 *第54回 日本生物物理学会*, 2016.
- 16) Miyashiro D, Wada Y, Shihira-Ishikawa I, Miya-waki A, & Kamimura S. Direct flow analysis around the beating flagella of sea-urchin sperm cells supporting the slender body theory of micro-swimmers *31st International Congress on High-speed Imaging and Photonics*, 2016.
- 17) S. Kamimura, Y. Fujita, Y. Wada, T. Yagi, T. Shima, Y. Okada, H. Iwamoto. X-ray fiber diffraction analysis of microtubule revealing the dynamic changes of axial tubulin repeats in native microtubules *2016 EMBL Symposia Microtubules, Microtubules: From Atoms to Complex Systems*,

- 2016.
- 18) 宮崎謙哉・池田実咲・神谷律・箕浦高子。鞭毛のグライディングに関与する高分子量タンパク質 FAP113 および FMG-1B の役割。日本動物学会関東支部第 71 回大会 2019 年 3 月
 - 19) 田中文香・竹中未来・神谷律・箕浦高子。クラミドモナスの微小管重合阻害剤耐性に関するシャペロンタンパク質 Apm1 の役割。日本動物学会関東支部第 71 回大会 2019 年 3 月
 - 20) 箕浦高子・神谷律。遺伝子を単一化したクラミドモナスからの、チューブリン変異株の高効率単離。2019 年生体運動研究合同班会議 2019 年 1 月
 - 21) 豊岡 博子・浜地 貴志・西村 芳樹・宮城島 進也・箕浦 高子・野崎 久義。ボルボックス系列異型配偶ユードリナにおける配偶子誘導要因の解析。日本植物学会第 82 回大会 2018 年 9 月
 - 22) 近藤 裕祐・小川 倫加・菅野 英美里・廣野 雅文・箕浦 高子・神谷 律・八木 俊樹。中間鎖点突然変異による外腕ダイニンモーター活性の低下。第 56 回日本生物物理学会年会 2018 年 9 月
 - 23) 箕浦高子・荻原由太郎・鈴木涼介・福澤秀哉・山野隆志・神谷律。Properties of *Chlamydomonas* mutants that lack one of the two alpha- or two beta-tubulin genes. 18th International Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas*. 2018 年 7 月
 - 24) 箕浦高子。α、β-チューブリン遺伝子を 1 コピーしかもたないクラミドモナス変異株の性質。2018 年生体運動研究合同班会議 2018 年 1 月
 - 25) 石神里穂・箕浦高子。*Xenopus* 上皮細胞の繊毛形成時に見出された特徴的なアクチン構造。第 12 回細胞運動研究会 2017 年 9 月
 - 26) 小川倫加・菅野英美里・近藤裕祐・廣野雅文・箕浦高子・神谷律・八木俊樹。外腕ダイニン中間鎖の点突然変異によるクラミドモナス鞭毛運動性の低下。第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月
 - 27) 小川倫加・菅野英美里・近藤裕祐・廣野雅文・箕浦高子・神谷律・八木俊樹。クラミドモナス・ダイニン外腕中間鎖変異による運動性の低下。日本動物学会第 88 回大会 2017 年 9 月
 - 28) 石神里穂・箕浦高子。*Xenopus* 上皮細胞の一次繊毛形成におけるアクチン細胞骨格の再配置。日本動物学会第 88 回大会 2017 年 9 月
 - 29) 石神里穂・箕浦高子。Ciliogenesis in *Xenopus* epithelial cells may depend on novel actin-containing structures formed at the basal region. The 22nd International Congress of Zoology 2016 年 11 月
 - 30) 箕浦高子・福澤秀哉・山野隆志。Isolation of *Chlamydomonas* mutants that lack one of the two alpha-tubulin or two beta-tubulin genes. The 22nd International Congress of Zoology 2016 年 11 月
 - 31) 神谷律・柴小菊・稲葉一男・箕浦高子。鞭毛・繊毛の表面運動：現象の普遍性と膜タンパク質のダイナミクス。第 54 回日本生物物理学会年会 2016 年 11 月
 - 32) 箕浦高子・福澤秀哉・山野隆志。Isolation of *Chlamydomonas* mutants that lack one of the two alpha-tubulin or two beta-tubulin genes. EMBO conference on Cilia 2016 2016 年 10 月
 - 33) 箕浦高子・青木誠志郎。Phylogenetic analysis of NAP, an unconventional actin of the Volvocales. 17th International Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas*. 2016 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：箕浦高子

ローマ字氏名：Takako Mioura

所属研究機関名：中央大学

部局名：理工学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 80300721

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。