

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 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

2 研究者氏名: 木下 専

3 研究のねらい:

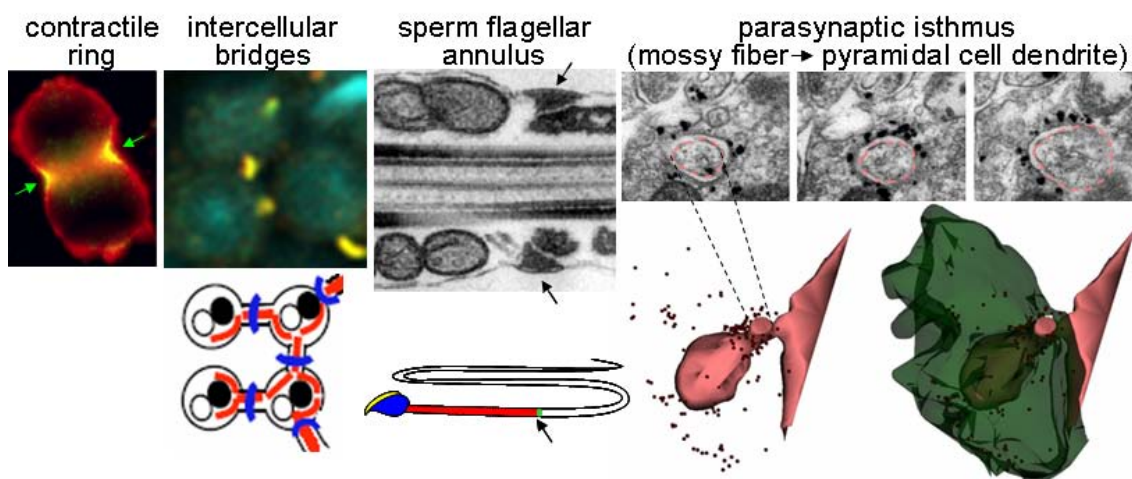
セプチンは、アクチンやチューブリンに次ぐ普遍的なヌクレオチド結合性細胞骨格蛋白質である。しかし、細胞内では多くの場合アクチン系・微小管系・膜骨格系に紛れて存在すること、変異体が致死となるか重複遺伝子によって代償されること、阻害剤がないことなどのために発見と解析が遅れた。また、アクチン・フィラメントが 1 種類、微小管が 2 種類のサブユニットの規則正しい重合体であるのに対し、セプチン・フィラメントは 3 種類以上のサブユニットから成るやや不規則な重合体である。その複雑さの故に、サブユニットの立体構造やフィラメント形成機構も謎に包まれている。本研究では、電子顕微鏡法、RNA 干渉法、遺伝学的手法を駆使してセプチン集合体の生理機能と関連病態を探索するとともに、再構成系を利用して多様かつユニークな高次集合状態を実現している構造基盤の解明を目指す。

4 研究成果:

(1) セプチン系超分子構造体の探索と機能解析

セプチン・フィラメントのサブユニット構成・局在・機能に関しては生物種や細胞系譜による多様性が著しく、未知の部分が多い(3)。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。

### Submembranous septin assemblies discovered *in vivo*



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。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、RNA 干渉法とライブ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(1、スタンフォード大学との共同研究)。

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(金粒子標識+銀増感法)連続切片増から抽出した 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。セプチン集合体の特徴的な環状分布は小脳のシナプス近傍でも見られ、繊細な細胞形態の維持や膜蛋白質の組織化など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・再取り込みに必要な分子群(すなわち合成酵素、シタキシン、トランスポーターなど)の組織化ないし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caffolding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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -シヌクレインと直接会合するため、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。さらに検討を重ねることにより、「Sept4 が前シナプス膜直下からレビー小体へと隔離されて欠乏することがドパミン伝達障害の一因である」という病態モデルを提案した(5)。

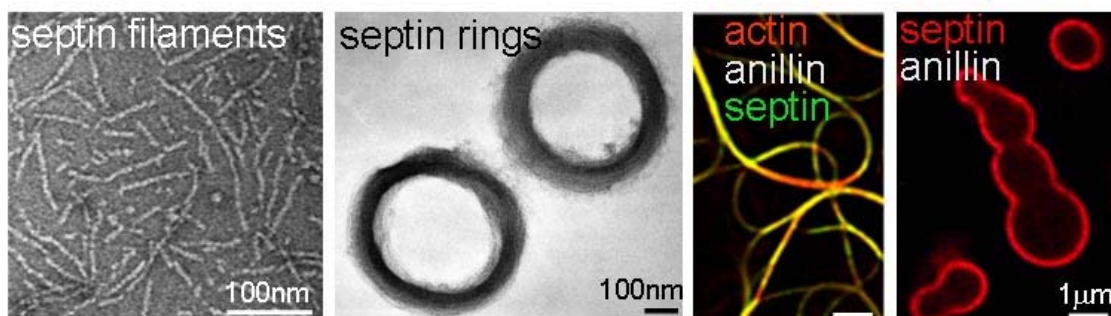
一方、海馬や小脳で見つかったセプチン環状集合体の形状や機能は Sept4 欠損のみでは破綻しなかったため(4)、その生理的意義は依然不明である。一方、このマウスの予想外の雄性不妊が精子鞭毛内のセプチン環状集合体の発見につながり、その破綻が鞭毛構造の脆弱化と鞭毛運動の微弱化をもたらすことがわかった。この知見に基づき、臨床家と共同で男性不妊患者の検体をスクリーニングしたところ、精子無力症(微弱鞭毛運動を主徴とする原因不明の疾患)の 25%においてセプチン環状集合体の破綻を検出した。セプチンは、本疾患初の分子診断マーカーとして、治療方針決定や原因解明に役立つと期待されている(2 および投稿中)。

これらの事例の蓄積により、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ていることが認知されつつある。セプチン系は、アクチン系や微小管系のように細胞全体の形状を global に支持・制御する連続的な細胞骨格系ではなく、細胞内の微細構造ないし超分子複合体を支持・安定化する local な分散型 scaffolding システムであるという考えを提案した(3)。

## (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。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 重膜リポソームの曲率を制御して多数の細管を突出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(J. Biochem 2003 および未発表)。従って、 $\alpha/\beta$ -チューブリンヘテロダイマーの重合・脱重合が $\beta$ -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、セプチン複合体サブユニットの酵素活性が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、酵母のセプチン高次集合体はダイナミックに再編成する一方、GTP/GDP の代謝回転が観測できないという Harvard 大学グループの逆説的な報告とも符合する(J Biol Chem. 279, 3111, 2004; Nature 443, 466, 2006)。

### (3) セプチン系超分子構造体の構造解析を目指して

上記のように、セプチンの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判明した。(当領域第2期生、村上聡研究者の協力に感謝する。)同様に、チューブリンの構造解析に唯一成功した California 大学グループ、GTPase の構造解析を専門とする Max Planck 研究所グループなども酵母、線虫、ヒトのセプチンの構造解析を数年来試行してきたが、いずれも成功していない。このような国際研究状況の中、本研究者は特殊な培養細胞において Sept4 サブユニットが機能未知の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。この事実を利用して、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。上記 California 大学グループや Zürich 工科大学グループとの国際共同研究により、さきがけ研究期間終了後も引き続きこの問題に取り組んでいく。

### 5 自己評価:

高等動物セプチン集合体の微細形態および生理・病理機能の解析においては国際競争に負けな研究ができた。これはひとえにさきがけの支援の賜物と考えている。しかし、機能と構造の二兎を追ったこともあり、構造解析においては重合性蛋白質の構造解析が一筋縄ではいかないことを再認識するにとどまった。残された問題は、共結晶化や目標を共有するグループとの共同研究などによって数年以内に解決したい。

### 6 研究総括の見解:

本研究課題は、多様な高次凝集構造をとるセプチン複合体を、京都大学藤吉研究室で開発中の極低温電子顕微鏡で解析することを当初目標に上げていたが、極めて凝集性の高い複合体のため凍結体での観察は無理と判断し、当領域の X 線結晶構造解析専門家の知恵も借りて共結晶化による構造解析に的を絞っている。その点は道途ばであるが、一方セプチン複合体の微細構造や機能解析においては見るべき成果をあげた点、評価できる。当初目標の構造解析の道は厳しいが、他のさきがけ研究者も 2 年後に目標達成した例もあるので是非チャレンジを続けて欲しい。

### 7 主な論文等:

#### 論文

- (1) Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. **Science** 307, 1781-1785, 2005.

- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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**)
- (5) Ihara M, Yamasaki N, Tomimoto H, Kitano A, Tanigaki A, Hikawa E, Noda M, Takanashi M, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity (revised version submitted to **Neuron**)

(全 16 報)

特許・受賞

該当なし

招待講演 国際 5 件 国内 9 件

- (1) April 13–16, 2004, Kinoshita M. The 5th UK–Japan Cell Cycle Workshop. “The septin cytoskeleton is essential for the structural integrity and motility of mammalian spermatozoa” (Nara, Japan).
- (2) August 15–20, 2004, Kinoshita M. Gordon Research Conference on Macromolecular Organization and Cell Function. “The septin cytoskeleton is essential for structural and mechanical integrity of mammalian spermatozoa” (Oxford, UK).
- (3) May 28–31, 2005, Kinoshita M. “The Lord of the Rings: The Return of the Ring.” The 1st International Septin Workshop. (Aarhus, Denmark).
- (4) March 15–17, 2006, Kinoshita M. “Emerging roles of submembranous septin scaffolds in terminally differentiated mammalian cells” The 9th Membrane Research Forum (Kyoto, Japan)
- (5) June 11–16, 2006, Kinoshita M. “Emerging roles of septin scaffolds in developing and degenerating brain.” Gordon Research Conference on “Molecular and Cellular Neurobiology” (Hong Kong, China)

(全 14 件)