

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06602

研究課題名(和文) 微小管内チューブリン分子ラセン配置の柔軟性と可塑性

研究課題名(英文) Flexibility and plasticity of the tubulin lattice within assembled microtubules

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SPRING-8にてウシ脳微小管のX線繊維回折を高速冷却条件下で調べることに初めて成功した。超分子複合体構造の温度特性を調べた最初の研究報告例となり、以下の新知見を得た。1つ目は、微小管が長さ方向と直径方向で異なる冷却収縮率となる点で、チューブリン分子が温度によって構造変化することの直接的な証拠となる。2つ目は、17度が構造を維持できる臨界温度となる点、3つ目は、微小管安定化剤の存在で冷却収縮率が明らかに変化する点、4つ目は、再加温で再形成される微小管構造を調べ、脱重合時と再重合時の構造の違いが検出できた点である。微小管構造の新しい動態解析手法として提案できる画期的な手法となるだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子は独特の高次構造を持ち、金属粒子やポリマー粒子とは異なり、非等方的な構造を持つ。温度変化による熱膨張率もその構造を反映していると期待できる。本研究は、この点を高精度のサブμmスケールで明らかにした最初の研究例となる。研究手法上、冷却しなければならぬクライオEMで解明された分子構造を解釈する上で、程度の差はあれ、低温構造変化する生体分子もある点は、考慮すべき新事実である。また、低温条件下で哺乳類の脳微小管は不安定化する性質があるが、その生物物理学的な説明、さらには、より温度順応型の他の真核生物から、哺乳類の微小管が進化して来た理由や分子進化プロセスの理解にもつながると期待している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the dynamic changes of X-ray fiber diffraction from brain microtubules (MTs) on rapid cooling at SPRING-8. This is the first example to show the temperature-dependent structural dynamics of supramolecular compounds, and we obtained the following four new findings. The first is that MTs have the different rate of shrinkage on cooling in the length and diameter directions, which is a direct proof that tubulin molecules undergo structural changes at low temperature. The second is that 17 degrees is the critical temperature at which the MT structure can be maintained, the third is that the cooling shrinkage rate clearly changed depending on MT stabilizers (paclitaxel and laulimalide), and the fourth is that the difference in structures between depolymerization and repolymerization was observed by investigating diffraction patterns during re-warming. This study would be an epoch-making one that is proposing a new tool to investigate the dynamic features of MT structures.

研究分野：生物物理学

キーワード：微小管 X線繊維回折法 小角散乱 微小管安定化剤 流動配向法 負の熱膨張係数 チューブリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

X線繊維回折法を使った微小管の構造解析は、長さ方向のチューブリン周期、および平均微小管径を短時間で、生理的な溶液条件下で計測できる点で優れている。たとえば、1 mg の試料溶液の場合、10~20 秒の X 線照射によって十分な回折信号を得られるために、温度や種々の化学物質の濃度を変えた時の時間変化を追跡することも容易である。このような実験は、申請者が独自に開発してきた微小管流動配向法によってはじめて可能になることを、論文発表等でこれまで示して来た (Sugiyama et al., 2009; Kamimura et al., 2016; Shima et al., 2018)。対照的な手法は、分解能の優れたクライオ電顕法であるが、1つの溶液条件で1~2万枚の写真を撮影する必要があるが、画像処理法によって原子スケールの微小管構造を理解できる点が大きな特徴となる。前者に比べ後者が、溶液条件を刻々と変える実験、種々の薬剤の効果を比較する実験、温度変化やゆらぎなどの評価を行う実験などの研究へ展開することが非常に困難なことを考えると、すでに数10以上あることが知られている抗がん剤候補を調べ、他の溶液条件、薬剤組み合わせ、時間経過などを探るような研究は不可能に近い。クライオ電子顕微鏡の他に、X線結晶解析や従来の生化学的・光学顕微鏡を使った研究手法で得られる情報を補間する形で、本研究で開発応用する X 線繊維回折法を利用し、微小管研究の発展に寄与できるものと期待している。

2. 研究の目的

生理的な溶液条件下で微小管の Å ~ nm スケールの微細な構造変化とゆらぎを、定量的に評価できる新手法を確立し、微小管の構造解析へ応用することが本研究の目的である。この研究の最大の特徴は、独自の流動配向装置を使用する点である。試料溶液を2枚の平板で挟み、その片方を10~20 rps の速度で回転させるとわずか容量が100 μL の試料液に剪断流を起こすことができる。これにより微小管を回転円周方向に効率よく配向させることができることを確認している。配向後、シンクロトロンの高輝度 X 線を照射し、得られる回折信号の子午線軸信号から微小管内のチューブリン周期、赤道軸信号から平均微小管径やプロトフィラメント数に関わる情報を収集する。この研究手法のための粘度条件、平板間の距離コントロール、温度制御、回転速度の最適化、液の交換方法や薬剤添加方法など、細かな実験条件の確認は、当研究室にてすべて完了させている。当初は試料の傾斜角を変えて微小管内のラセン角を正確に求める実験を試みたが、信号の精度が期待通りには上がらないことが判明したため、本研究途中で、温度変化に関する研究へと途中で切り換えた。これは、低温で微小管構造が不安定化することがすでに多くの研究から知られており、教科書的な記述として見られるものの、そのしくみについての解答は得られていないためである。もう一つは、クライオ電顕法による研究において、観察する試料はやむなく氷結前の低温状態を通過させた上に瞬間凍結することになるが、この時の構造変化についての知見はほとんどなかったためである。SPring-8 でこれまで使用して来たビームライン (BL45XU) を高輝度型 (BL40XU) に切り換え、1~2 秒ほどの X 線照射で構造解析が可能になった点でも高速の構造変化を追跡する研究が可能になった。

3. 研究の方法

X線繊維回折は、タンパク質や DNA 構造解析へと応用されて来た古典的な手法で、細胞骨格の研究にも幅広く利用されて来た経緯がある。しかし、多くは、筋繊維や神経繊維のように、すでに配向している実験材料を使うか、あるいは、磁場配向 (Bras et al., 1998) や遠心操作による効率の悪い配向手法 (Mandelkow et al., 1977) を用いるしかなかった。そのため、微小管の様に、

短時間で会合・脱会合する試料、あるいは、その経時的な変化、温度や薬剤添加後の変化を追跡するといった生理学的な研究への応用は極めて難しかった。しかし、申請者は、試行錯誤の末、粘性を高めた水溶液内で起こす剪断流によって、微小管が容易に一方へ配向することを発見し、これに中空モーターの利用、および、新規のX線用窓材の使用や温度管理の方法など数々の改善を行う事で、より再現性よく、安定したX線繊維回折像の観察ができる技術として確立できた。同じ手法を持った研究室は他にはなく、共同研究者となる2～3の他機関に計測技術を提供し、研究を進めつつある。本研究では、さらに大きな装置の改良を行った。微小管の重合・脱重合の反応、および、薬剤添加による構造変化は30秒程度で起こることがわかっていたので、それよりも速い速度で微小管試料の温度を変化させる必要がある。装置全体を10～20秒で冷却・再加温させる装置を完成させる作業をまず研究中盤から実施することになった。

精製したウシの脳チューブリンを大量(10～50 mg)に必要とする点、微小管安定化剤の生化学的な特性が明確である点、電子顕微鏡法や結晶解析による構造特性が調べられている点(調べられつつある点)さらに、すでに様々な微小管安定化剤を合成・保有している点で、スペインのDiaz博士の研究室の協力は不可欠であるが、2017～2018年の共同研究の実績によってすでに学会発表も行い、共著の論文作成もはじめている。この点でも、研究を遂行する環境はよく整っていると判断している。この研究室とは、これまで同様の共同研究を計測すると同時に、種々の微小管安定化剤、およびチューブリン試料の無償提供を受ける予定である。

4. 研究成果

低温処理で微小管が容易に脱重合し、微小管からチューブリン二量体へと解離反応が進むことがよく知られた事実である。教科書的な記述にも多く見られ、細胞分裂周期を同調させるときにも、短時間、低温処理して微小管を破壊することも行われている。しかし、そのメカニズムは、まだ、解明されておらず、以下の2つの考え方がある。一つは、会合・脱会合の平衡が低温で後者に偏るためであるという考え方である。これは現象の説明に過ぎないが、Caplow et al (1988)は特にGTPキャップ構造での変化が大きいためであることを示唆している。これとは別の考え方を本研究では考えた。微小管内のチューブリン二量体の構造が低温で変化し、これがチューブリンダイマー間の結合を弱める作用としてはたらき、脱会合が加速するというモデルである。これはX線回折で調べる場合、会合・脱会合速度よりも高速で温度変化させ、構造の変化を調べる解析しないと考えた。

本研究の結果、以下の様な新しい知見を得ることができた。微小管の長さ方向の周期(チューブリン二量体の平均長を示す)と直径方向(チューブリン二量体の横方向の相互作用)の変化を区別して解析すると、低温処理で、異なる収縮率を微小管は示し、長さ方向へ $70 \times 10^{-6}[1/K]$ 、直径方向へは $180 \times 10^{-6}[1/K]$ であった。これは低温条件にすると、より直径方向へは圧縮が進むことになる。水溶液の収縮が $50 \sim 110 \times 10^{-6}[1/K]$ であることを考えると、直径方向への変化は大きい。もちろん、この収縮はクライオ電顕で調べられる分解能よりも小さなもので、これまでの構造解析ではもちろん解明されなかったことではある。低温にする場合、17度が閾温度になることもわかった。これは溶液条件で調べたFygenon et al.(1994)の結果と一致している。この閾温度近くで、微小管直径が収縮からわずかに拡張する様子も観察できたが、詳しい解析は現在進めている最中である。

チューブリン分子サイズ(4 nm)を反映した回折信号が容易に検出できることが、微小管の特徴である。すでに形成されている微小管はGTP加水分解を終了したGDP-チューブリンが大半を占めているが、新しく形成される微小管は加水分解前のGTP-チューブリンであると考えられ

るため、本研究では、再加温後に形成される微小管の構造にも着目した。その結果、期待通りの分子長の長いチューブリンであることもわかった。GTP アナログを使うことなく、GDP-チューブリン、GTP-チューブリンの構造比較ができる点でも、本研究手法は、今後、有効な方法となるであろう。4 nm 周期信号の幅、つまり、チューブリン周期のゆらぎや不均一性に関して、温度依存性が明らかに観察でき、この点の解析も今後進めてゆきたい。

さらに、興味深い結果は、微小管安定化剤を使った実験である。結合サイトが異なる2つの薬剤、パクリタクセルとラウリマライドを今回主に使用した。パクリタクセルは、抗がん剤としてひろく使われる薬剤であるが、チューブリン分子長を3%伸長させることがわかっている。しかし、低温時にこの伸長が元に戻る、つまり、負の熱膨張係数 ($-15 \sim -40 \times 10^{-6} [1/K]$) を示すという非常にユニークな特性を示すことがわかった。直径方向の温度変化は、コントロールとなるGDP-微小管と差は無かった。ラウリマライドの結合による効果はこれとは正反対で、長軸方向への変化はコントロールとほとんど変わらなかったが、ラウリマライド結合によって拡張した微小管径は、低温条件下でも元に戻る、直径方向への変化は抑えられることがわかった。微小管安定化剤は、結合する部位によって異なる構造変化をチューブリン分子に引き起こすが、その温度特性も結合サイトによって大きく異なることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 藤田 洋介, 箕浦 高子, Longo Alessandrob, 和田 祐子, 八木 俊樹, 岩本 裕之, 神谷 律, 上村 慎治	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 SAXS Signals from Double-Stranded DNA under Shear-Flow Conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SPRING-8/SACLA 利用研究成果集	6. 最初と最後の頁 469-472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18957/rr.8.3.469	査読の有無 有
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

1. 著者名 Juan Estevez-Gallego et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Structural model for differential cap maturation at growing microtubule ends	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLIFE	6. 最初と最後の頁 e50155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.50155	査読の有無 有
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

1. 著者名 Estevez-Gallego Juan, Josa-Prado Fernando, Ku Siou, Buey Ruben M, Balaguer Francisco A, Prota Andrea E, Lucena-Agell Daniel, Kamma-Lorger Christina, Yagi Toshiki, Iwamoto Hiroyuki, Duchesne Laurence, Barasoain Isabel, Steinmetz Michel O, Chr?tien Denis, Kamimura Shinji, D?az J Fernando, Oliva Maria A	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural model for differential cap maturation at growing microtubule ends	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	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) 10.7554/eLife.50155	査読の有無 有
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

1. 著者名 Tsuyoshi SATO, Tomotaka SHIRANE, Yuuko WADA, Hiroshi IMAI & Shinji KAMIMURA	4. 巻 2019(25)
2. 論文標題 Development of phase-contrast/dark-field microscopy with scanning laser illumination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Institute of Science and Engineering. Chuo University	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) 10.24789/00012390	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊落舜太郎・和田祐子・上村慎治
2. 発表標題 微小管安定化剤が鞭毛運動に与える阻害効果
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mina Nakahara et al.
2. 発表標題 Variogram and correlogram assay of cell motility: Bioconvection in harmful algae <i>Chattonella</i> .
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村慎治・岩本裕之
2. 発表標題 微小管の非等方的冷却収縮
3. 学会等名 日本生物物理学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rie Ayukawa et al.,
2. 発表標題 GTP-チューブリンはどのようにして微小管の核を生成するか? (1) 直線型オリゴマーの形成
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seigo Iwata et al.
2. 発表標題 GTP-チューブリンはどのようにして微小管の核を生成するか? (2) オリゴマーのラテラルな相互 作用
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村慎治
2. 発表標題 X線繊維回折法によって明らかとなった秒単位の微小管構造変化
3. 学会等名 日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村慎治
2. 発表標題 微小管内チューブリン周期の絶対値
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>シンクロナイトロン技術を使い微小管の構造変化を解明 https://www.chuo-u.ac.jp/aboutus/communication/press/2020/03/48371/ 微小管が生まれる分子メカニズムを解明 - ごく少数の直線状オリゴマーだけが微小管になる - https://www.chuo-u.ac.jp/aboutus/communication/press/2021/02/53099/ シンクロナイトロン技術を使い微小管の構造変化を解明 https://www.chuo-u.ac.jp/aboutus/communication/press/2020/03/48371/ シンクロナイトロン技術を使い微小管の構造変化を解明 (プレスリリース) http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2020/200317/ New structural model for microtubule ends https://www.cib.csic.es/news/research/new-structural-model-microtubule-ends</p>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スペイン	CSIC (Madrid)	ALBA (Barcelona)	