

微小管細胞骨格の剛性と弾性を司る新規微小管束化因子の同定および構造と機能の解析

東京大学大学院 医学系研究科 生体構造学研究室
八木 俊樹

1. 序論

さまざまな生物の中には、機能が知られていないながらも興味深い構造が存在する例がある。それらの構造は、生物一般に存在する構造が誇張されて現れたものである可能性があり、分子レベルで研究する価値があると考えられる。モリアオガエルの精子鞭毛は、正方格子状に並んだ300本以上の微小管が2本の軸糸構造(「9+2」構造)を取り囲む特徴的な構造をもつ(文献1)。このような規則的な微小管構造は非常に珍しいが、興味深いことに、哺乳類内耳の有毛細胞の支持細胞(Pillar Cell)にも、この構造に似た格子状の微小管束が観察されている(文献2)。これらの構造がもつ機能はまだ明らかにされていないが、細胞に剛性と弾性を与え、それぞれの細胞のもつ特有の機能を支える基盤になっている可能性がある。本研究では、この微小管束の未知の機能についてヒントが得られることを期待して、カエル精子鞭毛の架橋因子の同定と、精製した束化因子により形成された微小管束の構造解析を行った。この架橋因子は10回以上の繰り返し配列を共通にもつ7種類の蛋白質の複合体により形成されていることがわかった。このような特異な配列をもつ微小管架橋因子が見つかったのはこれが初めてである。in vitro で形成させた微小管束構造を電子顕微鏡観察したところ、微小管は正方格子ではなく六方格子状に束化されていることが分かった。In vivo では、未知の仕組みにより六方格子ではなく正方格子状に束化されていることが示唆された。

2. 方法

材料

モリアオガエル精子は HMDEK (30 mM Hepes (pH7.4), 5mM MgSO₄, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 50 mM K-acetate) 中に懸濁し、超音波処理 (Power: 10, Time: 2 seconds; Astrason) により頭部と鞭毛断片に分離した。この懸濁液を 5-50%ショ糖密度勾配遠心することにより、頭部と鞭毛断片それぞれを粗精製した。チューブリンは、ブタ脳から精製したものを使用し、微小管はタキソールを用いて安定化させた。

微小管束化因子の抽出と精製

精子鞭毛を TritonX-100 (終濃度 0.1%) を用いて脱膜したのち、高塩濃度条件下で蛋白質を抽出した。塩抽出は二段階で行い、0.5 M NaCl で抽出した抽出残渣をさらに 1.0 M NaCl で抽出し、それぞれの抽出物の微小管束化活性を調べた。高塩濃度抽出物をゲルろ過カラム (Superdex200, GE healthcare) にかき、微小管束化活性のある蛋白質を精製した。微小管の束化の様子は、サンプルを暗視野顕微鏡下で直接観察して確かめた。微小管と結合する蛋白質の同定は、微小管と共沈させたサンプルを SDS-PAGE 解析することにより行った。

束化因子のDNA 部分配列の決定

束化因子候補をゲルから切り出し、Lysyl Endopeptidase で処理後、抽出ペプチドの質量分析 (Voyager, Applied Biosystems) を行った。各ペプチド断片のアミノ酸配列は De Novo 解析により推定した。予測されたペプチド配列 “KDQRSPGKGDGGRK” に対して、degenerate primer を設計し、このプライマーを使ってカエル精巣 cDNA に対して PCR を行った。得られた PCR 産物の配列を決定した。

電子顕微鏡観察

モリアオガエル精子および精製束化因子を用いて作成した微小管の束、それぞれの超薄切片を作成して電子顕微鏡観察（1200H, JEOL）した。また、微小管に結合する微小管束化因子の構造をクライオ電子顕微鏡観察（2010F, JEOL）した。

3. 結果

モリアオガエル精子鞭毛からの微小管束化因子の抽出

精子鞭毛から微小管束化因子を抽出する条件を検討した。一般に、微小管結合蛋白質は塩濃度を上げると微小管から外れる。そこでまず、脱膜した精子そのものを高塩濃度で処理し、束化因子の抽出条件を検討したところ、束化因子は、0.5M NaCl の条件では精子鞭毛からほとんど抽出されないが、1.0 M の条件ではよく抽出されることがわかった。精子そのものから蛋白質を抽出すると頭部の蛋白質も一緒に抽出される。そこで次に、精子サンプルから頭部を取り除く方法を検討した。精子に超音波をかけると、頭部と鞭毛が分離し、鞭毛はさらにアルファベットの C の形の形に断片化された。これを 5-50% のショ糖密度勾配遠心にかけて、頭部は沈殿に鞭毛断片は上澄みに回収された。この鞭毛断片を脱膜後 0.5M NaCl で抽出し、その残渣をさらに 1.0 M NaCl で抽出したところ、1.0 M 抽出サンプルには高い微小管束化活性があった。このサンプルに含まれる蛋白質を SDS-PAGE により調べたところ、250 kDa 以上の蛋白質と 35 - 45 kDa の複数の蛋白質が混在していることが分かった。

束化因子の精製

この粗抽出サンプルをゲルろ過カラムにより精製した。各溶出分画の微小管束化活性を調べたところ、見かけの分子量が約 150 kDa の分画に高い活性が見られた。SDS-PAGE によりこの分画を調べたところ、そこには 35 - 45 kDa の 7 つの蛋白質が含まれていた。微小管との共沈実験からは、これらの蛋白質はすべて微小管と一緒に共沈することがわかった。これらの結果から、7 つの蛋白質が 150 kDa 程度の大きさの複合体を形成して微小管を束化していることが示唆された。

束化因子の部分配列の決定

質量分析器を用いて、この微小管束化因子の部分アミノ酸配列を決定した。MS 解析から、この 7 つの蛋白質はほとんど同じ組成のペプチドから構成されていることがわかった。この結果は、それぞれの蛋白質がほとんど同じアミノ酸配列をもつ可能性を示唆している。各ペプチドの配列を De Novo 解析から予測し、そのうち“KDQRSPGKGGHDGGRK” という配列に対して Degenerate primer を設計して PCR を行った。その結果、元の配列に相当する 45 bp の産物以外に、電気泳動上で等間隔に並ぶ 10 本以上のバンド（最大 1000 bp 程度）が増幅され、それらのバンドはいずれも “AAGGCACAGGGGACGCCAGGTGGC” という配列を繰り返しもつことが分かった。これらの結果から、7 つの蛋白質はいずれもこの繰り返し配列をもち、繰り返し回数の違いがそれぞれの分子量の違いに反映されていると考えられた。

微小管束の電子顕微鏡観察

精製した束化因子による微小管束構造を電子顕微鏡観察した。in vitro で再構成した微小管束と in vivo のカエル精子鞭毛の微小管束、それぞれの横断面を比較したところ、再構成した微小管束は正方格子ではなく六方格子の構造をもつことが分かった。一方、in vitro の微小管束において微小管間を架橋する構造をクライオ電子顕微鏡観察したところ、その構造と形はカエル精子鞭毛でみられた場合とほとんど同じであることも分かった。

4. 考察

本研究では、モリアオガエル精子鞭毛において微小管正方格子を形成する束化因子を同定した。この蛋白質は分子量 35 - 45kDa の少なくとも 7 種類の蛋白質からなる複合体であり、それらはともに “KAQRPPGG” という配列の繰り返しをもつことが示唆された。このような繰り返し配列をもつ微小管架橋因子が見つかったのはこれが初めてである。マイナスに荷電する微小管に結合する蛋白質はプラスに荷電していることが多いが、この束化因子がプラスに荷電していることは予測配列からも示唆された。予想された 8 アミノ酸の繰り返し配列中にはリジンやア

ルギニンといったプラス荷電のアミノ酸が3つもあることから、この蛋白質が強くプラスに荷電し、そのために微小管に強く結合することが考えられた。実際、”KAQRRPGG”の配列を3回繰り返す合成ペプチドも微小管を束化することから(未発表実験)、この繰り返し配列が微小管の束化において重要な働きをしていることが考えられる。

in vitro で形成させた微小管の束を電子顕微鏡で観察したところ、その束は精子鞭毛に見られるような正方格子構造ではなく、最密充填の六方格子構造になっていることがわかった。一方、微小管に結合する架橋因子の構造をクライオ電子顕微鏡で観察してみると、*in vitro* の微小管束でもカエル精子鞭毛でみられた場合と同様な形と大きさをもつ構造が微小管間に観察された。このことは、*in vitro* でも基本的には同じ架橋構造が形成されていることを示している。*In vitro* で正方格子構造ができなかった原因は、精製の過程で正方格子を形作る必須の因子を失ってしまった可能性が考えられるが、別の可能性としては、本来、微小管の正方格子を作るためには2種類の複合体が必要であり、抽出・精製の過程でこの2種類が混ざったために正方格子ができなかったという可能性も考えられる。この考えは、モリアオガエル精子の形成過程を解析した結果からも支持される。武藤らは、モリアオガエル精巣における精子の形成過程を組織学的に研究し、形成初期に軸糸の周りにバラバラに存在した微小管はいったんシート状に架橋され、続いてそのシート間、つまりもとの架橋からみて90度の方向に別の架橋構造が形成されて正方格子構造が完成することを観察した(文献3)。この観察結果は、正方格子を形成する架橋構造が90度方向でそれぞれ異なる蛋白質複合体から形成されている可能性を示唆する。今回同定した7種類の微小管結合因子は、発生過程の発現のタイミングで組み合わせが異なる2種類の複合体を形成し、それぞれはシートの形成と正方格子の形成という別々の機能を持つのかもかもしれない。出来上がった正方格子からまとめて抽出した束化因子を微小管と混ぜると、架橋の方向が乱れ、*in vivo* のような正方格子ができない可能性がある。正方格子ができるメカニズムを明らかにするためには、今後、形成途中の精子におけるサテライト微小管についても調べていく必要があるだろう。

本研究で明らかになった繰り返し配列をもつ蛋白質のホモログは他の生物でも機能している可能性が考えられる。この可能性を探るために、NCBIのデータベースにおいてこの配列に対するホモロジーサーチを行った。その結果、イソギンチャクやナメクジウオで同様の繰り返し配列をもつ仮想的な蛋白質(ORF)が見つかった。一方、ヒトやマウスなどの哺乳類では明確な繰り返しはないものの、繰り返しに近い配列をもち、かつ、プラス荷電アミノ酸を多く含むORFが見つかった。今後は、これらが実際に発現して機能しているかどうかについても調べていきたい。特に、哺乳類内耳の支持細胞で働く微小管束とどのような関係があるのかを調べたい。

5. 発表論文、参考文献

発表論文：

なし

参考文献：

1. Muto K., and Kubota H.Y. A Novel Mechanism of Sperm Motility in a Viscous Environment: Corkscrew-Shaped Spermatozoa Cruise by Spinning. *Cell Motil. Cytoskele.* 66: 281-291. (2009).
2. Tolomeo J.A., and Holley M.C. Mechanics of Microtubule Bundle in Pillar Cells from the Inner Ear. *Biophysical J.* 73:2241-2247. (1997).
3. Muto K., and Kubota H.Y. Ultrastructural Analysis of Spermiogenesis in *Rhacophorus arboreus* (Amphibia, Anura, Rhacophoridae) *J. Morphology* 272: 1422-1434. (2011).