

細胞内には微小管と呼ばれる管状の纖維が張り巡らされ、その微小管に沿ってさまざまな物質が輸送されることで生体の機能は保たれている。

「細胞内の物質輸送の仕組みを解き明かそうと、多くの研究者は物質の運び手であるキネシンやダイニンに注目して研究を進めてきました。しかし私はある観察をきっかけに、道路である微小管は柔らかく、構造がダイナミックに変化しており、それが運び手を助けているのではないか、と考えるようになりました」

理研脳科学総合研究センター（BSI）分子動態解析技術開発チームの武藤悦子チームリーダー（TL）はそう語る。武藤TLたちは10年以上の試行錯誤の末、世界に先駆けて、ヒトの微小管の材料であるチューブリンの発現系の開発に成功。その新しい技術を駆使して“柔らかい微小管”的実体に迫ろうとしている。

世界初の発現系で “柔らかい微小管”の実体に迫る

■ 微小管の奇妙な振る舞い

神経細胞は細胞体から軸索という長い突起を伸ばし、情報を伝える相手の細胞との間に配線することによって、神

経細胞のネットワークを構築する。ヒトの神経細胞には1mに及ぶ長い軸索もある。神経細胞の複雑なネットワークの構築には、細胞体でつくられたタンパク質

が軸索の先端へ運ばれ、逆に軸索の先端から細胞体へも物質が運ばれる必要がある。その軸索輸送における道路の役割をしているのが微小管である。微小管に沿って、細胞体から軸索の先端へはキネシン、逆方向へはダイニンというモータータンパク質が物質を輸送している（図1）。

1992～97年、“ERATO 柳田生体運動子プロジェクト”的メンバーだった武藤TLは、微小管の奇妙な振る舞いに気が付いた。武藤TLは、エネルギー物質であるATPの存在下で、キネシンをまぶした蛍光性のビーズ（キネシンビーズ）が1本の微小管と相互作用する様子を顕微鏡で観察した（図2）。すると、キネシンビーズが1個も付いていない微小管にはキネシンビーズはなかなか結合しないが、1個結合すると、その近くの領域で新たな結合が起きやすくなった。結合が立て続けに起きる結果、一時的に微小管上にキネシンビーズが数珠つなぎに並んで移動する“集団登校”的な様相を呈した。しかし、最後のキネシンビーズが離れて1個も結合していない状態になると、再び微小管にキネシンビーズは結合しにくくなり、次の結合が起きるまで長い時間がかかった。

「この観察結果は、私たちが歩く固い道路とは違って微小管は柔らかく、キネ

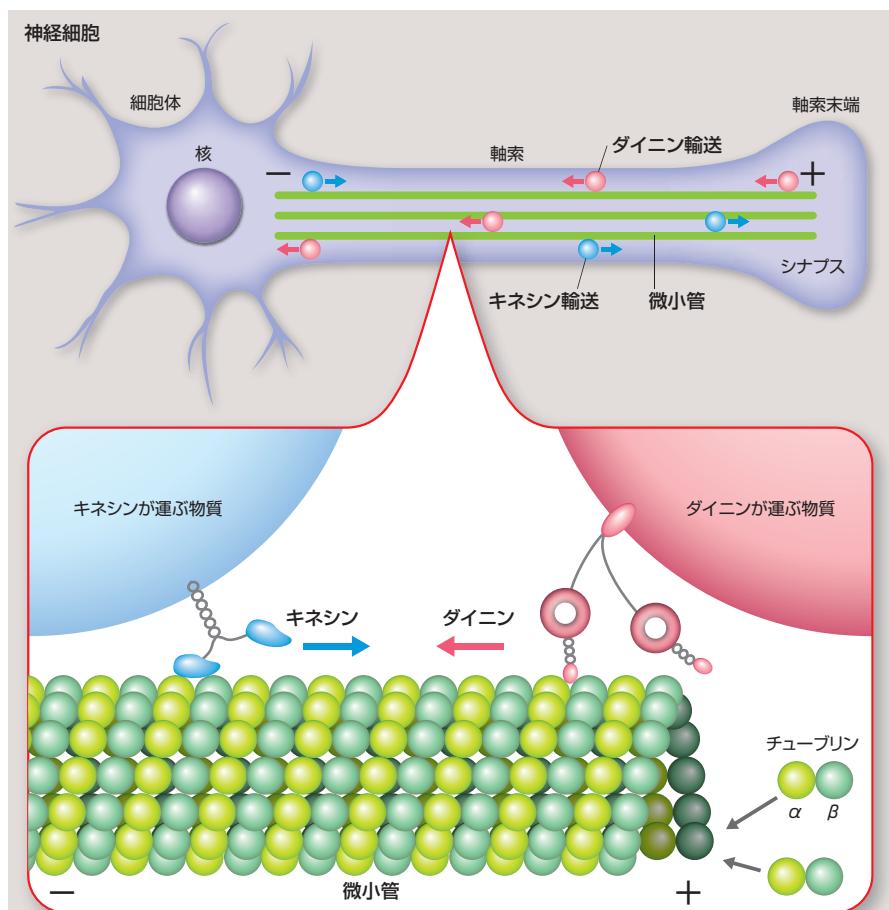


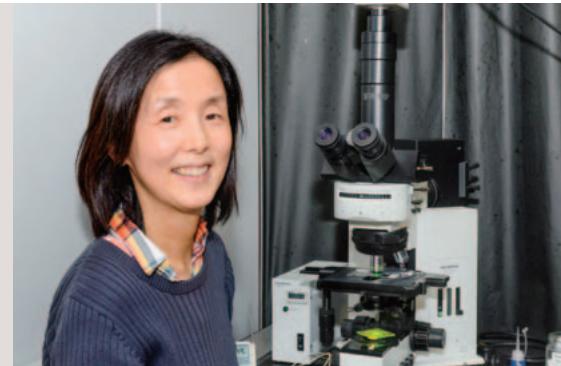
図1 神経細胞における軸索輸送

神経細胞の細胞体からシナプスを結ぶ軸索には、複数の微小管が並んでおり、これらの微小管に沿って、キネシンは細胞体からシナプスへ、ダイニンは逆方向へ物質を運ぶ。

武藤悦子（むとう・えつこ）

脳科学総合研究センター
分子動態解析技術開発チーム
チーフリーダー

1956年、東京都生まれ。理学博士。名古屋大学大学院理学研究科博士課程修了。愛知県立芸術大学 講師、ERATO研究員などを経て、2000年、理研脳科学総合研究センター（BSI）上級研究員。2004年、BSIユニットリーダー。2008年より現職。



シンの動きに伴って構造がダイナミックに変化している可能性を示しています。少なくとも、キネシンの結合しやすさという点で微小管は常に同じ状態ではないのです」と武藤TLは指摘する。

■ チューブリン発現系の開発に成功

柔らかい微小管に興味をかき立てられた武藤TLは、BSIの研究員となった2000年から、本格的にその研究に着手した。

微小管は、 α チューブリンと β チューブリンという2種類のタンパク質が重合したペアが基本単位となり、太さ25nm（1nm = 10億分の1m）ほどの筒状の纖維をつくっている（図1）。

α チューブリンと β チューブリンにはそれぞれ複数の遺伝子がある。武藤TLがBSIで研究をスタートした当時、試験管内で单一遺伝子から特定の種類のチューブリンを発現させて微小管を合成する技術が世の中にまだなく、実験では主にウシやブタの脳から生化学的に精製した微小管が使われていた。

「食肉処理場でウシやブタの脳を分けてもらい、2日間かけて脳から微小管を抽出します。しかし脳のチューブリンには複数の種類があることに加え、それらが、さまざまな化合物が付く“翻訳後修飾”を受けるため、全部合わせると20種類以上のチューブリンが入り混じった微小管で実験をすることになります。 α と β がそれぞれ單一種類のチューブリンでできた微小管を使って実験ができるようにならないと、“柔らかい微小管”的実体に分子レベルで迫ることができません」

合成経路が複雑なため、試験管内でチューブリンをつくる発現系は実現不可能ともいわれていた。「私たちは参考文献もほとんどない中で、手探りで発現系の開発を始めました」

香月美穂 研究員（現 福岡大学）、内村誠一 研究員（現（株）ダイセル）たちを中心に試行錯誤を重ね、チーム発足から6年後の2006年、出芽酵母を利用して、出芽酵母の単一遺伝子からチューブリンをつくる発現系の開発についに成功した。

■ 発現系で重要なアミノ酸を特定

微小管にキネシンビーズが1個結合すると、その近くで結合が起きやすくなつたのはなぜか。その謎に迫るため、武藤TLたちはキネシンやダイニンの結合や運動に必要なチューブリン上のアミノ酸群を特定する実験を始めた。

開発した発現系を用いて、特定の場所に変異を入れた遺伝子を発現させることで、チューブリン分子の特定のアミ

ノ酸を別のアミノ酸に置き換えた変異チューブリンをつくることができる。武藤TLたちは、変異チューブリンから合成した微小管ではキネシンやダイニンとの相互作用がどう変化するかを調べ、相互作用に重要なチューブリン上のアミノ酸を次々と明らかにしていった。

「その一連の研究から、驚くべきことが明らかになりました。その一つは、チューブリンのまったく同じ場所が、キネシンの運動とダイニンの運動の両方に必要だったことです」

それは、 α チューブリンの“H11'-H12ループ”という4個のアミノ酸から成る場所だ（図3）。「そのうちの1個であるグルタミン酸を別の種類のアミノ酸に置き換えると、キネシンとダイニンの両方とも、運動のエネルギー源であるATPを加水分解することも、微小管上を動くこともできなくなってしまったのです。チューブリンは α と β を合わせて900個以上のアミノ酸から構成されていますが、そのうちのたった4個でできたル

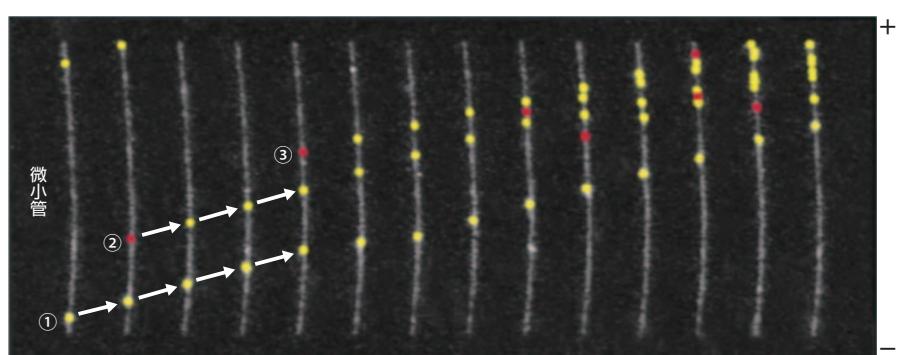


図2 キネシンビーズと微小管の相互作用

出典：*J. Cell Biol.*, 168, 691-696 (2005).

ATPを加えた状態で、キネシンビーズが1本の微小管と相互作用する様子を1秒間隔で連続撮影し、時間順に並べたもの。微小管に初めて結合したキネシンビーズの位置を赤色、その後、微小管を移動する時々刻々の位置を黄色で示している。①のキネシンビーズの近くの領域に②が結合し、続いて②の近くに③が結合し、同様のことが繰り返し起きた結果、最後のフレームでは微小管の+端附近に複数のキネシンビーズが数珠つなぎに並んだ。

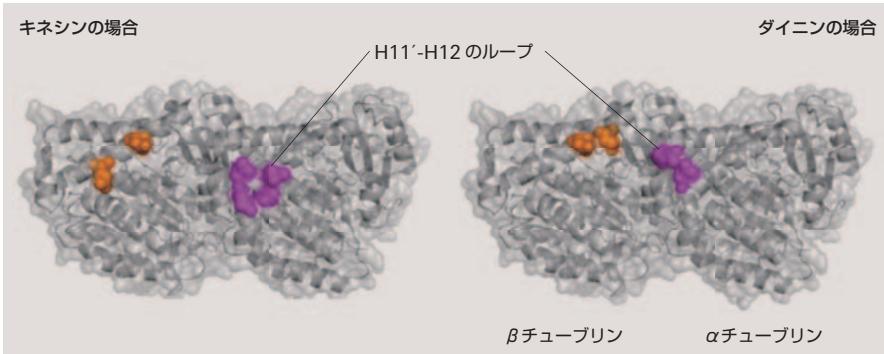


図3 ダイニン・キネシンの運動に必要なアミノ酸

酵母チューブリンの変異解析により、ダイニンとキネシン、それぞれのモータータンパク質が運動するのに必要な微小管上のアミノ酸群が明らかになった。どちらのモータータンパク質も、ATPを分解して微小管上を動くには、 α チューブリンのH11'-H12のループ（マゼンタ）にあるアミノ酸との結合を必要としていた。オレンジ色で示された β チューブリンのH12のアミノ酸群は、運動を安定化する補助的な役割を担う。

が、キネシンの運動とダイニンの運動の両方に決定的な役割を果たしているのです」

生物進化の過程で、キネシンとダイニンは、それぞれGタンパク質とAAAファミリーATPaseというタイプの異なるタンパク質群から生まれたため、構造もATPを加水分解する仕組みも異なり、共通点がほとんどない。「それにもかかわらずどちらも、 α チューブリン上のH11'-H12ループとの結合を必要としていることは、微小管には単なる道路以上の機能があることを示唆しています。私は、H11'-H12ループは微小管が構造変化を引き起こすスイッチかもしれないと想像しています。キネシンやダイニンがH11'-H12ループに結合すると、このスイッチがオンになって微小管側の構造変化を引き起こし、ほかのキネシンやダイニンが結合しやすい状態になるのかもしれません」

■ チューブリン変異が神経疾患の原因に

意外な展開もあった。チューブリンヒトの神経疾患との関連性だ（図4）。「私たちはキネシンの運動に必要なチューブリンのアミノ酸群についての研究成果を、2006年と2010年に論文発表しました。2報目の発表と同じく、ハーバード大学の研究グループが、3型先天性外眼筋繊維症（CFEOM3）という神経発達障害は β 3チューブリン遺伝子の変異が原因である、という論文を発表しました。神経疾患の研究は、私たちの研究

とは縁遠い分野だと思っていましたが、CFEOM3の発症に関与するアミノ酸群は、私たちが示したキネシンと微小管の相互作用に必要なチューブリンのアミノ酸群とほぼ一致していました」

ダイニンの場合も同様に、武藤TLたちがダイニンの運動に必須であると同定したチューブリンのアミノ酸に変異が起ると、滑脳症など重篤な脳の発達障害が起きることを、神経疾患の研究者が報告している。「ますますもって、微小管は単なる道路以上の重要性を持っていくことが分かってきたのです」

■ ヒトチューブリンの発現系を開発

チューブリンの変異が神経疾患に関与していることを知った武藤TLたちは、ヒトのチューブリン発現系の開発に挑戦することにした。「ヒトのチューブリンを合成できるようになれば、神経疾患の研究に役立つだけでなく、チューブリンを標的とした抗がん剤の開発などにも利用が可能になり、基礎から応用まで幅広い分野に貢献できます」

酵母に比べ、ヒトのチューブリンは合成の分子回路が複雑で、発現系の開発は困難を極めた。箕浦逸史 研究員、八久保 有 研究員、鮎川理恵 技術員たちが力を合わせ、バキュロウイルスを利用してヒトのチューブリン遺伝子を昆虫細胞で発現させる手法で、ついに2013年、世界に先駆けてヒトチューブリンの発現系の開発に成功した。その新しい発現系は従来の出芽酵母を利用した発現系

図4 神経疾患とその発症原因となるチューブリン遺伝子

神経疾患	チューブリン遺伝子
滑脳症	$TUBA3$ ($\alpha 1A$)
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	$TUBA4A$ ($\alpha 4A$)
皮膚の発達異常 (Kunze type)	$TUBB$ ($\beta 1$)
多小脳回症	$TUBB2B$ ($\beta 2$)
3型先天性外眼筋繊維症 (CFEOM3)	$TUBB3$ ($\beta 3$)
大脳皮質形成異常	$TUBB3$ ($\beta 3$)
小頭症	$TUBB5$ ($\beta 5$)

に比べて精製効率が100倍近く向上し、生化学の実験が格段に容易になった。

■ 分子から神経細胞、脳へ

ヒトチューブリンの発現系を使った、武藤TLたちの最新の研究成果を紹介しよう。

「神経変性疾患CFEOM3の遺伝子変異に対応するアミノ酸は、これまで私たちが変異解析で明らかにしたアミノ酸群とだいたい一致していたのですが、異なるものもありました。その一つが $\beta 3$ チューブリンの262番目にあるアルギニン、R262です」

タンパク質を構成するアミノ酸（アミノ酸残基）のうち、アルギニンやリジンはプラス電荷を持ち、アスパラギン酸やグルタミン酸はマイナス電荷を持つ。キネシンと微小管の相互作用には、キネシン表面のプラス電荷を持ったアミノ酸と、微小管側のマイナス電荷を持ったアミノ酸の結合が重要とされ、微小管側のアミノ酸としては例外的なプラス電荷のR262は見逃されていた。

箕浦研究員は、R262のアミノ酸を、CFEOM3の患者によく見られるように電気的に中性のアミノ酸に置き換える（R262A）、顕微鏡下でキネシンと変異微小管の相互作用を調べた（図5B中央）。

「R262Aの変異が入ったチューブリンから成る微小管に、キネシンは結合できませんでした。微小管表面のアミノ酸としては例外的なプラスの電荷を持つR262が、キネシンとの相互作用に重要なとは、私たちにとって意外な発見でした」と武藤TL。

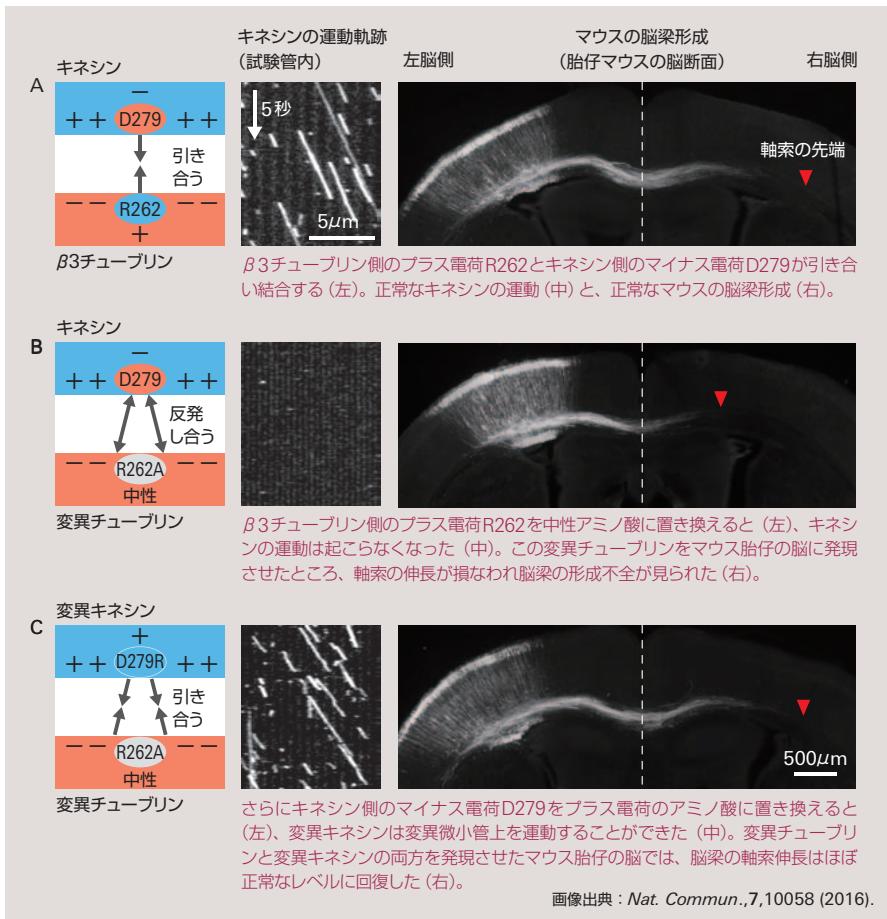


図5 キネシンの運動とマウスの脳梁形成の関係を調べる実験

この結果を当時すでに知られていた構造データと見比べ、箕浦研究員たちは、微小管上で例外的なプラス電荷であるR262は、キネシンのL12ループにある、キネシン上では例外的なマイナス電荷のアスパラギン酸D279と結合しているのではないかと考えた(図5A左)。電気的性質の点で例外的なアミノ酸同士が静電的に引き合っているのではないかと想像したのである。

「もしその推理が正しければ、キネシンL12のマイナス電荷のD279をプラス電荷のアミノ酸(D279R)に変えてやれば、変異キネシンは変異微小管上を動けるようになるかもしれません。まさに“割れ鍋にとじぶた”です(図5C左)。実際に試してみると予想は的中し、この変異を持つキネシンは、R262A変異チューブリンでできた微小管の上を動くことができました! (図5C中央)」と武藤TLは解説する。

この結果はさらにBSIの神経成長機構研究チーム(上口裕之TL)、視床発生研

究チーム(下郡智美TL)との共同研究に発展した。R262Aの変異を導入したチューブリンを胎仔マウスに発現させると、CFEOM3の患者で見られるように、左右の脳をつなぐ脳梁という場所の軸索の長さが短くなること、しかし変異チューブリンと一緒に変異キネシンも発現させた場合には、脳梁の軸索の長さはほぼ正常なレベルに回復することが分かった(図5C右)。

「変異微小管と変異キネシンを同時に発現させ、両者の分子間の相互作用を回復させると、軸索の伸長も正常に戻ったのです。分子レベルの実験で得られた知見を、BSI内の共同研究により、神経細胞や脳のレベルの現象と関連づけることができました。これからもBSI内外の研究室と協力して、異なる階層で起こる現象を統合的な視点で解き明かしていきたいと思います」

■ 本当の進歩は新しい技術がもたらす
チームは今後、どのような方向に研究

関連情報

- 2016年1月18日プレスリリース
先天性外眼筋繊維症に伴う神経発達異常の仕組みを解明
- 2015年1月12日プレスリリース
ダイニン分子モーターの活性化機構の解明に向け大きく前進

を進めるつもりなのか?

「生化学実験にも応用可能なチューブリンの大量発現系ができ、“柔らかい微小管”的実体に迫る実験が、ようやく実現可能になりました。その手始めとして私たちは今、微小管が何通りの構造を取り得るのか調べようとしています。これまで、間接的なデータから推測するしかなかった微小管の複数の構造を、分子レベルで定義することが、“柔らかさ”的実体を明らかにする第一歩だと考えます」

そのスタートラインに立てるようになるまでに10年以上の歳月を要してまで、ヒトチューブリンの発現系の開発にこだわった武藤TLは、「実現不可能ともいわれた技術の開発に取り組んだのは、大きなギャンブルでした」と振り返る。

何が武藤TLを支えたのか。「進歩は、新しい手法、技術ができたときに起きます。本当の進歩をもたらしたいという強い思いが、心の支えになりました。最近、細胞内輸送における微小管の役割が研究者の関心を集めようになり、私たちの開発したチューブリン発現の技術を使って、世界中の多くの研究者たちが実験を始めています」

「キネシンやダイニンが微小管に沿って物質を運ぶとき、道路である微小管の側もダイナミックに構造を変化させていいのではないか? これは常識外の考え方で、これまで多くの研究者から否定されてきましたが、研究の発展とともに、それが当たり前のことになる時代はもうすぐでしょう」

(取材・構成: 立山 晃/フォトンクリエイト)