

微小管のアセチル化を制御する蛋白質群の探索と その機能解析

[1] 組織

代表者：水野 健作
(東北大学・大学院生命科学研究科)
対応者：安井 明
(東北大学・加齢医学研究所)
分担者：大橋 一正
(東北大学・大学院生命科学研究科)
千葉 秀平
(東北大学・大学院生命科学研究科)
菅野 新一郎
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 25 万円

[2] 研究経過

微小管は α 、 β チューブリンのヘテロ二量体がタンデムに配向されたプロトフィラメントを基本構造としており、その動態は細胞内物質輸送や細胞分裂期の紡錘体形成をはじめ、細胞の形態形成や維持、増殖・分化などの多くの過程で柔軟かつ多様な制御を受けている。微小管の構造的・機能的な多様性は様々な微小管結合蛋白質(MAPs)や翻訳後修飾によって保証される。アセチル化は元来、安定化した微小管構造の指標と見なされてきたが、近年になって微小管のアセチル化はMAPsや各種モータータンパク質の結合特異性や活性を変化させ、細胞内極性形成や細胞内物質輸送を制御することが明らかになった。これまでに、チューブリンのアセチル化を担うアセチル基転移酵素や脱アセチル化酵素が複数種同定されているが、これらの因子を制御する分子メカニズムの詳細は明らかになっていない。

酵母からヒトまで高度に保存されたタンパク質である Funy(Fry)は、AGC キナーゼファミリーに属する Ser/Thr キナーゼである NDR の活性化蛋白質であり、ショウジョウバエの遺伝学的解析から、両者は協調して上皮細胞の形態形成や神経受容領域の確立に機能していることが知られている。我々は以前に、哺乳類細胞体細胞分裂期における Fry の機能解析を行い、Fry 発現抑制細胞では紡錘体形成および体細胞分裂中期の染色体の赤道面への整列に欠陥が生じることを明らかにした。加えて、Fry が体細胞分裂初期から紡錘体上のアセチル化微小管と強い局在の

一致を呈する新規MAPsであることを明らかにしている。さらに、最近になって Fry は一次繊毛の軸糸を構成するアセチル化微小管上にも強く局在することを見出し、Fry が微小管のアセチル化の制御に関わる可能性が示唆されていた。しかし、Fry による微小管のアセチル化制御機構および微小管動態制御の実態については不明であった。

そこで、本研究では、Fry を介した新たなチューブリンアセチル化制御機構およびその微小管動態制御機構の解明を目的に研究を実施した。プロジェクト開始後1年目(昨年度)は、プロテオーム解析技術を基盤とした Fry の結合蛋白質の網羅的解析のための実験系を構築し、また、Fry の一次構造に基づいた *in silico* 解析による結合蛋白質の推定に着手し、複数の Fry 結合蛋白質の存在を明らかにした。プロジェクト2年目にあたる本年度は、実際に Nano/LC/MS 質量分析器を用いた解析により、複数の Fry 結合蛋白質を同定した。さらに、Fry と新規結合蛋白質群の相互作用解析を行うとともに、結合因子の一つとして同定した既知のチューブリン脱アセチル化酵素の酵素活性に対する Fry の結合の影響について解析を行った。

本共同研究プロジェクトの遂行にあたり、平成22年4月から、加齢医学研究所の対応者である安井教授、菅野講師と綿密な研究打ち合わせを行っている。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は以下に示す研究成果を得た。

a) Fry 結合蛋白質の同定：

ヒト Fry を認識する抗体を用いたアフィニティー精製により、ヒト培養細胞株の細胞溶解液中から複数の Fry 結合タンパク質の存在を明らかにした(図1)。さらに、タグ付き Fry のN末端またはC末端欠変異体の発現細胞株を樹立し、プロテオーム解析に基づいた Fry の結合蛋白質の探索にも着手し、多数の結合タン

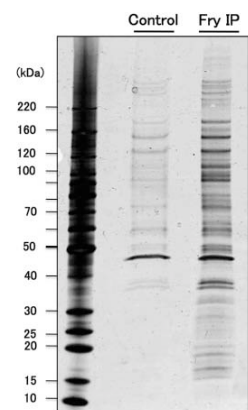


図1. Fry抗体を用いたアフィニティー精製によるFry結合蛋白質の解析

パク質の存在を確認している。これまでに同定された新規 Fry 結合タンパク質の中には、微小管動態や、微小管を主要構成因子とする繊毛や紡錘体の形成への関与が示唆されるタンパク質が含まれており、現在これらの因子に *in vitro* および細胞内での結合を確認すると共に微小管の機能に与える影響を検討中である。

b) Fry と微小管脱アセチル化酵素の相互作用解析：

Fry の一次構造に基づいた *in silico* 解析により推定された既知の微小管脱アセチル化制御酵素との結合を *in vitro* および細胞内で確認した。さらに、結合部位の探索をおこなったところ、Fry は N 末端部分の特徴的なロイシンジッパー構造を介して、また、脱アセチル化酵素は触媒ドメインを介して相互作用していることが明らかになった。そこで、Fry の結合が脱アセチル化酵素の酵素活性に与える影響を検証する目的で、アセチル化チューブリンを基質とした *in vitro* チューブリン脱アセチル化実験を行った。この結果、脱アセチル化酵素存在下におけるチューブリンのアセチル化レベルの減少は、Fry 共存下において顕著に抑制されることが明らかになった。以上の結果から、Fry は微小管脱アセチル化酵素と結合し、その活性を抑制することで、微小管アセチル化の制御に関与している可能性が示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

私たちは、Fry がアセチル化した微小管上に局在し、アセチル化制御因子の活性制御を介して微小管のアセチル化を促進することで、紡錘体構築や物質輸送などにおける微小管動態を制御する可能性を示唆する結果を得た。これまでに微小管のアセチル化制御メカニズムの詳細は不明であり、本研究の成果は学術的に重要な知見を提供するものと期待される。微小管のアセチル化は分裂期紡錘体に限らず神経突起の形成、繊毛や鞭毛の構築、多様な細胞内小胞輸送と密接に結びついている事が明らかになっており、Fry 結合タンパク質の同定と Fry によるアセチル化を介した微小管制御機構の解明は様々な生命現象の理解に貢献する事が期待される。また微小管機能の欠陥は多様な疾患の原因となりうることから、本研究の成果が医学・薬学の分野に大きく貢献する事が期待される。哺乳類細胞の Fry の機能は未だ不明な点が多く残っており、細胞内シグナルネットワークにおける位置づけも不明である。本研究で明らかになった Fry 結合タンパク質解析と微小管動態制御の一端が明らかになることにより、今後さらに本研究が幅広く発展していく事が期待される。

[4] 成果資料

本共同研究による成果は、今後、原著論文として発表する予定である。なお、本共同研究の基礎研究成果として今年度中に発表した論文は以下の通りである。

- (1) Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villen, J., Haas, W., Kovacs, J. J., Shukla, A. K., Hara, M., Hernandez, M., Lachmann, A., Zhao, S., Lin, Y., Cheng, Y., Mizuno, K., Ma'ayan, A., Gygi, S. P., and Lefkowitz, R. J. Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 15299-15304 (2010).
- (2) Garg, P., Verma, R., Cook, L., Soofi, A., Venkatarreddy, M., George, B., Mizuno, K., Gurniak, C., Witke, W., and Holzman, L. B. Actin depolymerizing factor cofilin-1 is necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J. Biol. Chem.*, 285, 22676-22688 (2010).
- (3) Tsuji, T., Ohta, Y., Kanno, Y., Hirose, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. Involvement of p114-RhoGEF and Lfc in Wnt-3a- and Dishevelled-induced RhoA activation and neurite retraction in N1E-115 mouse neuroblastoma cells. *Mol. Biol. Cell*, 21, 3590-3600 (2010).
- (4) Itoh, G., Kanno, S., Uchida, K. S. K., Chiba, S., Sugino, S., Watanabe, K., Mizuno, K., Yasui, A., Hirota, T., and Tanaka, K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J.*, 30, 130-144 (2011).