

第4の細胞骨格“セプチン”の機能の可視化に世界で初めて成功 —膜と蛋白質との連携が異常なために起きる多くの疾患の仕組みの解明に期待—

この度、名古屋大学大学院理学研究科の滝口金吾 助教、滝口陽子（研究補助員）並びに京都大学大学院医学研究科の木下 専 講師からなる研究グループは、膜結合能を有する重合性蛋白質で、第4の細胞骨格とも呼ばれているセプチンが、生体膜のモデルである人工脂質膜小胞（リポソーム）に活発な突起の形成伸長を誘導して変形させる過程を可視化することに世界で初めて成功しました。これにより今後、生体膜とセプチンのように膜の裏打ち構造を作る細胞骨格との相互作用が異常になることに起因すると考えられている多くの疾患の発症機構の解明に応用することも期待できます。

なお、本研究成果は、2008年1月22日付（米国東部時間）米国科学雑誌「Current Biology」 電子版に掲載されました。

第4の細胞骨格“セプチン”の機能の可視化に世界で初めて成功。

—膜と蛋白質との連携が異常なために起きる多くの疾患の仕組みの解明に期待—

【ポイント】

- ・ 膜のダイナミックスが活発な脳からの抽出液が、生きた細胞と同等サイズの膜小胞に対して強力な膜突起誘導活性を示すことを発見した。
- ・ セプチンというパーキンソン病や男性不妊症、腫瘍形成など多くの疾患に関係する新規の細胞骨格蛋白質が、その膜突起誘導活性の正体であることを明らかにした。

【背景】

セプチンは、アクチン系や微小管系などの他の細胞骨格と協調して、細胞質分裂や神経のシナプスにおけるスパイン形成など細胞の機能発現に重要な生体膜の形態形成に関与していることが分かっています。

また、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患においてセプチン蛋白質が異常凝集・沈着を起こすことも知られており、最近 Sept4 がドパミン神経機能に必須な蛋白質で、神経細胞内に大量に存在する α -シヌクレインというパーキンソン病の原因蛋白質の変性と神経毒性を抑える神経保護効果を持つことが明らかにされています。加えて、この Sept4 が欠損すると精子鞭毛内にあるセプチンを主成分とするリング状の構造体が失われ、精子が脆弱になり運動性を失うために不妊症になることもマウスとヒトで示されています。さらに、セプチン遺伝子が転座している白血病・リンパ腫の症例や、セプチン遺伝子が増幅ないし過剰発現している固形腫瘍が多数報告され、腫瘍の発生との関連も示唆されています。

しかし、セプチンが重合・形状変化・脱重合する機構や生体膜と相互作用する機構など基本的な性質が不明であるため、セプチンの生体内での詳しい役割や作用機序については、示されてきたその重要性にもかかわらずまだ明らかになっていませんでした。

【研究の内容】

本研究では、第4の細胞骨格系であるセプチンが、生体膜モデルであるリポソームに活発な突起の形成・伸長を誘導する過程を可視化することに世界で初めて成功しました（論文1）。さらに、リアルタイムイメージングによって（論文2）、巨大リポソームが突起を形成し伸長させる過程の可視化に成功しました（図1A、バー 10 μm 、光学顕微鏡像（暗視野）、数字は秒）。

光学顕微鏡で突起形成を起こしていることを前もって確認したリポソームの試料を電子顕微鏡で観察したところ、セプチンは膜表面上で重合して突起の周囲を巻くように線維形成しており（図1B、バー 200 nm、電顕像）、膜突起部分の太さは約 400 nm と揃っていました（図1C）。この太さは丁度、神経伝達に重要なスパイン構造や精神鞭毛の

付け根部分などと同じ大きさです。セプチンは、細胞内では分裂中の細胞の分裂面や神経細胞のシナプス結合を形成している部位など膜が活発に変形しているところに局在していることが知られていますが、そこでセプチンが具体的にどのような機能を担っているかは不明でした。今回の我々の観察により、セプチンが膜の形態形成に積極的に関与し変形を促していることが示されました（図1D）。

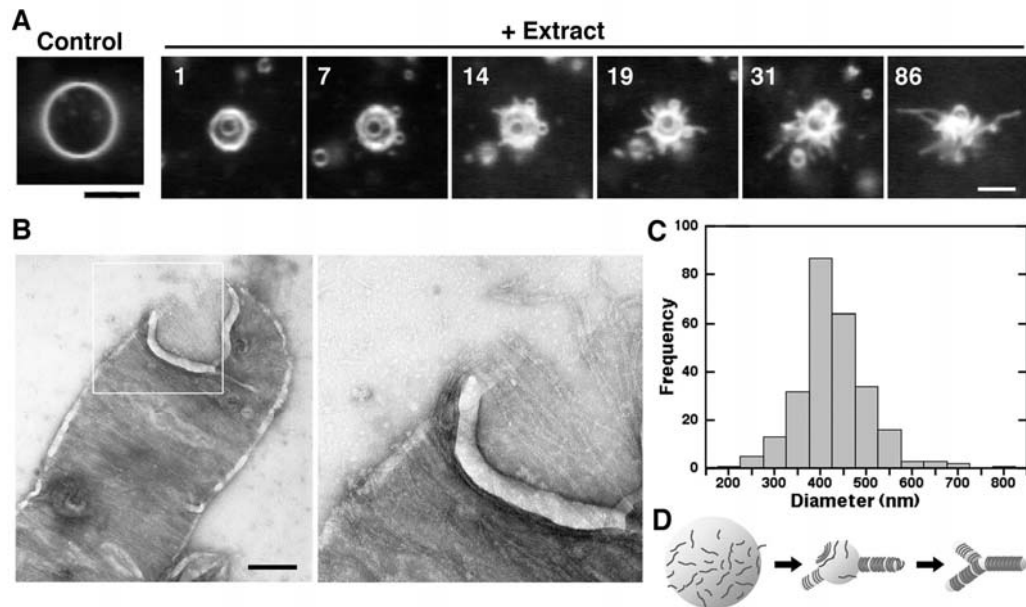


図 1

セプチンは第4の細胞骨格とも言われますが、このセプチンが他の細胞骨格系、アクチンや微小管と決定的に異なるのは、脂質二重膜と直接結合相互作用できることです（論文3および4）。セプチンの膜との結合と線維形成とが同時に調和して起きることにより、観察されたような膜の変形が生じることが推測されます（図2）。

今回の研究成果は、リポソームの変形過程を直接観察する系が新しい膜作用蛋白質の探索や膜変形過程の解析に有効なことを示しています。今後セプチンが膜突起形成を起こす機構について、様々なミューテーションを加えたセプチンを用いた実験の解析や理論シミュレーションを使った解析を推進することにより（論文5）、さらに詳しく明らかにして行く予定です。

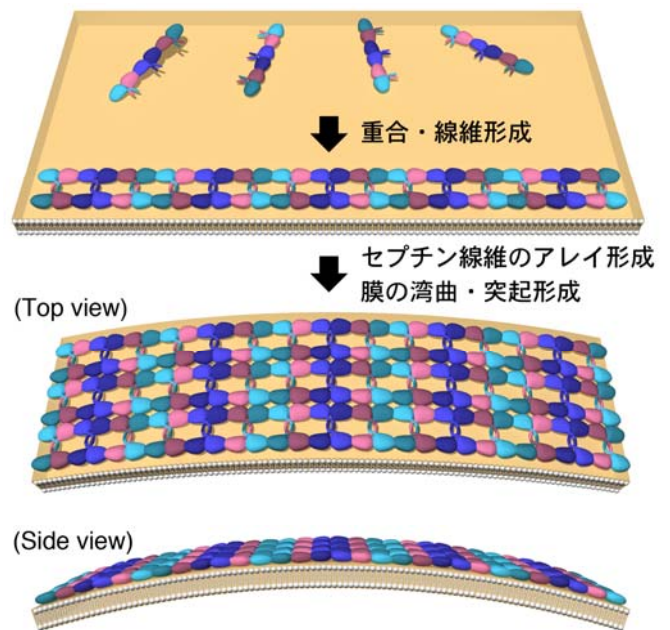


図 2

【成果の意義】

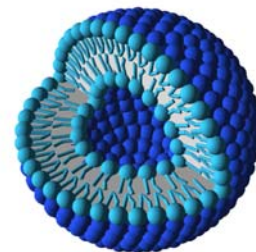
セプチンは、植物を除く全ての真核生物から見いだされ、しかも種を越えてよく保存されていること、細胞分裂や細胞の形態形成・運動など細胞の機能発現に必須なこと、セプチンの欠損や異常が、生物に致死を招いたり、神経変性、不妊症、腫瘍発生などの多くの疾患の発症進展に関与していることなど、数多くの証拠からその重要性が示されていました。しかしながら、セプチンが具体的にどのような役割を担っているかは不明でした。

セプチンについては、膜が活発に変形しているところに局在していること、アクチンや微小管など他の細胞骨格蛋白質と共同して働いていることが多いこと、生体膜と直接相互作用できることなどが知られています。その一方、単離したセプチンは、重合して線維形成するのに何時間何日ももの長い時間を要することや、試験管内で形成された線維が短い（長くても 200 nm 程度）ことなどから比較的静的な細胞骨格で、アクチン系や微小管系など他のダイナミックな細胞骨格が構築した細胞膜の形状や構造を力学的に補強する役目をしているのではないかと予想されてきました。

本研究は、脂質二重膜の表面では、単離したセプチンでも素早く長い線維を形成でき、しかも線維がさらに作用し合ってより高度な構造体（束やリング、螺旋、メッシュなど）を作り上げること、その結果積極的に膜の変形を引き起こすことができることを明らかにしました。今まで役割や機能が明確ではなかった第4の細胞骨格であるセプチンが実はダイナミックで細胞膜の形態制御に直接関与していることや、セプチンが膜変形を誘導する機構を世界に先駆けて示したことで、今回の研究における発見は非常に重要です。今後、様々なミューテーションを加えたセプチンを用いた実験を進めて行くことにより、セプチンが関与していると考えられている多くの疾患や、さらには生体膜と細胞骨格との相互作用が異常なために起きる疾患の発症機構が解明されて行くことが期待できます。

【用語説明】

リポソーム (liposome) : 人工脂質膜小胞。分子内部に親水性部分と疎水性脂肪鎖の両方を持つ脂質、例えばリン脂質が水溶液中に存在すると、その疎水性部分が水溶液に対して露出しないように親水性部分を外側に向けて自己集合して脂質二重膜を形成します。さらに脂質二重膜は自然に閉じて袋状の膜小胞を形成します (右モデル図)。このようにして形成されてくる人工脂質膜小胞をリポソームと呼び、古くから生体膜の最も単純化したモデルとして多くの実験研究に使われて



きました。近年、医薬品や化粧品の素材の1つとして、応用面でも注目され始めています。今回の研究で使われているリポソームは直径が数ミクロンから数十ミクロンもあり、巨大リポソームとも呼ばれます。これは生きた細胞とほぼ同じサイズで、しかも光学顕微鏡で直接観察できる

利点を持っています。

私たちはこのリポソームを利用することによって、様々な脂質組成を持つ膜が色々な界面活性剤に晒された時に見せる挙動を直接観察することによって、殺菌効果を持つような強力な界面活性剤は瞬時に脂質二重膜を破壊する一方、生化学などの分野で膜蛋白質を単離精製する際によく使う界面活性剤は脂質二重膜を穏やかに可溶化して行くことを可視化することに成功しています(論文6)。

セプチン(septin):細胞骨格系を構成する一群の蛋白質で、重合してセプチン線維を形成します。アクチン線維、微小管、中間径線維に次いで第4の細胞骨格とも呼ばれ、酵母から昆虫・ヒトまでの植物を除く全ての真核生物で保存されています。ヒトのセプチン遺伝子 Sept1-Sept13 に由来するセプチンのほとんどは脳に多く含まれます。

細胞骨格:重合して線維形成する蛋白質群の総称。特にアクチン線維と微小管が有名でよく研究されています。アクチン線維は分子モーターであるミオシンと共同して働くことにより、筋肉や心臓はもとより、腸の蠕動などその他の内蔵の運動も担います。細胞レベルでも細胞の形態形成や形態維持、逆に形態変化や運動まで担っており、細胞が分裂する際には収縮環を形成して細胞質分裂に関与します。一方、微小管は分子モーターのダイニンやキネシンと共同して、例えば神経軸索内では神経伝達物質などのスムーズな運搬に関与し、また真核生物の鞭毛や繊毛運動を担い、細胞が分裂する際には紡錘体を形成して染色体の均等分配に関与します。

【論文名】

- (1) Tanaka-Takiguchi Y, Kinoshita M, Takiguchi K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Current Biology*
- (2) Takiguchi K, Nomura F, Inaba T, Takeda S, Saitoh A, Hotani H. Liposomes possess drastic capabilities for topological transformation. *ChemPhysChem* 3, 571-574 (2002)
- (3) Kinoshita M. Diversity of septin scaffolds. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 54-60 (2006).
- (4) Kinoshita M, Field CM, Coughlin ML, Straight AF, Mitchison TJ. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. *Developmental Cell* 3, 791-802 (2002)
- (5) Umeda T, Inaba T, Ishijima A, Takiguchi K, Hotani H. Formation and maintenance of tubular membrane projections: Experiments and numerical calculations. *BioSystems* 93, 115-119 (2008)
- (6) Nomura F, Nagata M, Inaba T, Hiramatsu H, Hotani H, Takiguchi K. Capabilities of liposomes for topological transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 98, 2340-2345 (2001)