

特集：タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

微小管伸長端結合タンパク質の分子制御機構

林 郁 子

細胞骨格のひとつ、微小管は細胞内の様々な現象に影響を及ぼす。それは微小管の構造がもつ極性と、動的不安定性とよばれる運動に依存するものである。微小管を制御する因子は数多くあるが、なかでも微小管の伸長端に特異的に集積する伸長端結合タンパク質は微小管を安定化するばかりでなく、微小管と細胞皮質や染色体キネトコアとの相互作用に重要な役割を果たす。近年、これらのタンパク質群の複合体の立体構造解析が進み、また試験管内での伸長端集積現象の再構成系が構築され、分子レベルでの認識機構が理解されつつある。そして微小管も含めた伸長端結合タンパク質間の過渡的な相互作用が微小管のダイナミクスを制御していることが明らかとなった。本稿ではここ5年の分子生物学的知見を中心にした成果を概説する。

はじめに

微小管はアクチンや中間系フィラメントなどと同様、すべての真核生物に保存された細胞骨格因子のひとつである。微小管は細胞分裂期に形成される分裂装置（紡錘体）の主要構成成分であるばかりでなく、間期には細胞小器官の配置決定や細胞極性、さらには細胞移動にも深く関わっている。これらの機能は微小管そのものがもつ極性のためばかりでなく、微小管と相互作用する様々な因子（微小管結合タンパク質 microtubule-associated proteins : MAPs）によるものでもある。本稿では MAPs の中でも微小管伸長端に特異的に結合するタンパク質群に焦点をあてて解説する。

1. 微小管のダイナミクス

(a) 微小管とその構成因子チューブリンの構造

微小管は α および β チューブリンからなるヘテロ二量体で構成されている。 α チューブリンと β チューブリンはおよそ 50% の相同配列をもち、立体構造も類似している。また両方ともにグアニンヌクレオチド結合能をもつ。このチューブリン二量体が重合して微小管を形成するわけであるが、その方向性によって二量体間の相互作用の強さが異なる。二量体の長軸方向の相互作用は横に並ぶよりはるかに安定である。このように縦長にチューブリン二量体が並んだ構造をプロトフィラメントと呼ぶ。プロトフィラメントは α と β の繰り返しであるため、構造に極性が生じる。この極性はキネシンやダイニンなどの微小管結合性モータータンパク質が微小管上で運動方向を決定するのに重要な役割を果たす。プロトフィラメントが13本横方向に並んで直径 25nm の中空の管を形成したものが微小管である（図 1a）。このとき隣り合うプロトフィラメントが微妙にずれることで、中空管を形成したときに1ラインだけ不連続な継ぎ目（seam）が生じる。

微小管は GTP に依存して重合する。試験管内では重合速度は両端で異なり、 β チューブリンの位置する端でよりはやく重合が行われる。このため β チューブリン側をプラス端（伸長端）、 α チューブリン側をマイナス端とよぶ。

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻（〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29）

Molecular mechanism of microtubule plus-end tracking proteins

Ikuko Hayashi (Supramolecular Biology, International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, 1-7-29 Suehiro, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan)

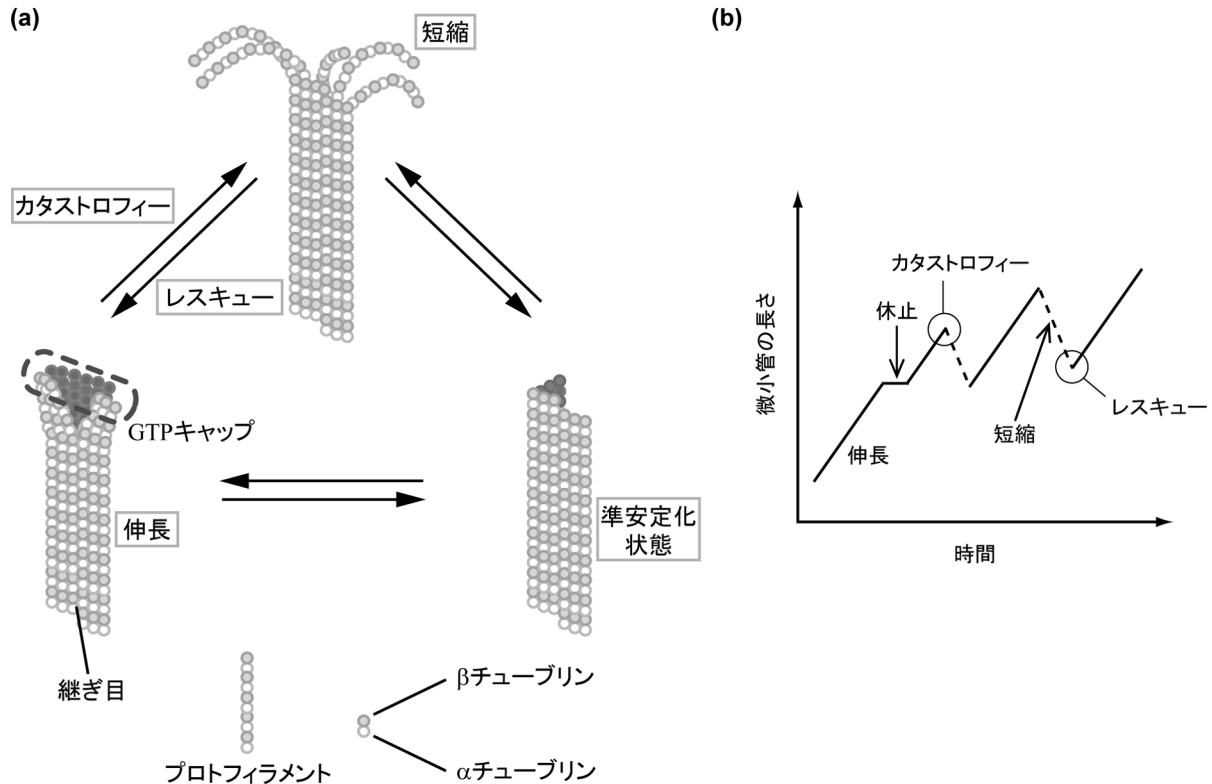


図1 微小管の動的不安定性

(a) 微小管の動的不安定性における構造変化。伸長中の微小管はGTPキャップによって安定化される。プラス端はわずかにそったシート状の構造をとる。短縮状態のときプラス端はプロトフィラメントが剥けたような構造をとる。
(b) 微小管の長さの経時変化。伸長から短縮への変化をカタストロフィー、短縮から伸長への変化をレスキューといい、それぞれ丸で囲んで示した。

微小管のほとんどの部分はGDP結合型チューブリンである。細胞内では多くの微小管がマイナス端を微小管形成中心（動物細胞では中心体）に配置し、伸長端を細胞の各所に伸ばす。特に、移動中の細胞においては細胞の進行方向に伸長端が配向される。

電子顕微鏡による観察から、微小管が伸長するとき伸長端は先の開いたシート状構造をとることが知られている^{1,2)}。そのとき伸長端の一番端の β チューブリンはGTP結合型であるため、この先端の部分をGTPキャップと呼ぶ。GTPキャップが存在する間、微小管は中空管の構造を維持し安定化していると考えられている²⁾。GTPキャップが喪失した場合、チューブリンが脱重合、すなわち微小管が短縮する。このとき微小管の先端部はプロトフィラメントが外に巻いた皮の剥けたような構造になる。

(b) 微小管の動的不安定性

微小管の重合・脱重合反応は非常にダイナミックに繰り返される。このような不安定な動態を動的不安定性 (dynamic instability) とよぶ (図1a; 文献3)。微小管の動的不安定性は四つのパラメータ、すなわち伸長、短縮、伸長から短縮への転換 (カタストロフィー (catastrophe))、あるいはその逆反応 (短縮から伸長、レスキュー (rescue))

によって制御される (図1b; 文献4)。動的不安定性は試験管内でも細胞の中でも観察することができる。しかし細胞内での微小管の伸長速度は精製した微小管を用いた試験管内での重合実験に比べて明らかに速く、レスキューとカタストロフィーの相変換がより頻繁に起こる。試験管内での微小管の伸長速度は反応温度とチューブリン濃度に依存する。これらの至適条件を満たせば微小管は伸長を続けることができ、カタストロフィーはほとんど起こらない。一方、細胞内で微小管の動的不安定性を決定する最重要因子はMAPsである。この制御には古典的なMAPsであるMAP1, MAP2, tauなど微小管全域に分布するタンパク質群やキネシンモーターが知られている。しかしこれらのタンパク質が微小管を介して細胞極性にどの程度影響を及ぼすかは謎のままであった。ここ10年、蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) を用いた光学顕微鏡によるライブセルイメージング技術が向上したことにより、微小管の特異的な部位に局在化するタンパク質群 (plus-end tracking proteins: +TIPs) が存在することがわかった。以下、+TIPsについての最近の進展を概説する。

2. 微小管伸長端に作用するタンパク質群

微小管伸長端には様々な種類のタンパク質がいろいろな結合様式で作用する。多くの+TIPsは微小管と結合してその構造を安定化する。最初に発見された+TIPはCLIP170 (cytoplasmic linker protein 170) とよばれる分子量およそ 170k ダルトンの巨大分子である⁵⁾。CLIP170 は未重合のチューブリンあるいは新たに伸長したばかりの伸長端に結合して微小管伸長端に集積する。微小管がさらに伸長すると CLIP170 は微小管から解離する。この現象をトレッドミルと呼ぶ (treadmilling; 図 2)。この発見の後, EB1 (end-binding protein 1) やダイニン制御因子ダイナクチン (p150^{Glued}) も CLIP170 同様にトレッドミルによって伸長端と会合することが明らかとなった。+TIPs にはトレッドミル運動をするタンパク質を介して伸長端領域に集積するタンパク質群も存在する。この局在化機構をヒッチハイク (hitchhiking) と呼ぶ。EB1 を介したがん抑制遺伝子産物 APC (adenomatous polyposis coli) や, CLIP170 を介した CLASPs (CLIP-associating proteins) の伸長端集積が例にあげられる⁶⁾。これらのタンパク質は自身で微小管に結合する能力もあることから, ヒッチハイクをするタンパク質群は複数の微小管安定化機構をもつと考えられる。さらに近年, 細胞外からのカルシウム流入を制御する膜タンパク質 STIM1 (stromal interaction molecule 1) も EB1 へのヒッチハイクによって伸長端に局在化することが明らかとなり, 微小管が+TIPs を介して様々な分子機構に関わっている

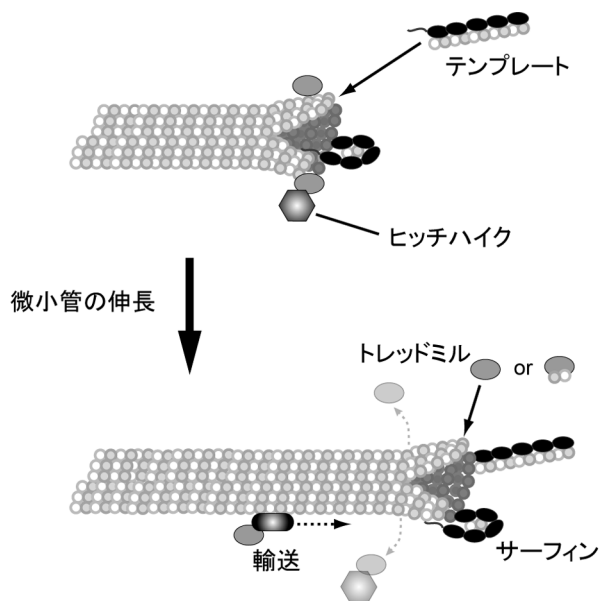


図2 微小管の伸長端に局在化する分子の作用機構

●●●●● XMAP215: テンプレートモデル, またはサーフィンによって伸長端に局在化する. ●●●●● トレッドミルによって集積する +TIPs. ●●●●● ヒッチハイクによって集積する +TIPs. ●●●●● 輸送によって +TIPs を伸長端に運ぶ分子 (キネシンモーター).

ことが示された⁷⁾。+TIPsの伸長端への集積はキネシンモーターによる輸送 (transport) によって運ばれる場合もある。例えば分裂酵母の CLIP170 相同タンパク質 Tip1p は EB1 相同タンパク質 Mal3p に依存するばかりでなくキネシンモーター Tea2p による輸送によっても伸長端に集積することが知られている⁸⁾。その他、伸長端でのサーフィン (surfing), すなわち未重合のチューブリンに結合して微小管の重合・脱重合を媒介する現象も知られる。ごく最近、全反射照明蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy; 後述) を用いて XMAP215 が微小管ポリメラーゼであることが報告された⁹⁾。XMAP215 は五つの微小管結合性 TOG ドメインをもつ。この TOG ドメインがチューブリンを囲むようにして結合し、伸長端にチューブリンを運ぶと考えられている。また、XMAP215 はテンプレートモデル (template model) とよばれる方法でプロトフィラメントに張り付き、伸長端に運ぶことでも知られている¹⁰⁾。上に述べたものは微小管を安定化するタンパク質群とその機構であるが、これらの他に伸長端にて微小管脱重合を促進するキネシンも見つかっている¹¹⁾。このように様々な因子が異なった会合様式を用いて動的不安定性を制御していることがわかる。図 3 に主要な +TIPs を示すので参照されたい。

3. 試験管内での +TIPs の伸長端集積現象の再構成

図3からわかるように、+TIPs 同士はいろいろな分子間相互作用を形成する。その相互作用は非常に複雑で、細胞内への遺伝子導入による+TIPs の過剰発現や siRNA による発現抑制などの細胞生物学的解析が進んでも、それぞれの+TIPs の微小管や他の因子に対する役割・自身の活性化機構など不明な点が多かった。そのためこの伸長端集積現象を試験管内で再構成しようと多くの人々が試みてきたが10年近く誰も成功してこなかった。

これまでの解析から分裂酵母において Mal3p は Tip1p, Tea2p に非依存的に伸長端に結合することがわかって^{いる}^{8,12)}。また真核生物では APC, ACF7, CLASPs や CLIP170 は EB1 の局在化に影響を与えることなく伸長端から取り除くことができる^{13~16)}。そのため EB1 は伸長端で機軸となる +TIP であると推測されていた。しかし、EB1 は微小管結合タンパク質であるにも関わらず試験管内では弱い微小管結合能しかもたないことから、細胞内と試験管内で全く異なる挙動をとる謎の多い分子と考えられてきた。このような疑問に対する答えのひとつとして、+TIPs には分子内相互作用が存在することが明らかとなった^{17,34)}。すなわち EB1 がチューブリンや微小管と結合するためには、他の分子と会合して活性化されなければいけないということである(後述)。

分子レベルでより詳細な+TIPsの分子制御機構を知る

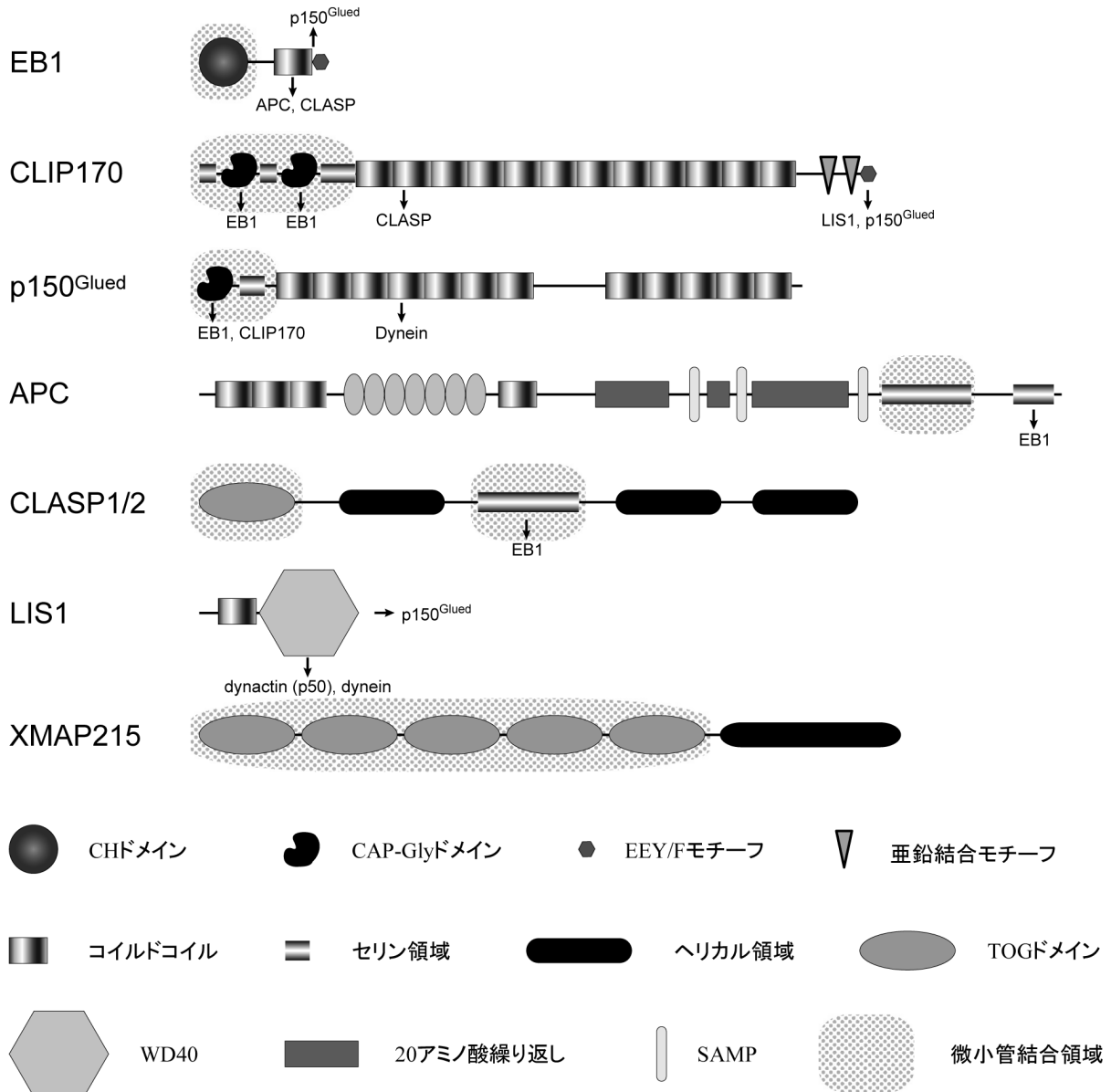


図3 主な+TIPsのドメイン構造とその相互作用
微小管結合領域を編み目で示した。

ためにも、試験管内での伸長端集積現象の再構成系の構築と、立体構造解析による複合体の認識機構の解明が切望されていた。

(a) 電子顕微鏡による Mal3p の解析

細胞生物学的な解析から、EB1は伸長しているプラス端には結合するが短縮しているプラス端に局在化しないことがわかっている。一方、CLIP170やp150^{Glued}は短縮するプラス端にも集積できるため、EB1は他の+TIPsとは異なる微小管構造を認識していると考えられる。近年、電子顕微鏡による微小管とMal3p複合体の構造解析が発表され、+TIPsの微小管認識機構について最初の複合体立体構造の知見が得られた¹⁸⁾。

Mal3pは強い結合で微小管伸長端につくばかりでなく、微小管全体にも弱い親和性がある。この性質を利用して薬剤（微小管脱重合阻害剤タキソール (taxol)）で安定化させた微小管とMal3pの複合体を金属蒸着法によって電子顕微鏡解析したところ、Mal3pは微小管の継ぎ目部分に結合してその構造を安定化させていることがわかった（図4）。これは、プロトフィラメントが横並びに管を形成するときに隠れてしまう部分が継ぎ目上に露出され、Mal3pと結合することを示唆している。このようにしてMal3pはプロトフィラメントの継ぎ目を閉じる役割を果たしているのかもしれない。

ここ最近の蛍光顕微鏡技術の発達とCCDカメラの導入

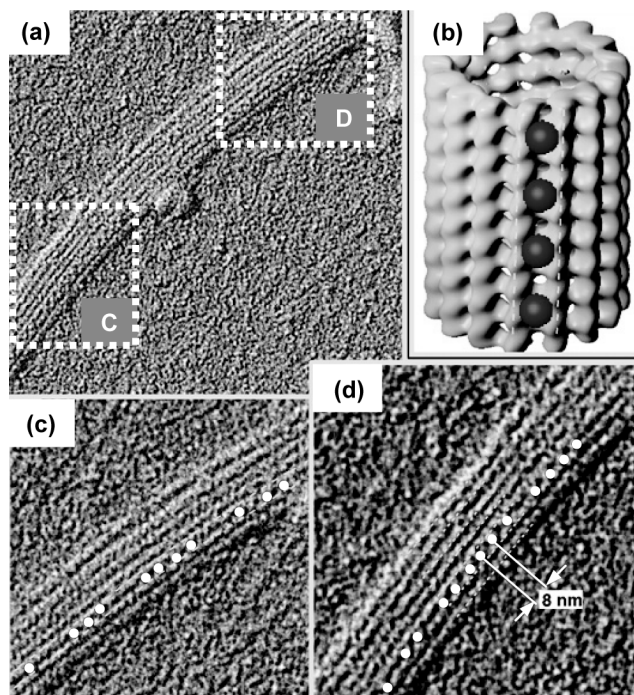


図4 微小管と Mal3p 複合体の解析 (文献 18 より転載)

- (a) Mal3p と共に重合させた微小管の電子顕微鏡写真。
 (b) 電子顕微鏡写真に基づいた微小管と Mal3p の複合体モデル。球が Mal3p。Mal3p は継ぎ目上に並ぶ。
 (c) (d) (a) の C と D の拡大写真。観察された Mal3p (白丸) の間隔は 8nm で、チューブリン二量体の長軸の長さとも一致する。

により、+TIPs は動物細胞において GTP キャップと考えられる部分より広領域の伸長端 (<2 μ m) を覆うことが明らかとなっている。+TIPs は GTP キャップというよりむしろ伸長端に特異的な構造、例えばプロトフィラメントのひずみや伸長端にのみ露出されたチューブリンの部分構造を認識しているのではないかとする仮説もあり、この電子顕微鏡解析の結果と合致する。では +TIPs は一体微小管の何を認識しているのか? この疑問には +TIPs と伸長端の複合体のさらに高分解の立体構造解析が期待される。

(b) 試験管における Mal3p の微小管伸長端集積現象

これまで +TIPs について様々な知見が主に細胞生物学的手法を通して得られてきた。それに比べて分子レベルの解析は立ち遅れていた。その最も大きな理由は細胞内で起こる伸長端集積現象を試験管内で再現できないということにあった。昨年末、これからはばく分子生物学的解析の大きな礎となるべき、試験管内での Mal3p の伸長端集積現象の再構成系の報告がなされた¹⁹⁾。

Surrey, Brunner, Dogterom らのグループは微小管のシードをアビジン-ニュートラアビジン反応によってカバーガラスに固定し、別々に蛍光色素標識したチューブリンと Mal3p を用いて微小管伸長反応を行い光学顕微鏡で観察した (図 5b, c)。ここで TIRF 顕微鏡を用いることに

より、カバーガラス近傍の限定された領域で起きる微小管重合反応の高感度検出に成功した (図 5a)。試験管内で Mal3p はプラス端にもマイナス端にも局在化する。また Mal3p は自分自身でトレッドミル運動を行うことが観察された。これは細胞内での EB1 の挙動や、アフリカツメガエルの卵母細胞抽出液を用いた EB1 の試験管内微小管伸長端集積と同様のものであった (図 5d, 文献 20)。Mal3p は Tip1p や Tea2p とも相互作用するが、これら二つの因子は細胞内で Mal3p の伸長端集積に必須でない⁸⁾。試験管内では、Tip1p と Tea2p はそれ自体で伸長端に集積できないこと、しかし Mal3p と協同することでこれら三者複合体がより効果的に伸長端に集積できることがわかった。しかし三者の伸長端集積後、Mal3p は伸長端から解離し、Tip1p は Tea2p によってさらに微小管の側面方向に輸送される。ここでのひとつの疑問は、試験管内で Mal3p は微小管のカタストロフィーとレスキュー両方の頻度を上昇させることである。これは今まで高等動物の EB1 でわかっている事実: EB1 は細胞内でカタストロフィー抑制因子であるという観察と反する。今後、ここで論じた以外の MAPs を系に含めることでより生理条件に近い再構成系を確立するとともに、個々の因子の伸長端集積の意義を見出すことを期待する。

4. +TIPs の立体構造解析: 様々なドメイン間の相互作用

+TIPs の伸長端での相互作用は非常に複雑であるにも関わらず、その相互作用に関わるドメインやモチーフは限られたものである。微小管結合ドメインである EB1 の CH (calponin homology) ドメインと CLIP170 や p150^{Glued} に見られる CAP-Gly (cytoskeleton associated protein, Gly-rich) ドメインについては早い時期に立体構造が決定され、その微小管結合部位も推定されてきた (図 6a; 文献 21, 22)。それ以外にも CLASPs にみられる TOG ドメインやセリン・塩基性残基に富んだ領域が微小管との結合の安定化に作用している (図 3)。

近年、+TIPs 同士の複合体の立体構造解析が進み、微小管を含めた +TIPs のネットワークを理解できることとなった。

(a) +TIPs 同士の相互作用

EB1 の C 末端ドメインはコイルドコイルの二量体構造をとり、数多くの +TIPs と相互作用する場を提供する (図 6b; 文献 23, 24)。それにも関わらず、他の +TIPs の発現量の変化によっても EB1 は伸長端への集積に影響を受けないことから、+TIPs ネットワークを中心で制御する“ハブ”と考えられるようになった²⁵⁾。EB1 は APC の結合因子として最初に発見された²⁶⁾。APC には C 末端側にセリンに富んだ配列があり、その中でも Ile-Pro のジペプチド

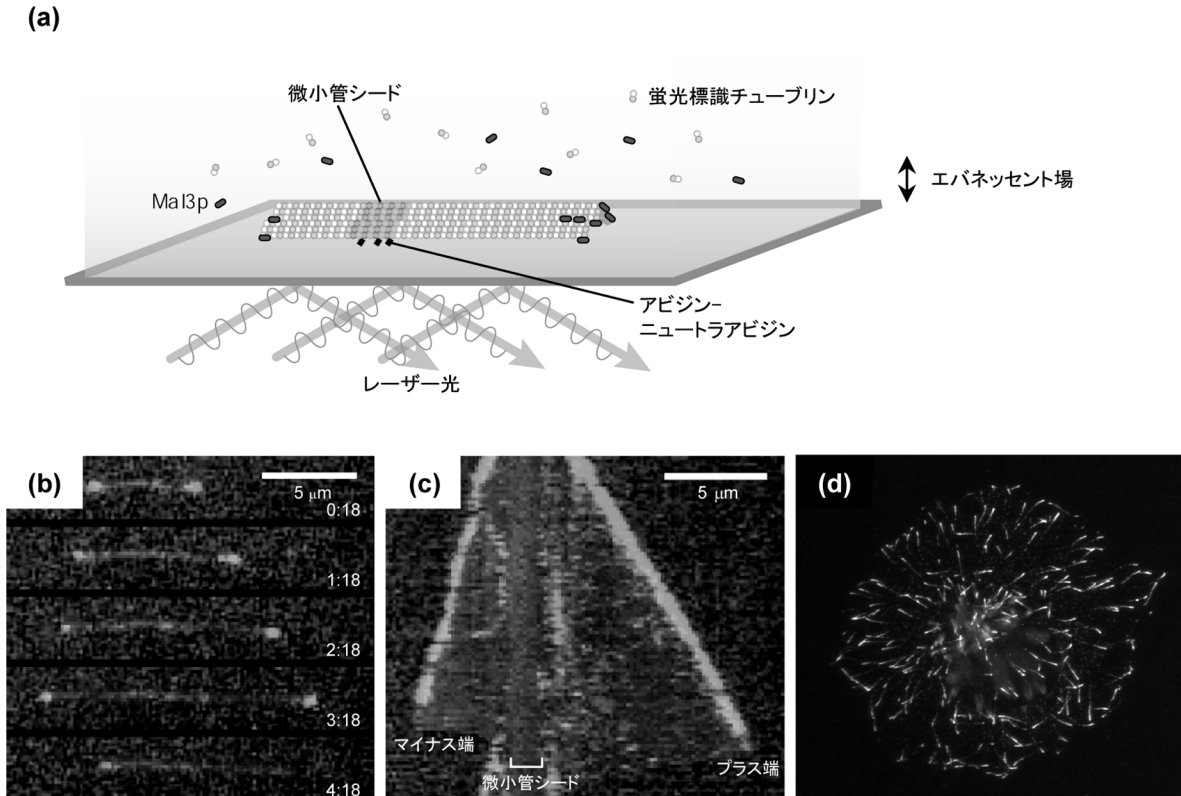


図5 Mal3pの試験管内伸長端集積反応

(a) TIRF顕微鏡を用いた実験の図解。微小管シードはカバースリップに固定され、そこからのMal3pによる微小管重合反応を観察する。TIRF顕微鏡を用いることにより、エバネッセント場(50~150nm)の反応を選択的に観察できる。

(b) Mal3pによる微小管伸長反応の経時変化。微小管、Mal3p両方とも異なる色の蛍光で標識をして観察。写真ではMal3pが微小管伸張端に集積して強いスポットとして現れる。数字は時間(分:秒)。(b)と(c)は文献19より転載。

(c) Mal3pによる微小管伸長反応のカイモグラフ。

(d) 細胞内におけるEB1 (A. Akhmanova 博士の好意による)。

(IPモチーフ)がEB1のC末端領域にある保存度の高い疎水性キャビティに入り込むと推測されている²³⁾。APCと同様にEB1に相互作用すると考えられているMACF2やCLASPsにもこのモチーフは保存されており、EB1とIPモチーフの結合はヒッチハイクする+TIPsが伸長端に集積するために獲得した結合様式であると推測される。

EB1のC末端にはもうひとつ特徴的な配列が存在する。C末端最後のおよそ10残基には酸性アミノ酸に富んだ領域があり、 α チューブリンのC末端と非常に似通った配列(EEY/Fモチーフ、図6c)を有する。この酸性領域はp150^{Glucl}やCLIP170のCAP-Glyドメインの結合に必須であることが示され、複合体の結晶構造も決定された(図6d; 文献17, 27, 28)。EB1のEEY/FモチーフはCAP-Glyドメインにある保存された疎水性の穴にすっぽり入り込む。またモチーフ内のグルタミン酸のひとつがp150^{Glucl}のCAP-Glyドメインに保存されたアルギニン側鎖と水素結合を形成している(図6d)。このアルギニンとEB1のEEY/Fモチーフの相互作用はEB1とp150^{Glucl}の結合に必須であ

る。

p150^{Glucl}のCAP-GlyドメインはCLIP170のC末端にも結合することができる。CLIP170はN末端側にセリンに富んだ配列に囲まれた二つのCAP-Glyドメインを、C末端側に二つの亜鉛結合モチーフをもつ。p150^{Glucl}はC末端側一番最後の亜鉛結合モチーフに依存して細胞内で伸長端に局在化する^{29, 30)}。昨年この結晶構造が筆者らを含む二つのグループから発表された(図6e; 文献31, 32)。EB1の認識に必須であったアルギニンは亜鉛結合モチーフの認識にも関わっている。またCLIP170の最後の3残基はGlu-Thr-PheというEEY/Fモチーフと非常に似通った配列であり(図6c)、このモチーフがEB1と相同な立体配置でp150^{Glucl}に認識されることがわかった(図6c)。

CLIP170の亜鉛結合モチーフはダイニンのアクセサリ因子であるLIS1とも結合する。LIS1はp150^{Glucl}と競争的にCLIP170と結合するが³⁰⁾、その複合体の立体構造情報はまだ得られていない。ダイニンの伸長端への集積は複数の経路、すなわちLIS1を介してCLIP170によって、あるいは

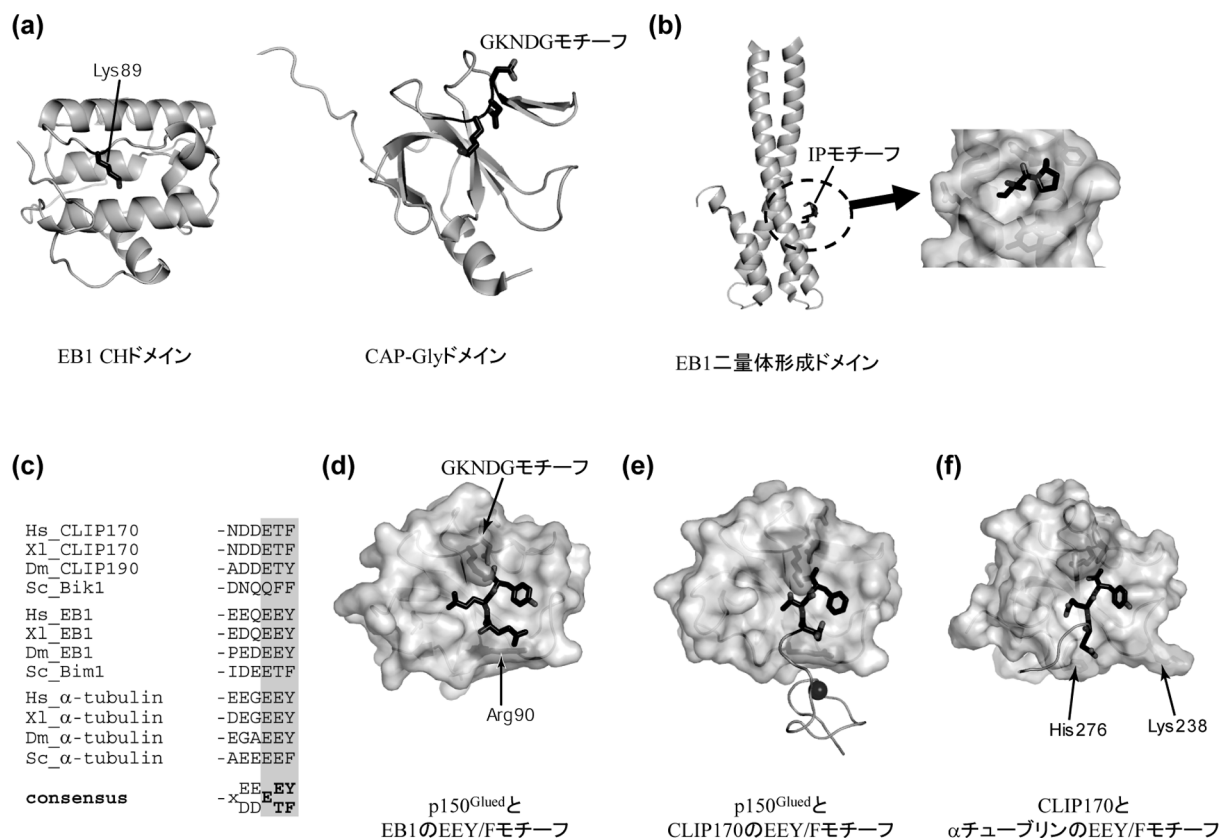


図6 +TIPsの立体構造解析

(a) 微小管伸長端結合ドメインの結晶構造。(左) EB1のCHドメイン (PDBコード: 1PA7)。結合に必要な保存されたリジン残基 (Lys89) をスティック表示した。(右) CAP-Glyドメインの結晶構造。保存された配列 (GKNDGモチーフ) をスティック表示した (1LPL)。

(b) EB1の二量体形成ドメインの結晶構造 (1WU9)。シンメトリ展開により見つかったIPモチーフをスティック表示で示す。右はその拡大図。IPモチーフを囲む疎水性に富んだ残基をスティック表示した。

(c) CLIP170, EB1, αチューブリンのC末端側にあるEEY/Fモチーフ。Hs: ヒト, Xl: アフリカツメガエル, Dm: ショウジョウバエ, Sc: 出芽酵母。

(d) (e) (f) CAP-GlyドメインとEEY/Fモチーフの立体構造。EEY/Fモチーフを黒のスティックで示す。GKNDGモチーフを矢印で示す。

(d) p150^{Glued}とEB1の結晶構造 (2HL3)。結合に必要なp150^{Glued}のアルギニン残基 (Arg90) を矢印で示す。

(e) p150^{Glued}とCLIP170の結晶構造 (2HQH)。亜鉛を球で示す。

(f) CLIP170とαチューブリンの水溶液中の構造 (2E4H)。複合体形成に重要なp150^{Glued}のArg90に相当するEEY/Fモチーフ認識残基を矢印で示す (Lys238, His276; 文献32, 40, 筆者ら投稿中)。

はp150^{Glued}に運ばれて集積すると考えられているが、詳しい分子レベルの解析はこれからであろう。

CLASPsは他の+TIPsとは異なりN末端側に微小管結合ドメインであるTOGドメインをもつ。しかし伸長端集積は、中央部分のセリンに富んだ配列がEB1と結合することにより行われる³³⁾。CLASPsはいくつかのヒートリピート構造をもつと予測されており、そのC末端領域はCLIP170のコイルドコイル領域とも相互作用する¹³⁾。このC末端領域はCLASPsの伸長端集積に必要でないが、EB1結合領域とともに微小管の安定化に必須である³³⁾。しかし、これらの立体構造情報は今のところ得られていない。

(b) +TIPsの分子内相互作用

+TIPsには分子内相互作用をするものが知られている。

その最初の例はCLIP170において示された³⁰⁾。CLIP170のN末端側の二つのCAP-GlyドメインがC末端側の二つの亜鉛結合モチーフと分子内で会合することが電子顕微鏡およびGFPを用いた蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescent resonance energy transfer: FRET) 分光法によって示された (図7)。この分子内相互作用により、CLIP170はC末端領域を欠いた活性型変異体に比べ微小管との結合能が弱い。ここでp150^{Glued}などの亜鉛結合モチーフ結合タンパク質やEB1などのCAP-Glyドメイン結合タンパク質がCLIP170と分子間相互作用することによって自己阻害が解除され、協同的に微小管と相互作用する (文献31, 筆者ら投稿中)。

EB1もまた分子内相互作用をもつ。C末端側のEEY/Fモチーフを含む最後の20アミノ酸がN末端側の微小管結

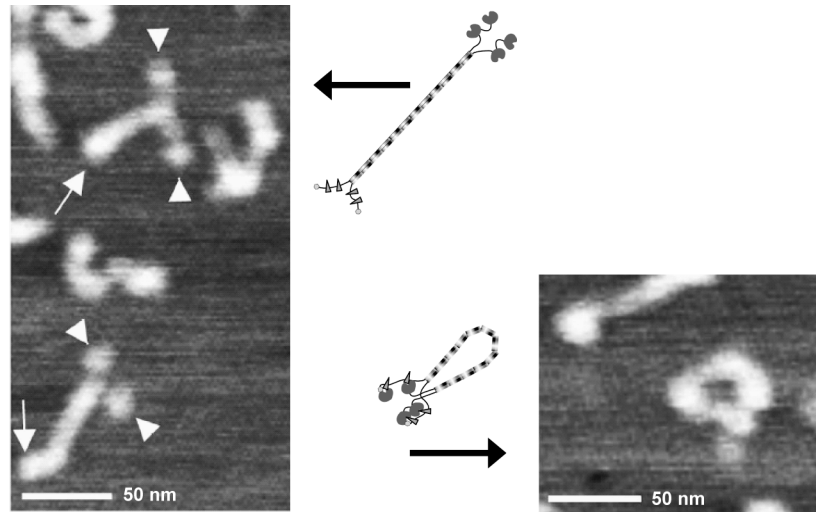


図7 CLIP170の分子内相互作用

CLIP170の電子顕微鏡写真。左が分子内相互作用が解除された活性型、右が分子内相互作用のある不活性型。文献30より抜粋。

合CHドメインを自己阻害する。その結果、試験管内ではEB1による微小管重合はほとんど見られない^{17,34)}。ここでp150^{Glued}やCLIP170に含まれるCAP-GlyドメインがEEY/Fモチーフへ結合することによりEB1が活性化される。また、APCはEB1への結合にEEY/Fモチーフを必要としないにも関わらずEB1の微小管結合能を活性化する³⁵⁾。APCのEB1への結合領域はEEY/Fモチーフの近傍に位置するため²³⁾、APCのような巨大分子が相互作用することにより立体的に分子内相互作用を阻害すると推測される。このEB1の分子内相互作用は非常に弱く、ゲル濾過法などでは検出することができない¹⁷⁾。核磁気共鳴法によって弱いながらも有意な相互作用($>10^{-5}$ M)を検出した例といえる。しかし、これらの自己阻害は細胞内で必須であるわけではない。細胞生物学においてこれまで多くの解析が自己阻害ドメインのない形でなされてきたが、EB1、CLIP170いずれも伸長端に正常に局在化することができる。しかしEB1の活性型変異体が試験管内で非常に強い微小管重合能をもつことを考えると^{17,34)}、C末端の二量体形成ドメインがEB1の活性の程度を他の+TIPsと結合することで制御しているのかもしれない。

この他にAPCやMCAKなども分子内相互作用することが報告されている^{36,37)}。自己阻害は+TIPsに一般的に見られる現象と捉えてもよいといえよう。アクチン結合性タンパク質においても多くの分子が自己阻害機構を有し、タンパク質間相互作用によってその制御を解除する。このような分子内・分子間相互作用を介した構造タンパク質の情報伝達は細胞骨格因子の共通した分子制御機構なのかもしれない⁽³⁸⁾。

(c) +TIPsとチューブリンとの相互作用

EB1のCHドメインは微小管結合ドメインである。これまでMal3pと微小管の複合体の電子顕微鏡による構造解析が行われたが¹⁸⁾、原子レベルでの結合様式はまだわかっていない。近年、キネトコア構成因子として知られるHec1がCHドメインをもち、キネトコアでの微小管接着安定化因子としてはたらくことが明らかとなった³⁹⁾。この二つのCHドメインで微小管結合に必須なリジン残基は保存されており(図6a)、その部位はアクチンフィラメントに結合するCHドメインと立体構造上同じ領域-疎水性残基に富んだパッチにある²²⁾。これまでアクチン結合性CHドメインを含むタンパク質のアクチンフィラメントへの結合については、電子顕微鏡や生化学的な手法も含めた様々な解析が行われている。今後、EB1やHec1は新しい種類のCHドメインタンパク質として構造生物学的な興味が高まると思われる。

一方、CLIP170の α チューブリン認識については、CAP-Glyドメインと α チューブリンのEEY/Fモチーフとの複合体の立体構造が核磁気共鳴法によって決定された⁴⁰⁾。この水溶液中の構造はEB1とp150^{Glued}複合体の結晶構造と相同である²⁷⁾。なかでも α チューブリンの最後のチロシン残基はCAP-Glyドメインの疎水性の穴にはまり込んでおり(図6f)、この部位への変異導入により複合体は形成されなくなる。 α チューブリンのチロシン残基は細胞の中でチューブリンチロシンリガーゼ(tubulin tyrosine ligase: TTL)とチューブリンチロシンカルボキシペプチダーゼ(tubulin tyrosine carboxypeptidase: TTCP)のサイクルにより、 α チューブリンのC末端に結合したり切り離されたりする。TTL遺伝子をノックアウトしたマウス

神経細胞において CLIP170 が微小管に正しく局在化できないこと, CLIP タンパク質や p150^{Glu} が細胞の中でチロシン化したチューブリンにしか結合しないことも, これまでの解析結果と合致する^{41, 42)}。さらに, EB1 や CLIP170 の p150^{Glu} との複合体においても, EEY/F モチーフの最後の芳香族アミノ酸は複合体形成に必須である^{17, 28, 31, 32, 43)}。しかし, EB1 と α チューブリンは EEY という同じ配列をもつにも関わらず, EB1 は TTL の基質にはならないことから, α チューブリンの脱チロシン化と EB1 は別の微小管制御機構に位置すると示唆される⁴³⁾。

このように CAP-Gly ドメインを介した分子内・分子間相互作用は立体構造的にも複合体の親和性 (μ M 程度の相互作用) においてもお互いに非常に類似している。また, その相互作用同士は排他的であることから, +TIPs の過渡的な伸長端集積現象は細胞内での局所的な環境によって柔軟に変化しうるものと考えられる。

+TIPs の局在化の制御因子のひとつにリン酸化もあげられる。多くの +TIPs がセリンに富んだ配列を有し, その領域を介して微小管結合を安定化することから, +TIPs のリン酸化による微小管結合能の低下が考えられる。実際, APC や CLASPs はグリコーゲン合成リン酸化酵素 3 β (GSK3 β) のリン酸化によって微小管結合を阻害される^{44, 45)}。同様に CLIP170 はラパマイシン (mTOR), p150^{Glu} は cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKA) によって阻害される^{46, 47)}。また +TIPs 間では, サイクリン依存性リン酸化酵素 (CDC2) によって APC がリン酸化されると EB1 へ結合できなくなることも知られている⁴⁸⁾。

おわりに

この 10 年の間に微小管伸長端集積因子についての研究は驚くべき進展を見せ, 微小管ダイナミクスの一部の事象を非常にうまく説明できるようになった。しかし重要な問題はまだ山積している。第一に, 生理条件下における集積因子の再構成系が調っていないことがあげられる。それゆえに高等動物での因子間の制御機構がいまだ不明瞭である。第二には原子レベルでの微小管と集積因子の相互作用が全くわかっていないことである。今後はこれらの問題を解明するとともに, 伸長端からの情報伝達が微小管ダイナミクス, ひいては細胞の極性にどう影響を与えるかが焦点となるであろう。

文 献

- Chrétien, D., Fuller, S.D., & Karsenti, E. (1995) *J. Cell Biol.*, 129, 1311–1328.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., & Milligan, R.A. (1991) *J. Cell Biol.*, 114, 977–991.
- Mitchison, T. & Kirschner, M. (1984) *Nature*, 312, 232–237.
- Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., & Salmon E.D. (1988) *J. Cell Biol.*, 107, 1437–1448.
- Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R., & Kreis, T.E. (1999) *Cell*, 96, 517–527.
- Carvalho, P., Tirnauer, J.S., & Pellman, D. (2003) *Trends Cell Biol.*, 13, 229–237.
- Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Hoogenraad, C.C., & Akhmanova, A. (2008) *Curr. Biol.*, 18, 177–182.
- Busch, K.E., Hayles, J., Nurse, P., & Brunner, D. (2004) *Dev. Cell*, 6, 831–843.
- Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., & Hyman, A.A. (2008) *Cell*, 132, 79–88.
- Kerssemakers, J.W., Munteanu, E.L., Laan, L., Noetzel, T.L., Janson, M.E., & Dogterom, M. (2006) *Nature*, 442, 709–712.
- Wordeman, L. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17, 82–88.
- Busch, K.E. & Brunner, D. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 548–559.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B.M., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., & Galjart, N. (2001) *Cell*, 104, 923–935.
- Morrison, E.E., Wardleworth, B.N., Askham, J.M., Markham, A.F., & Meredith, D.M. (1998) *Oncogene*, 17, 3471–3477.
- Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., & Fuchs, E. (2003) *Cell*, 115, 343–354.
- Komarova, Y.A., Akhmanova, A.S., Kojima, S., Galjart, N., & Borisy, G.G. (2002) *J. Cell Biol.*, 159, 589–599.
- Hayashi, I., Wilde, A., Mal, T.K., & Ikura, M. (2005) *Mol. Cell*, 19, 449–460.
- Sandblad, L., Busch, K.E., Tittmann, P., Gross, H., Brunner, D., & Hoenger, A. (2006) *Cell*, 127, 1415–1424.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., & Surrey, T. (2007) *Nature*, 450, 1100–1105.
- Tirnauer, J.S., Grego, S., Salmon, E.D., & Mitchison, T.J. (2002) *Mol. Biol. Cell*, 13, 3614–3626.
- Li, S., Finley, J., Liu, Z.J., Qiu, S.H., Chen, H., Luan, C.H., Carson, M., Tsao, J., Johnson, D., Lin, G., Zhao, J., Thomas, W., Nagy, L.A., Sha, B., DeLucas, L.J., Wang, B.C., & Luo, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 48596–48601.
- Hayashi, I. & Ikura, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 36430–36434.
- Honnappa, S., John, C.M., Kostrewa, D., Winkler, F.K., & Steinmetz, M.O. (2005) *EMBO J.*, 24, 261–269.
- Slep, K.C. & Vale, R.D. (2007) *Mol. Cell*, 27, 976–991.
- Lansbergen, G. & Akhmanova, A. (2006) *Traffic*, 7, 499–507.
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., & Kinzler, K.W. (1995) *Cancer Res.*, 55, 2972–2977.
- Honnappa, S., Okhrimenko, O., Jaussi, R., Jawhari, H., Jelesarov, I., Winkler, F.K., & Steinmetz, M.O. (2006) *Mol. Cell*, 23, 663–671.
- Bu, W. & Su, L.K. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 49721–49731.
- Goodson, H.V., Skube, S.B., Stalder, R., Valetti, C., Kreis, T.E., Morrison, E.E., & Schroer, T.A. (2003) *Cell Motil. Cytoskeleton*, 55, 156–173.
- Lansbergen, G., Komarova, Y., Modesti, M., Wyman, C., Hoogenraad, C.C., Goodson, H.V., Lemaitre, R.P., Drechsel, D.N., van Munster, E., Gadella, T.W., Grosveld, F., Galjart, N.,

- Borisy, G.G., & Akhmanova, A. (2004) *J. Cell Biol.*, **166**, 1003–1014.
- 31) Weisbrich, A., Honnappa, S., Jaussi, R., Okhrimenko, O., Frey, D., Jelesarov, I., Akhmanova, A., & Steinmetz, M.O. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 959–967.
 - 32) Hayashi, I., Plevin, M.J., & Ikura, M. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 980–981.
 - 33) Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., & Akhmanova, A. (2005) *J. Cell Biol.*, **168**, 141–153.
 - 34) Manna, T., Honnappa, S., Steinmetz, M.O., & Wilson, L. (2008) *Biochemistry*, **47**, 779–786.
 - 35) Nakamura, M., Zhou, X.Z., & Lu, K.P. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1062–1067.
 - 36) Li, Z. & Näthke, I.S. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 5195–5204.
 - 37) Moore, A. & Wordeman, L. (2004) *Biochem. J.*, **383**, 227–235.
 - 38) Lim, W.A. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 61–68.
 - 39) Wei, R.R., Al-Bassam, J., & Harrison, S.C. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 54–59.
 - 40) Mishima, M., Maesaki, R., Kasa, M., Watanabe, T., Fukata, M., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 10346–10351.
 - 41) Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P.A., Job, D., & Wehland, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 7853–7858.
 - 42) Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., & Job, D. (2006) *J. Cell Biol.*, **174**, 839–849.
 - 43) Komarova, Y., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G.G., & Akhmanova, A. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5334–5345.
 - 44) Zumbunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A. & Näthke, I.S. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 44–49.
 - 45) Wittmann, T. & Waterman-Storer, C.M. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 929–939.
 - 46) Choi, J.H., Bertram, P.G., Drenan, R., Carvalho, J., Zhou, H. H., & Zheng, X.F. (2002) *EMBO Rep.*, **3**, 988–994.
 - 47) Vaughan, P.S., Miura, P., Henderson, M., Byrne, B., & Vaughan, K.T. (2002) *J. Cell Biol.*, **158**, 305–319.
 - 48) Askham, J.M., Moncur, P., Markham, A.F., & Morrison, E.E. (2000) *Oncogene*, **19**, 1950–1958.
-