

極低温電子線断層法によるセプチン系超分子構造体の解析

— 複合体の構造と機能の解明及びその応用

木下 専

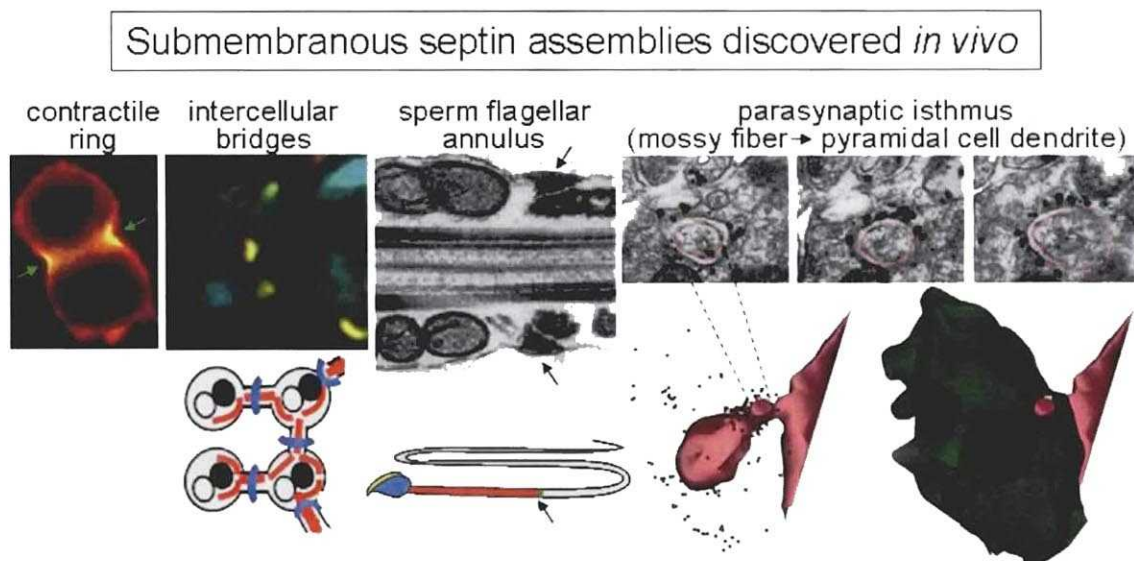
京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構

概要

セプチンは、アクチンやチューブリンに次ぐ普遍的なヌクレオチド結合性細胞骨格蛋白質である。しかし、特異的阻害剤がないことや、パラログ間の機能重複、不規則な重合性などが機能・構造解析を阻んできた。本研究では、セプチン集合体が染色体分配装置、精子鞭毛、シナプス装置の超分子複合体の局在や安定化のための足場を与えることを、RNA 干渉法、電子顕微鏡法、遺伝学的手法によって明らかにした。これらの知見に基づいて臨床検体を探索し、セプチン集合体の破綻が生殖系疾患や神経変性疾患の病態に関わることを見出した。以上から、セプチン系が単細胞レベルから高次脳機能まで多彩な生命現象を支えるスカフォールド・システムであると認識されるようになった。このように、セプチン系の機能的意義に関する理解が進んだ一方、不活発なヌクレオチド交換反応や重合・脱重合機構の背景となる構造基盤の解明には至っていない。残された謎を解く鍵を求めて、非重合性複合体を探索し、X線結晶構造解析を目指している。

1. セプチン系超分子構造体の探索と機能解析

セプチン・フィラメントは、アクチン系・微小管系・膜骨格系などに紛れて存在することが多い。このことが災いして、細胞骨格系の中でセプチン系の発見は最も遅れた。また、そのサブユニット構成・局在・機能に関しても生物種や細胞系譜による多様性が著しいことから、我々は未だセプチン系の全容をつかんでいない(1,3,8 に総説)。従って、セプチン集合体の局在と機能的意義の探索は、現時点においてもこの分野の最重要課題の1つである。



細胞レベルの研究により、アクチン系とセプチン系の相互依存的な超分子複合体形成が細胞質分裂の際の収縮輪形成に必須の役割を果たすことを以前報告した(2 に総説)。本研究では、細胞質分裂に先立つ染色体の赤道面への整列と紡錘体極への分配に動原体近傍のセプチン・スカフォールドが必須であることを、RNAi と詳細なタイムラプス蛍光イメージング法を用いて示した。すなわち、紡錘体赤道面付近のセプチン・クラスターを枯渇させると、染色体牽引モーター蛋白質 CENP-E が紡錘体赤道面に保持されず、両極へと迷走する。このため分裂中期に赤道面に整列すべき染色体の配列が乱れ、不等分配となる。この事実は、種々の悪性腫瘍で高頻度にみられるセプチン系の異常が染色体不安定化をもたらし、さらなる悪性化に加担する可能性を示唆するため、癌の進展において重要な意味を持つと考えられる(5)。

組織・個体レベルでは、脳のシナプス膜直下にセプチンが大量に集積していることを以前報告したが、詳細な分布様式や生理機能は不明であった。本研究では、免疫電子顕微鏡(イムノゴールド法)連続切片像から抽出した 2 次元デジタル画像のスタックをコンピュータ上で再構築して 3 次元空間におけるセプチンの分布を解析した。この技法により、例えば海馬では錐体細胞樹状突起棘の峽部を取り巻く苔状線維の前シナプス膜直下にセプチンが集積していることを明示することができた。セプチン集合体に特徴的な環状分布は小脳のシナプス近傍でも見られ、固有の生理機能を反映すると推測された。そこで、脳特異的サブユニットである Sept4 に着目して逆遺伝学的手法による機能探索を行った。作製した Sept4 遺伝子欠損マウスにおいては、ドパミン神経のシナプス伝達が低下していた。その原因を探索したところ、前シナプス膜直下のセプチン系が神経伝達物質ドパミンの合成・分泌・再取り込み系の機能分子群(すなわち合成酵素、シタキシン、トランスポーターなど)の安定化に必要であることがわかった。詳細な分子機構は解析中であるが、これまで推測の域を出なかった膜蛋白質のスカフォールドとしてのセプチン系の意義がこの系で検証できるであろう。

ドパミン伝達障害を主徴とする神経変性疾患にパーキンソン病がある。その病理学的特徴として、責任蛋白質 α -シヌクレインが細胞質内凝集体(レビー小体)を形成することが知られている。Sept4 は α -シヌクレインと直接会合する生化学的特性を持つため、パーキンソン病においてレビー小体に巻き込まれて共凝集することがわかった(4)。さらに検討を重ねることにより、「Sept4 が前シナプス膜直下のセプチン・スカフォールドからレビー小体へと隔離されることがドパミン伝達障害の一因である」という仮説を提唱した(10)。

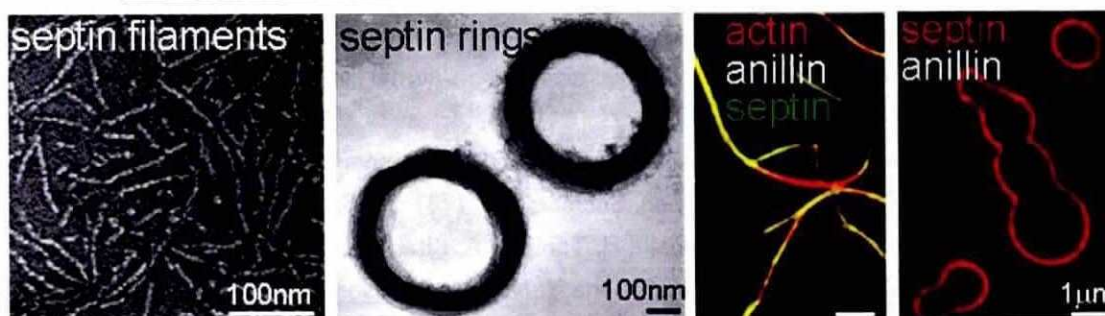
しかし、海馬や小脳で見つかったセプチン環状集合体の形状や機能は Sept4 欠損のみでは破綻しなかったため、その生理的意義は依然不明である。(この問題の解決のために別のアプローチを開始した。)一方、このマウスの予想外の雄性不妊が精子鞭毛内のセプチン環状集合体の発見につながり、その破綻が鞭毛構造の脆弱化と鞭毛運動の微弱化をもたらすことがわかった。この知見に基づき、臨床グループと共同で男性不妊患者の検体をスクリーニングしたところ、精子無力症(微弱鞭毛運動を主徴とする原因不明の疾患)の 25%においてセプチン環状集合体の破綻を検出した。セプチンは、本疾患初の分子診断マーカーとして、治療方針決定や原因解明に役立つであろう(6,11)。

以上の成果を踏まえて現時点でセプチンの生理機能を定義するならば、細胞全体の形状を global に支持・制御する古典的・連続的な細胞骨格系というよりはむしろ、細胞のごく一部ないし超分子複合体を支持・安定化する local な分散型スカフォールド・システム、とみなす方が適切であるという考え方を提唱した(8)。

2. セプチン系超分子構造体の *in vitro* 再構成

上記のようなセプチン系の多機能性は、20 種類以上のサブユニットの組み合わせ多様性だけでなく、フィラメント状複合体のフレキシブルな高次集合性や蛋白質・脂質との相互作用による構造転換によって実現されていると推測される。この複雑系において、複合体形成や高次集合の一般原理に迫るためには、最も単純なセプチン複合体の *in vitro* 再構成が有用である。

Diverse septin assemblies reconstituted *in vitro*



この再構成系により、これまでに、複合体形成の組み合わせ原理、セプチン・フィラメントの環状自己集合性、アクチン・セプチン超分子構造体形成の分子機構を発見・検証してきた(3)。最近の展開として、細胞膜裏打ち蛋白質アニリンがセプチン集合体の形状やトポロジーを転換させることや、セプチン複合体が脂質 2 重膜リボソームから多数の細管を突出(tubulation)させる変形活性を持つこともわかった(いずれも投稿準備中)。

複合体形成機構の解析の一環として、3 つのサブユニットから成る最も単純な再構成セプチン複合体のうち、1サブユニットの GTP 結合領域(P-loop)に GTP 結合不能型の1アミノ酸置換変異を導入した変異型複合体を複数調製した。これらの高次集合性を検討したところ、予想に反していずれも野生型と同等の高次集合性を保持していた(未発表)。従って、 α/β -チューブリンヘテロダイマーの重合・脱重合が β -サブユニットの GTP ターンオーバーと共役している事例とは異なり、セプチン複合体のいずれのサブユニットの酵素活性も高次集合とは共役していない可能性が示唆された。この事実は、酵母においてセプチンの GTP/GDP の代謝回転が観測できないという Harvard 大学グループの研究結果とも符合する(J Biol Chem. 279, 3111, 2004)。

3. セプチン系超分子構造体の構造解析を目指して

上記のような不活発なヌクレオチド交換反応や重合・脱重合機構に関する多くの謎を解くために、少なくともセプチンサブユニットの GTP 結合領域、できれば複合体丸ごとの構造情報が必要である。しかし、最も単純な再構成セプチン複合体であってもサブユニット数や形状が不規則であるため、電子線単粒子解析による高分解能の構造情報は期待できない。また、複合体・単一サブユニット・サブユニット断片のいずれをとっても、精製・濃縮の過程で重合ないし凝集してしまうため結晶化に不適であることが本研究で判明した。(チューブリンの構造解析に唯一成功した UC Berkeley グループ、GTPase の構造解析を専門とする Max Planck 研グループも数年前から酵母およびヒトのセプチン複合体の構造解析を試行しているが、いずれも難航しているという。)このような国際研究状況の中、我々は特殊な培養細胞において Sept4 サブユニットがある加水分解酵素と安定な複合体を形成していることを見出した。現在、Sf9 共発現系で両者の複合体を調製し、共結晶化による X 線構造解析の可能性を探っている。当初の予想通り、重合性蛋白質の構造解析は苦難に満ちたものであるが、さきがけ研究期間終了後も継続して取り組んでいく予定である。

参考文献

1. Kinoshita M. Protein Family Review: The Septins. **Genome Biology** (London) 4, 236:1–9, 2003.
 2. Kinoshita M., Field CM. Septins and Cytokinesis. **Encyclopedia of Biological Chemistry** (eds.W.J.Lennarz, M.D.Lane, D.W. Cleveland) Elsevier, vol.4. 22–26, 2003.
 3. Kinoshita M. Assembly of mammalian septins. **Journal of Biochemistry** (Tokyo) 134, 491–496, 2003.
 4. Ihara M, Tomimoto H, Kitayama H, Morioka Y, Akiguchi I, Shibasaki H, Noda M, Kinoshita M. Association of the cytoskeletal GTP-binding protein Sept4/H5 with cytoplasmic inclusions found in Parkinson's disease and other synucleinopathies. **Journal of Biological Chemistry** 278, 24095–24102, 2003.
 5. Spiliotis ET, Kinoshita M., Nelson WJ. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. **Science** 307, 1781–1785, 2005.
 6. Ihara M, Kinoshita A, Yamada S, Tanaka H, Tanigaki A, Kitano A, Goto M, Okubo K, Nishiyama H, Ogawa O, Takahashi C, Itohara S, Nishimune Y, Noda M, Kinoshita M. Cortical organization by the septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa. **Developmental Cell** 8, 343–352, 2005.
 7. Ono R, Ihara M, Nakajima H, Ozaki K, Kataoka-Fujiwara Y, Taki T, Nagata K, Inagaki M, Yoshida N, Kitamura T, Hayashi Y, Kinoshita M., and Nosaka T. Disruption of *Sept6*, a fusion partner gene of *MLL*, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by *MLL-SEPT6*, or the phenotype induced by loss of *Sept4*. **Molecular and Cellular Biology** 25, 24, 10965–10978, 2005.
 8. Kinoshita M. Diversity of septin scaffolds. (*In Cell structure and Dynamics Review Series*; eds. V. Small and M. Glotzer) **Current Opinion in Cell Biology** 18, 54–60, 2006.
 9. Ihara M, Hagiwara A, Monypenny J, Okawa K, Kinoshita A, Kitano A, Tanigaki A, Kaneko R, Kawahara S, Kirino Y, Itohara S, Noda M, Kinoshita M. A postmitotic septin in Bergmann glia is required for cerebellar neuronal development and motor learning. (revised version submitted to *Molecular and Cellular Biology*)
 10. Ihara M, Yamasaki N, Tomimoto H, Kitano A, Tanigaki A, Hikawa E, Noda M, Takanashi M, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a presynaptic scaffold and a Lewy body component, is a neuroprotective factor against toxic transformation of α -synuclein. (revised version submitted to *Neuron*)
 11. 西山博之、木下 専 セプチン系細胞骨格と精子無力症. **医学のあゆみ** 214 巻 3 号 221–222, 2005.
 12. 木下 専 再構成系と遺伝子破壊マウスによるセプチン系の解析. **細胞工学** 25 巻 7 号, 785–789, 2006.
 13. 木下 専 細胞分裂と細胞形態形成における GTP 結合蛋白質セプチンの役割 **生化学** 78 巻 8 号, 755–759, 2006.
- 他、国際会議発表 15 件(うち招待講演 5 件)、国内会議発表 30 件(うち招待講演 10 件)、6.に関してプレス発表 1 件(主要7紙掲載および NHK-TV・ラジオ報道)。

謝辞

領域総括、アドバイザーの先生方、個人研究者の皆様(特に大阪大学 村上聡先生)、JSTの皆様のご支援とご協力に心より感謝申し上げます。