

論文の内容の要旨

論文題目

低分子量ストレスタンパク質 α B-クリスタリンと微小管の相互作用

Interaction of stress protein α B-crystallin and microtubule

藤田義信

生体は常に様々なストレスを受け、またそれに絶えず応答している。生物は進化の過程において、これらのストレスから自身を守るために様々な仕組みを発達させてきたと考えられる。ストレスの中で非常によく研究されているものとして、高温ストレス(熱ショック)があげられる。この応答機構は生体が熱に曝されたときに熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein, HSP)と命名された一群のタンパク質を合成する応答として知られている。HSPは、熱ショック時に発現量が増加し変性したタンパク質の凝集を抑制したりリフォールディングを行うほか、新たに合成されたタンパク質の折りたたみを助けたり、タンパク質の分解時にも重要な役割を果たしている。HSPには分子量に従ってファミリーがあり、その中で15-30 kDaのものを低分子量ストレスタンパク質(small Heat Shock Protein, sHSP)と呼ぶ。

α B-クリスタリンは目のレンズ以外の組織においても、構成的に発現していることが知られているsHSPの一つである。レンズ以外では、 α B-クリスタリンは心筋、骨格筋などで比較的多く、腎臓、肺などで中程度、脳、脾臓でも少量発現していることが報告されている。筋組織中ではZ線に局在しており、筋線維タイプ依存的に発現している。 α B-クリスタリンの分子量は約22 kDaであるが、生体内では平均800 kDaの巨大な複合体を形成している。複合体は球形で、変性したタンパク質は中央の空洞部、あるいは表面に結合することが報告されている。 α B-クリスタリンは、レンズ内では他のレンズ構成タンパク質の変性凝集を抑制して、レンズの透明性を維持し

ていることが報告されている。しかしながら、レンズ以外での機能についてはよくわかっていない。いくつかの組織においては熱ショック時の細胞よりも α B-クリスタリンの発現量が高いことが知られており、このような組織においては非ストレス存在下においても α B-クリスタリンが何らかの重要な役割を果たしていることが推測される。そのような組織における機能に示唆を与えるものとして細胞骨格との相互作用が報告されている。アクチンに関しては細胞や *in vitro* で、中間系フィラメントでは、ビメンチン、グリア細胞繊維性酸性タンパク質、さらにデスミンなどで α B-クリスタリンとこれらの細胞骨格の相互作用を示す報告がなされている。

残る主要な細胞骨格である微小管に関しては、変性チューブリンダイマーとの相互作用に関する報告があるが、その重合体である微小管に対する相互作用を示す報告はない。微小管は、細胞形態の維持、細胞内器官やチューブリン自体も含む様々な分子の輸送のレールなどの生体にとって重要な機能を担っている。遊離チューブリンは比較的変性しやすいが、変性チューブリンは重合を抑制することが知られている。興味深いことに、微小管の脱重合や安定化によって α B-クリスタリンのmRNAとタンパク質の発現量が増減することが報告されている。これらの結果から、遊離チューブリンが α B-クリスタリンの基質となっており、そのため α B-クリスタリンの発現量が増加するといった可能性が考えられ、 α B-クリスタリンとチューブリン・微小管の密接な関係が考えられる。

本学位論文では、 α B-クリスタリンのレンズ以外の組織での機能を知るために、まず始めに、残る主要な細胞骨格である微小管に α B-クリスタリンが結合しうるかどうかについて検討した。もし、重合体である微小管に α B-クリスタリンが結合しているとすると、熱などにより変性したチューブリンを素早く捕捉し、凝集形成の抑制を容易に行える可能性があると考えたからである。細胞染色により微小管と α B-クリスタリンの共局在が観察されたこと、細胞抽出液を用いた再構成微小管と α B-クリスタリンが共沈してくることからこの結合が示唆された。また、電子顕微鏡による観察においてもこの結合が観察された。精製度の異なるチューブリンから形成した微小管と共沈する α B-クリスタリンを測定した結果、 α B-クリスタリンは微小管結合タンパク質(MAPs)を含む微小管に結合することを示した。高純度チューブリンから再構成した微小管に熱耐性MAPsを加えると、結合する α B-クリスタリン量が量依存的に増加することから、熱耐性MAPsとして精製されるタンパク質群のうちのどれかを介して α B-クリスタリンが微小管に結合していると考えられた。また、部位欠損 α B-クリスタリンを用いた実験により、この結合が α B-クリスタリンの11番目から56番目のアミノ酸で起こっていることを示した。

次に、この結合が微小管にどのような影響を与えるかについて検討した。 α B-クリスタリンが相互作用する細胞骨格に対する影響は、アクチン線維に関しては脱重合に対して安定化作用、中間径フィラメントに対してはバンドル化の抑制を及ぼすと報告されている。サブユニットの形状やその動的特性などに共通性のみられるアクチンに対するのと同様の効果が見られるので

はないかと考え、 α B-クリスタリンの微小管脱重合時における効果を検討した。ノコダゾールによる微小管脱重合を α B-クリスタリンが抑制することを、 α B-クリスタリンの発現量を増減させた細胞を用いた実験と蛍光顕微鏡を用いた微小管長の測定から示した。また、ノコダゾールと同じ作用機序をもつポドフィロトキシンを用いて実験を行い、この抑制効果が α B-クリスタリン量に依存する結果を得た。さらに、細胞内で微小管の動態を制御していると考えられているカルシウムによる微小管脱重合に対しても α B-クリスタリンが抑制効果を与えることを示した。

本学位論文は、非ストレス存在下に細胞内と*in vitro*において α B-クリスタリンと微小管の相互作用を初めて明らかにしたものである。 α B-クリスタリンが、筋芽細胞とグリオーマ細胞内で微小管ネットワークと局在を共にし、細胞抽出液から再構成した微小管と共沈したことから、この相互作用は筋特異的、あるいは脳特異的ではなく、より一般的なものであると考えられる。熱耐性MAPsを用いた実験から微小管への結合がこれらのいずれかのタンパク質を介していることが示唆された。熱耐性MAPsとして精製されるタンパク質にはMAP2、およびタウが含まれている。近年、分子シャペロンであるHSP70とHSP90の両方が、タウに結合し、リフォールディングを行うことが報告された。 α B-クリスタリンがアルツハイマー患者の脳内でタウとアミロイド- β を含む神経原線維変異に局在していることがいくつか報告されている。これらの結果と本研究をあわせて考えると α B-クリスタリンはタウと結合しているのかもしれないが、詳細については今後の課題であると考えられる。また、部位欠損 α B-クリスタリンを用いた実験から、この結合は α B-クリスタリンの11番目のアミノ酸から56番目のアミノ酸で起こっていることが示唆された。この領域はsHSPに保存されている α -クリスタリン領域とは異なっており、この結合 α B-クリスタリン特異的なものであることを推測させる。さらに、この領域には α B-クリスタリンの3つのリン酸化部位のうち2つが含まれており、リン酸化による制御が行われている可能性も考えられる。

複合体を形成しているsHSPは、その表面を基質となるタンパク質に結合部位として供して、変性タンパク質の凝集を抑制していると報告されている。本研究の結果とあわせて考えると、 α B-クリスタリンは一方では熱耐性MAPsを介して微小管と結合しており、もう一方では変性したタンパク質を凝集から防ぐための結合部位として供している可能性がある。 α B-クリスタリンの基質として変性チューブリンがあげられるので、 α B-クリスタリンはその重合フォームである微小管に熱耐性MAPsと結合する一方で、変性した脱重合フォームであるチューブリンと相互作用して、動的に重合脱重合の2つの相が制御されている微小管・チューブリン系をストレス存在下においては変性チューブリンの保護、非存在下には微小管脱重合の抑制を行って保護しているのかもしれない。

また、ほとんどのsHSPは筋でその発現量が高いことが知られており、 α B-クリスタリンもレンズ以外では心筋、骨格筋で発現量が高く、筋内での α B-クリスタリンの発現量は筋線維タイプ依存的事であることが報告されている。また、 α B-クリスタリンの発現量と酸化的代謝能はよく相

関していることが報告されている。これらの組織において、3種の細胞骨格により構築されるテンセグリティモデルは不断の持続性収縮に曝されていると考えられる。実際、培養細胞系において、ストレスファイバーのアクチオシン系の収縮により、微小管の脱重合が増加することを示唆する報告がある。このような収縮による微小管脱重合が、持続的収縮をしている心筋や遅筋で起こっているとすると、 α B-クリスタリンがこれらの組織においてその発現量を増やすことによって微小管脱重合を抑制する機能を果たしているのかもしれない。

本学位論文によって、 α B-クリスタリンが3種の細胞骨格全てと相互作用し、機能を果たしていることが明らかとなった。その詳細な結合の様態(結合部位と結合する標的タンパク質)と微小管脱重合抑制のメカニズムについては検討される必要があるが、この知見によって、これまでその機能について不明なところのあったsHSPの機能の一端が解明されたと考えられる。