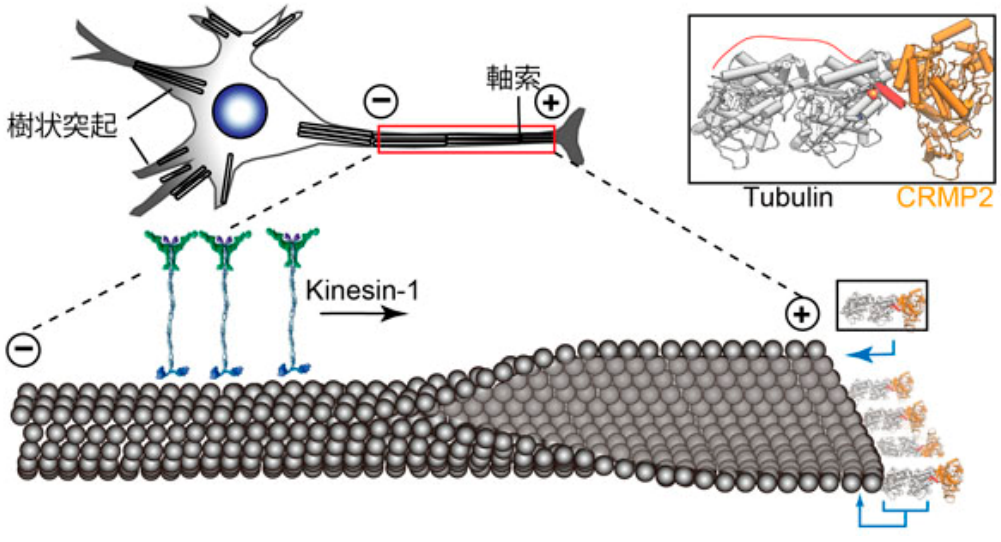
58　CRMP2による軸索誘導・反発の分子構造基盤の解明	仁田　亮

【目的】微小管結合蛋白質 Collapsin Response Mediator Protein 2（CRMP2）は、微小管への作用を介して、神経細胞の軸索突起の形成および伸長（軸索誘導）に関わることが報告されている。一方で CRMP2 はセマフォリンシグナル経路の下流因子であり、この経路により CRMP2 の C 末端ドメイン（テイルドメイン）がリン酸化を受けると、成長円錐が崩壊して軸索が退縮する（軸索反発）。つまり、CRMP2 は軸索の誘導因子であり、またリン酸化後の CRMP2 は軸索の反発因子として作用すると考えられている。そこで本研究では、CRMP2 がどのように神経細胞の軸索形成に関わり、またそのリン酸化により何故軸索が退縮するのか、神経細胞の分化、極性形成における根本的な生命原理を解明することを目的とする。そのために、CRMP2 の直接の相互作用部位である微小管に対する CRMP2 の作用を生化学的および細胞生物学的手法を用いて解明し、さらにその結果をもとに、原子レベルから細胞レベルまでのさまざまな構造解析手法を駆使し、その構造基盤を明らかにする。

【方法】*in vitro*、細胞内（COS7 細胞、培養神経細胞）、線虫個体内において、CRMP2 が微小管の重合、脱重合にどのような影響を及ぼすのかについて観察するとともに、その機能ドメインを調べた。またリン酸化 CRMP2 による変化も同様に観察した。続いて、CRMP2 の機能ドメインを用いた構造解析に移行した。野生型および擬似リン酸化型の CRMP2 を用い、X 線結晶解析を用いた原子レベルの構造解析、X 線小角散乱を用いた分子レベルの溶液構造解析、そして蛍光顕微鏡やクライオ電子顕微鏡を併用した超分子複合体〜細胞レベルの構造解析を併用した。

【結果】CRMP2 による軸索誘導・反発の詳細な分子機構が明らかとなってきた。CRMP2 は神経細胞の発生段階において、将来の軸索突起の先端に局在する。ここで CRMP2 は tubulin と一時的な 1：1 複合体を形成することにより、tubulin を効率よく微小管に取り込ませ、軸索特有の「軸索型微小管」（GTP 型微小管）の重合を促す。この結果、軸索型微小管を豊富に有する突起を効率的に伸長させることで軸索伸長を誘導し、神経細胞極性形成に大きく寄与する。微小管モーターキネシンは、CRMP2 が誘導した「軸索型微小管」を道標として軸索突起に侵入し、選択的な物質輸送を行う。これらの CRMP2 の微小管への効果は CRMP2-tubulin 複合体の形成により生じるため、CRMP2 の tubulin 結合面にアミノ酸点変異を導入すると、CRMP2 の機能は全てキャンセルされた。また、CRMP2 が C 末端部にリン酸化を受けると、CRMP2 と tubulin との静電的反発により複合体形成が阻害され、軸索型微小管の誘導効果が消失するのみならず微小管が不安定化され、軸索誘導から反発へとシグナルが切り替わる。

CRMP2 の軸索誘導モデル



58. CRMP2 による軸索誘導・反発の分子構造基盤の解明

仁田　亮

神戸大学 大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講座 生体構造解剖学分野

Key words：微小管，CRMP2，軸索誘導，X 線結晶解析，クライオ電子顕微鏡

緒　言

神経細胞の発生段階において、微小管自体の構造変化やその配向パターンが神経細胞の極性形成、軸索伸長に必須であり、また成熟神経細胞における微小管モーターによる物質輸送の振り分けにも関連していることが報告されている［1, 2］。微小管結合蛋白質 Collapsin Response Mediator Protein 2（CRMP2）は、微小管への作用を介して、神経細胞の軸索突起の形成、伸長（軸索誘導）に関わることが線虫および海馬培養神経細胞の実験から報告されている［3，4］。一方で CRMP2 はセマフォリンシグナル経路の下流因子であり、この経路により CRMP2 の C 末端ドメイン（テイルドメイン）がリン酸化を受けると、成長円錐が崩壊する（軸索反発）［5］。つまり、CRMP2 は軸索の誘導因子であり、またリン酸化 CRMP2 は軸索の反発因子として作用すると考えられているが、その分子機構については未知の部分が多い。

そこで本研究では、CRMP2 の軸索誘導・反発における役割、分子機構を明らかにするため、CRMP2、微小管、そして微小管の構成蛋白質 tubulin の構造、機能、相互作用解析を行った。X 線結晶構造解析、X 線小角散乱、クライオ電子顕微鏡、蛍光顕微鏡など、原子レベルから細胞レベルまでのあらゆる構造、機能解析法を駆使して、細胞生物学、神経科学的研究により重要性が明らかとなってきた CRMP2 の知見を、一旦 *in vitro*、原子レベルの構造生物学的解析に落とし込み、その結果をまた細胞レベルの研究へと還元するという、細胞生物学と構造生物学とを融合させた研究手法を用いた。その結果、CRMP2 は、軸索突起の微小管重合端周辺に局在して tubulin と結合し、軸索特有の GTP 型微小管を効率良く重合させることを通じて、軸索に「GTP 型微小管」という道しるべを作りながら効率良く軸索誘導を促進することが明らかになった。そして微小管モーターは、この道しるべを辿って軸索への輸送を行っていた。さらに、CRMP2 のリン酸化は微小管結合部位の静電的反発を誘導し、CRMP2 と微小管との結合を阻害することによって微小管を不安定化し、軸索誘導から反発へとシグナルを切り替えることも示された［6，7］。

方　法

in vitro、細胞内（COS7 細胞、培養神経細胞）、線虫個体内において、CRMP2 が微小管の重合、脱重合にどのような影響を及ぼすのかについて観察するとともに、その機能ドメインを調べた。またリン酸化 CRMP2 による変化も同様に観察した。続いて、CRMP2 の機能ドメインを用いた構造解析に移行した。野生型および擬似リン酸化型の CRMP2 を用い、X 線結晶解析を用いた原子レベルの構造解析、X 線小角散乱を用いた分子レベルの溶液構造解析、そして相関顕微観察法にて蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を併用した超分子複合体の構造解析を併用して、統合的な理解を目指した。具体的には、以下の様に研究を推進した。

1.　CRMP2 および tubulin の準備

CRMP2 の野生型コンストラクト CP525［7×His-tag－ヒト CRMP2 1～525］と 2 種類の擬似リン酸化コンストラクト CP525-S522D［CP525 の S522 をアスパラギン酸（D）に置換］、CP525-4D［T509D、T514D、S518D、S522D］を pET21b にサブクローニングした。これらを大腸菌 BL21 細胞で発現させ、アフィニティクロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにて精製した。tubulin は豚の脳から高塩濃度下で重合、脱重合を繰り返し精製した。

2. 微小管重合アッセイ

CRMP2 の有無による微小管の重合能の差異を評価した。tubulin を 37℃へ移す時点を開始点とし、波長 350 nm の吸光度の変化を観察した。また、テトラメチルローダミンで標識した tubulin の重合速度を、全反射蛍光顕微鏡 ELYRA P.1 system（Carl Zeiss）を用いて観察した。

3. CRMP2 誘導型微小管のクライオ電子顕微鏡観察

CRMP2 共存下で重合した微小管をクライオ電子顕微鏡により観察した。急速凍結装置 Vitrobot Mark IV（Thermo Fischer）により微小管試料を凍結し、クライオ電子顕微鏡 Tecnai Arctica（Thermo Fischer）を使用して撮影した。

4. COS7 細胞を用いた微小管重合実験

COS7 細胞 は 5%CO_2インキュベーターを用いて 37℃で培養した。CRMP2 を Lipofectamine 2000 を用いて COS7 細胞に導入し、COS7 細胞を 4℃で 2 時間培養することにより微小管を脱重合させた。その後、37℃で 0、1、2、3 分培養して微小管重合を誘導し、重合した微小管の様子を CRMP2 導入細胞と非導入細胞とで比較した。

5. 多角度光散乱法による分子間相互作用解析

CP525 と tubulin を等モル比で混合し、ゲル濾過クロマトグラフィーを施行した。そのピーク分画を多角度光散乱法で解析し、CP525 と tubulin とが等モル比で複合体を形成していることを確認し、その際の推定分子量を計算した。

6. CRMP2 の X 線結晶構造解析

CP525、CP525-S522D、CP525-4D を蒸気拡散法により結晶化し、SPring8 のビームライン BL41XU、BL32XU、BL26B2 および Swiss Light Source のビームライン BLX06DA を利用して X 線回折データを収集した。回折データは HKL2000、PHASER、PHENIX、COOT を用いて三次元構造を解析した。

7. CRMP2-tubulin 複合体の X 線小角散乱実験

CP525-tubulin 複合体をゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、BioSAXS-1000 （RIGAKU）を用いて X 線小角散乱実験を行った。データは ATSAS を用いて解析し、*AB initio* モデリングを施行した。

8. 鶏後根神経節ニューロンを用いた軸索伸長速度の観察

E7～8 週の鶏後根神経節ニューロンに単純ヘルペスウイルスを用いて EGFP-CRMP2 を形質導入し、EGFP のみを形質導入したものと比較して、後根神経節ニューロンの伸長速度を比較した。

9. 線虫神経系を用いた微小管を介した細胞内物質輸送の観察

CRMP2 の線虫ホモログである unc-33 を用いた。unc-33 の野生型を導入した線虫神経系と unc-33 の微小管結合面の変異体（微小管との結合能を喪失している変異体）を導入した線虫神経系とを比較した。RAB-3 を標識することにより、軸索に輸送されるシナプス小胞の局在を観察した。

結　果

1. CRMP2 による微小管重合誘導効果の観察

生化学的手法および細胞生物学的手法を組み合わせることにより、野生型 CP525 が微小管重合を促進すること、また擬似リン酸化コンストラクト CP525-S522D、CP525-4D は微小管重合促進効果がないことが明らかになった。具体的には、350 nm の吸光度変化や全反射蛍光顕微鏡による微小管伸長速度の観察（図 1A）、COS7 細胞による微小管重合の共焦点蛍光顕微鏡観察により、野生型 CP525 は微小管重合を 1.5～2 倍ほど速くなることが明らかになった。また、全反射蛍光顕微鏡による観察では、CRMP2 が微小管重合を促進する際、微小管の先端（重合端）へ集積することも明らかになった（図 1B）。

2. CRMP2 誘導型微小管のクライオ電子顕微鏡観察

CP525 存在下で重合した微小管を急速凍結し、クライオ電子顕微鏡を用いてその形状を観察した。CP525 誘導型微小管は、特徴的なシート状の重合端を示す GTP 型微小管であることが明らかになった（図 1C）。過去の報告では、GTP 型微小管は軸索に豊富に見られることが示されており［2］、CRMP2 は軸索に特有な GTP 型微小管の重合を誘導することがわかった。

3. CRMP2 と tubulin との相互作用解析

CP525 が微小管の重合端に集積していることから、CRMP2 と tubulin との相互作用の有無をゲル濾過クロマトグラフィーおよび多角度光散乱法により解析した。その結果、CP525 単独ではホモ四量体を呈すること、また CP525 は tubulin との相互作用により四量体を解体し、CP525 と tubulin と 1 : 1 結合すること、そしてその推定分子量は 158.1 kDa であることが明らかとなった。一方で、CP525-S522D、CP525-4D はともに tubulin との相互作用が減弱し、四量体のまま存在するため、tubulin との 1 : 1 複合体を形成しないことが確認された。

4. CRMP2 の X 線結晶構造解析

CP525、CP525-S522D、CP525-4D はいずれもホモ四量体を呈し、非常に類似した立体構造を取っていた（図 1D）。その大部分が球状ドメインであり、C 末端の約 35 アミノ酸残基のみフレキシブルなテイルドメインを呈する。球状ドメインはいずれもほぼ同じ立体構造を呈していたが、テイルドメインの主鎖には小さな構造変化を認め、その構造変化により四量体の位置関係に軽度の並進、回転を認めた。テイルドメインの先にリン酸化部位があるため、テイルドメインの構造変化がリン酸化による負電荷の付加によるものと考えられたが、リン酸化部位自体はフレキシブルな構造を呈しており、構造決定には至らなかった。

5. CRMP2-tubulin 複合体の溶液構造

CP525 と tubulin との 1 : 1 複合体の溶液構造を X 線小角散乱法により解析した（図 1E）。その結果、CRMP2 は tubulin の GTP ポケットのある重合端を塞ぐように結合しており、その結合中心はテイルドメインの根元にあるヘリックス H19 であることがわかった。

6. CRMP2 変異体を用いた検証実験

CP525 の H19 の 3 つの塩基性残基（K483、R485、R487）をアラニンに変えた変異体 CP525-RA を作製し、野生型 CP525 と同様に微小管重合誘導効果やクライオ電子顕微鏡観察を行ったところ、CP525-RA では微小管伸長効果も軸索型微小管誘導効果も消失していることがわかった。また、鶏後根神経節ニューロンでは、野生型に比べ CP525-RA 導入ニューロンでは明らかに微小管伸長が阻害されていることがわかった。また線虫神経系では、シナプス小胞の微小管モーターキネシンによる輸送状況を観察した。野生型 CP525 を導入すると RAB-3 で標識されたシナプス小胞は全て軸索へ輸送されるのに対し、CP525-RA を導入したものではシナプス小胞が軸索にも樹状突起にも同じように運ばれてしまう、つまりキネシンの物質輸送の振り分けに異常を来すことが明らかになった（図 1F）。

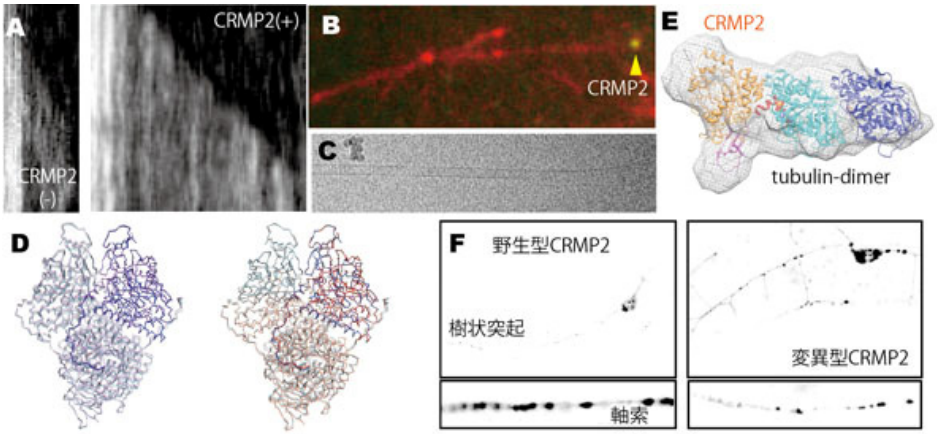


図 1. CRMP2 の軸索誘導の分子機構

A. CRMP2 の微小管重合速度亢進（全反射蛍光顕微鏡 TIRF）。

B. CRMP2 の微小管重合端への集積（TIRF）。

C. CRMP2 存在下で重合した微小管のクライオ電子顕微鏡像。

D. CP525、CP525-S522D、CP525-4D の結晶構造。

E. CP525-Tubulin 複合体の立体構造。

F. 線虫内の軸索微小管形成による道標の破綻。CRMP2 変異体では樹状突起への誤輸送が起こる。

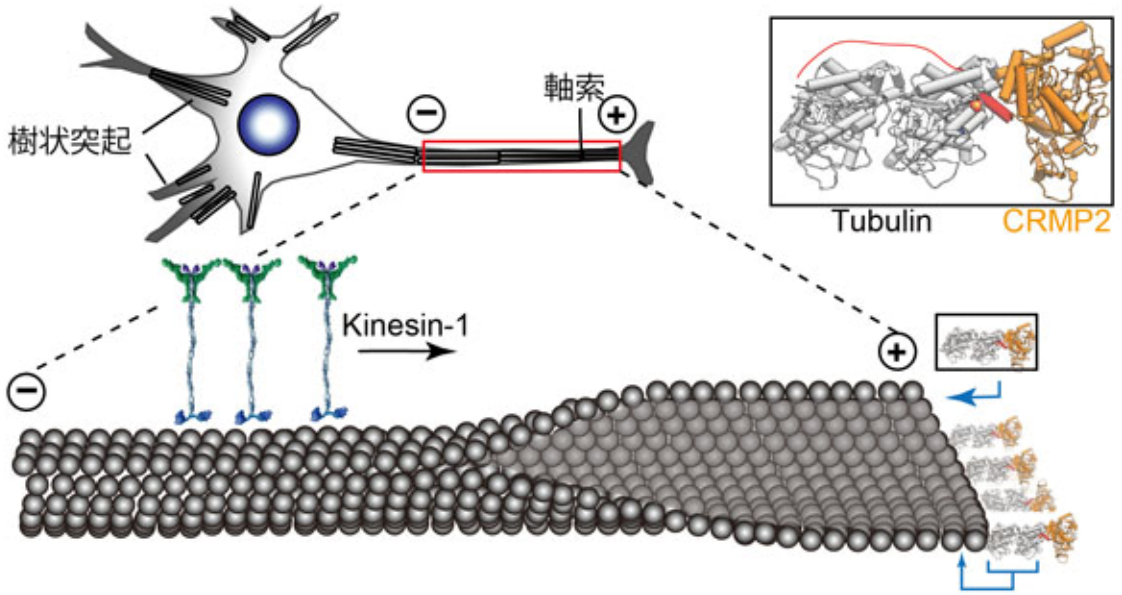


図 2. CRMP2 の軸索誘導モデル
CRMP2が軸索型微小管を誘導、それを道標にKinesin-1が軸索に侵入する。

考　察

以上の結果から、CRMP2 による軸索誘導・反発の詳細な分子機構が明らかとなってきた（図 2）。CRMP2 は神経細胞の発生段階において、将来の軸索突起の先端に局在する。ここで CRMP2 は tubulin と一時的な 1：1 複合体を形成することにより、tubulin を効率よく微小管に取り込ませ、軸索特有の「軸索型微小管」（GTP 型微小管）の重合を促す。この結果、軸索型微小管を豊富に有する突起を効率的に伸長させることで軸索伸長を誘導し、神経細胞極性形成に大きく寄与する。微小管モーターキネシンは、CRMP2 が誘導した「軸索型微小管」を道標として軸索突起に侵入し、選択的な物質輸送を行う。これらの CRMP2 の微小管への効果は CRMP2-tubulin 複合体の形成により生じるため、CRMP2 の tubulin 結合面にアミノ酸点変異を導入すると、CRMP2 の機能は全てキャンセルされた。また、CRMP2 が C 末端部にリン酸化を受けると、CRMP2 と tubulin との静電的反発により複合体形成を阻害され、軸索型微小管の誘導効果が消失するのみならず微小管が不安定化され、軸索誘導から反発へとシグナルが切り替わる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学学際フロンティア研究所の丹羽伸介博士、理化学研究所の白水美香子博士、横浜市立大学大学院医学研究科の五嶋良郎教授、東京大学大学院医学系研究科の廣川信隆特任教授、東京大学定量生命科学研究所の深井周也准教授、（株）リガクの松本崇博士である。また本研究に多大な貢献をした神戸大学大学院医学研究科生体構造解剖学分野のメンバーに感謝したい。

文　献

1) Arimura N, Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. Nat Rev Neurosci. 2007 Mar;8(3):194-205. PMID: 17311006 DOI: 10.1038/nrn2056.

2) Nakata T, Niwa S, Okada Y, Perez F, Hirokawa N. Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. J Cell Biol. 2011 Jul 25;194(2):245-55. Epub 2011 Jul 18. PMID: 21768290 DOI: 10.1083/jcb.201104034.

3) Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Ménager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K. CRMP2 induces axons in cultured hippocampal neurons. Nature neuroscience 2001 Aug;4(8):781-782. PMID: 11477421 DOI: 10.1038/90476.

4) Maniar TA1, Kaplan M, Wang GJ, Shen K, Wei L, Shaw JE, Koushika SP, Bargmann CI. UNC-33 (CRMP) and ankyrin organize microtubules and localize kinesin to polarize axon-dendrite sorting. Nature neuroscience 2011 Nov 20;15(1):48-56. PMID: 22101643 DOI: 10.1038/nn.2970.

5) Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P. & Strittmatter, S. M. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. Nature 1995 Aug 10;376(6540):509-14. PMID: 7637782 DOI:10.1038/376509a0.

6) Niwa S, Nakamura F, Tomabechi Y, Aoki M, Shigematsu H, Matsumoto T, Yamagata A, Fukai S, Hirokawa N, Goshima Y, Shirouzu M, Nitta R. Sci Rep. 2017 Sep 6;7(1):10681. PMID: 28878401 DOI: 10.1038/s41598-017-11031-4.

7) Sumi T, Imasaki T, Aoki M, Sakai N, Nitta E, Shirouzu M, Nitta R. Structural Insights into the Altering Function of CRMP2 by Phosphorylation. Cell Struct Funct. 2018;43(1):15-23. PMID: 29479005 DOI: 10.1247/csf.17025.