

2019年9月17日

報道関係者各位

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

細胞表面で波打つ繊毛の微小管の超微細な立体構造の観察に 世界で初めて成功、その内側からの補強機構を解明 ～不妊など繊毛病の病態解明にも期待～

【成果の要点】

- ・細胞の運動を駆動する繊毛の微小管の立体構造を、クライオ電子顕微鏡を用いて高分解能で決定
- ・微小管内のタンパク質が微小管を安定化する機構を初めて解明
- ・繊毛の安定化機構の解明は、繊毛病などの遺伝病の病態の理解にも有用

【概要】

ヒトの精子が鞭毛を波打たせて移動するように、真核生物は細胞表面の駆動装置である繊毛・鞭毛により運動しています。ヒトの場合、繊毛・鞭毛の異常は、不妊など繊毛病を引き起こすことも知られています。このように重要な駆動装置である繊毛・鞭毛は一秒間に数十回にも及ぶ波打ち運動をしており、その負荷に耐えるため、繊毛・鞭毛内の軸となる微小管は非常に安定で丈夫な構造をしています。その安定化の機構の詳細は分かっていませんでした。

奈良先端科学技術大学院大学（学長：横矢直和）先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域の市川宗厳助教らの研究グループは、カナダのマギル大学のメンバーらと協力し、超微小な物質の立体構造を得ることができるクライオ電子顕微鏡法を用いて、繊毛の微小管の立体構造をこれまでにない高い分解能(4.3 Å)で得ることに世界で初めて成功しました。これによって、繊毛の微小管内には多数のタンパク質構造が網目状に結合していて、内部から微小管構造を裏打ちすることで補強していることが見出されました。また、微小管の構成要素であるチューブリン（タンパク質）による格子構造は、微小管内タンパク質によって、安定な伸長型の構造に固定されることも明らかとなりました。さらに、京都大学のメンバーと協力することで、微小管内部へのタンパク質の結合がその微小管構造を安定化することを、分子の動きをコンピューター上で再現する「分子動力学シミュレーション」という手法でも示すことが出来ました。

本研究は、細胞の運動駆動を担う繊毛・鞭毛の微小管の安定化機構という生命に根源的な機構を解明し生命科学の発展に寄与するものであるとともに、繊毛病の病態がどのように引き起こされるかを理解する上でも重要な基盤となることが期待されます。

この成果は、米国東部時間の令和元年9月16日(月)付の *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 誌 (National Academy of Sciences) のオンライン版に 2 p.m. に掲載されました。(DOI: 10.1073/pnas.1911119116)。

つきましては、関係資料を配付いたしますので、取材方よろしくお願いたします。

【ご連絡事項】

- (1) 本件につきましては、奈良先端科学技術大学院大学から奈良県文化教育記者クラブをメインとし、学研都市記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブへ同時にご連絡しております。
- (2) 取材希望がございましたら、恐れ入りますが下記までご連絡願います。
- (3) プレスリリースに関する問い合わせ先

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 構造生命科学研究室
市川宗厳 TEL : 0743-72-5594 E-mail : michikawa@bs.naist.jp

【背景と目的】

生物にとって、動くことは非常に重要です。単細胞真核生物やヒトの精子は、繊毛・鞭毛^{*1}という運動駆動装置を用いることで、細胞運動を駆動しています（図 1A）。繊毛・鞭毛はまた、ヒトの体内でも、気管内の異物を取り除いたり、脳脊髄液の流れを生み出したりします。さらに、胚発生の際の左右軸を決定することも知られています。そのため、繊毛・鞭毛の異常はヒトにおける不妊や腎臓病など多岐に渡る重篤な症状を引き起こすことが知られており、これらの病態は総じて繊毛病と呼ばれます。これらの繊毛病の病態を理解するためには、繊毛・鞭毛の構造を解明することが必要不可欠でした。

繊毛・鞭毛の内部構造は、微小管^{*2}を中心として構成されており、2本のシングレット微小管（中心対微小管）を9本のダブルット微小管が取り囲んでいるため、「9+2構造」と呼ばれています。このダブルット微小管は、まずチューブリンが集まって繊維状のプロトフィラメント^{*3}になり、それが管状に13本並んだA小管と、10本のB小管の2種類が連なって形成されます（図 1A）。

一秒間に数十回もの波打ち運動をする繊毛・鞭毛内の過酷な環境に耐えるため、ダブルット微小管は、同じチューブリンを構成要素とする細胞質内のシングレット微小管と比べて非常に安定であることが知られていました。しかしながら、その安定化の詳しいメカニズムは分かっていませんでした。そこで、本研究では、ダブルット微小管をクライオ電子顕微鏡法^{*4}を用いて高分解能^{*5}で立体構造を得ることで、その安定化機構を解明することを目指しました。

【研究の成果】

繊毛・鞭毛の構造は真核生物で良く保存されているため、本研究では繊毛虫テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*)を用いて研究を行いました。テトラヒメナ繊毛からさらにダブルット微小管を単離し、クライオ電子顕微鏡を用いて撮影を行いました（図 1A）。カナダのマギル大学の Thermo Fisher Scientific 社製の最新鋭のクライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いることで、構造解析用に質の良い電顕像を大量に集めました。得られた電顕像からダブルット微小管の領域を切り出し、異なる角度から撮られた多数の画像から、元のダブルット微小管の三次元構造を再構成した結果、4.3 Å (1 Å は 100 億分の 1 メートル) という分解能でダブルット微小管の立体構造を得ることができました（図 1B）。これは、ダブルット微小管の立体構造を、世界で初めて近原子分解能で示した結果です。

得られた立体構造をみると、ダブルット微小管内には、多数のタンパク質構造が結合している様子が見出されました。また、複数のフィラメント状のタンパク質構造がダブルット微小管内を走っている様子も高分解能で明らかとなりました。これらの微小管内タンパク質構造は、互いに連結しており、ダブルット微小管のチューブリン格子構造を裏打ちしていました（図 1C）。特に、A小管内にはB小管と比べてより複雑な微小管内タンパク質のネットワークが存在していました。サルコシルという界面活性剤でダブルット微小管を処理したところ、B小管が先に壊れ始めたことから、この微小管内タンパク質のネットワークがチューブリン格子構造を安定化していると示唆されました。

サルコシル処理で得た A 小管についても同様にクライオ電子顕微鏡法によって解析することで、その立体構造を 4.9 Å 分解能で得ました（図 2A）。この A 小管のみの構造からは、いくつかの微小管内タンパク質が失われていました。ダブルット微小管と比較すると、チューブリン格子の長さが、長軸方向に 2 Å 程度短くなっている様子が観察されました（図 2B）。この結果は、微小管内タンパク質の結合が、微小管のチューブリンの格子構造の構築に直接影響しているということを示す初めての結果です。

先行研究の結果から、シングレットの微小管のプロトフィラメント内のチューブリンが GTP と結合しているときは伸長した真っすぐな構造をとるが、GTP が加水分解されて GDP になると 2 Å 程度短くなって屈曲し、プロトフィラメントが剥がれ落ちてチューブリンが脱重合していくことが知られています。一方、我々のダブルレット微小管の構造では、結合しているのが GDP であるにも関わらず、チューブリン格子は伸長した安定な構造を取っていました。このため、ダブルレット微小管のプロトフィラメントは、内側の微小管内タンパク質によって、安定な伸長型の構造に固定されていると考えられました。

我々のクライオ電子顕微鏡法によって得たダブルレット微小管の立体構造では、A 小管と B 小管の重なっている領域にフィラメント状の構造が走っている様子が観察されました (図 3A)。クライオ電子顕微鏡構造をもとに構造モデリングを行うことで、このフィラメント状の構造が、Rib43a と呼ばれるタンパク質に対応していることを明らかにしました (図 3B)。Rib43a は、ダブルレット微小管に結合していることが知られていましたが、ダブルレット微小管内での位置はこれまで特定されていませんでした。さらに、この Rib43a は、チューブリンのタキソール結合領域に入り込んでいる様子が観察されました。タキソールは、微小管を安定化させることが知られている抗がん剤としても用いられる低分子化合物です。Rib43a の結合様式は、タキソールのそれと非常に類似しているものでした (図 3C)。そのため、Rib43a は、タキソールと同様の機構でプロトフィラメントを安定化していると考えられました。タキソール結合領域に低分子化合物ではなく、タンパク質が結合する様子は、本研究で初めて見出されたものです。そこで、この Rib43a がチューブリン格子構造に与える影響を、分子動力学シミュレーション⁶を用いて調べたところ、Rib43a がある場合では、ない場合に比べて、チューブリン格子構造がエネルギー的に安定になっていることが分かり、やはり微小管内へのタンパク質の結合が微小管構造を安定化していることが示されました。

以上の結果を統合し、微小管内タンパク質の結合が、繊毛・鞭毛のダブルレット微小管を安定化する機構についての詳細なモデルを提唱しました (図 4)。まず、微小管内タンパク質のネットワークは、チューブリン格子構造内を内側から繋ぎとめることで、チューブリン格子構造の破損や、チューブリンの脱落を防いでいると考えられます。また、微小管内タンパク質は、内側からチューブリン格子構造を安定な伸長型の構造に固定しています。これによって、先端においてプロトフィラメントが屈曲して剥がれ落ち、チューブリンが脱重合してしまうことも阻止していると考えられます。さらに、Rib43a は、タキソールと同様の機構で A 小管と B 小管の間の領域のプロトフィラメントを安定化していると考えられます。

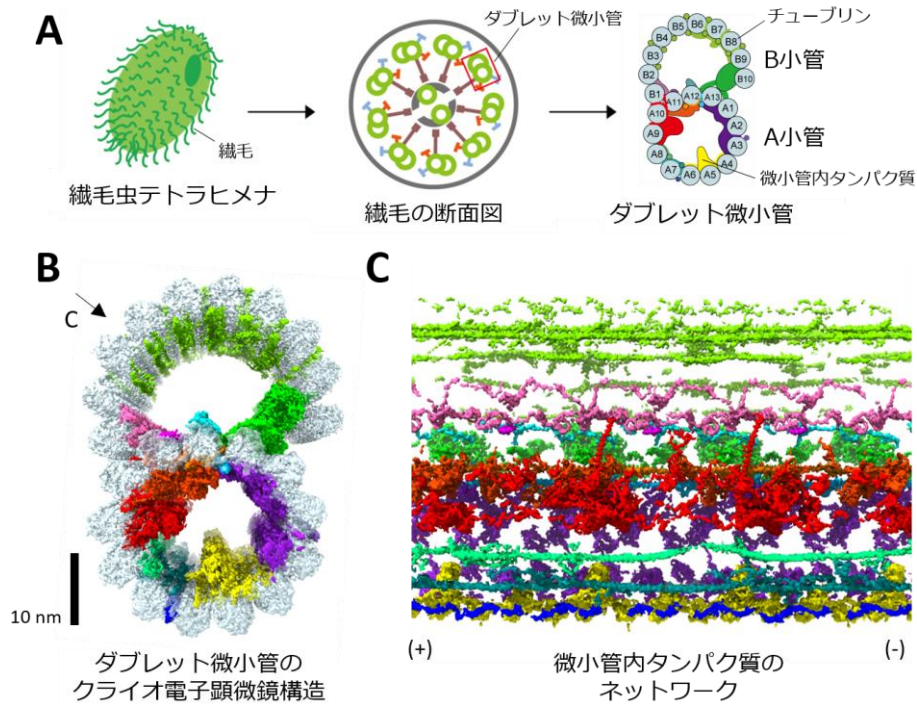


図1. 繊毛のダブルレット微小管のクライオ電子顕微鏡構造.

繊毛虫テトラヒメナから単離したダブルレット微小管(A)の構造をクライオ電子顕微鏡法を用いて高分解能で得た(B). ダブルレット微小管のチューブリン格子の内側には微小管内タンパク質の複雑なネットワークが形成されていた(C). 図中の(+)及び(-)は、微小管のプラス端・マイナス端を意味する(以下同様).

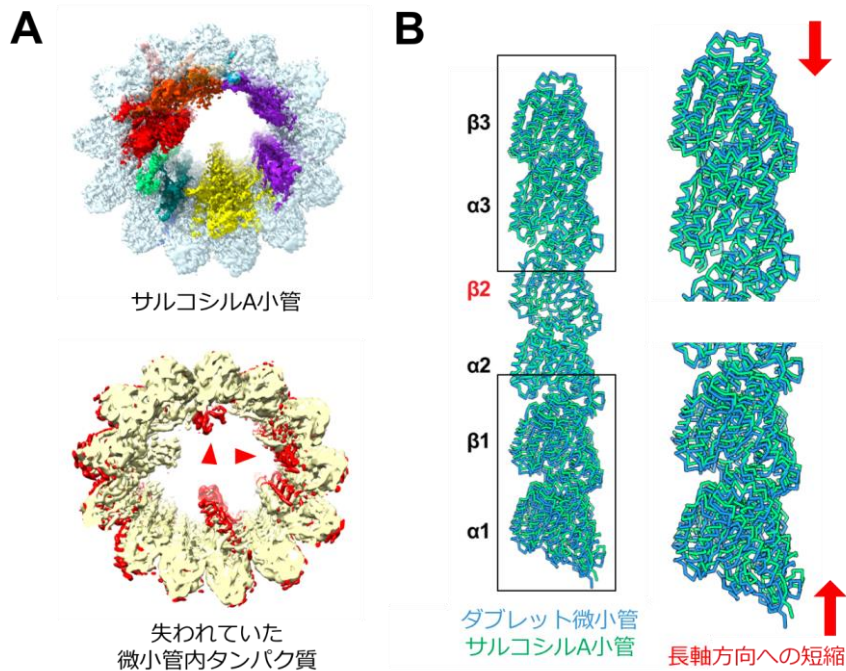


図2. サルコシル処理で得たA小管(A)とチューブリン格子の構造変化(B).

サルコシル処理後の構造では、いくつかの微小管内タンパク質構造が失われており(赤矢頭の領域)、ダブルレット微小管の構造と比較して、チューブリン格子構造が長軸方向に短縮していた(赤矢印).

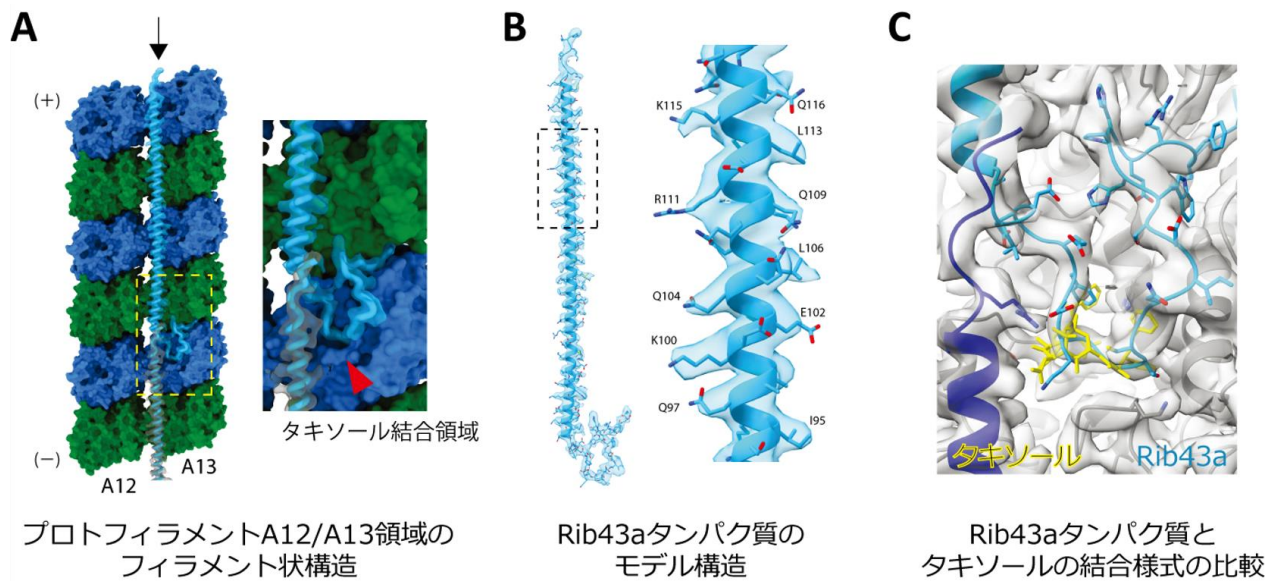


図3. ダブルレット微小管内のフィラメント状構造はRib43aタンパク質に対応する。
チューブリンのプロトフィラメントA12, A13間のフィラメント状構造(A, 矢印)は、Rib43aタンパク質(B)に対応すると考えられる。Rib43aは、チューブリンのタキソール結合領域(A, 赤矢頭)に入り込んでおり、その結合様式はタキソールのそれと類似していた(C)。

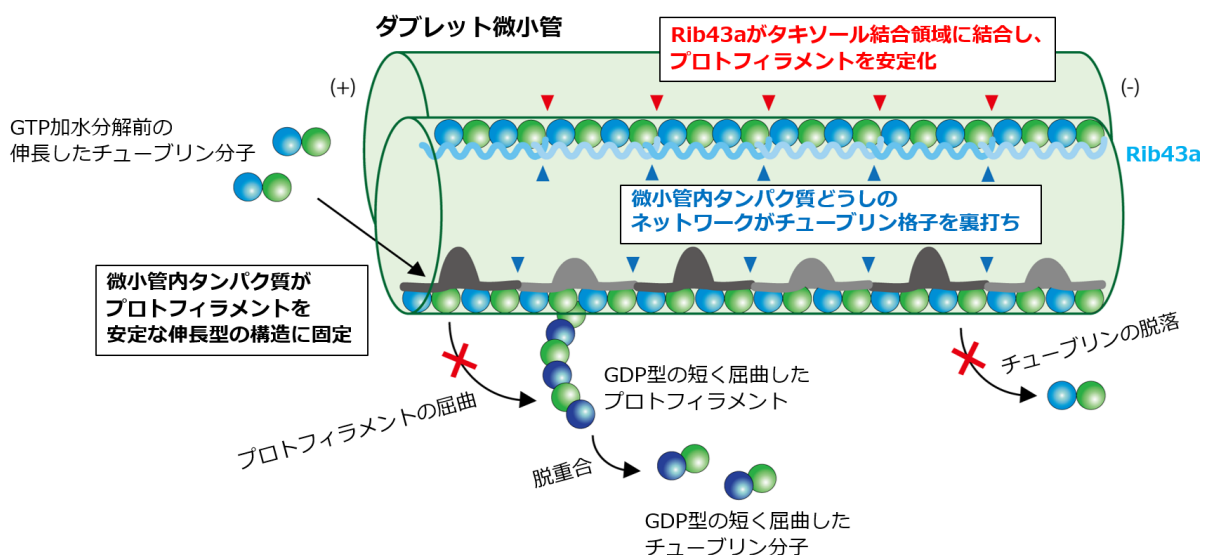


図4. 微小管内タンパク質によるダブルレット微小管の安定化機構のモデル。
微小管内タンパク質のネットワークは、チューブリン格子を内側から裏打ちすることで、チューブリンの脱落やチューブリン格子構造の破損を防ぐ。また、微小管内タンパク質は、プロトフィラメントを安定な伸長型の構造に固定することで、先端でのプロトフィラメントの屈曲・脱重合を抑制する。さらに、Rib43aタンパク質はタキソールと同様の機構でプロトフィラメントを安定化する。

【今後の展開】

本研究によって、繊毛・鞭毛のダブルレット微小管の構造を原子レベルに近い分解能で明らかとすることができ、その内部に複雑に結合した微小管内タンパク質の詳細な構造を明らかにすることができました。さらに、A小管とB小管の間のフィラメント状構造がRib43aに対応することを構造モデリングによって示しました。ダブルレット微小管内には、この他にも多数のタンパク質構造が存在しているので、今後、他のタンパク質についても構造モデリングや、X線結晶構造解析を行うことでダブルレット微小管全体の完全な構造モデルを構築することを目指したいと考えています。ダブルレット微小管が内部に結合するタンパク質によって安定化されているという本研究の結果は、これらのタンパク質の生体内での重要性を意味します。これらの微小管内タンパク質の異常が、ダブルレット微小管の不安定化を招き、繊毛病の病態を引き起こしていると考えられます。ダブルレット微小管内のタンパク質に注目することで新たな繊毛病の原因タンパク質の特定や、診断に繋がる可能性も期待されます。

本研究成果は、日本学術振興会 海外特別研究員制度、日本学術振興会 若手研究者海外挑戦プログラムなどの支援を受けました。

【用語解説】

- *1 繊毛・鞭毛：ヒトを始めとする真核生物の細胞から突出している微細な毛のような構造。波打ち運動をすることで、細胞の運動を駆動したり、細胞外液の流れを作り出す。
- *2 微小管：チューブリンというタンパク質が複数集まって構成された極小のチューブ状の構造。細胞や繊毛に構造的安定性を与える細胞骨格として働く。
- *3 プロトフィラメント：微小管のチューブリン重合体の長軸方向の列。
- *4 クライオ電子顕微鏡法：溶液中の生物試料を液体エタンで急速凍結し、電子顕微鏡によって観察することで、生体内に近い状態での構造を観察することができる手法。さらに、多数の電頭像から切り出した粒子を平均化することで、タンパク質の立体構造を高分解能で得ることが出来る。
- *5 分解能：どの程度離れた2つの点を分離して認識できるかという指標。小さい値であればあるほど、より詳細な構造が認識できることを意味する。
- *6 分子動力学シミュレーション：コンピューターによる計算を用いて、タンパク質が溶液内でどのように挙動するかを調べる手法。

【本研究内容についてコメント出来る方】

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

豊島 陽子

E-mail: cyytoyo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp TEL 03-5454-6752

【本プレスリリースに関するお問い合わせ先】

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域 構造生命科学研究室

市川 宗厳

E-mail: michikawa@bs.naist.jp TEL 0743-72-5594