

## 研究テーマ

## ゴルジ体でおこる微小管形成の構造機能解析

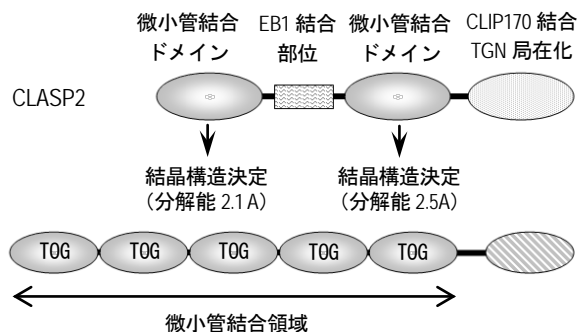
## 1. はじめに

細胞骨格因子のひとつ、微小管は細胞極性形成に重要な役割を果たす。その制御因子にはこれまでモーター蛋白質が知られてきたが、この10年の間に微小管の伸長端に作用してその動的不安定性を制御する微小管伸長端集積蛋白質群(+TIPs)が見つかった(林、生化学, 2008)。なかでもCLASPsは微小管を介して染色体分離・細胞分裂・細胞移動に深く関わっていると考えられている。この制御にはGSK3 $\beta$ をはじめとする様々なリン酸化酵素や+TIPsのひとつであるCLIPs、さらにトランスゴルジ網(TGN)局在分子GCC185などの結合分子が関わっていると考えられている(Akhmanova et al., 2001; Efimov et al., 2007)。CLASPsは全長1300アミノ酸弱で複数の機能ドメインがあるにも関わらず、その分子基盤はCLASP1のN末端微小管結合性TOGドメインを除いてよくわかっていない(図1)。

(目的)CLASP2の微小管認識機構及び安定化機構を立体構造に基づく分子生物学的手法によって明らかにする。またCLASP2結合因子であるGCC185とCLIP170の結合部位を明らかにし、分子認識機構を探索する土台を構築する。将来的にCLASP2とGCC185およびCLIP170の認識機構を細胞内でも検証することにより、CLASPsの微小管を通じての小胞輸送や細胞移動の制御機構について解明したい。

## 2. 方法

CLASP2の機能ドメインの組換え蛋白質発現系の構築、蛋白質調製と結晶化、構造決定と変異体の解析を目指す。また試験管内における微小管認識についてゲル濾過法および光散乱実験によって解明する。さらにCLASP2の結合相手であるCLIP170やGCC185の結合領域をY2H法により決定する。



(図1) CLASP2とXMAP215のドメイン構造

## 3. 結果

(試料調製)CLASP2には3つのドメインが存在する。各ドメインの大腸菌を用いた蛋白質調製を完了するとともに、微小管結合領域および全長のCLASP2の昆虫細胞を用いた蛋白質発現系を構築した。

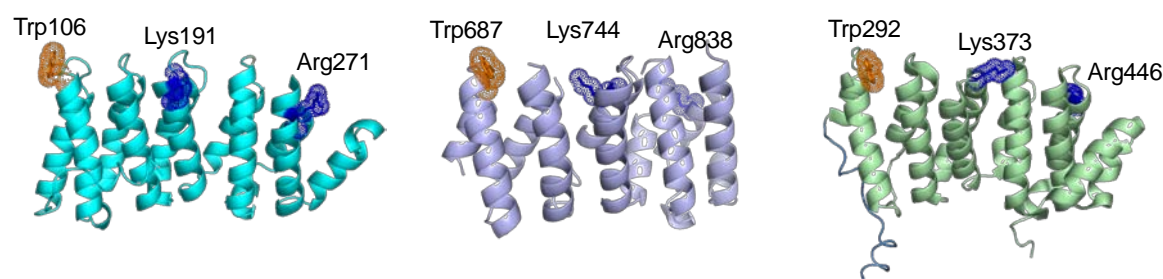
(結晶構造解析)CLASP2には2つの微小管結合ドメインが存在する。セレンメチオニン導入による多波長異常分散法によってこれら2つのドメインの結晶構造を決定した(図2(a,b))。この2つのドメインは共にヘリックス-ヘリックスが繰り返されるヒートリピード構造をもつ。類似構造検索によってこれらは微小管結合蛋白質に見られるTOGドメインと同じグループに分類されることがわかった。TOGドメインを含む蛋白質には細胞分裂期にキネトコアにて微小管の染色体捕獲に関わるXMAP215がよく知られる。XMAP215のTOGドメインで微小管認識に必須である疎水性残基および塩基性残基がCLASP2の微小管ドメインにおいても保存

される(図2(c))。また保存残基に変異を導入することによって、CLASP2のTOGドメインの微小管結合能が失われることから、CLASP2の微小管結合ドメインは真正のTOGドメインであることが明らかとなった。現在微小管に結合する全領域とその変異体を作成して、試験管内における微小管安定化能の解析を行っている。(結合相手との相互作用)CLASP2のC末端領域は蛋白質間相互作用の役割を担う。この結合相手にはTGNに局在するGCC185やCLIPsなどコイルドコイル構造をとる蛋白質群が知られている。本課題ではY2H法によってGCC185のCLASP2結合領域の最小領域(~55アミノ酸)を決定した。このコイルドコイル領域の構造解析を行うとともに、CLASP2との相互作用解析を開始している。

(図2) CLASP2とXMAP215のTOGドメインの立体構造

立体構造上保存された残基をラベルした。

(a) CLASP2N末端側微小管結合ドメイン (b) CLASP2C末端側微小管結合ドメイン (c) XMAP215のTOGドメイン



#### 4. 考察

構造機能解析の結果からCLASP2はTOG様ドメインを複数個もち、配列上TOGドメインを5つ直列にもつXMAP215と同じファミリーに属することが推測される。しかしCLASPsはXMAP215にはみられないGSK3 $\beta$ によるリン酸化制御を受ける(Kumar et al., 2009)。またXMAP215は微小管伸張端にて微小管ポリマーゼとしてはたらくのに対し、CLASPsはレスキュー因子(微小管を脱重合から重合へ転移させる蛋白質)として作用することがわかっている(Brouhard et al., 2008)。この2つの蛋白質は似通ったドメイン構造をもつにも関わらず微小管に対するはたらきが異なることから、より高次の解析をする必要があると考えられる。今後、CLASP2全長のチューブリンとの電子顕微鏡解析を行うとともに、細胞にCLASPの様々な変異体を導入することで細胞内でのそれぞれのドメインの役割をより詳細に解析することを目指す。

#### 5. 参考文献

Akhmanova et al. (2001) Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* **104**, 923-35.

Brouhard et al. (2008) XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**, 79-88.

Efimov et al. (2007) Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* **12**, 917-30.

Kumar et al. (2009) GSK3 $\beta$  phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *J. Cell Biol* **184**, 895-908.

Slep & Vale (2007) Structural Basis of Microtubule Plus End Tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1

林 郁子 (2008) 微小管伸長端結合タンパク質の分子制御機構. *生化学*, **6**, 521-530.