

学位論文抄録

微小管切断活性をもつ AAA タンパク質 spastin の線虫ホモログの構造と機能
(Structure and function of the *Caenorhabditis elegans* homologue of spastin, a member of
AAA proteins with microtubule-severing activity)

石躍 由佳

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻細胞複製学

指導教員

小椋 光 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子細胞制御学

学位論文抄録

[目的] 近年, AAA (ATPases Associated with various cellular Activities) タンパク質に起因するヒト疾患が相次いで報告されている。AAA タンパク質の一つである spastin は, 重篤な神経変性疾患である遺伝性痙性対麻痺の原因因子として同定された。最近, 培養細胞およびショウジョウバエを用いた実験により, spastin が微小管切断活性を示すことが報告されている。しかしながら, spastin が微小管とどのように相互作用し, その後どのようなメカニズムで微小管を切断するかは明らかになっていない。そこで本研究では, これらを明らかにするため, 線虫の spastin ホモログである SPAS-1 の生化学的・構造生物学的解析を行った。

[方法] 大腸菌を用いて発現・精製した野生型および変異型 SPAS-1 を用いて, ATPase 活性, オリゴマー状態および基質との相互作用を解析した。また, *in vivo* において微小管切断活性を評価する系を培養細胞で構築し, SPAS-1 の微小管切断の機能に重要な残基の同定を試みた。

[結果] 培養細胞を用いた系により, SPAS-1 が微小管切断活性を有することを明らかにした。そして, SPAS-1 の ATPase 活性が, tubulin あるいは微小管を添加することにより促進されること, SPAS-1 の N 末端領域 (microtubule binding domain: MTBD) で tubulin と直接相互作用することを見出した。また, ゲル濾過クロマトグラフィーにより SPAS-1 の 6 量体形成は濃度依存的に起こり, ATP を必要としないことを明らかにした。一方, 変異体を用いた解析から, SPAS-1 の微小管切断活性には, リング状オリゴマーの pore に位置する保存された芳香族残基とその周辺および pore 内部に位置する複数の塩基性残基が重要であることを明らかにした。表面プラズモン共鳴法を用いて, SPAS-1 が酸性残基の豊富な tubulin C 末端ペプチドと特異的に相互作用することを見出した。

[考察] 今回得られた結果をもとに, spastin による微小管切断のモデルを提唱する。(1) SPAS-1 は MTBD を介して微小管と結合し, ATP 非依存的に 6 量体を形成し, (2) リング状オリゴマーの pore 周辺に位置する塩基性残基により tubulin C 末端を認識し, (3) SPAS-1 の ATP 依存的な構造変化により微小管から tubulin が外される。これらのステップが繰り返され, 微小管脱会合が起こる。

[結論] ヒト spastin と SPAS-1 の相同性は高く, SPAS-1 で明らかになる機構が spastin の機能およびヒト疾患発症機序の理解に貢献する可能性は高い。したがって, 本研究で得られた結果は, spastin 遺伝子座に変異をもつ遺伝性痙性対麻痺の病因解明, さらには治療法の開発にも役立つものと考えられる。