

目次

1) 要旨	3
2) 本博士論文に関する発表論文	4
3) 謝辞	5
4) 略語一覧	7
5) 研究の背景と目的	8
5)-1 AAA タンパク質	
5)-2 遺伝性痙性対麻痺	
5)-3 Spastin	
5)-4 線虫の spastin ホモログ	
5)-5 本研究の目的	
6) 実験方法	23
6)-1 株および培地	
6)-2 プラスミド	
6)-3 大量培養によるタンパク質の発現および精製	
6)-4 ATPase 活性の測定	
6)-5 ゲルろ過クロマトグラフィー	
6)-6 <i>In vitro</i> における pull down assay	
6)-7 表面プラズモン共鳴	
6)-8 培養細胞における transfection 実験	
6)-9 免疫抗体染色	
6)-10 NMR 測定	
7) 実験結果	33
7)-1 培養細胞における微小管切断活性の評価	
7)-2 SPAS-1 の特性	
7)-3 SPAS-1 の ATPase 活性	
7)-4 SPAS-1 の微小管結合領域の同定	
7)-5 SPAS-1 N 末端の構造解析	
7)-6 SPAS-1 のオリゴマー形成状態の検討	
7)-7 C 末端 α -helix の解析	
7)-8 Pore の保存された芳香族残基トリプトファンの解析	
7)-9 Pore 周辺の保存された塩基性残基の解析	
7)-10 Pore の塩基性残基 K257 の解析	
8) 考察	55

9) 結語	64
10) 参考文献	65

1) 要旨

[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。

2) 本博士論文に関する発表論文

2)-1 関連論文

1. **Yuka Matsushita-Ishiodori**, Kunitoshi Yamanaka, Hiroshi Hashimoto, Masatoshi Esaki and Teru Ogura, Conserved aromatic and basic amino acid residues in the pore region of *Caenorhabditis elegans* spastin play critical roles in microtubule severing, *Genes Cells*. 14, 925-940, 2009.

2. **Yuka Matsushita-Ishiodori**, Kunitoshi Yamanaka, Teru Ogura, The *C. elegans* homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 157-162, 2007.

2)-2 参考論文

1. Teru Ogura, **Yuka Matsushita-Ishiodori**, Ai Johjima, Masayo Nishizono, Shingo Nishikori, Masatoshi Esaki and Kunitoshi Yamanaka, From common molecular basis of the AAA ATPase to various energy-dependent and independent activities of AAA proteins., *Biochem. Soc. Trans.* 36, 68-71, 2008.

2. 松下由佳, 山中邦俊, 小椋光. 神経疾患と AAA+ 蛋白質. 細胞 (7 月臨時増刊号) 38, 41-44, 2006.

3) 謝辞

本研究で用いた線虫の *spas-1* 欠失変異体は東京女子医大の三谷昌平博士に、cDNA クローンは国立遺伝学研究所の小原雄治博士に分与いただきました。また、熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野の吉田 哲博士（現 慶応大学医学部）には、HEK293 細胞および pcDNA3FLAG ベクターを提供していただきました。

熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野の白木伸明博士には、培養細胞に関する実験技術すべてにおいて、ご指導をいただきました。ここに厚く御礼を申し上げます。

熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野の寺沢宏明教授および吉永壮佐助教には、NMR 測定に関する試料調製からデータ解析に至るすべてにおいて、懇切丁寧なご指導をいただきました。深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、研究その他において大変お世話になりました本研究室の皆様から感謝いたします。

熊本大学発生医学研究所器官構築部門肝臓発生分野の勝賢二郎助教には、表面プラズモン共鳴法の立ち上げに、多大なご協力をいただき、有益なご助言を賜りました。深く感謝いたします。

横浜市立大学の橋本博博士には、コンピューターモデリングをしていただき、有益なご助言を賜りました。ここに厚く御礼を申し上げます。

本研究は、熊本大学発生医学研究所発生制御部門分子細胞制御分野において、小椋光教授および山中邦俊准教授の指導のもと行われたものである。本研究を進めるにあたり、多大なご指導、ご鞭撻をいただきました小椋光教授、懇切丁寧なご指導をいただきました山中邦俊准教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究は文部科学省 21 世紀 COE プログラム「細胞系譜制御研究教育ユニットの構築」およびグローバル COE プログラム「細胞系譜制御研究の国際的人材育成ユニット」の支援を受け、著者は COE ジュニア・リサーチアソシエイトとして雇用され支援を受けました。COE リエゾンラボメンバーの方々には多くのご指導ならびにご助言をいただきました。深く感謝いたします。

さらに本研究は、「発生医学研究所における男女共同参画推進に係る事業」の支援を受けました。深く感謝いたします。

実験を行うにあたり、適切なお指導をいただきました本研究室の諸先輩方、そして六年間の研究生活その他において大変お世話になりました本研究室の皆様に心から感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり経済的援助を惜しむことなく、精神的にも支えとなった両親、家族に深く感謝します。

4) 略語一覧

AAA: ATPases associated with various cellular activities

ADP: adenosine 5'-diphosphate

ATP: adenosine 5'-triphosphate

b: bases

bp: base pairs

BSA: bovine serum albumin

CBB: Coomassie brilliant blue

CD: circular dichroism

DAPI: 4', 6'-diamidino-2-phenylindole

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid

FITC: fluorescein 5-isothiocyanate

FudR: 5-fluorodeoxyuridine

GFP: green fluorescent protein

HSP: hereditary spastic paraplegia

HSQC: heteronuclear single-quantum coherence

IPTG: isopropyl-1-thio- β -galactopyranoside

NMR: nuclear magnetic resonance

NOE: nuclear Overhauser effect

NP-40: Nonidet P-40

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

rpm: revolutions per minute

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis

SRH: second region of homology

アミノ酸 1 文字表記

A = アラニン

E = グルタミン酸

Q = グルタミン

D = アスパラギン酸

N = アスパラギン

L = ロイシン

G = グリシン

K = リジン

S = セリン

V = バリン

R = アルギニン

T = トレオニン

P = プロリン

I = イソロイシン

M = メチオニン

F = フェニルアラニン

Y = チロシン

C = システイン

W = トリプトファン

H = ヒスチジン

5) 研究の背景と目的

5)-1 AAA タンパク質

AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) タンパク質とは、よく保存された約 240 アミノ酸残基からなる ATPase ドメイン (AAA モジュール) を共通に持っており、タンパク質およびその複合体の立体構造をエネルギー依存的に変換する分子シャペロンである (Hanson and Whiteheart, 2005; Ogura and Wilkinson, 2001)。AAA タンパク質は原核生物からヒトに至るまで普遍的に存在し、真核細胞ではほぼ一定の数 (20 数個) 存在することが知られている。図 1 に示すように、それぞれの AAA タンパク質は様々な細胞機能に関与しており、これにちなんで AAA タンパク質と命名された。

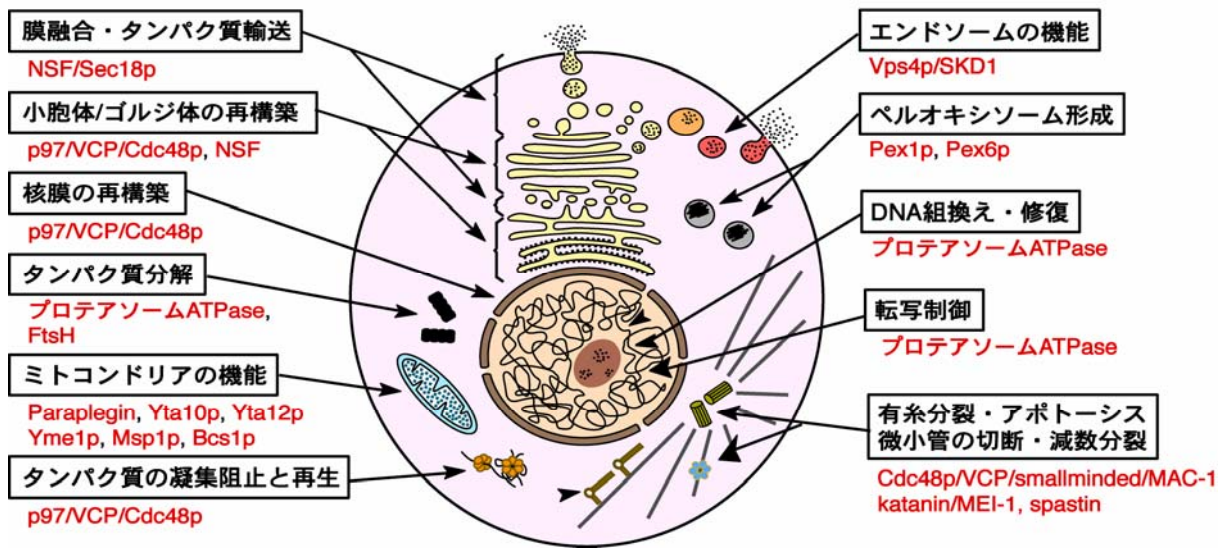


図 1. AAA タンパク質の細胞機能。AAA タンパク質が関与する主な細胞機能を模式的に示す。それぞれの構造の相対的な大きさなどは不正確である。

AAA タンパク質は、John E. Walker らにより提唱された Walker 型 ATPase に分類される (Walker *et al.*, 1982)。Walker 型 ATPase は、多くのヌクレオチド結合タンパク質によく保存された二つのモチーフ Walker A モチーフ: GxxxxGKT/S (x は任意のアミノ酸) および Walker B モチーフ: hhhhDE (h は疎水性アミノ酸) をもっている。Walker A モチーフは ATP の二つのリン酸基と相互作用し ATP を捕捉する働きをもち、Walker B モチーフのアスパラギン酸残基は ATP の β および γ 位のリン酸基に配位する Mg^{2+} と相互作用し、グルタミン酸残基は ATP の加水分解に働く水分子を活性化する (Ogura and Wilkinson, 2001)。すなわち、Walker A モチーフは ATP の結合に、Walker B モチーフは ATP の加水分解に必要である。

AAA タンパク質が他の ATPase と区別される点は、AAA ドメイン内の構造的特徴にある。AAA ドメインは、Walker 型 ATPase の特徴である Walker A, B モチーフの他に、他の ATPase には存在しない約 20 アミノ酸残基からなる SRH (second region of homology) 配列を持っている。

また、AAA ドメインの相同性により 6 つのサブグループに分類される。26S プロテアソームのサブユニット、タンパク質輸送における膜融合過程に働く因子、小胞体およびゴルジ体の再構築に関わる因子、ペルオキシソーム形成因子、減数分裂に関連する因子、メタロプロテアーゼである (図 7 参照)。AAA ドメイン以外の構造により AAA タンパク質の機能の多様性を広げているが、共通してタンパク質またはその複合体のアンフォールディング (unfolding)・脱会合 (disassembly)・脱凝集 (disaggregation) に関与している。したがって、AAA タンパク質、特に AAA ドメインの機能を解明することは、AAA タンパク質の共通分子機能の解明につながると考えられる。さらに近年、AAA タンパク質に起因するヒト疾患・実験動物の発生異常が相次いで報告されていることから、医学的にも注目されているファミリータンパク質である (表 1)。

表 1 ヒト疾患・実験動物の発生異常に関わる AAA タンパク質

Pex1p, Pex6p	ヒト	ペルオキシソーム病	藤木, 2004
spastin	ヒト	遺伝性痙性対麻痺 (常染色体優性遺伝形式)	Hazan <i>et al.</i> , 1999
paraplegin	ヒト	遺伝性痙性対麻痺 (常染色体劣性遺伝形式)	Casari <i>et al.</i> , 1998
p97/VCP	ヒト	骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う家族性封入体筋炎	Watts <i>et al.</i> , 2004
BCS1L	ヒト	複合体 III 欠損症	de Lonlay <i>et al.</i> , 2001
BCS1L	ヒト	GRACILE 症候群	Visapää <i>et al.</i> , 2002
BCS1L	ヒト	Björnstad 症候群	Hinson <i>et al.</i> , 2007
fidgetin	マウス	fidget 変異 (頭部, 特に内耳・眼の発達異常)	Cox <i>et al.</i> , 2000
p97/VCP	マウス	ポリグルタミン凝集体による神経細胞死	Yasuda <i>et al.</i> , 1999
p97/VCP	マウス	アポトーシス	Shirogane <i>et al.</i> , 1999
MAC-1	線虫	アポトーシス (CED-4 結合)	Wu <i>et al.</i> , 1999
ter94/VCP	ショウジョウバエ	ポリグルタミン凝集体による神経細胞死	Higashiyama <i>et al.</i> , 2002
NSF	ショウジョウバエ	comatose (昏睡)	Pallanck <i>et al.</i> , 1995
smid	ショウジョウバエ	Smallminded (中枢神経系の未発達, 細胞分裂異常)	Long <i>et al.</i> , 1998

ヒト疾患に関わる AAA タンパク質として、ペルオキシソーム形成因子である Pex1p と Pex6p はヘテロオリゴマーを形成し、ペルオキシソーム形成におけるペルオキシソームタンパク質のインポート過程に働く Pex5p のエクスポートに関与していることが報告されている (Platta *et al.*, 2005)。これらを欠損するとペルオキシソームを形成できなくなり、ヒトでは Zellweger 症候群などの遺伝病を発症することが知られている (藤木, 2004)。遺伝性痙性対麻痺 (Hereditary spastic paraplegia: HSP) の原因因子として paraplegin と spastin の二つの AAA タン

パク質が同定されている。Paraplegin はミトコンドリアに局在する膜結合型 AAA メタロプロテアーゼであり、これに変異をもつ患者筋の組織化学的解析によりミトコンドリアの呼吸機能不全が観察され、結果として遺伝性痙性対麻痺を発症することが示唆されている (Cassari *et al.*, 1998)。私たちの研究室において線虫の paraplegin ホモログの RNAi 実験を行ったところ、ミトコンドリアの呼吸機能障害を伴う成長阻害が観察された (山田-稲川ら, 未発表)。また、内耳や眼の発達異常や行動異常を示す fidget (落ち着きのない) 変異マウスの原因因子として、fidgetin が同定された (Cox *et al.*, 2000)。さらに p97 に関しては、骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う家族性封入体筋炎の原因因子であることが報告され (Watts *et al.*, 2004)、また私たちの研究室においてもポリグルタミン凝集体を発現させた線虫において、p97/VCP ホモログを共発現させると凝集体が部分的に減少すること、*in vitro* において p97/VCP は凝集体形成を抑制することを報告している (Nishikori *et al.*, 2008; Yamanaka *et al.*, 2004)。BCS1L はミトコンドリア内膜の複合体 III の形成に必要なタンパク質であり、複合体 III 欠損症, GRACILE 症候群, Björnstad 症候群の原因因子であることが報告されている (de Lonlay *et al.*, 2001; Hinson *et al.*, 2007; Visapää *et al.*, 2002)。複合体 III 欠損症および Björnstad 症候群の疾患では、変異 BCS1L タンパク質が、複合体 III の形成を妨げ、ミトコンドリア電子伝達系の活性を低下させることが分かっている。一方、GRACILE 症候群の患者の複合体 III 活性はほぼ正常であることから、BCS1L タンパク質が複合体 III の会合以外にも重要な機能を有することが示唆された。本研究課題である spastin については 5)-3 項に詳述するが、このように AAA タンパク質は様々な重篤な疾患および発生異常に関与している。

5)-2 遺伝性痙性対麻痺

HSP は、遺伝性を有し、進行性の両下肢の痙性と筋力低下を呈し、上位運動ニューロンの変性を主徴とする一群の疾患である。現在までに、34 以上の遺伝子座が報告されており、このうち 17 座については原因遺伝子が同定されている (表 2) (Crosby *et al.*, 2002; Depienne *et al.*, 2007)。細胞接着分子である L1CAM 変異は、性染色体劣性遺伝形式を示す (Jouet *et al.*, 1994)。主に神経系で発現しており、*in vitro* の実験により L1CAM 相互作用が軸索のバンドリングに影響し神経突起の伸長、軸索ガイダンスの過程に関与している可能性が示唆されている。PLP1 (proteolipid protein 1) 変異も L1CAM 変異と同様に、性染色体劣性遺伝形式を示す (Yool *et al.*, 2000)。オリゴデンドロサイトの成熟において主な役割を担っており、ミエリン鞘 (随鞘) の構造的構成成分であることも報告されていることから、軸索への異常なシグナリングが HSP の発症に関与することが示唆されている。Atlastin は、GTPase のダイナミンファミリーに属する (McNiven *et al.*, 2000)。ダイナミンはアクチンや微小管など細胞骨格と相互作用することが知られている (Zhao *et al.*, 2001)。また、ヒト患者で報告されている atlastin 変異は GTPase 活性を欠損し、さらに神経細胞において atlastin を knock-down すると、軸索の形成および伸長が阻害されることが報告されている (Zhu *et al.*, 2006)。興味深いことに、Evans ら (2006) は、

atlastin が spastin と相互作用し、培養細胞において spastin の局在を制御していることを示した。NIPA1 変異は常染色体優性遺伝形式を示す (Rainier *et al.*, 2003)。主に神経細胞で発現が見られ、9 つの膜貫通ドメインをもつ膜輸送体、あるいは受容体である。ごく最近、ショウジョウバエおよびヒトにおいて、NIPA1 が BMP シグナル伝達を阻害することが報告されており、BMP シグナル伝達が軸索伸長および誘導を制御していることから、軸索の変性が疾患発症の原因であることが示唆されている (Wang *et al.*, 2007; Tsang *et al.*, 2009)。KIAA0196 変異は常染色体優性遺伝形式を示す (Valdmanis *et al.*, 2007)。ゼブラフィッシュにおいて KIAA0196 を knock-down すると、短く異常な分岐を示す運動ニューロンが観察されたが (Valdmanis *et al.*, 2007)、詳細な疾患発症メカニズムについては明らかになっていない。神経特異的キネシンである KIF5A も、HSP 原因因子として同定された (Reid *et al.*, 2002)。KIF5A は、ATP 依存的に微小管上を移動し、積荷を輸送するキネシンスーパーファミリーに属する分子モーターである。運動ニューロンに豊富に存在しており、神経系において前向性の軸索輸送にかかわっていることが知られている。HSP を発症するすべての KIF5A の変異体は、微小管への結合能あるいはキネシンの運動性を欠損しており、結果として積荷の輸送効率が低下し、シナプスへの供給が不足することが示されている (Ebbing *et al.*, 2008)。HSP60 は、paraplegin と同様にミトコンドリアに局在するシャペロン分子として同定された (Hansen *et al.*, 2002)。Bross ら (2008) は、ヒト患者で報告されている HSP60 変異体が ATPase 活性および folding 活性を欠損することを示した。Spartin については、アミノ酸配列の相同性より、atlastin や KIF5A と同じように、微小管と相互作用すると考えられている (Ciccarelli *et al.*, 2003)。一方で、NIPA1 と同様に、BMP シグナル伝達の阻害剤として働くことも報告されている (Tsang *et al.*, 2009)。Maspardin 変異は常染色体劣性遺伝形式を示す (Simpson *et al.*, 2003)。ごく最近、アルデヒド脱水素酵素である ALDH16A1 が相互作用因子として同定されたが、HSP 発症における相互作用の意義は明らかになっていない (Hanna and Blackstone, 2009)。REEP1 についても、ミトコンドリアに局在する HSP 原因因子として同定されたが (Züchner *et al.*, 2006)、疾患発症メカニズムについては明らかになっていない。Protrudin は主に、脳、脊髄などの中枢神経系で高発現しており、神経突起の形成に必要な因子であることが報告されている (Shirane and Nakayama, 2006)。Protrudin が GDP 結合型 Rab11 と結合し、神経突起形成部位への細胞膜成分のリサイクル輸送が促進されることから、protrudin 変異が膜輸送の異常を引き起こし、疾患を発症すると考えられている。CYB7B1, spatascin, seipin および saccin については、詳細な細胞内機能が明らかになっていないため、疾患発症メカニズムに関する知見は得られていない (Depienne *et al.*, 2007)。

以上の知見から、図 2 に示すような疾患発症機構が考えられている (Casari *et al.*, 2001)。しかしながら、それぞれの異常が神経変性を導くメカニズムは未だ明らかになっていない。

表 2 HSP の分類

遺伝子	遺伝子座	遺伝形式	臨床型*1	タンパク質
L1CAM (SPG1)	Xq28	性染色体劣性遺伝性	複合型	L1CAM
PLP1 (SPG2)	Xq28	性染色体劣性遺伝性	複合型 (まれに純粋型)	PLP1
SPG3A	14q11-q21	常染色体優性遺伝性	純粋型	Atlastin
SPG4	2p22	常染色体優性遺伝性	純粋／複合型	Spastin
SPG5A	8q	常染色体劣性遺伝性	純粋型	CYB7B1
SPG6	15q11.1	常染色体優性遺伝性	純粋型	NIPA1
SPG7	16q24.3	常染色体劣性遺伝性	純粋／複合型	Paraplegin
SPG8	8q23-q24	常染色体優性遺伝性	純粋型	KIAA0196
SPG9	10q23.3-q24.2	常染色体優性遺伝性	複合型	
SPG10	12q13	常染色体優性遺伝性	純粋型	KIF5A
SPG11	15q13-q15	常染色体劣性遺伝性	純粋型	Spatacsin
SPG12	19q13	常染色体優性遺伝性	純粋型	
SPG13	2q24-q34	常染色体優性遺伝性	純粋型	HSP60
SPG14	3q27-q28	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG15	14q22-q24	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG16	Xq11.2	性染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG17	11q12-q14	常染色体優性遺伝性	複合型	Seipin
SPG19	9q33-q34	常染色体優性遺伝性	純粋型	
SPG20	13q12.3	常染色体劣性遺伝性	複合型	Spartin
SPG21	15q21q22	常染色体劣性遺伝性	複合型	Masparidin
SPG23	1q24-q32	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG24	13q14	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG25	6q23-q24.1	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG26	12p11.1-q14	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG27	10q22.1-q24.1	常染色体劣性遺伝性	純粋／複合型	
SPG28	14q21.3-q22.3	常染色体劣性遺伝性	純粋型	
SPG29	1q31.1-21.1	常染色体優性遺伝性	複合型	
SPG30	2q37.3	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPG31	2p12	常染色体優性遺伝性	純粋型	REEP1
SPG32	14q14-q21	常染色体劣性遺伝性		
SPG33	10q24.2	常染色体優性遺伝性	純粋型	Protrudin

SPG35	16q21-q23	常染色体劣性遺伝性		
SPG37	8p21.1-q13.3	性染色体優性遺伝性	純粋型	
SAX1	12p13	常染色体優性遺伝性		
SAX2	17p	常染色体劣性遺伝性	複合型	
SPOAN	11q31	常染色体劣性遺伝性	複合型	
ARSACS	13q	常染色体劣性遺伝性	複合型	Sacsin
ARSAL	2q	常染色体劣性遺伝性	複合型	

*1 臨床型は、両下肢の痙性麻痺と筋力低下を主症状とする純粋型と痙性対麻痺に加え、錐体外路症状、精神発達遅延、小脳失調、末梢神経障害、網膜色素変性症などの神経学的異常を伴う複合型に分類される。

*2 Depienne ら (2007) の報告以降、さらに数ヶ所の遺伝子座が追加されたが、本表では省略する。

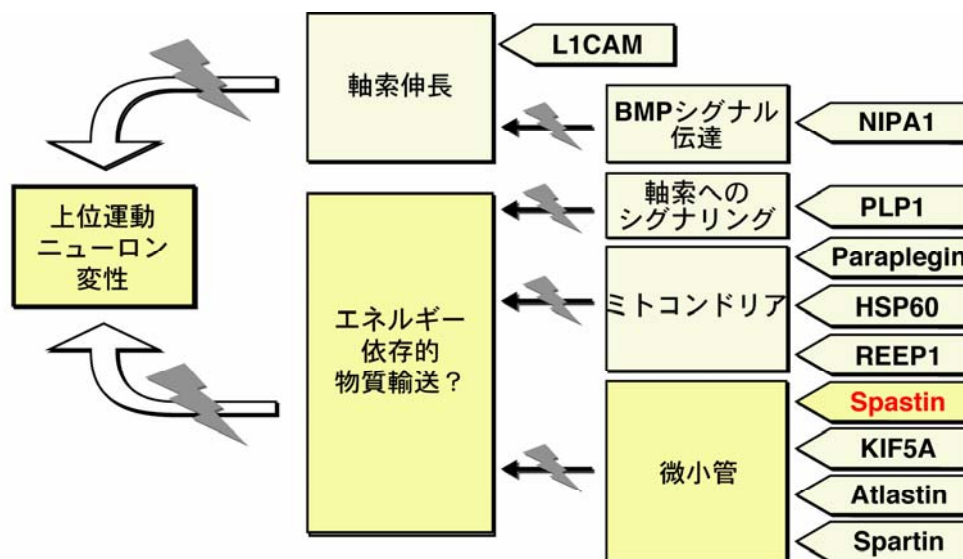


図 2. 遺伝性痙性対麻痺における原因因子から神経変性に至る経路の模式図 (Casari *et al.*, 2001 を改変)。Spastin は微小管と相互作用し微小管ダイナミクスに関与することが報告されている。

5)-3 Spastin

ヒト疾患において、二点連鎖解析により患者の染色体を調べた結果、SPG4 は 2p22 に位置することが明らかになり (Raskind *et al.*, 1997), さらに BAC clone を用いて本領域の塩基配列を決定したところ、すでに HSP の原因因子として報告されていた paraplegin (Casari *et al.*, 1998) と同じ AAA ドメインをもつ ORF の存在が明らかになった (Hazan *et al.*, 1999)。そこで Hazan ら (1999) は、この ORF に着目し、健常者ならびに SPG4 患者試料の塩基配列を決定した。その結果、患者試料のみに変異が存在することを明らかにし、paraplegin と同じ AAA ドメインをもつ本 ORF が SPG4 の原因因子であることを示し、spastin と名付けた。

Spastin 変異は常染色体優性遺伝形式を示し、HSP の患者の約 40%が spastin の遺伝子に変異

を持つことが報告されている (Fonknechten *et al.*, 2000)。正常なヒトおよび患者のリンパ芽球 cDNA の解析により, missense, nonsense, frameshift, splicing mutation, exon skipping など様々な種類の変異が同定されているが, AAA ドメイン内の変異が最も多い。また, 血液リンパ球から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行った結果, ヒト患者では spastin の発現量が健常者のほぼ半量になっていたことから, spastin 遺伝子に変異が起こるとタンパク質そのものが発現しなくなり病気が発症するハプロ不全であることが報告されている (Burger *et al.*, 2000)。また, 近年, マウスおよびショウジョウバエの神経系において高いレベルで発現が認められている (Charvin *et al.*, 2003, Trotta *et al.*, 2004)。

5)-3-1 Spastin の機能

ヒト spastin の遺伝子モデルおよびタンパク質モデルを図 3 に示す。ヒト spastin は 17 のエクソンからできている。616 アミノ酸残基からなり, C 末端側に AAA ドメインをもつ (図 3)。また, N 末端側には, 疎水性アミノ酸残基が豊富な疎水性ドメイン, 微小管相互作用および細胞内輸送 (Microtubule interacting and trafficking: MIT) ドメインならびに微小管結合ドメイン (microtubule binding domain: MTBD) が存在する。



図 3. ヒト spastin タンパク質の概略図。49-80 アミノ酸残基, 疎水性ドメイン (青); 116-194 アミノ酸残基, MIT ドメイン (緑); 270-328 アミノ酸残基, MTBD (水色); 342-599 アミノ酸残基, AAA ドメイン (赤)。

Spastin についての研究の初期段階は, 主にヒト培養細胞を用いた研究によって進められた。Errico ら (2002) は, spastin が微小管切断活性を示す katanin と同じサブグループに含まれることに着目した。彼女らは培養細胞においてヒト spastin を過剰発現させると, 微小管が消失するという免疫抗体染色の結果を示し, spastin の微小管切断活性を提唱した。また, N 末端領域および AAA ドメインを欠損した spastin を導入した細胞抽出液を用いた分画実験により, spastin の N 末端領域が微小管との相互作用に関与していることを示した。同時に, ヒト患者由来の変異をもつ spastin を発現させると, 微小管のバンドル形成が誘導されることを示し, ヒト HSP 患者で同定された spastin 遺伝子の変異が dominant negative である可能性を示唆した (Errico *et al.*, 2002)。その後, Trotta ら (2004) はショウジョウバエを用いて, RNAi により神経系の spastin 発現を特異的にノックダウンすると, ショウジョウバエの歩行運動能力が乏しくなること, さらにニューロン軸索末端において, 微小管の集積→シナプスエリアの減少→シナプス電流電圧振幅の増加を見出した。これらのことから, spastin 変異が微小管機能への影響により神経伝達における欠損を導くことを提唱した。その後さらに, W. Yu ら (2008) は, ラット神経培養細胞を用いて, spastin を過剰発現させると軸索の分岐形成が促進されること

を示した。このことから、spastin 変異が軸索周辺の微小管切断能の欠損を引き起こし、異常な軸索が形成されることにより、HSP が発症すると考えられた。一方、Roll-Mecak ら (2005)、Evans ら (2005) は、それぞれショウジョウバエ、ヒト spastin のリコンビナントタンパク質を用いて、*in vitro* における微小管切断活性を示した (図 4)。ごく最近では、ATP 依存的な微小管切断活性と ATP 非依存的なバンドル形成活性の二つの異なる活性が報告された (Salinas *et al.*, 2005)。彼らは、リコンビナントタンパク質を用いて、*in vitro* における微小管の形態観察および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行い、spastin 非存在下ではバンドルが形成されないのに対し、spastin を加えるとバンドルを形成し、さらにそれが ATP 加水分解非依存的に起こっていることを示した。これらの結果は、Errico ら (2002) の研究において、ATPase 活性を示さない spastin 変異体で微小管のバンドル形成が観察されることと一致する。

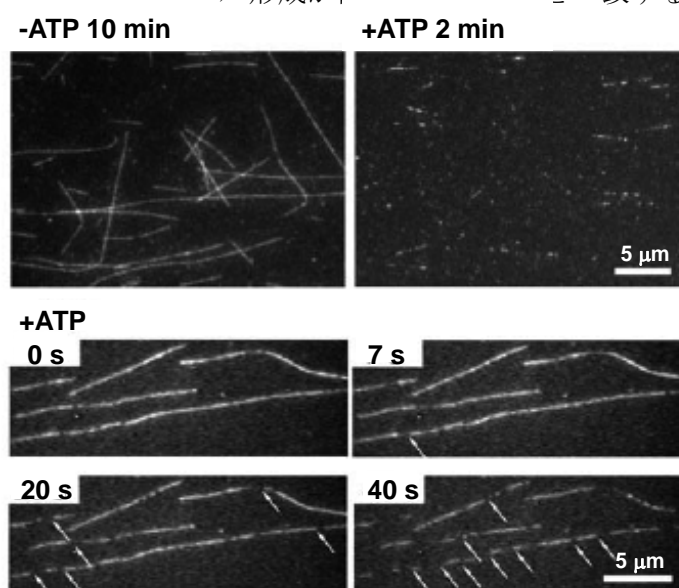


図4. 精製したショウジョウバエspastinの微小管切断活性の可視化 (Roll-Mecak *et al.*, 2005)。ローダミンが付加されたtubulinを重合した微小管をtaxolで安定化し、そこへショウジョウバエのリコンビナントGST-spastinを添加し、1 mM ATP存在下における微小管形態の経時的変化を蛍光顕微鏡により観察した (下図)。矢印は微小管の切断箇所を表す。左上はATP非存在下における10分後の微小管の形態、右上は1 mM ATP存在下における2分後の微小管の形態を示す。

一方、AAA タンパク質の細胞内における多様な機能は、基質やアダプタータンパク質との相互作用部位である N 末端領域に依存することから、spastin についても N 末端領域のドメインの解析が進められている。Cicarelli ら (2003) は、アミノ酸配列の解析により、spastin の N 末端領域 (116-194a.a.) に MIT ドメインが存在することを示した。Spastin と同じサブグループに含まれ、エンドソームの輸送に関わる AAA タンパク質 SKD1 (Yoshimori *et al.*, 2000) も MIT ドメインをもっている。Reid ら (2005) は、spastin と相互作用する因子として、yeast two-hybrid 法によりエンドソームのタンパク質である CHMP1B を同定した。さらに、これらが spastin の MIT ドメインで相互作用していることを示し、膜輸送における役割を提唱した。

しかしその後、CHMP1Bを含む複数のエンドソームタンパク質で構成される ESCRT タンパク質複合体が、細胞質分裂の際に現れる midbody に局在することが明らかとなり (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita *et al.*, 2007), さらに Connell ら (2009) によって、spastin が MIT ドメインを介して (おそらく CHMP1B を介して) midbody に局在し、midbody 周辺の微小管を切断することが示された。

一方、Errico ら (2004) により、spastin と相互作用する因子として、中心体タンパク質である NA14 が同定された。彼女らは、Ciccarelli らの提唱する MIT ドメインとは異なる 49-80a.a. 領域 (疎水性ドメイン) を欠損させると、spastin は NA14 に結合しなくなり、微小管との相互作用もなくなることを示した。他方、Roll-Mecak ら (2005) は、ショウジョウバエの spastin を S2 細胞で発現させ免疫抗体染色を行った結果、全長 spastin が微小管および細胞質中の小胞に局在するのに対し、疎水性ドメインを欠損させた変異 spastin はサイトゾルに拡散することを示した。しかし、疎水性ドメインを欠失させても微小管の消失が見られたことや、疎水性ドメインを欠失するとともに AAA ドメインにも変異をもつ spastin は微小管へ局在することから、Errico ら (2004) の結果とは対照的に、微小管との相互作用には疎水性ドメインは必要でないことを示した。

White ら (2007) は、MIT ドメインと AAA ドメインの間の領域 (270-328 a.a.) を欠損させると、培養細胞における微小管切断活性が消失することを示し、この領域を微小管結合ドメイン (MTBD) と命名した。さらにごく最近、spastin の相互作用因子として小胞体タンパク質 RTN1 が同定された (Mannan *et al.*, 2006)。RTN1 は神経伝達系で特異的に発現していることから、spastin 変異によるシナプス小胞輸送の異常が神経軸索変性を引き起こし、HSP を発症している可能性も提唱されている。このように、N 末端領域のドメイン解析においても様々な見解があり、正確なドメイン機能の解明には至っていない。

以上のように、spastin に関する研究は、近年めざましく進んでいるが、その詳細な機能および分子メカニズムについてはまだ不明な点が多い。

5)-3-2 Spastin の構造

最近、Roll-Mecak ら (2008) は、ショウジョウバエ spastin の AAA ドメインの立体構造を X 線結晶回折法により決定した (図 5)。他の AAA タンパク質の構造とよく似て、spastin の AAA ドメインの中心もヌクレオチド結合ドメイン (α/β nucleotide-binding domain: NBD) と四本の helix を含むドメイン (smaller four-helix bundle domain: HBD) から成る。一方、NBD を囲むように位置している N 末端および C 末端の helix (それぞれ $\alpha 1$, $\alpha 11$) は、spastin に特有の構造である。

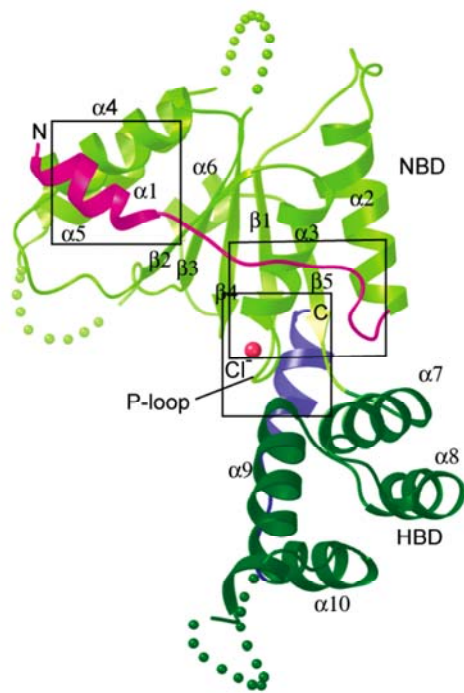


図 5. ショウジョウバエ spastin の AAA ドメインの立体構造 (Roll-Mecak and Vale, 2009)。黄緑色は NBD, 緑色は HBD, マゼンタは spastin に特有の N 末端 helix / loop, 青は spastin を含むサブグループに特有の C 末端 helix を示す。

一方, N 末端については, spastin と同じサブグループに属する Vps4 の MIT ドメインの立体構造が NMR 解析により決定された (Scott *et al.*, 2005b, Takasu *et al.*, 2005)。その構造は, 3 本の α -helix ($\alpha 1 \sim 3$) がバンドルを形成したものであった。その後, Stuchell-Brereton ら (2007) は NMR 解析により, Obita ら (2007) は結晶構造解析により, Vps4 の MIT ドメインと基質である CHMP1B の C 末端領域の結合状態の立体構造を明らかにした。ここでは, ごく最近 Yang ら (2009) が明らかにした, ヒト spastin の MIT ドメインと CHMP1B の C 末端領域の結合状態の立体構造を図 6 に示す。

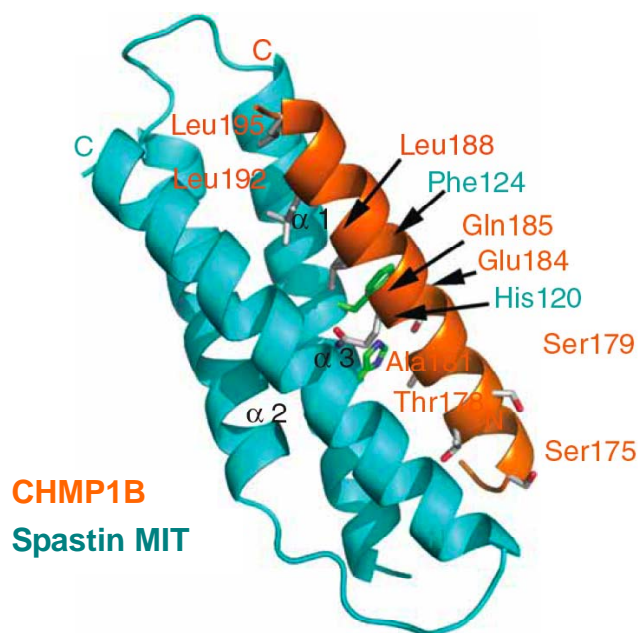


図 6. ヒト spastin-CHMP1B の立体構造 (Yang *et al.*, 2009)。水色は spastin, 橙色は CHMP1B を示す。

5)-4 線虫の spastin ホモログ

線虫の体は卵から成虫までほぼ透明なため、微分干渉顕微鏡を用いることにより生きたまま細胞レベルの観察ができる。さらに筋肉、消化管、神経系など、動物の基本的な構造をすべて持っており、全細胞系譜、神経回路網および塩基配列が同定されているため、遺伝性痙性対麻痺のような神経変性疾患の解析に適している。また世代交代が3日と多細胞モデル生物の中では最も短く、多数の個体について統計的解析ができるなどの利点もあり、疾患モデル生物として確立することが出来れば、spastin 遺伝子の変異に起因する遺伝性痙性対麻痺の病因・病態解明および治療薬・治療法の開発に最も早く到達できる。

線虫には、図7に示す通り、25種類のAAAタンパク質が同定されている。また、前述のように6つのサブグループに分類されている。

C24B5.2は451アミノ酸残基からなり、C末端側にAAAドメインをもつ構造をとっている(図7)。C24B5.2はヒトspastinと最も近いところに位置づけられていることから、線虫のspastinホモログであると考えられ、SPAS-1と命名された(図8)。SPAS-1とヒトspastinのアミノ酸配列は、C末端領域、特にAAAドメインで相同性が高い(図9)。ヒトやマウス、ショウジョウバエにおいては、MITドメインの相同性が認められるのに対し、SPAS-1ではMITドメインに相当する領域の相同性が認められない(図9)。また、MITドメインより前の疎水性ドメインを含むN末端領域も欠失している。さらに、MTBDは生物種間でアミノ酸配列の相同性が低い領域である。

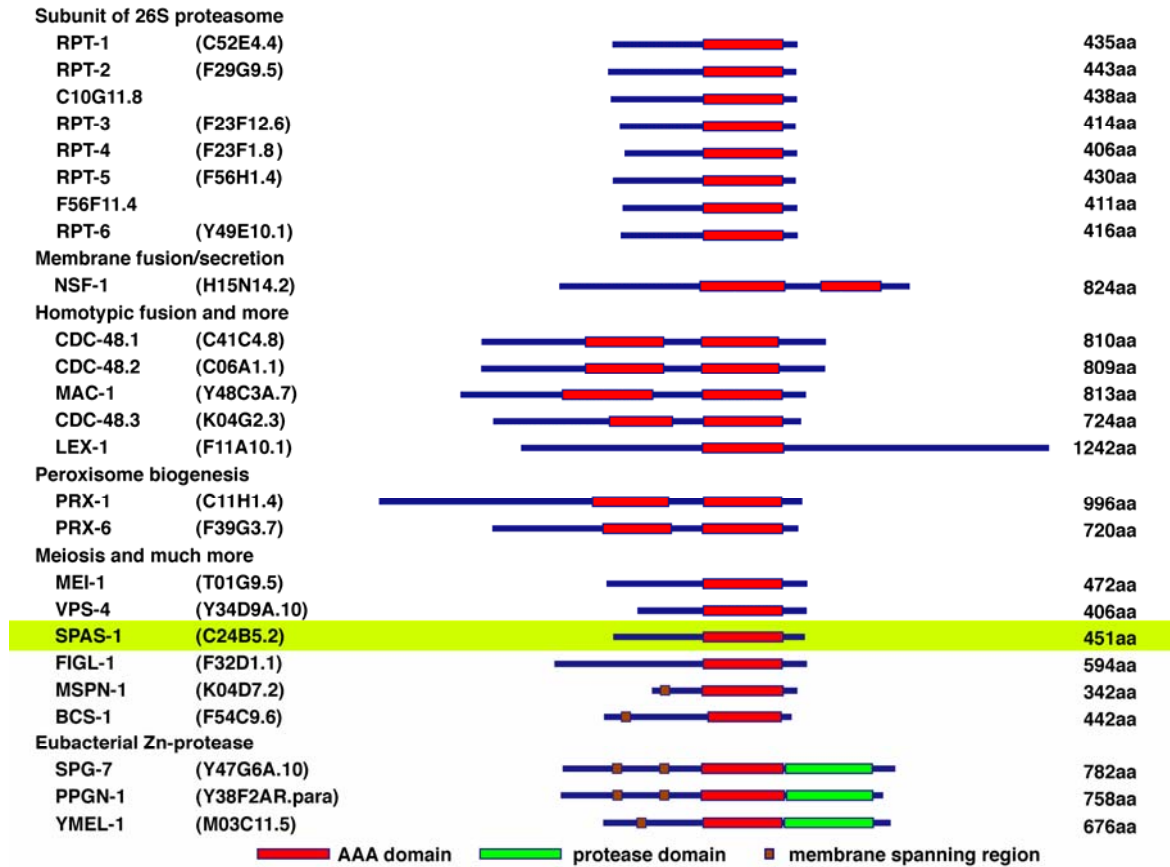


図 7. 線虫の AAA タンパク質。線虫では、25 種類の AAA タンパク質が同定されている。

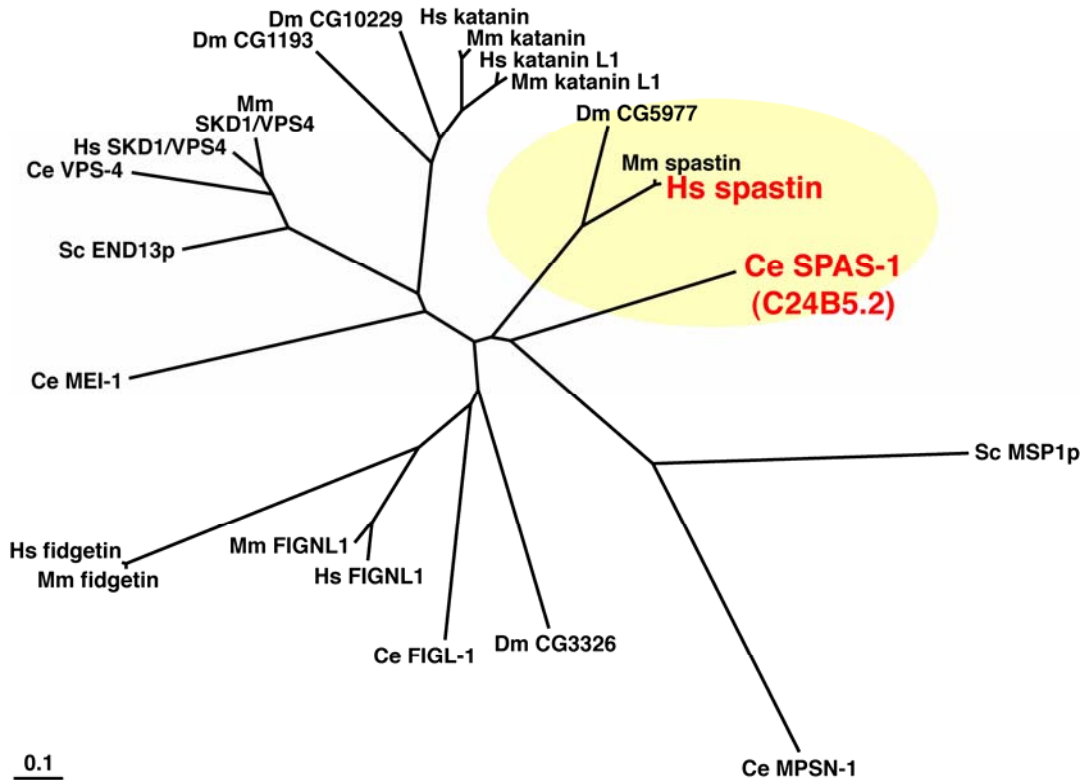


図 8. SPAS-1 を含むサブグループの系統樹。線虫 SPAS-1 はヒト spastin と最も近いところに位置づけられる。

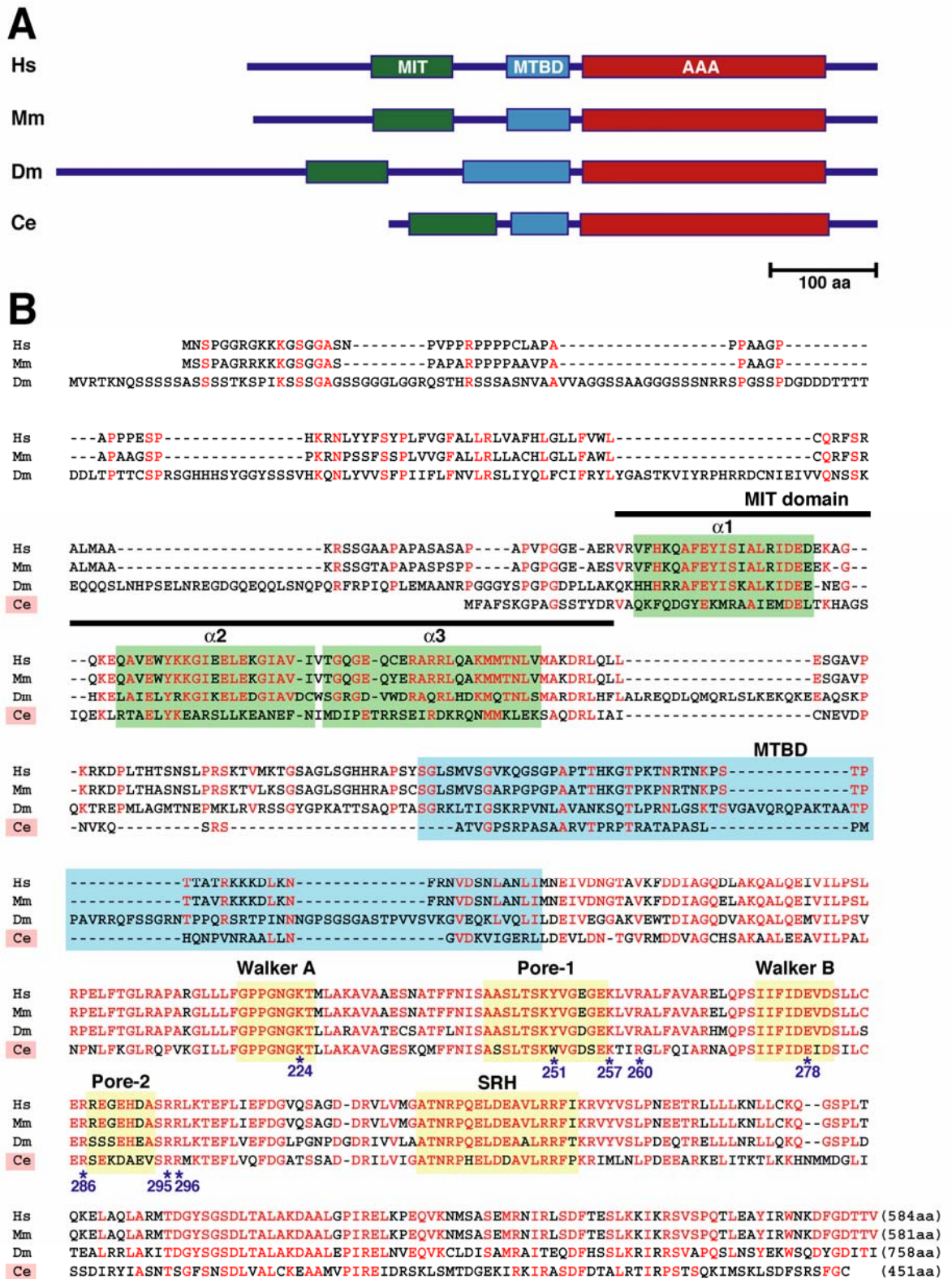


図 9. 各生物種における spastin ホモログのアミノ酸配列の相同性。保存性の高い残基は赤で示した。

Hs, ヒト spastin; Ms, マウス spastin; Dm, ショウジョウバエ spastin; Ce, 線虫 spastin。

私は、線虫 *spastin* ホモログ *spas-1* 欠失変異体 (Δ *spas-1* 株) において、統計学的に有意な産卵数の減少や成長遅延および卵母細胞の形成異常や多陰門といった表現型が観察されることを示した。一方、線虫抽出液を用いて発現解析を行ったところ、SPAS-1 には時期特異的選択的スプライシングにより、exon 4 が有るものと無いもの 2 種類の産物が存在し、exon 4 が有るものは胚時期に特異的に発現していることを見出した (図 10)。これらの結果から、SPAS-1 は発生、特に卵母細胞形成過程において重要な役割を担っていることが示唆された (Matsushita-Ishiodori *et al.*, 2007)。

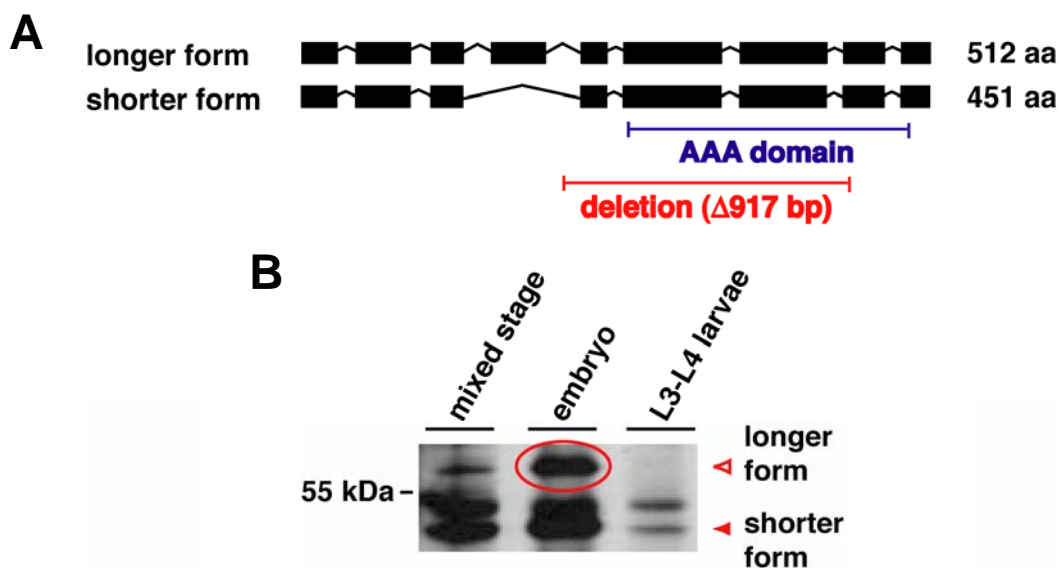


図 10. SPAS-1 の発現解析結果。A) 選択的スプライシングにより産出される二種類の *spas-1* 産物。B) Western blotting による各成長段階における SPAS-1 の発現解析結果。Mixed stage, 胚時期および L3-L4 幼虫に分けて線虫を回収し、Western blotting を行った。

さらに、線虫の初期胚における微小管の観察を行った結果、 Δ *spas-1* 株では中心体領域において微小管の集積が見られた (図 11)。これは、 Δ *spas-1* 株では微小管切断活性をもつ SPAS-1 を欠失しているため、微小管が切断されなくなったためであると考えられる。これら一連の結果をまとめると、線虫においても、ヒトと同じように、*spastin* が微小管切断にかかわっている可能性が示唆された (Matsushita-Ishiodori *et al.*, 2007)。

SPAS-1 と同じサブグループには、微小管切断活性をもつ *katanin* のホモログ T01G9.5 (MEI-1), *fidget* 変異マウスの原因因子として同定された *fidgetin* のホモログ F32D1.1 (FIGL-1) などがある (図 7)。これらは、構造的にも機能的にも多様性が見られることから「減数分裂 / その他」に分類され、今後機能解析が期待されるサブグループである。

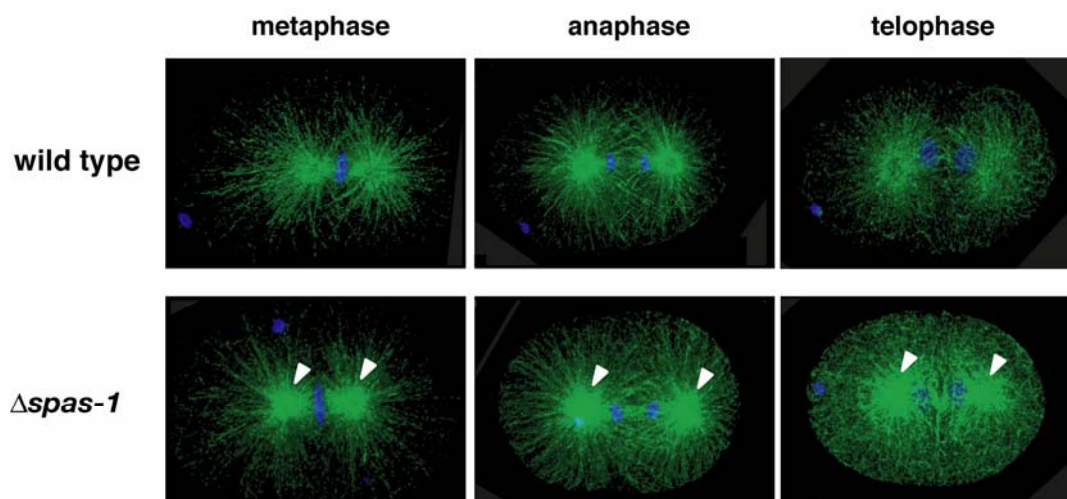


図 11. 免疫抗体染色による線虫初期胚の微小管の観察 (Matsushita-Ishiodori *et al.*, 2007)。Anti- α -tubulin 抗体 (緑) を用いて、野生型および $\Delta spas-1$ 株の免疫抗体染色を行った。なお、染色体は DAPI (青) により染色を行った。

5)-5 本研究の目的

本研究では、spastin による微小管切断の分子メカニズムに関する知見を得るため、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。具体的な検討項目を以下に記載する。

- (1) *In vivo* における微小管切断活性の評価系の構築
- (2) 精製した野生型および変異型 SPAS-1 を用いた各種生化学的的特性の評価
- (3) NMR 解析を用いた SPAS-1 N 末端領域の構造解析
- (4) SPAS-1 の微小管切断の機能に重要な残基の同定

6) 実験方法

6)-1 株および培養

6)-1-1 大腸菌

本研究で使用した菌株を表 3 に示した。N 末端に His₆ タグが付加された産物産生の際には BL21(DE3)株, その他においては XL1-Blue 株を用いた。

大腸菌の培養には, 基本的に L 培地 (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.4) を使用した。薬剤耐性マーカーによる選択のために, 必要に応じて 50 µg/ml アンピシリンを培養液に添加した。*lac* プロモーターとその派生プロモーターからの転写誘導のために, IPTG を培養液に添加した。

表 3 本研究で使用した株

菌株	遺伝子型
XL1-Blue	<i>hsdR17, supE44, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac/F'</i> [<i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15::Tn10 (<i>tet</i> ^r)]
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B</i> (<i>r_Bm_B</i> ⁻), <i>gal</i> (<i>λ cI857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1, dcm</i> (DE3))

6)-1-2 ヒト腎臓由来 HEK293 細胞

ヒト腎臓由来 HEK293 細胞は吉田 哲博士 (熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野) に分与いただいた。細胞の培養には, DMEM 培地 [10% FBS (Hyclone), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Invitrogen)] を使用した。

6)-2 プラスミド

本研究で使用したプラスミドを表 4 に示した。また, それぞれのプラスミドを作製するのに用いたプライマーを表 5 に示した。N 末端に His₆ タグを付加したコンストラクトを作製するためのベクター pET15b, N 末端に GST タグを付加したコンストラクトを作製するためのベクター pGEX-6P-3 は, それぞれ Novagen 社および GE ヘルスケア バイオサイエンス社から購入した。また, N 末端に FLAG タグを付加した培養細胞発現用コンストラクトを作製するためのベクター pcDNA3FLAG は吉田 哲博士 (熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野) に分与いただいた。

表4 本研究で使用した *spas-1* 関連プラスミド

プラスミド	由来	特徴	出典
pCKX1222	pBluescript II SK(+)	アンピシリン耐性: yk735e10 由来 SPAS-1 cDNA	山中
pCKX1030	pET15b	アンピシリン耐性: yk479e10 由来 MEI-1 cDNA	山中
pCKX1046	pET15b	アンピシリン耐性: yk61d2 由来 FIGL-1 cDNA	山中
pCKX1161	pET15b	アンピシリン耐性: yk1312f11 由来 Vps4 cDNA	山中
pCKX1230	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged exon4 (-) SPAS-1 発現用	山中
pCKX1023	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged exon4 (+) SPAS-1 発現用	山中
pCKX6036	pET15b	アンピシリン耐性: K224R 変異をもつ His ₆ -tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6037	pET15b	アンピシリン耐性: E278Q 変異をもつ His ₆ -tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6051	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6062	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K224R 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6070	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: E278Q 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6065	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: FLAG-tagged MEI-1 発現用	本研究
pCKX6066	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: FLAG-tagged FIGL-1 発現用	本研究
pCKX6067	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: FLAG-tagged Vps4 発現用	本研究
pCKX6025	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 (1-210) 発現用	本研究
pCKX6033	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 (1-152) 発現用	本研究
pCKX6032	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 (1-103) 発現用	本研究
pCKX6099	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 (115-172) 発現用	本研究
pCKX6042	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: FLAG-tagged SPAS-1 ΔMIT (17-100) 発現用	本研究
pCKX6043	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: FLAG-tagged SPAS-1 ΔMTBD (115-165) 発現用	本研究
pCKX6139	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 (1-152) 発現 NMR 測定用	本研究
pCKX6124	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 (1-172) 発現 NMR 測定用	本研究
pCKX6126	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 (1-182) 発現 NMR 測定用	本研究
pCKX6111	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: FLAG-tagged SPAS-1 ΔC-term (1-432) 発現用	本研究
pCKX6146	pET15b	アンピシリン耐性: His ₆ -tagged SPAS-1 ΔC-term (1-432) 発現用	本研究
pCKX6063	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: W251A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6079	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: W251E 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6080	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: W251K 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6085	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: W251F 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6038	pET15b	アンピシリン耐性: W251A 変異をもつ His ₆ -tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6077	pET15b	アンピシリン耐性: W251E 変異をもつ His ₆ -tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6078	pET15b	アンピシリン耐性: W251K 変異をもつ His ₆ -tagged SPAS-1 発現用	本研究

pCKX6081	pET15b	アンピシリン耐性: W251F 変異をもつ His ₆ -tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6112	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: R176A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6113	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K205A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6114	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K236A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6094	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6106	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: R260A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6107	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: R267A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6121	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: R286A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6122	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: R295A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6123	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: R296A 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6136	pGEX-6P-3	アンピシリン耐性: GST-tagged TBA-1 (428-449) 発現用	本研究
pCKX6090	pET15b	アンピシリン耐性: K257A 変異をもつ His ₆ -tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6129	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257R 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6130	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257E 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6131	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257Q 変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6128	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257A/W251A 二重変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6132	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257A/R260A 二重変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6133	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257A/R286A 二重変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6134	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257A/R295A 二重変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究
pCKX6135	pcDNA3FLAG	アンピシリン耐性: K257A/R296A 二重変異をもつ FLAG-tagged SPAS-1 発現用	本研究

* 括弧内はアミノ酸の残基数を示す。

表 5 本研究で使用したプライマー

プライマー	塩基配列	出典
6051-5'	5'-GCCCCGCTAGCTTCGCCTTTTCAAAGGTCCCG-3'	本研究
6051-3'	5'-GCCCCGCTAGCTTAGCAACCGAAACTTCG-3'	本研究
6065-5'	5'-GCCCTCTAGAAATGGGGATGTGCAGTCAGTCATTCG-3'	本研究
6065-3'	5'-GCCCTCTAGATTACATGGCACCAAAAGAGTCACACC-3'	本研究
6066-5'	5'-GCCCTCTAGATATTCTCCAAAACGGGTAAACTCAATGTGACC-3'	本研究
6066-3'	5'-GCCCTCTAGATCAACGGGATATTGAAGGAGGTGG-3'	本研究
6067-5'	5'-GCCCTCTAGATCGGTTCCGGCACTTCAGAAGGCC-3'	本研究
6067-3'	5'-GCCCTCTAGATTATTCCTGTCCATCCTGTCCG-3'	本研究
6025-5'	5'-CCAATCATATGATGTTTCGCCTTTTCAAAGGTCCCGCCGG-3'	本研究
6025-3'	5'-CCAATGGATCCAGGCTGCCGAAGTCCTTTGAATAAG-3'	本研究
6033-3'	5'-CCGATGGATCCTGCAGCTCGATTTACTGGATTCTGATGC-3'	本研究
6032-3'	5'-CCGGCGGATCCATTACAAATTGCAATGAGTCTATCCTGAGCGC-3'	本研究
6099-5'	5'-CCGGTCATATGGCTACAGTTGGACCGTCACGACC-3'	本研究
6099-3'	5'-CCGATGGATCCGTTGTCAAGAACCCTCGTCTAGTAAACG-3'	本研究
6139-5'	5'-CCAATCATATGTTTCGCCTTTTCAAAGGTCCCGCCGG-3'	本研究
6139-3'	5'-CCGATGGATCCTTATGCAGCTCGATTTACTGGATTCTGATGC-3'	本研究
6124-3'	5'-CCGATGGATCCTTAGTTGTCAAGAACCTCGTC-3'	本研究
6126-3'	5'-CCGATGGATCCTTATCCGGCAACATCATCCATCCG-3'	本研究
6111-3'	5'-GCCCCGCTAGCTTATGGTCTGATTGTGCGCAATGC-3'	本研究
6146-3'	5'-CCGATGGATCCTTATGGTCTGATTGTGCGCAATGC-3'	本研究
6136-5'	5'-GCCCCGGATCCATGAAGGACTACGAAGAGGTCCG-3'	本研究
6136-3'	5'-GCCCCGCGCCGCTTTAATACTCTTCTCCTTCC-3'	本研究

pCKX6051 は, SPAS-1 の N 末端に FLAG を融合した培養細胞発現用コンストラクトである。pCKX1222 を鋳型として, 6051-5' と 6051-3' をプライマーとして用いて PCR を行い, 得られた PCR 産物を *NheI* で処理後, pcDNA3FLAG ベクターの *XbaI* サイトに挿入した。

pCKX6065, pCKX6066 および pCKX6067 は, それぞれ N 末端に FLAG を融合した MEI-1, FIGL-1 および VPS4 のコンストラクトである。pCKX1030, pCKX1046 および pCKX1161 を鋳型として, 6065-5' と 6065-3', 6066-5' と 6066-3' および 6067-5' と 6067-3' をプライマーとして用いて PCR を行い, *XbaI* 処理後, pcDNA3FLAG ベクターの *XbaI* サイトに挿入した。

pCKX6036, pCKX6037, pCKX6038, pCKX6077, pCKX6078, pCKX6081 および pCKX6090 は, それぞれ N 末端に His₆ が付加された SPAS-1 の K224R (AAA→AGA), E278Q (GAA→CAA), W251A (TGG→GCG), W251E (TGG→GAG), W251K (TGG→AAG), W251F (TGG→TTT) および K257A (AAA→GCA) 変異体のタンパク質発現用コンストラクトである。また, pCKX6062, pCKX6070, pCKX6063, pCKX6079, pCKX6080, pCKX6085, pCKX6112, pCKX6113, pCKX6114, pCKX6094, pCKX6106, pCKX6107, pCKX6121, pCKX6122, pCKX6123, pCKX6129, pCKX6130, pCKX6131, pCKX6128, pCKX6132, pCKX6133, pCKX6134 および pCKX6135 は, それぞれ N 末端に FLAG が付加された SPAS-1 の K224R (AAA→AGA), E278Q (GAA→CAA), W251A (TGG→GCG), W251E (TGG→GAG), W251K (TGG→AAG), W251F (TGG→TTT), R176A (CGG→GCG), K205A (AAA→GCA), K236A (AAG→GCG), K257A (AAA→GCA), R260A (CGA→GCA), R267A (CGA→GCA), R286A (CGA→GCA), R295A (AGA→GCA), R296A (AGA→GCA), K257R (AAA→AGA), K257E (AAA→GAA), K257Q (AAA→CAA), K257QA/W251A, K257QA/R260A, K257QA/R286A, K257QA/R295A および K257QA/R296A 変異体の発現用コンストラクトである。pCKX1230 あるいは pCKX6051 を鋳型として, それぞれの変異プライマーを設計し, Stratagene 社の QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて作製した。K257A 二重変異体は, pCKX6094 を鋳型として, それぞれもう一方の変異プライマーを用いて再度変異の導入を繰り返した。変異が正確に導入されていることを sequence によって確認した。

pCKX6042 および pCKX6043 は, それぞれ N 末端に FLAG を融合した SPAS-1 ΔMIT (17-100) および SPAS-1 ΔMTBD (115-165) のコンストラクトである。pCKX6051 を鋳型として, それぞれの変異プライマーを設計し, Stratagene 社の QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて作製した。それぞれ目的の領域が欠失していることを sequence によって確認した。

pCKX6111 は, N 末端に FLAG を融合した SPAS-1 (1-432) のコンストラクトである。pCKX6051 を鋳型として, 6051-5' と 6111-3' をプライマーとして用いて PCR を行い, *NheI* 処理後, pcDNA3FLAG ベクターの *XbaI* サイトに挿入した。

pCKX6025, pCKX6033, pCKX6032, pCKX6099 および pCKX6146 は, それぞれ N 末端に His₆ が付加された SPAS-1 (1-210), SPAS-1 (1-152), SPAS-1 (1-103), SPAS-1 (115-172) および SPAS-1 (1-432) のタンパク質発現用コンストラクトである。pCKX1230 を鋳型として, それ

ぞれ 6025-5' と 6025-3', 6025-5' と 6033-3', 6025-5' と 6032-3', 6099-5' と 6099-3' および 6146-5' と 6146-3' をプライマーとして用いて PCR を行い, *NdeI* および *BamHI* 処理後, pET15b ベクターの *NdeI-BamHI* サイトに挿入した。

pCKX6139, pCKX6124 および pCKX6126 は, それぞれ N 末端に His₆ が付加された SPAS-1 (1-152), SPAS-1 (1-172) および SPAS-1 (1-182) の NMR 測定用タンパク質発現コンストラクトである。pCKX1230 を鋳型として, それぞれ 6139-5' と 6139-3', 6125-5' と 6124-3' および 6125-5' と 6126-3' をプライマーとして用いて PCR を行い, *NdeI* および *BamHI* 処理後, pET15b ベクターの *NdeI-BamHI* サイトに挿入した。

pCKX6136 は, N 末端に GST が付加された TBA-1 (F26E4.8) のタンパク質発現用コンストラクトである。国立遺伝学研究所の小原博士に分与いただいた cDNA クローン yk1300d1 を鋳型として, 6136-5' と 6136-3' をプライマーとして用いて PCR を行い, *BamHI* および *NotI* 処理後, pGEX-6P-3 ベクターの *BamHI-NotI* サイトに挿入した。

6)-3 大量培養によるタンパク質の発現および精製

目的のプラスミドを用いて BL21(DE3) を形質転換し, 得られたコロニーを L 培地 (50 µg/ml ampicillin) 1.5 l で 30°C, 18 時間培養し, 最終濃度 0.5 mM になるように IPTG を添加し, さらに 25°C で 3 時間培養した。遠心 (7,000 rpm, 4°C, 10 分間) 後, 上清を取り除き, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で菌体を洗った後, 再度遠心を行い (7,000 rpm, 4°C, 10 分間), 菌体を回収した。

以上のようにして得られた菌体に Lysis buffer 22.5 ml および protease inhibitor 225 µL を加え懸濁し, 超音波により破碎した。遠心 (12,000 rpm, 4°C, 15 分間) 後, 上清をさらに超遠心 (40,000 rpm, 4°C, 1 時間) し, 不溶性画分を取り除いた。得られた上清を透析 (Spectrum Laboratories, Inc. 製 [MWCO: 12-14,000] 透析膜を使用) した後, Ni²⁺-NTA Agarose (QIAGEN) 2 ml と混合し, 4°C で 1 時間ゆるやかに攪拌した。Ni²⁺-NTA Agarose を wash-1 buffer 50 ml で 2 回洗い, さらに wash-2 buffer 50 ml, wash-3 buffer 50 ml で洗った。次に, elution-100 buffer 10 ml で 2 回, elution-200 buffer 10 ml で 5 回, 計 7 画分に分けて溶出を行った。各画分 10 µl を 12.5% SDS-PAGE で電気泳動し, 泳動後 CBB 染色を行い, 目的タンパク質が精製できていることを確認した。目的のタンパク質が含まれている画分を濃縮し, 再度透析を行った。精製したタンパク質の濃度は, PIERCE 社製 BCA Protein Assay Kit を用いて測定した。CD 測定, ゲルろ過クロマトグラフィーおよび NMR 測定用のタンパク質試料については, lysis buffer 以外のすべての buffer から NP-40 を除いて精製を行った。また, 精製は必要に応じて, AKTA システムを用いて行った (6)-10 項参照)。

表 6 タンパク質の発現および精製において用いた調製試薬

試薬名	組成
Lysis buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 500 mM NaCl – 0.2% NP-40 – 0.1 mM ATP – 1 M Arg · HCl – 20 mM imidazole
wash-1 buffer (dialysis-1 を兼ねる)	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 500 mM NaCl – 0.2% NP-40 – 0.1 mM ATP – 20 mM imidazole
wash-2 buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 500 mM NaCl – 0.2% NP-40 – 0.1 mM ATP – 20 mM imidazole – 10% glycerol
wash-3 buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 50 mM NaCl – 0.2% NP-40 – 0.1 mM ATP – 20 mM imidazole – 10% glycerol
elution-100 buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 50 mM NaCl – 0.1% NP-40 – 0.1 mM ATP – 100 mM imidazole – 10% glycerol
elution-200 buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 50 mM NaCl – 0.1% NP-40 – 0.1 mM ATP – 200 mM imidazole – 10% glycerol
dialysis-2 buffer	25 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 50 mM NaCl – 0.01% NP-40 – 10% glycerol

6)-4 ATPase 活性の測定

マラカイトグリーン法を用いて 30°C における ATPase 活性を測定した。ATPase 活性測定 buffer を用いて、反応系 25 μ L に対して、SPAS-1 2.2 μ g を使用し、反応を行ったのち、マラカイト混合液 200 μ L を加え、vortex により激しく混合した。さらに 1 M sodium citrate 25 μ L を加え、vortex により激しく混合した後、30°C で 30 分間静置し、波長 660 nm における吸光度を測定した。濃度既知の KH_2PO_4 を用いて求めた検量線から、ATP 加水分解により生じる遊離したリン酸の量を算出した。

表 7 ATPase 活性測定に用いた調製試薬

試薬名	組成
ATPase 活性測定 buffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 5 mM DTT
マラカイト混合液	1 mM Malachite green / dH_2O / 50 mM Ammonium molybdate / 2.5% Polyvinyl alcohol (2 : 2 : 1 : 1)

6)-5 ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィーは、AKTA システムを用いて行った。精製したタンパク質を Superose 6 10/300GL (GE Healthcare) にアプライし、buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% Glycerol) を流速 2 ml/min で送液して 1 ml ずつフラクションを回収した。溶出したサンプルに含まれるタンパク質の量は、280 nm の吸光度をモニターすることにより、あるい

は、各フラクションを 15% SDS-PAGE で電気泳動することにより検出した。

6)-6 *In vitro* における pull down assay

Francke ら (2005) の方法にしたがって、*in vitro* における pull down assay を行った。

His₆ タグが付加されたタンパク質 36 μl (20 μg), 5×pull down assay buffer 25 μl, dH₂O 64 μl, Ni²⁺-NTA Agarose 75 μl を混合し、4°C で 1 時間ゆるやかに攪拌した後、1 μg/μl ウシ脳 tubulin (Cytoskeleton) 3 μl を加えて、さらに 4°C で 3 時間ゆるやかに攪拌した。Agarose を wash buffer 1.2 ml で 3 回洗った後、200 mM imidazole 100 μl を加え、軽くピペッティングし遠心を行った (3,000 rpm, 4°C, 1 分間)。上清 80 μl に 5×sample buffer 20 μl を加え、約 10 分間煮沸し vortex で分散した。本試料 20 μL を 12.5% SDS-PAGE で電気泳動し、泳動後ニトロセルロースメンブレンに Wet 法 (25 V, overnight) でブロッキングした。メンブレンを 5% スキムミルクでブロッキングした後、anti-α-tubulin 抗体 (Sigma) で反応させ、さらに anti-Mouse Ig, Horseradish Peroxidase linked F(ab')₂ fragment (from sheep)(GE ヘルスケア バイオサイエンス) で反応させた。PBS-T でメンブレンをよく洗った後、chemiluminescence reagent に浸し、X 線フィルムに感光させ、α-tubulin を検出した。

表 8 pull down assay に用いた調製試薬

試薬名	組成
Pull down assay buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 0.1% Triton X-100 – 20 mM imidazole – protease inhibitor
wash buffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5) – 0.1% Triton X-100 – 20 mM imidazole
Transfer buffer	20 mM Tris – 150 mM glycine – 20% methanol
PBS	137 mM NaCl – 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ – 2.68 mM KCl – 1.47 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS containing 0.1% Tween 20
chemiluminescence reagent	Enhanced Luminol Reagent / Oxidizing Reagent (1:1) いずれも PerkinElmer LifeScience 社製
5×sample buffer	0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) – 50% glycerol – 5% SDS – 5% 2-mercaptoethanol – 2.5% Bromphenol Blue

6)-7 表面プラズモン共鳴

装置は、GE ヘルスケア バイオサイエンス社製の BIACORE2000 を用いた。

SPAS-1 N 末端と tubulin の相互作用を検出するためには、Sensor Chip CM4 (GE ヘルスケア バイオサイエンス) に、リガンドとしてウシ脳あるいはブタ脳 tubulin を固定し、アナライトとして各種 His₆-SPAS-1 欠失変異体を添加した。また、His₆-SPAS-1 と tubulin C 末端の相互作用

用を検出する際は、Sensor Chip CM4 に、リガンドとして GST- α -tubulin C 末端 (22 残基: KDYEEVGADSNEGGNEEEGEEY) を固定し、アナライトとして、His₆-SPAS-1 を添加した。この際、リガンドのコントロールとして GST、アナライトのコントロールとして BSA を用いた。すべての測定は、流速 20 μ l/min, 測定温度 25°C で行った。

表 9 表面プラズモン共鳴実験に用いた試薬

試薬名	組成
固定化 buffer	ウシ脳およびブタ脳 tubulin 固定: 10 mM CH ₃ COONa-HCl (pH 4.4) tubulin C 末端固定: 10 mM CH ₃ COONa-HCl (pH 5.0)
試料 buffer	10 mM Hepes (pH 7.6) – 0.005% Tween20 – 1 mM DTT – 1 mM MgCl ₂ – 3 mM ATP

6)-8 培養細胞におけるトランスフェクション実験

遺伝子導入方法として、リポフェクション法を用いた。また、リポフェクション試薬は Roche 社の Fu-GENE 6 を用いた。

トランスフェクション前日に、ゼラチンコートしたカバーガラスが敷き詰められた 24 well plate に 40~60%コンフルエントとなるように細胞を播いた。翌日、プラスミド 1 μ l (200 ng) および Fu-GENE 6 0.6 μ l を無血清培地 20 μ l に加え混合し、室温で 15 分反応させた。前日に播いた細胞の培地を交換し、そこへ反応後の DNA 溶液を滴下し、37°C, 5% CO₂ で 48 時間培養した。

6)-9 免疫抗体染色

トランスフェクション後のプレートから培地を取り除き、4% パラホルムアルデヒド (PFA) / PBS を用いて室温で 30 分間固定した。その後、ナカライテスク社製の Blocking One でブロッキングし、FITC conjugated anti- α -tubulin 抗体 (Sigma) および Cy3 conjugated anti-FLAG 抗体 (Sigma) を用いて染色した。また、核染色には、DAPI (Roche) を用いた。顕微鏡観察は、Leica 社製の Leica Spectral Confocal Scanning System, TCS-SP2 を用いて行った。

6)-10 NMR 測定

目的のプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、¹⁵N および ¹³C で安定同位体標識した栄養源を含む M9 最少培地中で培養を行った。まず、100 μ g/ml Ampicillin を含む LB 培地 30 ml に形質転換した大腸菌を植菌し、37°C, 120 rpm で培養した。OD₆₀₀ が 0.8 に到達したら、遠心 (8,000 rpm, 4 °C, 10 分間) し、菌体を回収し、100 μ g/ml Ampicillin を含む最少培地 750 ml に植菌した。さらに 37°C, 120 rpm で培養し、OD₆₀₀ が 0.8 に到達したら、最終濃度が 1 mM となるように IPTG を添加し、誘導を行った。その後、37°C, 120 rpm で 6 時間培養し、

遠心 (7,000 rpm, 4 °C, 10 分間) して菌体を回収した。

以上のようにして得られた菌体に Lysis buffer (表 6 参照) 22.5 ml および protease inhibitor 225 μ L を加え懸濁し, 超音波により破碎した。その後, 超遠心 (40,000 rpm, 4°C, 1 時間) し, 不溶性画分を取り除いた。AKTA システムを用いて, His Trap HP 5 ml (GE ヘルスケア バイオサイエンス) を buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.1 mM ATP, 10% glycerol) で平衡化し, 可溶性画分をアプライした。0-300 mM Imidazole のグラジエントで溶出し, 1 ml ずつフラクションを回収し, 各フラクションを SDS-PAGE で電気泳動して目的タンパク質が精製できていることを確認した。目的のタンパク質が含まれている画分を透析 (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol) し, 濃縮を行った。精製したタンパク質の濃度は, SDS-PAGE で濃度既知の BSA とともに泳動し, CBB 染色後, ゲルをスキャナーで取り込み, バンドの濃さを定量して算出した。

測定試料は, 95% H₂O / 5% D₂O を溶媒として, 25 mM Tris-HCl(pH 6.8), 150 mM NaCl, 10 mM DTT の緩衝液で溶解した。また, NMR 測定は, Bruker AVANCE III (¹H 共鳴周波数 600 MHz) 分光計を用いて, 測定温度はすべて 25°C で行った。

FID データは, NMRPipe を用いてプロセッシング (ウィンドウ関数, フーリエ変換, 位相補正, ベースライン補正など) を行った (Delaglio *et al.*, 1995)。帰属は, 北海道大学の稲垣冬彦らが開発した Olivia (objective, chemical shift library-based and stereo view assignment) を用いて行った。また, 得られた化学シフトを基に行う二次構造解析には, TALOS を用いた (Cornilescu *et al.*, 1999)。

7) 実験結果

7)-1 培養細胞における微小管切断活性の評価

培養細胞を用いて、微小管切断活性の評価系の構築を試みた。N末端に FLAG tag を融合した各種 SPAS-1 cDNA コンストラクトを作製し、HEK293 細胞で強制発現させた。その結果、野生型 SPAS-1 を発現する細胞において、微小管の消失が見られた (図 12A)。一方、ATP 結合能および加水分解能を欠損する変異体 K224R および E278Q (Ogura and Wilkinson, 2001) を導入した細胞では、微小管の消失は認められなかった。以上の結果から、線虫 spastin ホモログ SPAS-1 も微小管切断活性を有することを明らかにした。さらに、SPAS-1 による微小管の切断には、ATPase 活性が必要であることも見出した。

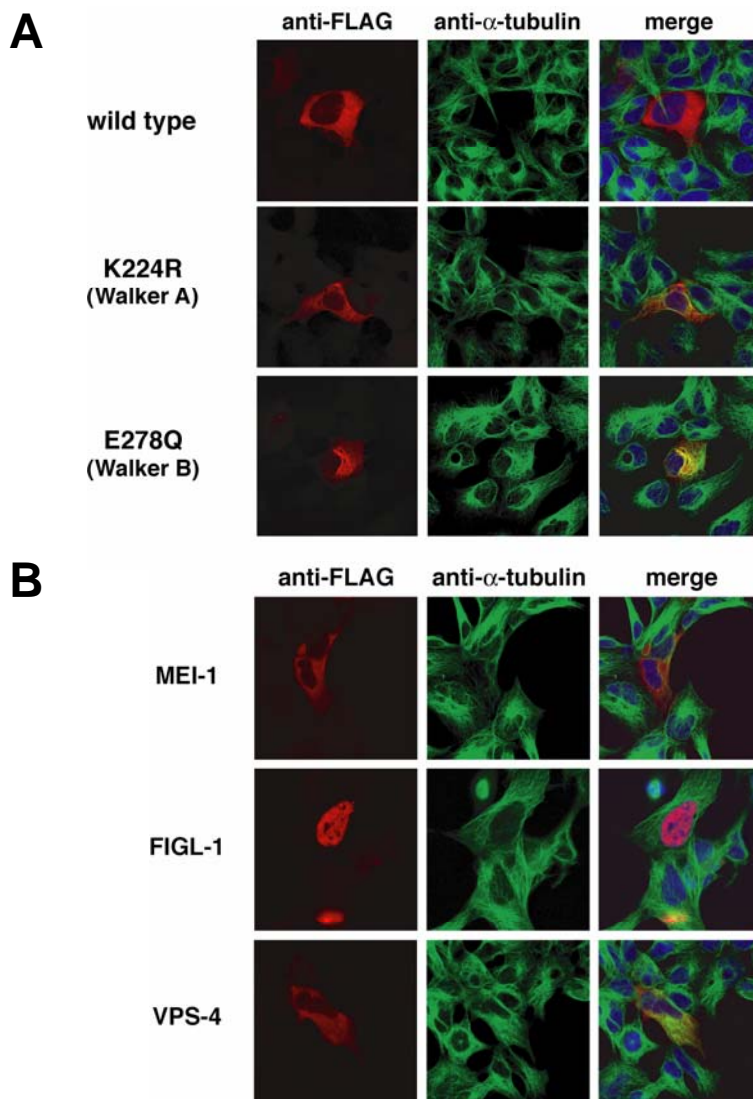


図 12. 免疫抗体染色による HEK293 細胞の観察。FuGENE 6 (Roche) を用いて、各種 AAA タンパク質の cDNA を transfection し、48 時間後に PFA で固定した。その後、anti- α -tubulin 抗体 (緑) および anti-FLAG 抗体 (赤) を用いて、免疫抗体染色を行った。なお、染色体は DAPI (青) により染色を行った。A) 野生型および各種 SPAS-1 変異体の微小管切断活性。B) Spastin を含む AAA サブグループの各種タンパク質の微小管切断活性。

また, SPAS-1 と同じ AAA サブグループに属する katanin ホモログ T01G9.5 (MEI-1), fidgetin ホモログ F32D1.1 (FIGL-1), Vps4 ホモログ Y34D9A.10 (VPS-4) についても, 同様の実験を行った。その結果, 微小管切断 AAA タンパク質として最初に同定された katanin ホモログ MEI-1 については, SPAS-1 と同様に, 微小管切断活性が認められた (図 12B)。一方, FIGL-1 および VPS-4 は, 微小管切断活性を示さなかった (図 12B)。近年, Zhang ら (2007) は, ショウジョウバエにおいて, 三つの AAA タンパク質 katanin, spastin および fidgetin が微小管切断活性をもつことを示したが, 線虫においては katanin ホモログ MEI-1 と spastin ホモログ SPAS-1 のみが微小管切断活性を有することを見出した。

7)-2 SPAS-1 の特性

SPAS-1 exon 4(-) の二次構造を調べるために, CD スペクトル測定を行った。その結果, 222 nm および 208 nm に負の極大をもつ α -helix 構造に特徴的なスペクトルが見られた (図 13A)。また, α -helix の残基モル楕円率 $[\theta]_{222}$ が -35700 ± 2800 であり, ランダムコイルの $[\theta]_{222}$ が -3900 であることより, SPAS-1 exon 4(-) の二次構造における α -helix 含量を次式によって見積もると, 28.4%であった。

$$\% (\alpha\text{-helix}) = [\theta]_{222} - 3900 / (-35700 - 3900)$$

また, 熱に対する構造変化を調べるために, 25 °C から 95 °C まで 5 °C 毎に温度を上げて, CD スペクトル測定を行った結果, 温度上昇に伴い, 222 nm の負の極大ピークが小さくなった (図 13A)。これは, SPAS-1 タンパク質中の α -helix 含量が減少していったためであると考えられる。図 12A に示したように, 構造が熱によって壊れるという二状態転移を示すことが明らかになった。さらに, 昇温速度 1 °C/min における熱変性曲線を図 12B に示し, 変性の中点温度 (T_m) を求めた結果, 47 °C であった。

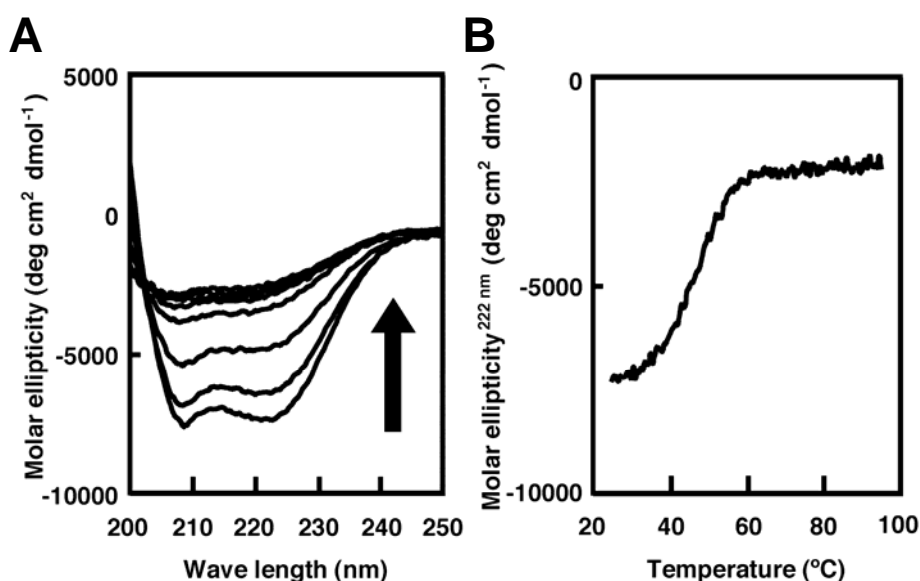


図 13. SPAS-1 の CD スペクトル測定結果。A) 測定温度, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 °C。B) 熱変性曲線。昇温速度, 1 °C/min。

7)-3 SPAS-1 の ATPase 活性

大腸菌で発現および精製した SPAS-1 について、ATPase 活性を測定した。ATPase 活性を定量する方法としては、マラカイトグリーン法を用いた (Akiyama *et al.*, 1996)。至適化された条件 (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 5 mM DTT, and 3 mM ATP in a 25- μ l reaction mixture at 37 °C) で、野生型 SPAS-1 は 70 nmol/mg/min の ATPase 活性を示した (図 14A)。

一般的に AAA タンパク質は、基質存在下において ATPase 活性が促進されることが知られている (Azumi *et al.*, 2006; Hartman *et al.*, 1998; Makyio *et al.*, 2002; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。そこで、微小管が SPAS-1 の ATPase 活性に及ぼす影響について、検討を行った。その結果、0.25 μ M の微小管存在下において、SPAS-1 の ATPase 活性は約 7 倍促進された (図 14B)。さらに、微小管の濃度は 0.25 μ M をピークに、それ以上濃くなると、SPAS-1 の ATPase 活性は低下することを見出した。

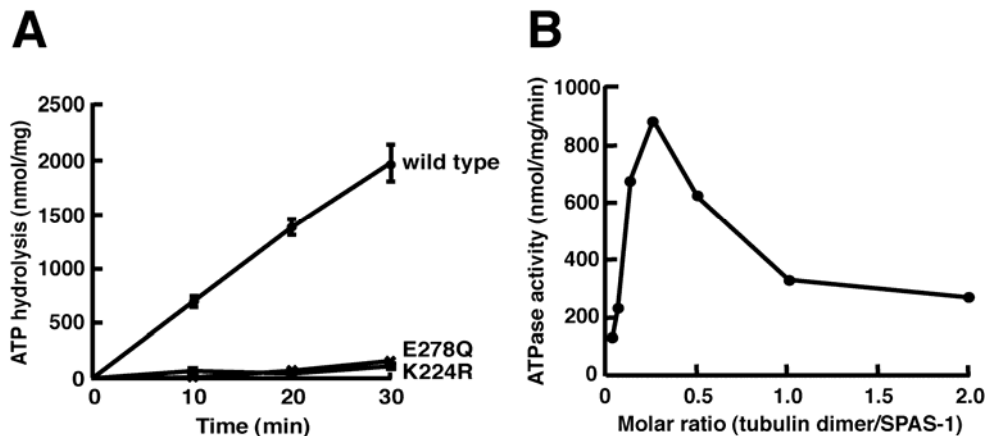


図 14. ATPase 活性測定結果。ATPase 活性を定量する方法として、マラカイトグリーン法を用いた。反応系, 25 μ L; 反応液中の SPAS-1, 2.2 μ g; 緩衝液組成, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 5 mM DTT; ATP 濃度, 3 mM; 反応温度, 37°C。A) 野生型および各種 SPAS-1 の ATPase 活性。B) 微小管添加による SPAS-1 の ATPase 活性の促進。

7)-4 SPAS-1 の微小管結合領域の同定

SPAS-1 の微小管結合領域を同定するために、精製した SPAS-1 とウシ脳 tubulin を用いて相互作用実験を行った。図 15A に示すような様々な欠失変異体を作製し、pull down assay を行ったところ、SPAS-1 は最近ヒト spastin で同定された MTBD 領域で tubulin と直接相互作用することを見出した。微小管と相互作用するタンパク質が共通してもっているドメインであることから、これまで微小管結合ドメインと考えられていた MIT ドメインのみでは tubulin との相互作用は検出されなかった。

また、SPAS-1¹⁻¹⁵² について、表面プラズモン共鳴法により相互作用の検出を行った。リガンドとしてウシ脳 tubulin を固定し、アナライトとして SPAS-1¹⁻¹⁵² を添加した結果、SPAS-1¹⁻¹⁵² の添加量依存的に Resonance Unit (RU) が上昇した (図 15B)。なお、得られたセンサーグラム

から、解離定数 (K_D 値) は 2.38×10^{-7} と算出された。

In vivo における MTBD および MIT ドメインの微小管切断活性への影響を調べるために、培養細胞においてそれぞれの欠失変異体 (SPAS-1 Δ MTBD; Δ 115-165, SPAS-1 Δ MIT; Δ 1-100) を発現させたところ、MTBD 欠失変異体において、微小管の消失が見られなかったのに対し、MIT ドメイン欠失変異体では、野生型と同様に微小管の消失が認められた (図 16)。以上の結果から、*in vivo* および *in vitro* いずれにおいても、微小管の結合に MTBD が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

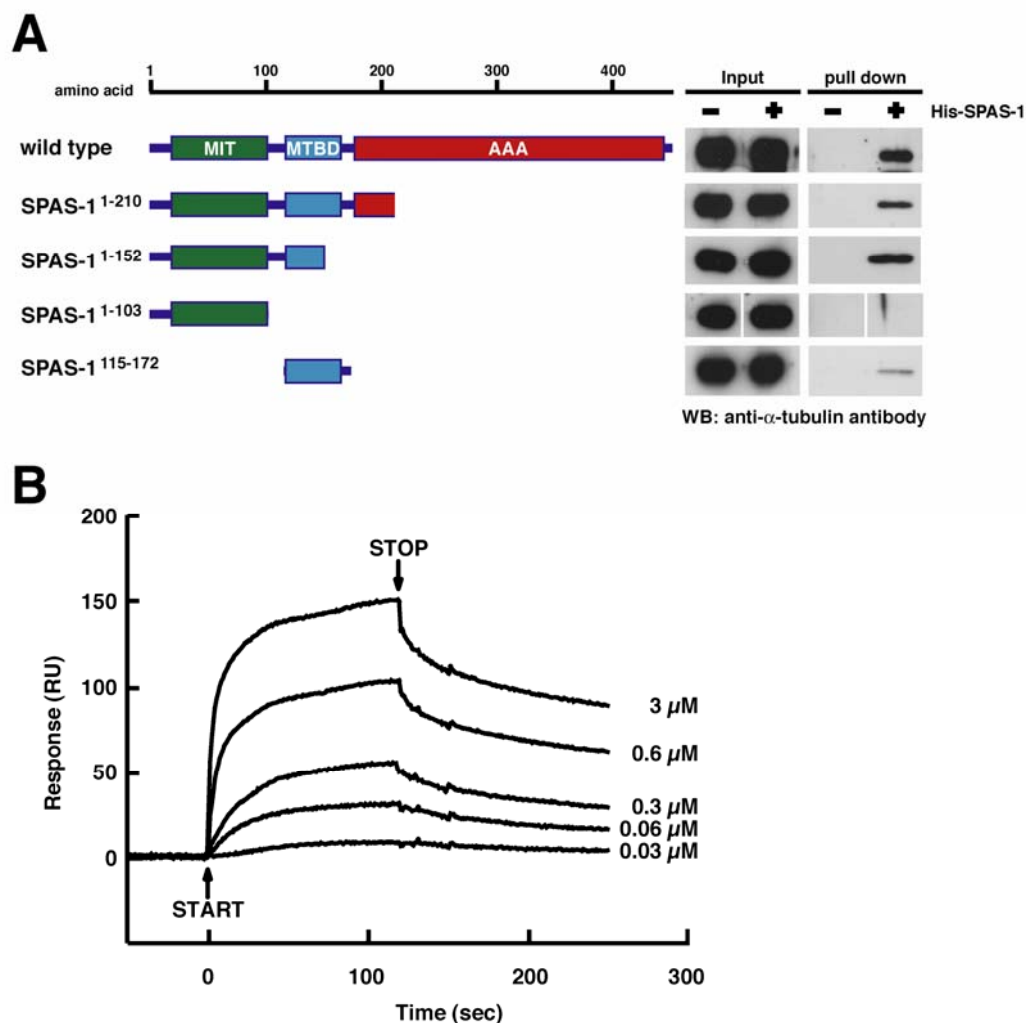


図 15. Pull down assay による SPAS-1 と tubulin の相互作用実験結果。A) His タグが付加された SPAS-1 と Ni^{2+} -NTA Agarose を 4°C で 1 時間ゆるやかに混合し、ウシ脳 tubulin を加えて、さらに 4°C で 3 時間ゆるやかに攪拌した。反応後、agarose を洗い、上清を取り除き、200 mM imidazole 100 μl を加えた後、遠心を行った。上清に $5\times$ sample buffer 20 μl を加え、約 10 分間煮沸し vortex で分散した。本試料を用いて、Western blotting を行った。B) 表面プラズモン共鳴法による SPAS-1¹⁻¹⁵² と tubulin の相互作用の検出。緩衝液組成, 10 mM Hepes (pH 7.6), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween 20, 1 mM DTT, 1 mM MgCl_2 , 3 mM ATP; 測定温度, 25°C ; 流速, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。

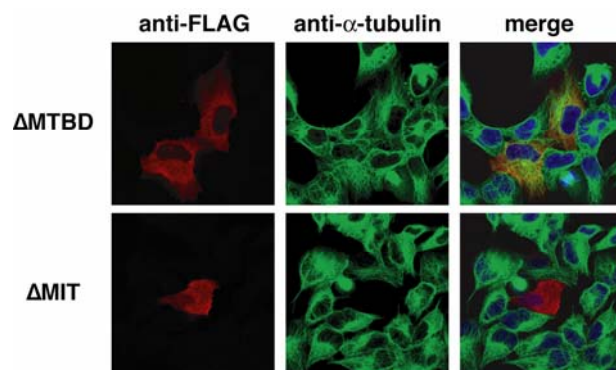


図 16. MTBD および MIT ドメインの微小管切断活性への影響。FuGENE 6 (Roche) を用いて、SPAS-1 ΔMTBD および ΔMIT cDNA を transfection し、48 時間後に PFA で固定した。その後、anti- α -tubulin 抗体 (緑) および anti-FLAG 抗体 (赤) を用いて、免疫抗体染色を行った。なお、染色体は DAPI (青) により染色を行った。

7)-5 SPAS-1 N 末端領域の構造解析

7)-5-1 NMR 測定条件の検討

前掲 7)-4 項で、pull down assay により SPAS-1 の微小管結合領域 MTBD を同定した (図 15A)。興味深いことに、SPAS-1 はヒトやマウス、ショウジョウバエの spastin と比較し N 末端が短く、疎水性ドメインや MIT ドメインに相当する領域の相同性が認められていない。さらに、MTBD は、微小管との結合に必須な領域であるにもかかわらず、生物種間でアミノ酸配列の相同性が低い領域である。そこで、NMR を用いて、MTBD を含む SPAS-1 N 末端領域の構造解析を試みた。

まず、NMR 測定用の SPAS-1 コンストラクトの最適化を行うために、図 17 に示した三つのコンストラクトについて ^{15}N 標識体を取得し、二次元 NMR (^1H - ^{15}N HSQC) 測定を行った。

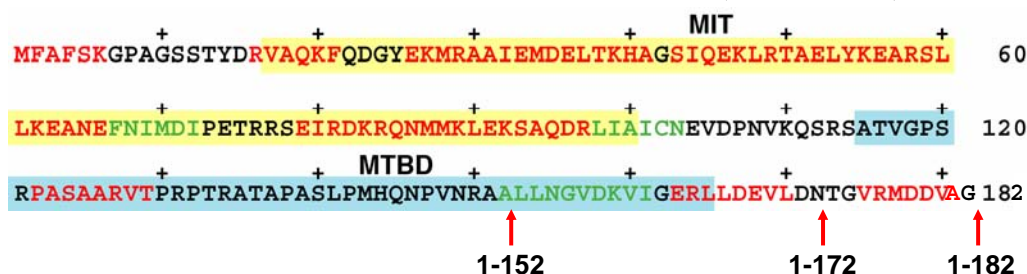


図 17. SPAS-1 N 末端領域のアミノ酸配列。Chou-Fasman 法 (http://mbs.cbrc.jp/papia-cgi/ssp_queryJ.pl) による二次構造予測の結果、 α -helix と予測されたアミノ酸残基を赤色で、 β -sheet と予測されたアミノ酸残基を緑色で示した。また、MIT ドメインを黄色で、MTBD を水色で囲った。

その結果、いずれのコンストラクトについても、良好なシグナルの分散が見られた (図 18A, B, C)。理想的なタンパク質の ^1H - ^{15}N HSQC は、それぞれのアミノ酸残基間のアミドプロトンとそれが結合した窒素の相関がすべてシグナルとして現れ (アミドプロトンを持たないプロリンは除く)、そのシグナルが分散していることである (構造をとっていない領域のシグナルは 8.4 ppm 付近に集まる)。図 18A では、約 130 個のシグナルが検出された。1-152 aa の領域

には 10 個のプロリンが含まれており、期待されるシグナルの数は 167 個である。N 末端側数残基分のシグナルが見えないことを考えると、十分なシグナル数であると推測される。図 18B および C では、図 18A と比較しコンストラクトのアミノ酸残基数がそれぞれ 20 および 30 個増えているにもかかわらず、シグナルが 2 個および 5 個しか増えていない、あるいは増えているシグナルが 8.4 ppm 付近であった。したがって、152-182 のアミノ酸領域は立体構造をとっていない可能性が示唆された。

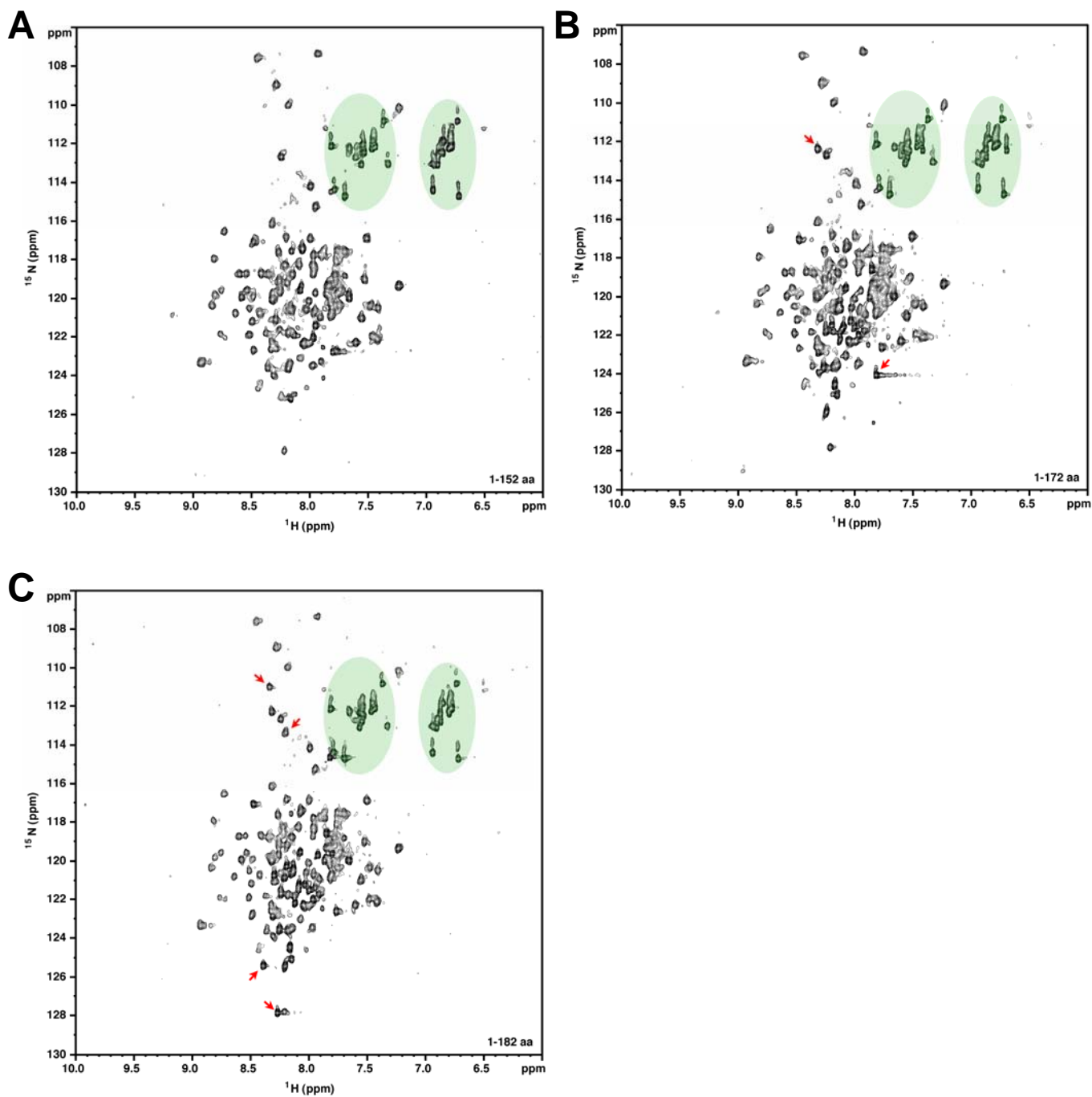


図 18. ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。測定 buffer 組成; 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.01% NP-40, 10% glycerol; 濃度, 200 μM ; 測定温度, 25 $^\circ\text{C}$ 。緑色で囲った領域は側鎖のシグナル。赤矢印は各コンストラクト特異的に見られるシグナル。A) His₆-SPAS-1¹⁻¹⁵²。 B) His₆-SPAS-1¹⁻¹⁷²。 C) His₆-SPAS-1¹⁻¹⁸²。

次に, tubulin と相互作用する領域を明らかにするため, これら全てについて tubulin との相互作用を検討した (図 19)。その結果, SPAS-1¹⁻¹⁵² および SPAS-1¹⁻¹⁷² は同程度の強さで tubulin と相互作用したのに対し, SPAS-1¹⁻¹⁸² はやや弱い相互作用を示した。これらの結果より, SPAS-1¹⁻¹⁵² を NMR による立体構造解析用コンストラクトとした。

解析を行うための良好な NMR スペクトルを得るべく, SPAS-1¹⁻¹⁵² について pH 7.5 および pH 6.8 の buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) を用いて溶液条件の検討を行った。その結果, pH 6.8 の buffer 条件で得られたスペクトルで顕著にシグナル数が増加し, おおよそ期待されるシグナルの数が得られた (図 20)。したがって, buffer の pH を 6.8 と設定した。

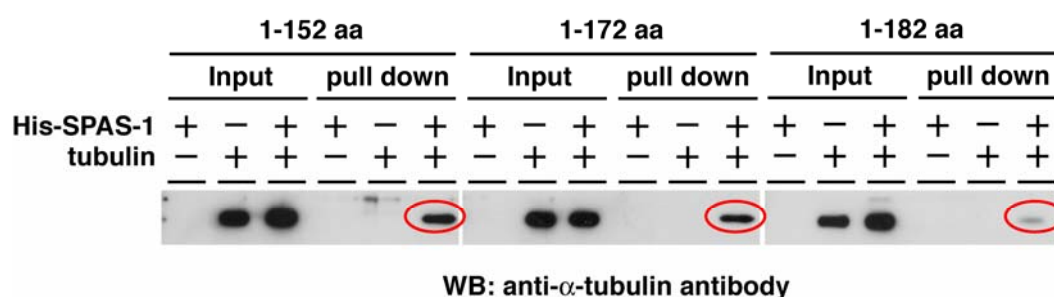


図 19. pull down assay による SPAS-1¹⁻¹⁵², SPAS-1¹⁻¹⁷² および SPAS-1¹⁻¹⁸² と tubulin の相互作用実験結果。His タグが付加された SPAS-1 各種変異体と Ni²⁺-NTA Agarose を 4°C で 1 時間ゆるやかに混合し, ウシ脳 tubulin を加えて, さらに 4°C で 3 時間ゆるやかに攪拌した。反応後, agarose を洗い, 上清を取り除き, 200 mM imidazole 100 μ l を加えた後, 遠心を行った。上清 80 μ l に 5 \times sample buffer 20 μ l を加え, 約 10 分間煮沸し vortex で分散した。本試料を用いて, Western blotting を行った。

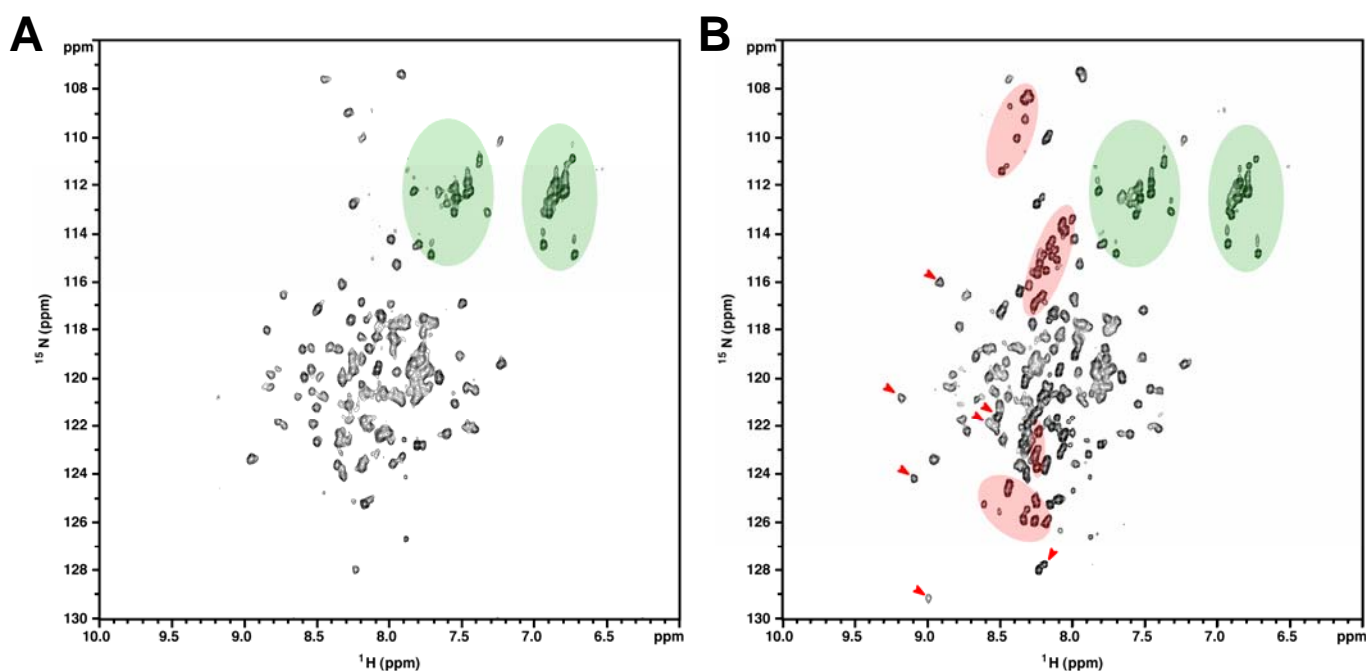


図 20. His₆-SPAS-1¹⁻¹⁵² の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル。測定 buffer 組成; 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; 濃度, 200 μ M; 測定温度, 25 °C。緑色で囲った領域は側鎖のシグナル。赤矢印および赤色で囲った領域は, pH 6.8 で特異的に見られるシグナル。A) pH 7.5。B) pH 6.8。

7)-5-2 NMR 測定と帰属および立体構造解析

^{15}N ならびに ^{13}C で標識した SPAS-1¹⁻¹⁵² について、前掲 7)-5-1 項で設定した条件で、二次元および三次元 NMR 測定を行った (表 10)。測定したスペクトルの一覧を表 10 に記す。その結果、89 % (125/141 aa) 帰属を完了した (図 21)。

表 10 帰属に用いた NMR スペクトル

3D HNCO	3D CBCA (CO) NH	3D HN (CA) CO
3D HNCA	3D HNCACB	3D HBHA (CO) NH
3D HN (CO) CA	3D C (CO) NH	3D H (CCO) NH

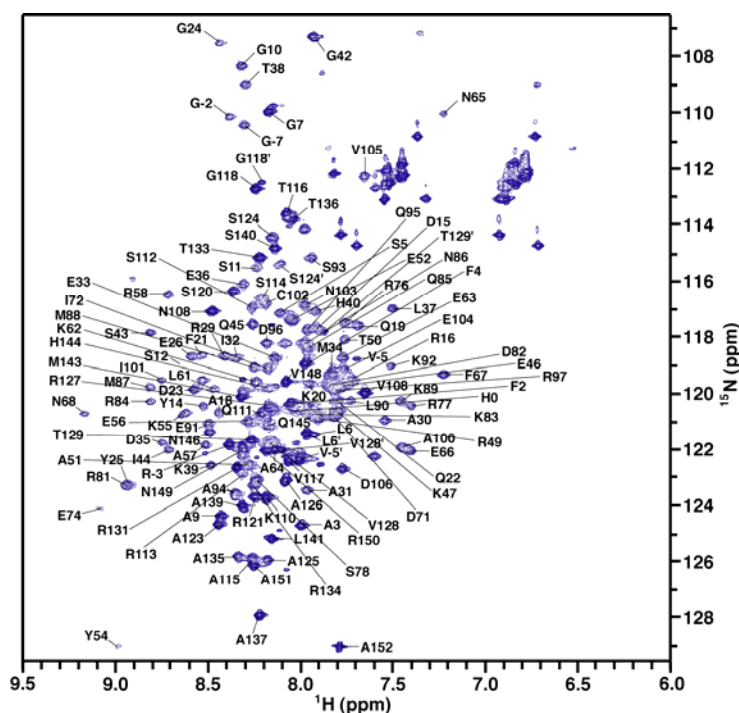


図 21. His₆-SPAS-1¹⁻¹⁵² の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。測定 buffer 組成; 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM DTT; 濃度, 200 μM ; 測定温度, 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

また、HNHA 測定を行い、帰属した NMR スペクトルをもとに、SPAS-1¹⁻¹⁵² の二次構造解析を行った。HNHA 測定により、アミドプロトンと α プロトンの相関ピークから、二面角 ϕ の情報を含む $^3J_{\text{HN}\alpha}$ 値を得ることができる。規則的な二次構造における $^3J_{\text{HN}\alpha}$ 値を表 11 に示す (Wüthrich, 1991)。

表 11 各種二次構造における $^3J_{\text{HN}\alpha}$ 値

二次構造	ϕ ($^{\circ}$)	$^3J_{\text{HN}\alpha}$ 値 (Hz)
α -helix	-57	3.9
3_{10} -helix	-60	4.2
逆平行 β -sheet	-139	8.9
平行 β -sheet	-119	9.7

$^3J_{\text{HN}\alpha}$ 値 < 6.0 Hz が 3 残基以上連続する領域を α -helix, $^3J_{\text{HN}\alpha}$ 値 > 7.0 Hz が連続する領域を β -sheet とした。それぞれのアミノ酸残基における二次構造を図 22 に示す。その結果, MIT ドメインに相当する領域は α -helix, その後ろは 152 番目までランダムコイルであることが示唆された。MIT ドメインについては spastin と同じサブグループに属する Vps4 で初めて立体構造が決定され, 3 本の α -helix から成ることが知られている (Scott *et al.*, 2005b; Takasu *et al.*, 2005)。また, ヒト spastin の MIT ドメインにおいても, α -helix 3 本から成る同様の構造が報告されている (Yang *et al.*, 2009)。したがって, 線虫においてはヒトやマウス, ショウジョウバエと比較し, MIT ドメインのアミノ酸の一次配列の相同性は低いものの (図 23), 高次構造は保存されている可能性が示唆された。

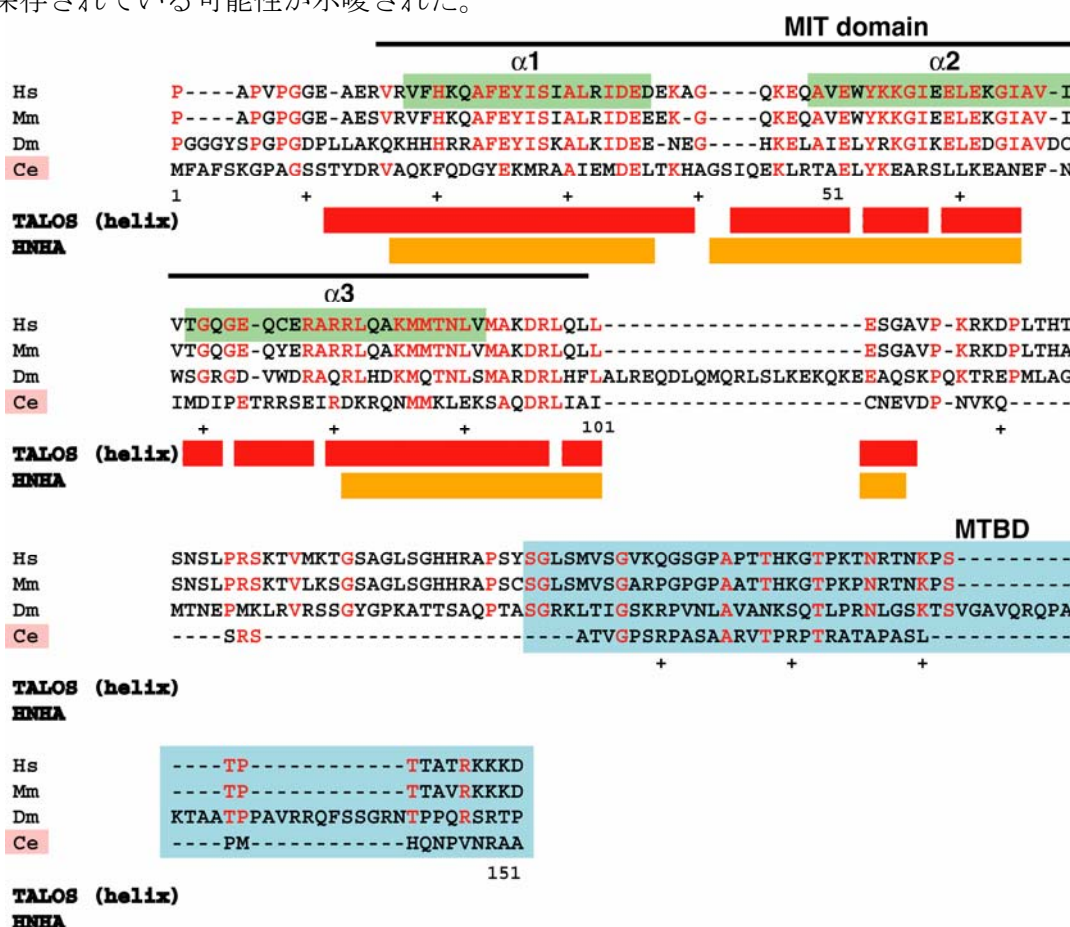


図 22. HNHA 測定による二次構造解析。SPAS-1 の NMR 解析に用いた領域のアミノ酸配列。保存性の高い残基は赤で示した。 ^1H - ^{15}N HSQC 測定で得られた化学シフトを基に二次構造解析 (TALOS) を行った結果, α -helix と予測された領域を赤色の線, HNHA 測定で得られた $^3J_{\text{HN}\alpha}$ の値から, α -helix と予測された領域を橙色の線で, アミノ酸配列の下に示した。

	ヒト	マウス	ショウジョウバエ	線虫
ヒト		96%	53%	22%
マウス			54%	22%
ショウジョウバエ				16%
線虫				

図 23. Spastin ホモログにおける MIT ドメインの相同性。ヒト (116-194 a.a.), マウス (114-191 a.a.), ショウジョウバエ (229-307 a.a.), 線虫 (17-100 a.a.) を比較した。

HNHA 測定による二次構造解析の結果、MTBD は α -helix でも β -sheet でもないことを明らかにした。そこで、分子の運動性を検討するために、 $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE 測定を行った。その結果、MIT ドメインを含む領域は運動性が低いのに対し、MTBD を含む領域は顕著に運動性が高いことを見出した (図 24; 分子の運動性が低いと $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ が 0.7~0.8, 高いと小さい値となる)。したがって、これら一連の解析結果から、MIT ドメインは α -helix の豊富な領域、MTBD は構造をとっていない領域であることが示唆された。

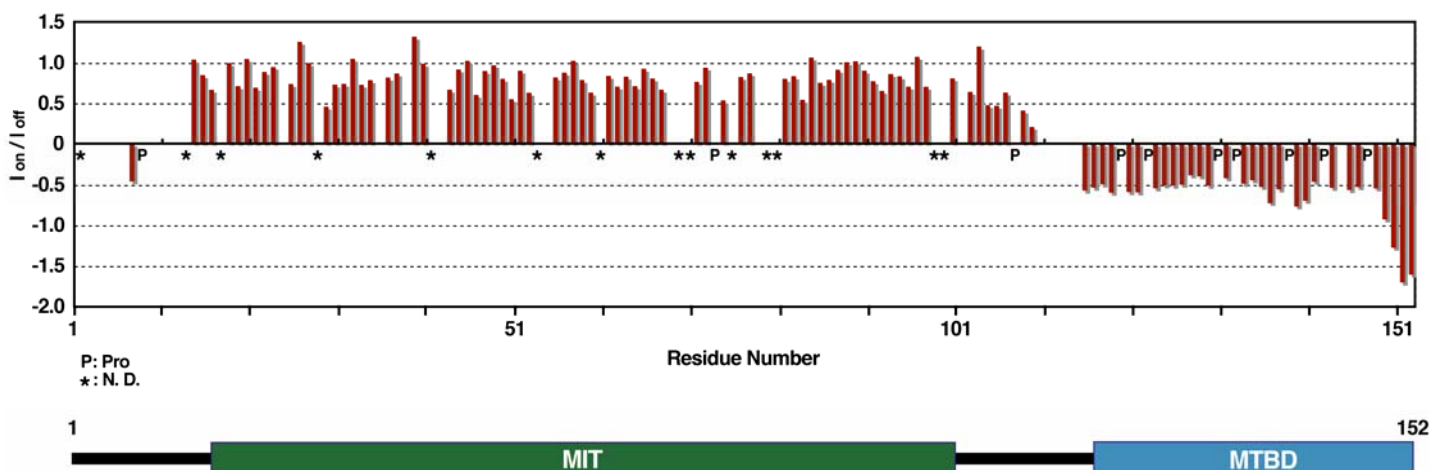


図 24. $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE 測定による分子運動性の解析。横軸をアミノ酸残基番号、縦軸を $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ とした。分子の運動性が低いと $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ が 0.7~0.8, 高いと小さい値となる。

7)-5-3 SPAS-1 N 末端領域と微小管の相互作用様式の解析

次に、SPAS-1¹⁻¹⁵² と tubulin の相互作用様式を明らかにするため、tubulin の滴定実験を行った。200 μM SPAS-1¹⁻¹⁵² 溶液にブタ脳 tubulin 溶液を順次添加し、NMR 測定を行い、 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルにより各種アミノ酸残基のシグナルの変化を追跡した。その結果、tubulin を添加することにより、シグナルの減少あるいは消失が認められた (図 25A)。これらを詳細に検討するために、それぞれのアミノ酸残基のシグナル強度の変化をプロットした (図 25B)。今回の検討では、SPAS-1¹⁻¹⁵² に対して tubulin を最大 1/10 当量添加しており、MTBD 領域では同程度のシグナルの減少が認められた。これは、SPAS-1¹⁻¹⁵² MTBD 領域が tubulin と強く結合することにより、SPAS-1¹⁻¹⁵²-tubulin 複合体 (130 kDa) を形成し、見かけの分子量が大きくなってしまったために、その分シグナルが消失したことによるものであると考えられる。さらに、MIT ドメインについては、tubulin を 1/10 当量しか添加していないにもかかわらず、60%程度のシグナル強度の減少が見られた。これは、SPAS-1¹⁻¹⁵² MIT ドメインと tubulin の結合解離が速いためと考えられる。すなわち、低い親和性である可能性が示唆される。以上の結果から、SPAS-1 は MTBD 領域で tubulin と強く相互作用し、さらに MIT ドメインを介して弱く相互作用していることが示唆された。そこで、このモデルを証明するために、SPR 法を用いて MIT ドメインおよび MTBD の tubulin に対する親和性の評価を試みた。リガンドとしてブタ脳

tubulin を固定し、アナライトとして各濃度の His₆-SPAS-1¹⁻¹⁵² (MIT+MTBD), His₆-SPAS-1¹⁻¹¹⁵ (MIT) および His₆-SPAS-1¹¹⁵⁻¹⁷² (MTBD) を添加した。その結果, 図 26 に示すように, MIT+MTBD および MTBD を添加したとき, Resonance Unit (RU) が上昇した。一方, MIT ドメイン単独のものでは, RU の上昇がわずかに見られたものの, MTBD を含んだ SPAS-1 と比較し, 顕著に小さかった。したがって, 表面プラズモン共鳴法で得られた結果からも, SPAS-1 は MTBD 領域で tubulin と強く相互作用し, さらに MIT ドメインを介して弱く相互作用している可能性が示唆された。

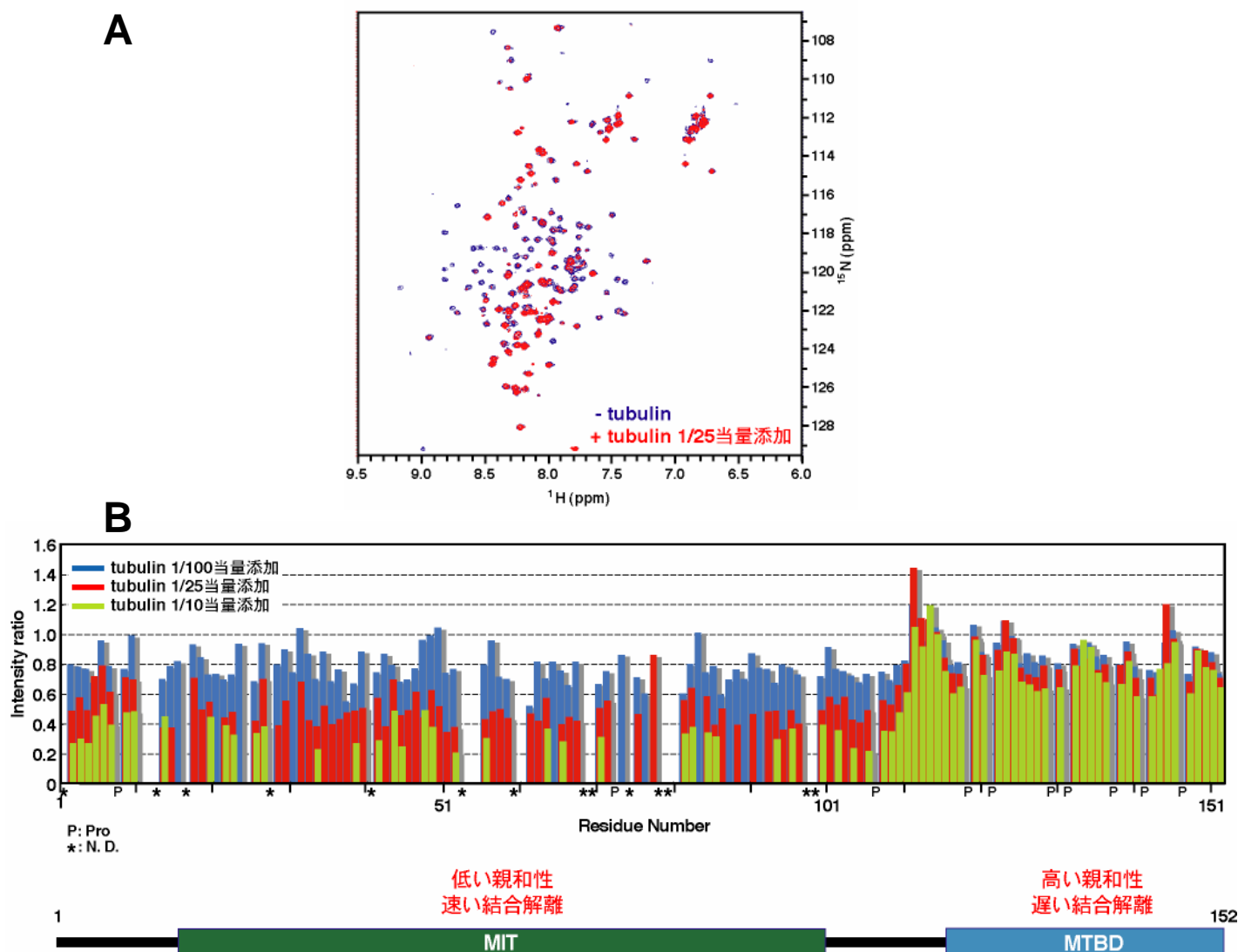


図 25. NMR を用いたブタ脳 tubulin 滴定実験結果。A) Tubulin 未添加および添加時における ¹H-¹⁵N HSQC スペクトル。B) 各モル比の tubulin 滴定時におけるシグナル強度の変化。横軸をアミノ酸残基番号, 縦軸をシグナル強度αとした。Tubulin 添加量 1/100, 1/25 および 1/10 当量をそれぞれ水色, 赤色および黄緑色で示した。

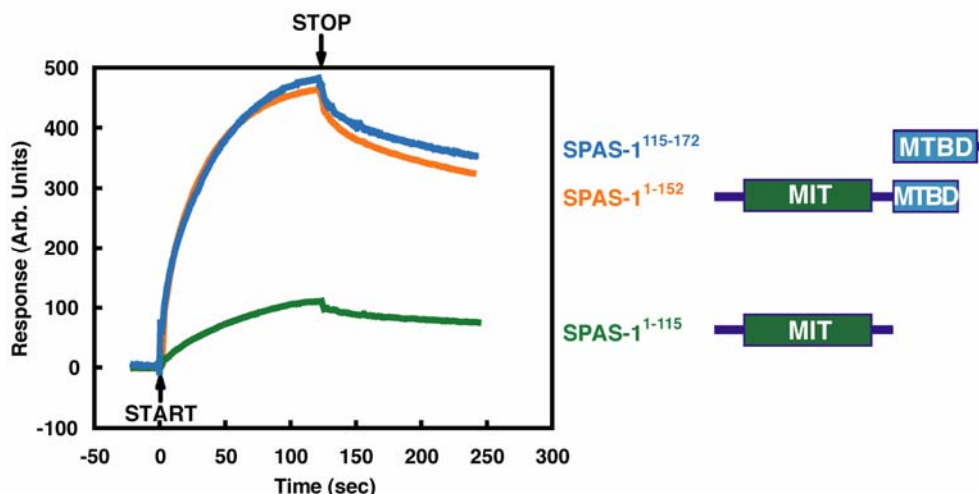


図 26. 表面プラズモン共鳴による SPAS-1¹⁻¹⁵², SPAS-1¹⁻¹¹⁵ および SPAS-1¹¹⁵⁻¹⁷² とブタ脳 tubulin の相互作用の検出。緩衝液組成, 10 mM Hepes (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM DTT; 測定温度, 25 °C; 流速, 20 μ l/min; SPAS-1 添加量, 30 μ M。

7)-6 SPAS-1 のオリゴマー形成状態の検討

AAA タンパク質は 6 量体などのリング状オリゴマーを形成し機能することが知られている (Ogura and Wilkinson, 2001)。近年, White ら (2007) や Roll-Mecak ら (2008) によって, ヒトおよびショウジョウバエ spastin の 6 量体形成には ATP の結合が必須であることが報告された。一方, Pantakani ら (2008) は, White らとは対照的に, ヒト spastin の 6 量体形成は ATP 非依存的に起こることを示した。そこで, SPAS-1 のオリゴマー状態を検討するため, ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。その結果, 野生型 SPAS-1 において, ATP 存在下でも, 低濃度 (<0.55 mg/ml) では安定な 6 量体は検出できなかった (図 27A)。しかし, 高濃度 (>5 mg/ml) において同様の検討を行ったところ, ATP 非存在下にもかかわらず, 野生型 SPAS-1 において, 6 量体の推定分子量 (300 kDa) 付近にピークが検出された (図 27B)。さらに, ATP 結合能を欠損する Walker A 変異体 K224R についても, 300 kDa 付近に単一のピークを示した。ここで実際に, K224R 変異体が ATP 結合能を欠損しているか否かをトリプトファン蛍光スペクトルの測定により検証した。SPAS-1 は 251 番目に一つだけトリプトファンをもち, これは AAA タンパク質でよく保存されている pore に位置する芳香族残基に相当する。本手法は, ATP 依存的に生じる AAA ドメインの構造変化をトリプトファン蛍光スペクトルの変化により検出することにより, SPAS-1 の ATP 結合能の有無を検討するものである (図 28A)(Wang *et al.*, 2003)。野生型では, ATP の添加に伴い, 350 nm 付近の蛍光強度の減少が認められた (図 28B)。一方, K224R 変異体では, ATP の有無にかかわらず蛍光スペクトルに変化が見られなかった。したがって, K224R 変異体は ATP 結合能をもたないと判断できる。以上の結果から, オリゴマーの形成は, ATP 依存性よりむしろ濃度依存性を示す可能性が示唆された。

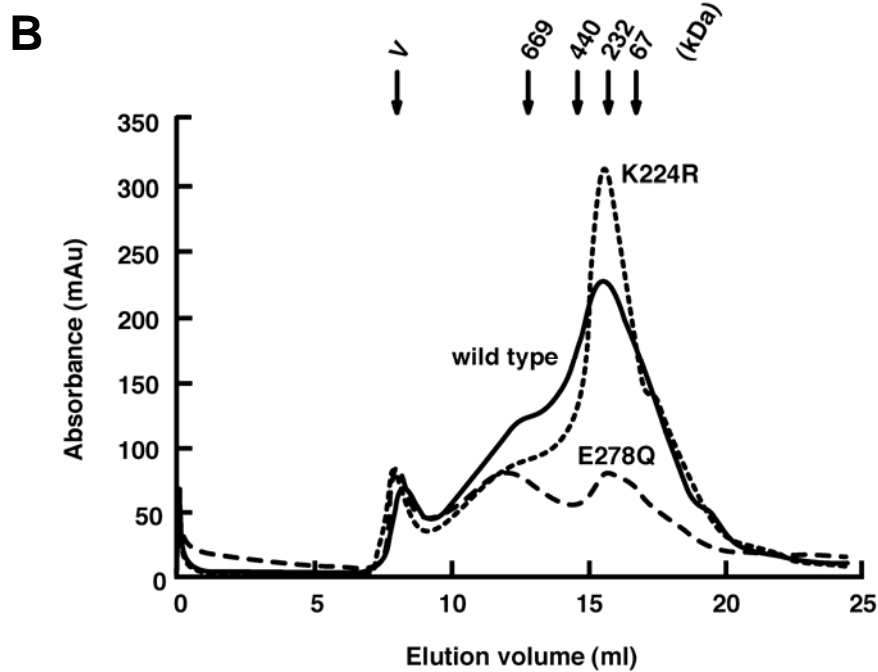
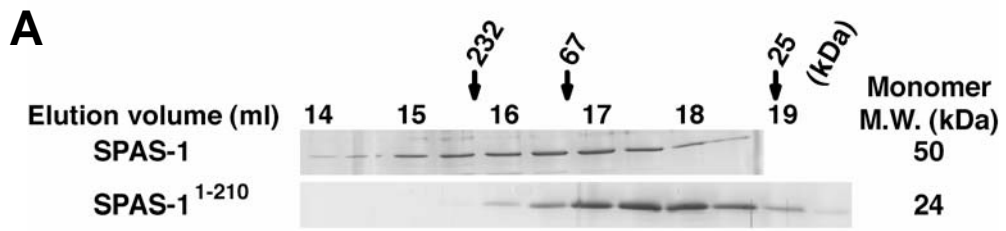


図 27. ゲル濾過クロマトグラフィー測定結果。A) 濃度, 0.55 mg/ml; 注入量, 100 μ l; 測定 buffer 組成, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.01% NP-40, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 3 mM ATP。B) 濃度, > 5 mg/ml; 注入量, 900 μ l; 測定 buffer 組成, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% glycerol。

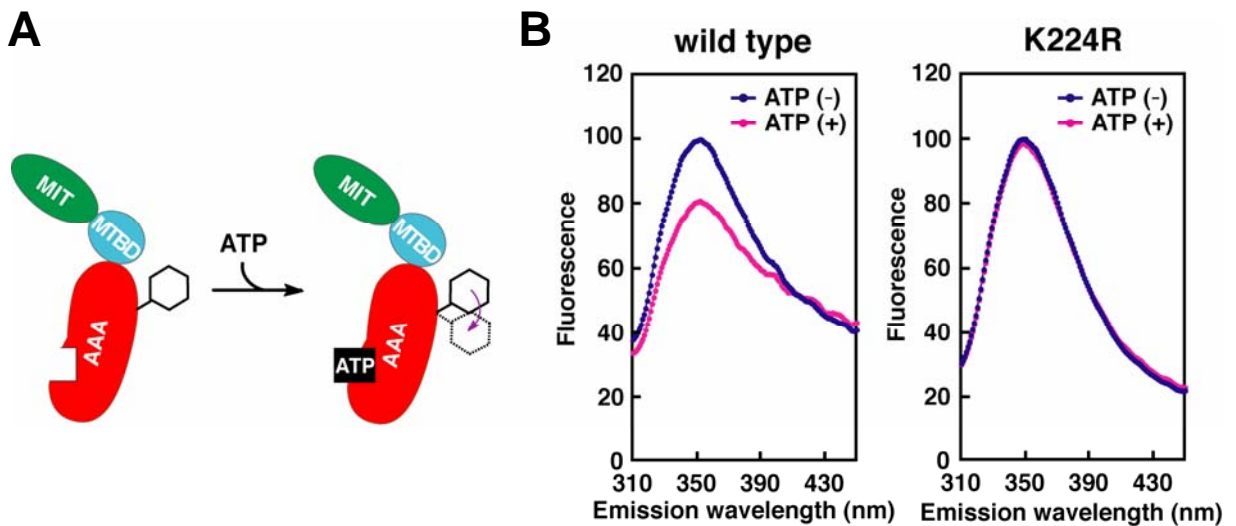


図 28. トリプトファン蛍光スペクトル測定による ATP 結合能の検出。A) 本手法の原理を模式的に示した。B) ATP の有無における野生型および K224R 変異体の蛍光スペクトル。励起波長: 295 nm。

一方, ATP 加水分解能を欠損する Walker B 変異体 E278Q においては, 300 kDa のピークの

高さが減少し、新たに 800 kDa 付近にピークが現れた (図 27B)。同じサブグループに属する別の AAA タンパク質 Vps4 では、12 量体を形成することも報告されており、また 12 量体の形成には、このサブグループに特有の構造である C 末端の α -helix が重要な役割を担っていることが示唆されている (Babst *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 2008; Landsberg *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2005a; Vajjhala *et al.*, 2008)。したがって、SPAS-1 についてもより大きな 12 量体を形成する可能性が示唆された。

7)-7 C 末端 α -helix の解析

前掲 7)-6 項において、SPAS-1 が 6 量体を形成することを確認したので、ショウジョウバエ spastin の AAA ドメインの構造 (PDB code: 3b9p; Roll-Mecak and Vale, 2008) を鋳型としてモデリングした単量体構造を代表的な AAA タンパク質 p97 D1 ドメインの 6 量体構造 (PDB code: 1r7r; Huyton *et al.*, 2003) にフィッティングし、SPAS-1 AAA ドメインの 6 量体リング構造のホモロジーモデリングを行った (図 29)。

Spastin を含む AAA サブグループのみに、共通する α -helix が C 末端に存在することが報告されており (Scott *et al.*, 2005a)、線虫の SPAS-1 についてもこの α -helix が存在し、それを図 29 の AAA ドメインの 6 量体リング構造のモデルにおいて示した。Vps4 において、この C 末端の α -helix が、オリゴマー形成および ATPase 活性に重要であることが報告されている (Vajjhala *et al.*, 2008)。

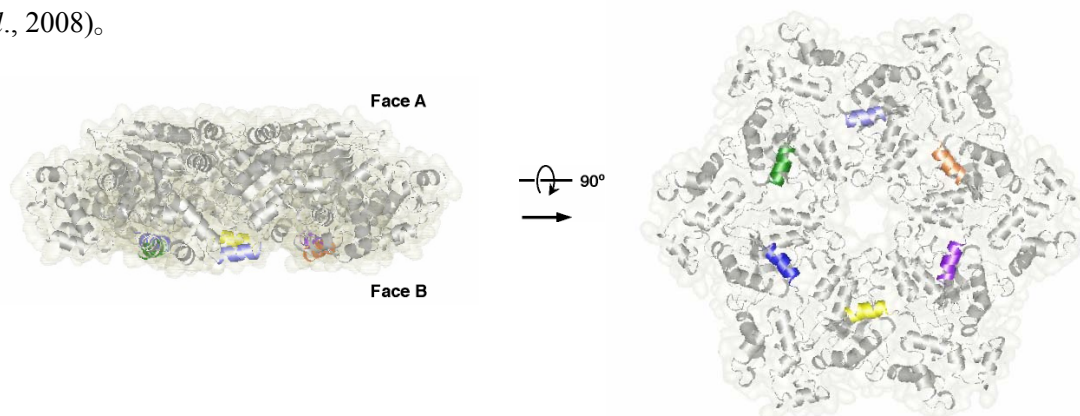


図 29. SPAS-1 を含むサブグループで保存された C 末端 α -helix。ショウジョウバエ spastin AAA ドメインの構造 (Roll-Mecak and Vale, 2008) を鋳型としてモデリングした単量体構造を p97 D1 ドメインの 6 量体構造 (Huyton *et al.*, 2003) にフィッティングした。SPAS-1 AAA ドメインの 6 量体リング構造のモデルに、それぞれの単量体の C 末端 α -helix を異なる色で示した。

そこで、保存された C 末端 α -helix を欠失した変異体を作製し、培養細胞における微小管切断活性を評価した。その結果、C 末端の α -helix を欠損した SPAS-1¹⁻⁴³² コンストラクトを発現する細胞では、微小管の消失が認められなかった (図 30)。したがって、C 末端 α -helix が SPAS-1 の微小管の切断に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

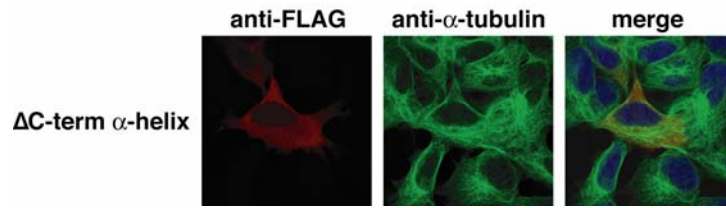


図 30. SPAS-1 による微小管切断における C 末端 α -helix の重要性。FuGENE 6 (Roche) を用いて、 Δ C 末端 α -helix SPAS-1 cDNA を transfection し、48 時間後に PFA で固定した。その後、anti- α -tubulin 抗体 (緑) および anti-FLAG 抗体 (赤) を用いて、免疫抗体染色を行った。なお、染色体は DAPI (青) により染色を行った。

次に、野生型および Walker B 変異体 E278Q それぞれについて SPAS-1¹⁻⁴³² コンストラクトを大腸菌で発現・精製し、オリゴマー状態の検討および ATPase 活性の測定を行った。その結果、SPAS-1¹⁻⁴³² では、野生型 (図 27B) に比べて 6 量体 (300 kDa) の形成が阻害され、単量体 (50 kDa) の分子量付近にピークが検出された (図 31A)。なお、SPAS-1¹⁻⁴³² E278Q においても、同様の傾向が見られた。さらに、いずれの変異体についても、ATPase 活性は認められなかった (図 31B)。以上の結果から、C 末端の α -helix はオリゴマーの形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

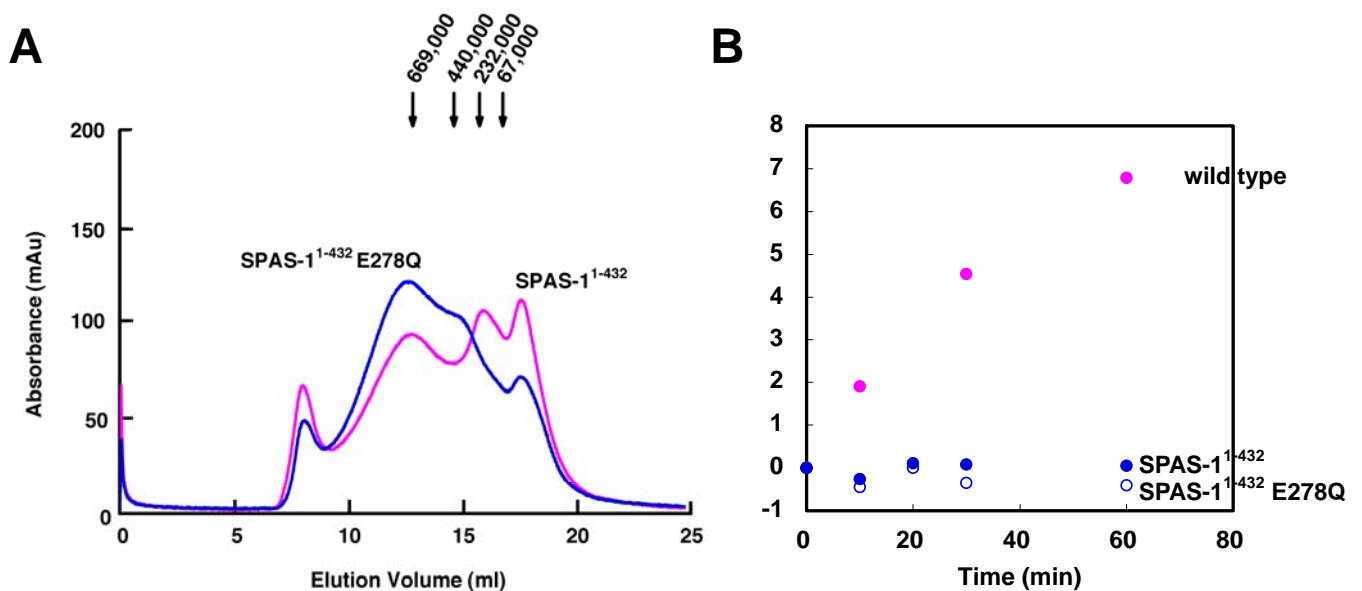


図 31. オリゴマー形成における C 末端 α -helix の重要性。A) ゲル濾過クロマトグラフィー測定結果。濃度, > 5 mg/ml; 注入量, 900 μ l; 測定 buffer 組成, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% glycerol。野生型 SPAS-1¹⁻⁴³² のスペクトルを桃色, SPAS-1¹⁻⁴³² E278Q のスペクトルを青色で示した。B) ATPase 活性測定結果。ATPase 活性を定量する方法として、マラカイトグリーン法を用いた。反応系, 25 μ l; 緩衝液組成, 10 mM HEPES-KOH (pH 8.2), 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 5 mM DTT; ATP 濃度, 3 mM; 反応温度, 37°C。

7)-8 Pore の保存された芳香族残基トリプトファン解析

AAA タンパク質はリング状オリゴマーを形成し、その pore に位置する芳香族残基はよく保存されており、機能に重要な役割を担っていることが知られている (Gerega *et al.*, 2005; Schlieker *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2005a; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。AAA タンパク質のなかで最も解析が進んでいる AAA プロテアーゼ FtsH においては、pore の芳香族残基フェニルアラニンアラニンを置換すると、基質を分解できなくなることが報告されている (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。線虫の SPAS-1 についても、AAA ドメインの 6 量体リング構造のホモロジーモデリングを行った結果、pore に相当する位置にトリプトファンを有することが明らかになった (図 32)。

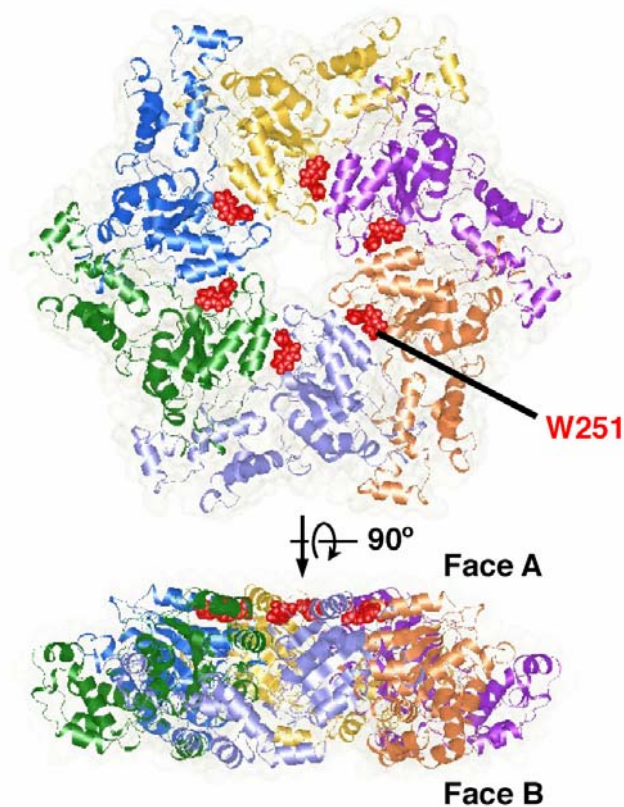


図 32. SPAS-1 AAA ドメインの 6 量体リング構造の pore の保存された芳香族残基。ショウジョウバエ spastin AAA ドメインの構造 (Roll-Mecak and Vale, 2008) を鋳型としてモデリングした単量体構造を p97 D1 ドメインの 6 量体構造 (Huyton *et al.*, 2003) にフィッティングした。

そこで、SPAS-1 による微小管切断における pore の芳香族残基の重要性を検討するために、251 番目のトリプトファンをアラニン、グルタミン酸、リジンおよびフェニルアラニンに置換した変異体を作製し、培養細胞における微小管切断活性の評価を行った。図 33 に示すように、全ての変異体は ATPase 活性を保持していた。しかしながら、W251A, W251E および W251R 変異体は微小管切断活性を消失した。一方、W251F 変異体は微小管切断活性を保持していた。以上の結果から、微小管切断において、保存された pore の芳香族残基が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

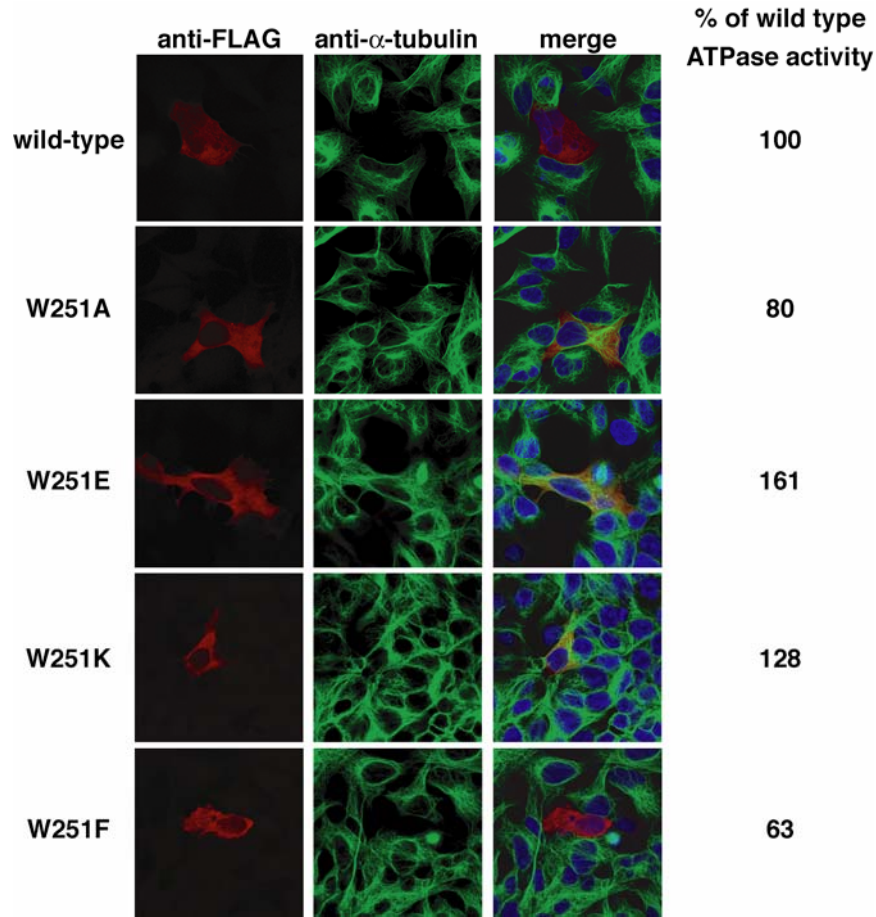


図 33. SPAS-1 による微小管切断における pore の保存された芳香族残基トリプトファン的重要性。

FuGENE 6 (Roche) を用いて、各種変異型 SPAS-1 cDNA を transfection し、48 時間後に PFA で固定した。その後、anti- α -tubulin 抗体 (緑) および anti-FLAG 抗体 (赤) を用いて、免疫抗体染色を行った。なお、染色体は DAPI (青) により染色を行った。

7)-9 Pore の保存された塩基性残基の解析

最近、ヒトにおいて、spastin が ATP 依存的に tubulin の C 末端と相互作用することが報告された (White *et al.*, 2007)。また、pore 周辺のアミノ酸残基に変異を導入すると、 α -tubulin あるいは β -tubulin C 末端との相互作用能を欠損することから、彼女らは spastin が 6 量体の pore 周辺で tubulin の C 末端を認識していると結論づけた。さらに Roll-Mecak ら (2008) は、*in vitro* において、 β -tubulin C 末端ペプチド存在下で spastin の微小管切断活性が阻害されることを示した。一方、 α -tubulin および β -tubulin の C 末端は、酸性残基が豊富で構造をとっていない領域であることが知られている (Nogales *et al.*, 1998; 1999)。そこで、図 34 のモデリングした SPAS-1 6 量体構造を基に、表面に露出している塩基性残基をアラニンに置換した変異体を作製し、微小管切断活性を評価した。その結果、リング状 6 量体の pore 周辺に位置する塩基性残基の変異体 K257A, R260A, R286A, R295A および R296A は微小管切断活性を消失したのに対し、pore から離れた塩基性残基 R176, R205, R236 および R267 への変異の導入は、微小

管切断活性に影響を与えなかった (図 34A, C)。以上の結果から、リング状 6 量体の pore 周辺に位置する塩基性残基が微小管の切断に重要であることを明らかにした。ここで興味深いことに、K257A 変異体は微小管切断活性を失うだけでなく、SPAS-1 が微小管と共局在するという他の変異体と異なる挙動を示した (図 34C)。これについての詳細な解析は、7)-10 項に後述する。

さらに、SPAS-1 のリング状 6 量体の pore が tubulin C 末端を認識している可能性が示唆されたため、表面プラズモン共鳴法を用いて、SPAS-1 と tubulin C 末端ペプチドの相互作用の検出を試みた。リガンドとして N 末端に GST を融合した線虫の α -tubulin (TBA-1) C 末端ペプチド (22 残基) を固定し、アナライトとして全長 SPAS-1 を添加した結果、SPAS-1 の添加量依存的に Resonance Unit (RU) が上昇した (図 35)。したがって、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。

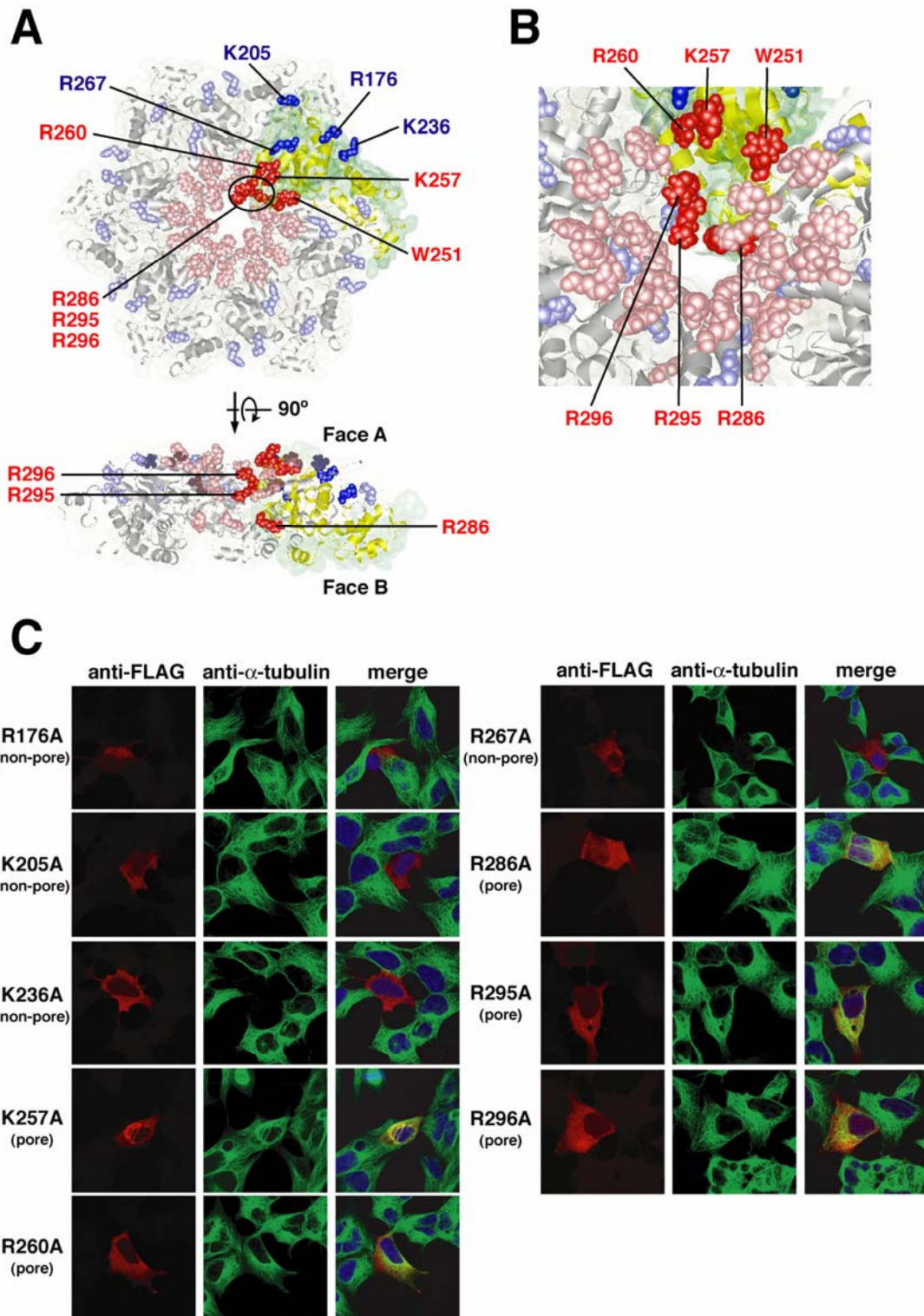


図 34. SPAS-1 による微小管切断における pore の保存された塩基性残基の重要性。A) SPAS-1 AAA ドメインの 6 量体リング構造のモデル。アラニン変異を導入し、微小管切断活性が消失したアミノ酸残基を赤で、微小管切断活性を保持したアミノ酸残基を青で示した。B) リング状 6 量体の pore 周辺の拡大図。C) 各種 SPAS-1 変異体の微小管切断活性の評価。FuGENE 6 (Roche) を用いて、各種変異型 SPAS-1 cDNA を transfection し、48 時間後に PFA で固定した。その後、anti- α -tubulin 抗体 (緑) および anti-FLAG 抗体 (赤) を用いて免疫抗体染色を行った。なお、染色体は DAPI (青) により染色を行った。

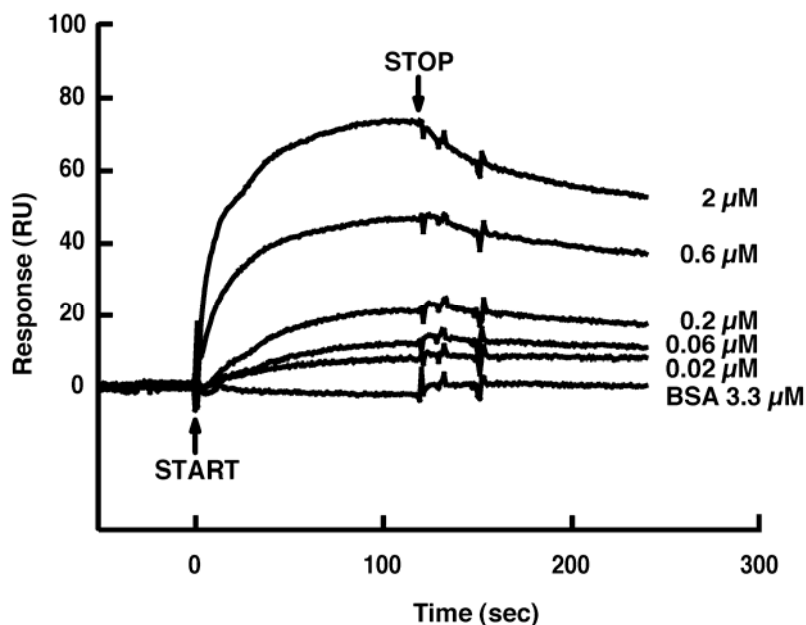


図 35. 表面プラズモン共鳴法による SPAS-1 と tubulin C 末端の相互作用の検出。緩衝液組成, 10 mM Hepes (pH 7.6), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween 20, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 3 mM ATP; 測定温度, 25 °C; 流速, 20 μl/min。

7)-10 Pore の塩基性残基 K257 の解析

前掲 7)-9 項において, K257A 変異体は微小管切断活性を失うだけでなく, 変異 SPAS-1 が微小管と共局在していることが観察された (図 34C)。同様の現象は, E278Q 変異体を発現する細胞でも観察された (図 12A)。E278Q 変異体は ATP 結合能を有するが, ATP 加水分解能を欠損するため (Ogura and Wilkinson, 2001), 微小管から SPAS-1 自身が脱会合できなくなり, 共局在していると考えられる。しかし, K257A 変異体については ATPase 活性を保持しており, 野生型と同様に安定な 6 量体も形成できる (図 36)。にもかかわらず, 微小管からの脱会合ができない。したがって, 257 番目のリジンは tubulin の認識だけではなく, 微小管からの脱会合にも関与している可能性が示唆された。そこで, 257 番目のリジンの機能を明らかにするため, リジンを長さが異なる同じプラスチャージをもつアルギニン, マイナスチャージをもつグルタミン酸, およびチャージをもたないグルタミンに置換し, 培養細胞における微小管ダイナミクスへの影響を調べた。その結果, いずれの変異体においても微小管の消失が認められなかった (図 37)。さらに, K257R および K257Q 変異体は, K257A 変異体と同様に, 微小管と共局在した。これらの結果から, 257 番目のリジンはプラスチャージをもつことだけでなく, その側鎖の長さも重要であることが示唆された。次に, tubulin を認識する他の pore 残基との二重変異体を作製し, 培養細胞における微小管切断活性を評価した。その結果, K257A/W251A および K257A/R260A の二重変異体では, K257A 変異体で見られていた微小管との共局在が解除されたのに対し, K257A/R286A, K257A/R295A 二重変異体は, 微小管との共局在を示したままであった (図 37)。また, K257A/R296A 二重変異体については, 約 80%

の細胞で微小管との共局在が解除された (図 37)。興味深いことに、SPAS-1 と微小管の共局在の解除に関与した 251 番目のトリプトファンおよび 260 番目のアルギニンは、立体構造上 FaceA の表面に露出しており、微小管との共局在の解除に関与しなかった 286 番目および 295 番目のアルギニンは pore 内部に位置する (図 34A, B)。そして、296 番目のアルギニンは、ちょうど pore 表面と内部の中間的なところに位置している (図 34A, B)。以上の結果から、SPAS-1 による微小管の認識には、pore 表面と内部の少なくとも二つの認識サイトがある可能性が示唆された。さらに、各種二重変異体における SPAS-1 と微小管の共局在の有無は、微小管が FaceA から pore 内部に translocation されている可能性を示唆する。

一方、代表的な AAA プロテアーゼである FtsH は、ATP 加水分解のサイクルが pore の構造を変換し、基質の translocation を促進することが報告されている (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。7)-6 項で述べたように、SPAS-1 においても、pore の芳香族残基である 251 番目のトリプトファンの蛍光スペクトルが、ATP の結合により変化することから、ATP 加水分解サイクルにおける pore の構造変換が示唆される。また、257 番目のリジンが、251 番目のトリプトワンの近傍に位置していることから、257 番目のリジンは、pore の構造変換が引き起こす微小管切断へのエネルギーの移行過程に関与している可能性が考えられる。

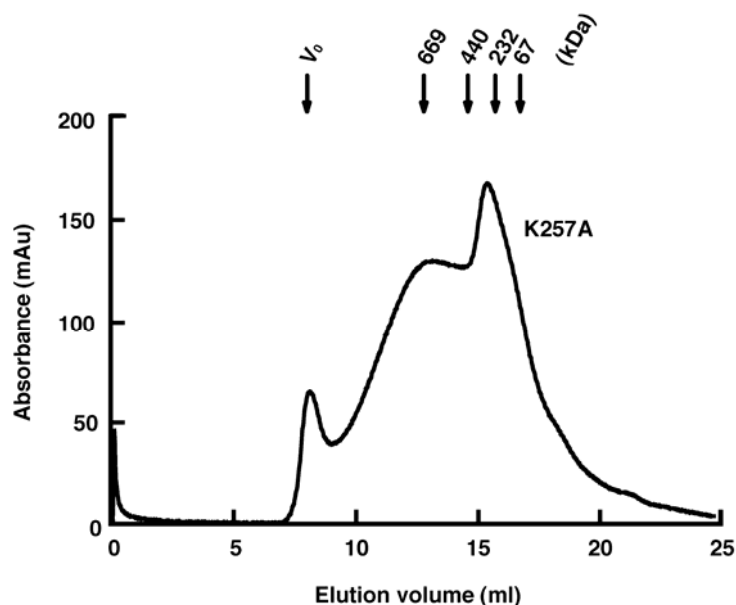


図 36. ゲル濾過クロマトグラフィー測定結果。濃度, > 5 mg/ml; 注入量, 900 μ l; 測定 buffer 組成, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% glycerol。

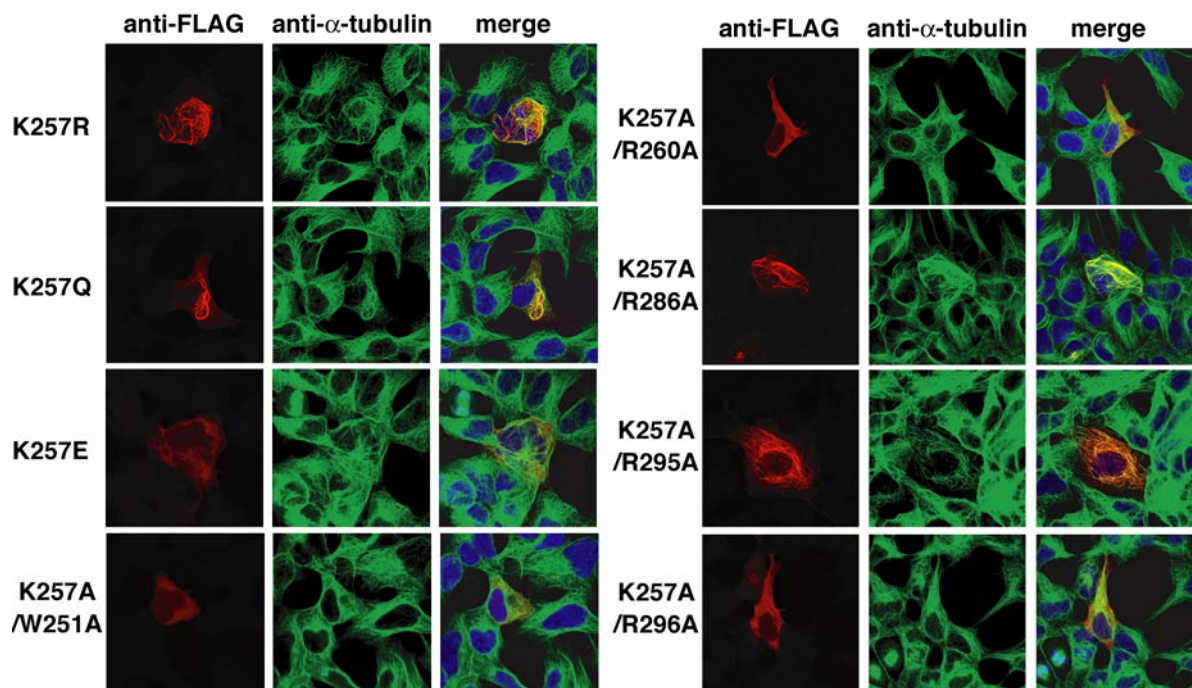


図 37. SPAS-1 による微小管切断における pore の塩基性残基 K257 の重要性。FuGENE 6 (Roche) を用いて、各種変異型 SPAS-1 cDNA を transfection し、48 時間後に PFA で固定した。その後、anti- α -tubulin 抗体 (緑) および anti-FLAG 抗体 (赤) を用いて、免疫抗体染色を行った。なお、染色体は DAPI (青) により染色を行った。

8) 考察

8)-1 SPAS-1 の ATPase 活性とその促進

線虫の spastin ホモログ SPAS-1 が ATPase 活性を有すること、その ATPase 活性が微小管を添加することにより促進されることを見出した (図 14A, B)。興味深いことに、代表的な AAA プロテアーゼである FtsH は、基質である casein や σ^{32} を添加することにより ATPase 活性が 2 倍程度促進されることが報告されているが (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)、微小管による SPAS-1 の ATPase 活性の促進は約 7 倍であった (図 14B)。AAA タンパク質の ATP 加水分解の分子機構として、6 量体の隣り合うサブユニットの共同作用で ATP 加水分解が起こるといふ「分子間触媒モデル」が提唱されている (図 38)(Ogura and Wilkinson, 2001)。後で述べるように、SPAS-1 は細胞内に存在する濃度では、単量体あるいは 2 量体で存在していると考えられる。したがって、SPAS-1 単量体 (あるいは 2 量体) が微小管に結合し、安定な 6 量体を形成することにより、ATPase 活性が促進されたと考えられる (図 39)。

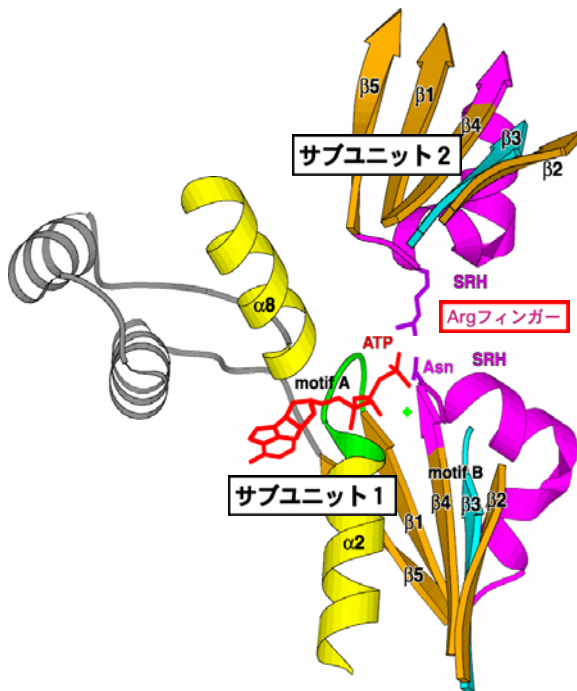


図 38. AAA ATPase の ATP 加水分解における分子間触媒モデル (Ogura and Wilkinson, 2001)。SRH をマゼンタ、ATP を赤で示す。2 分子間の SRH 領域と ATP が相互作用している。

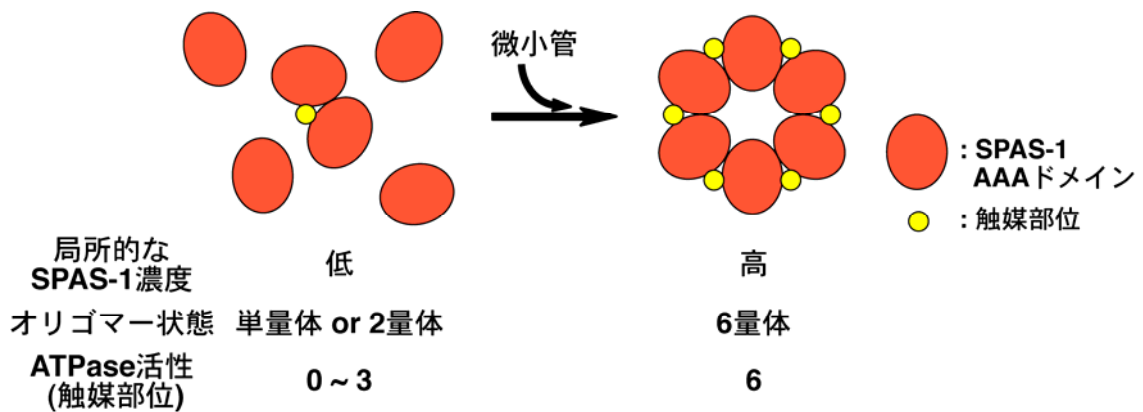


図 39. 微小管添加による SPAS-1 の ATPase 活性促進の分子機構 (模式図)。

8)-2 SPAS-1 の N 末端領域

Pull down assay により SPAS-1 の微小管結合領域を同定した。微小管と相互作用するタンパク質が共通してもっているドメインであることから、微小管結合ドメインと考えられていた MIT ドメインではなく、より C 末端側の MTBD 領域で tubulin と結合することを見出した (図 15)。MIT ドメインについては、最近、エンドソームのタンパク質である CHMP1B の C 末端が結合することが報告されており、さらに、それらの結合状態の構造も明らかになった (Reid *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009)。また、CHMP1B を含む複数のエンドソームタンパク質で構成される ESCRT タンパク質複合体が、細胞質分裂の際に現れる midbody に局在することが明らかとなり (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita *et al.*, 2007), Connell ら (2009) および Yang ら (2009) によって、spastin が CHMP1B を介して midbody に局在し、midbody 周辺の微小管を切断することが示された。したがって、今回の MIT ドメインは微小管の結合には強く関与しないという結果は、これらの報告と一致する。

一方、MTBD は微小管結合ドメインであるにもかかわらず、生物種間でアミノ酸配列の相同性が低い領域である。また、MIT ドメインについても、ヒトやマウス、ショウジョウバエにおいてはアミノ酸配列の相同性が高いのに対し、線虫においてはその相同性が低い。そこで、MIT ドメインおよび MTBD を含む SPAS-1 N 末端領域の構造解析を行った。その結果、MIT ドメインは α -helix の豊富な領域、MTBD は特定の立体構造をもたない領域であることを見出した (図 22, 24)。Spastin ホモログの MTBD の高次構造については、今までに報告がなく、今回私は、初めて SPAS-1 の MTBD の高次構造に関する知見を得た。MIT ドメインについては、Vps4 および spastin で立体構造が決定され、3 本の α -helix から成ることが報告されている (Scott *et al.*, 2005b; Takasu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009)。したがって、線虫においては MIT ドメインのアミノ酸配列が保存されていないものの、高次構造は保存されている可能性が示唆された。そこで、ソフトウェア MOE を用い、ヒト spastin の MIT ドメインの立体構造 (PDB code: 3eab; Yang *et al.*, 2009) を鋳型としてモデリングした SPAS-1 MIT ドメインの立体構造を図 40 に示す。すると、ヒト spastin において、CHMP1B の結合に重要である保存された二つの芳香族残基 (21 番目のフェニルアラニンと 25 番目のチロシン) および 36 番目のグルタミン酸は、SPAS-1 でも同様に、CHMP1B 結合面であると考えられる面に向かって露出していた (図 40 に青色で示した)。一方興味深いことに、3 本目の α -helix ($\alpha 3$) については、Yang (2009) らが CHMP1B と結合すると報告した二つの塩基性残基およびアスパラギンは保存されていないものの、二つの塩基性残基 (83 番目のリジンと 97 番目のアルギニン) および 86 番目のアスパラギンが CHMP1B 結合面に露出していた (図 40 に赤色で示した)。HNHA 測定の結果からも、SPAS-1 の 3 本目の α -helix は、従来の MIT ドメインのもの (図 22, 緑色で囲った $\alpha 3$) と比較し、より C 末端側にシフトしているように見えるため (図 22, 橙色の線)、機能的には保存されているが構造的には少し異なることが示唆される。

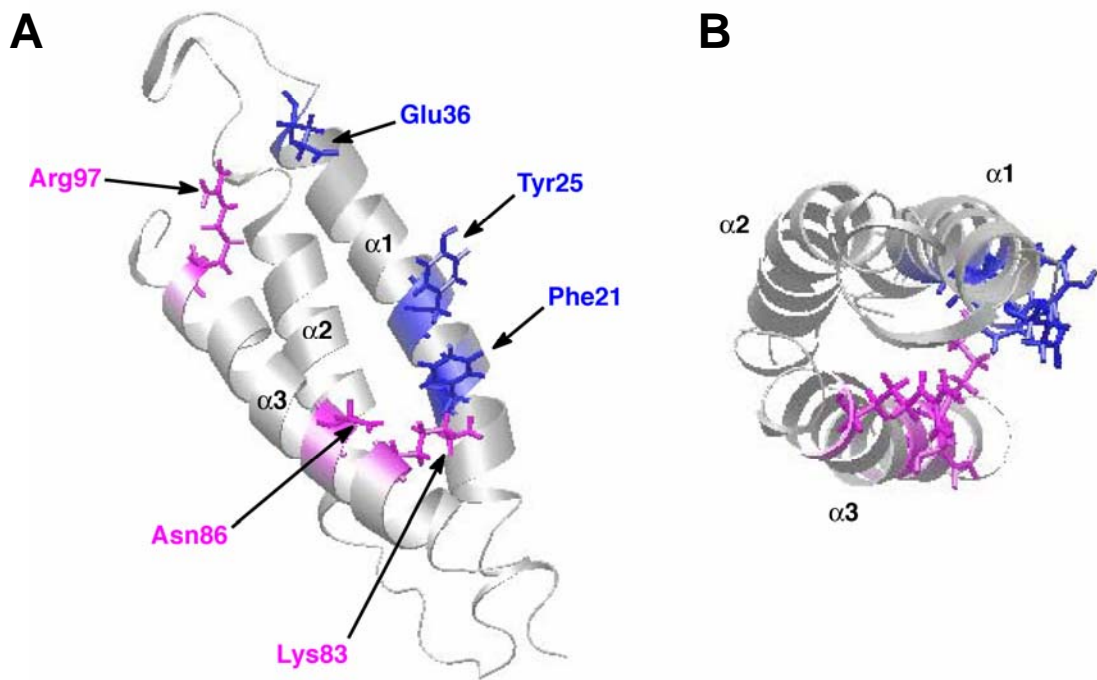


図40. SPAS-1 MITドメインのホモロジーモデリング。A) ヒト spastin のMITドメインの構造 (PDB code: 3eab; Yang *et al.*, 2009) を鋳型としてモデリングした SPAS-1 MITドメインの構造。ヒト spastin において、基質である CHMP1B の結合に重要である残基を青色で示した。3本目の α -helix ($\alpha 3$)で CHMP1B 結合面に露出しているアスパラギンおよびプラスチャージをもつ残基を赤色で示した。B) Aを上から見た図。

また、SPAS-1 と tubulin の相互作用様式を明らかにするために、tubulin 滴定実験を行ったところ、MTBD 領域で tubulin と強く相互作用し、さらに MIT ドメインを介して弱く相互作用している可能性が示唆された (図 25)。同様の結果は、表面プラズモン共鳴法を用いた相互作用実験からも得られ (図 26)、図 41 に示すような SPAS-1 と tubulin の相互作用モデルが考えられる。現段階では、tubulin に対する MIT ドメインの相互作用の生物学的意義は不明であるが、MTBD と tubulin の結合を補助するような役割があるのかもしれない。今後の課題である。

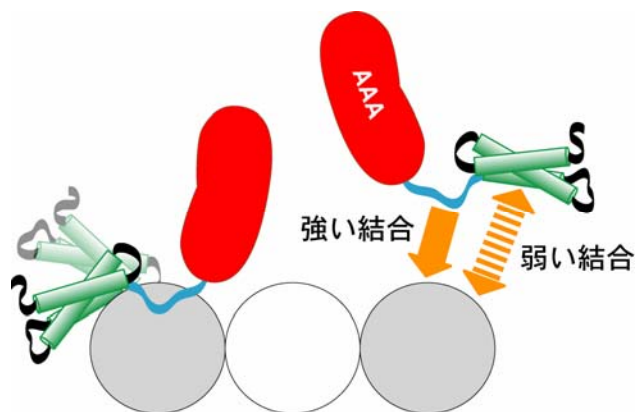


図41. SPAS-1 と tubulin の相互作用モデル。青色は MTBD、緑色は MIT ドメイン、赤色は AAA ドメインを示す。

また最近、天然変性タンパク質という分野が注目を集めている。天然変性タンパク質とは、特異的な機能をもつが、「本質的に不規則あるいは無秩序 (intrinsic disorder: ID)」な領域と呼ばれ、タンパク質分子の全体が不規則 (無秩序) 領域からなるもの、または部分的に不規則 (無秩序) 領域をもつものを言う (西川, 2009)。近年、立体構造解析法の一つである NMR 技術の飛躍的進歩により、ID ドメインおよびタンパク質の存在が認知されるようになったが、比較的新しい概念であるため、まだ不明な点も多い。SPAS-1 の MTBD はまさに ID 領域に相当すると考えられる。したがって、構造生物学的観点においても、大変興味深い領域であると考えられる。

8)-3 Spastin を含むサブグループのオリゴマー形成

FtsH を含め、AAA タンパク質は一般的に、6 量体などのリング状オリゴマーを形成し機能することが知られている (Ogura and Wilkinson, 2001)。一方で、spastin を含め、同じ AAA サブグループに属する katanin や Vps4 は、ATP 依存的に 6 量体を形成することが報告されている (Babst *et al.*, 1998; Hartman *et al.*, 1999; Roll-Mecak and Vale, 2008; White *et al.*, 2007)。しかしながら、今回私は、SPAS-1 が ATP 依存的よりむしろ濃度依存的に 6 量体を形成することを示した (図 27A, B)。前掲 8)-1 項で述べたように、SPAS-1 の ATPase 活性が微小管を添加することにより促進されたことから、SPAS-1 は MTBD を介して微小管に結合し、微小管上で局所的に SPAS-1 の濃度が高くなることにより、6 量体を形成しやすくなる可能性が示唆された。これは、今まで ATP 依存的にオリゴマーを形成すると考えられていた spastin にとって、新しい知見である。

また、SPAS-1 のオリゴマー形成状態の検討結果より、ATP 加水分解能に欠陥を有する Walker B 変異体 E278Q において、12 量体を形成する可能性が示唆された (図 27B)。AAA タンパク質の 12 量体形成については、spastin と同じサブグループに属する Vps4 でよく研究されている。12 量体は二つの 6 量体が tail to tail の形で積み重なったもので、その形成には、このサブグループで特異的な構造である C 末端の α -helix が重要な役割を担っていることが示唆されている (図 42)(Babst *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 2008; Landsberg *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2005a; Vajjhala *et al.*, 2008)。SPAS-1 も C 末端の α -helix をもっており (図 29)、これを欠失させた SPAS-1¹⁻⁴³² 変異体は微小管切断活性を示さない (図 30)。また、6 量体の安定性も低下し、ATPase 活性も示さなかった (図 31)。したがって、SPAS-1 についても C 末端の α -helix がオリゴマー形成に重要な役割を担っており、これにより ATPase 活性、微小管切断活性が惹起される可能性が示唆された。一方、Vps4 の場合、12 量体の形成および安定化に関与する因子として Vta1p が同定されている (Azmi *et al.*, 2006; 2008; Lottridge *et al.*, 2006; Vajjhala *et al.*, 2006; 2008; Z. Yu *et al.*, 2008)。Spastin については今までにこのような知見はなく、今回得られた結果は非常に興味深いものである。

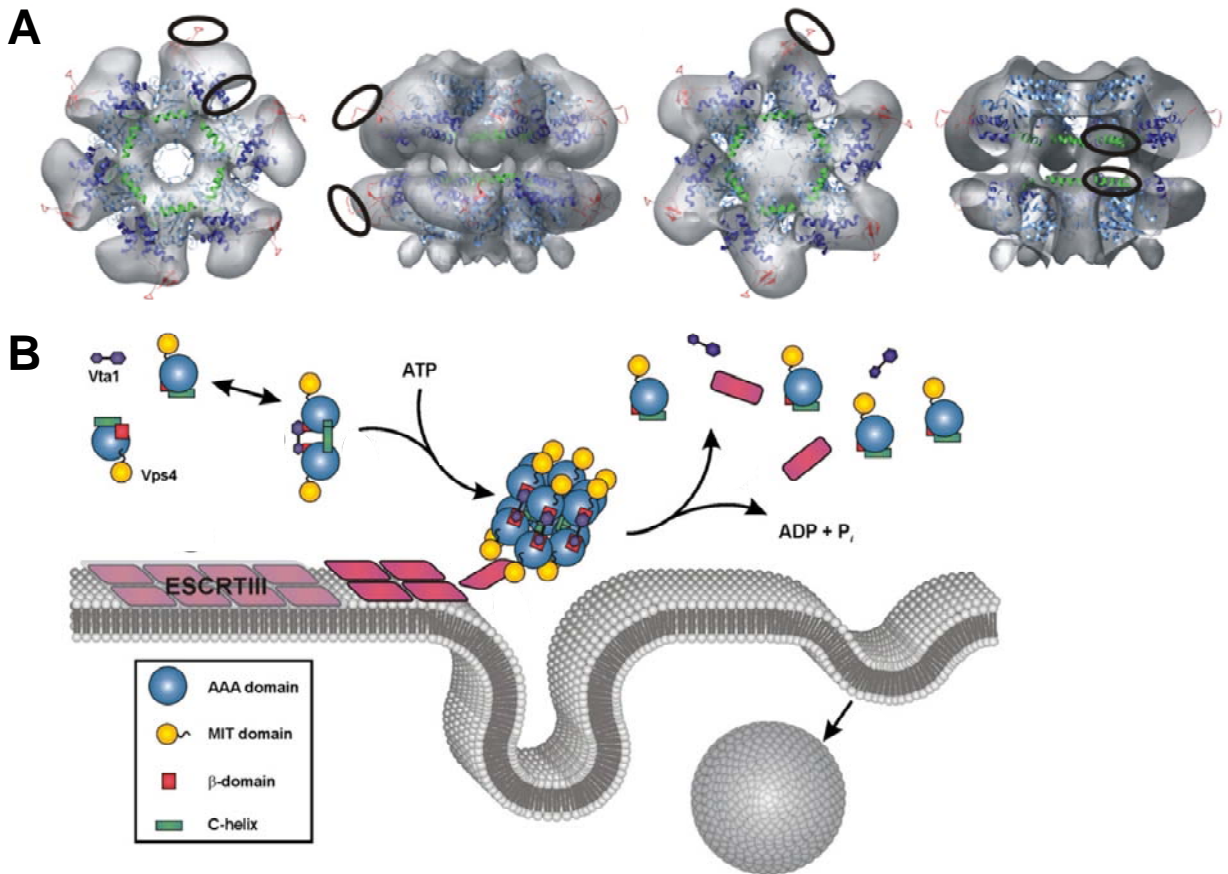


図 42. Vps4 のオリゴマー形成状態 (Landsberg *et al.*, 2009)。A) 電子顕微鏡観察により得られた Vps4 12 量体構造に Vps4 6 量体構造のホモロジーモデルをはめ込んだもの。左から、それぞれ上, 横, 下から見た図。一番右は、横から見た図を輪切りにしたもの。C 末端の α -helix は緑色で示されている。B) Vps4 12 量体がエンドソームの膜でタンパク質複合体を解体するモデル図。

8)-5 Pore の保存された芳香族残基と塩基性残基の重要性

AAA タンパク質のリング状オリゴマーの pore に位置する芳香族残基はよく保存されており、機能に重要であることが知られている (Gerega *et al.*, 2005; Schlieker *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2005a; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。SPAS-1 も pore の芳香族残基に相当する位置にトリプトファンを有しており、これをアラニン、グルタミン酸およびリジンに置換すると、微小管切断活性が消失することを見出した (図 33)。一方、同じ芳香族残基であるフェニルアラニンに置換した変異体では、微小管切断活性は保持されており (図 33)、SPAS-1 においても、微小管の切断に保存された pore の芳香族残基が重要な役割を担っている可能性が示唆された。一方、微小管を subtilisin で処理し、 α -および β -tubulin の C 末端を除去すると、katanin および spastin による微小管の切断が起こらなくなることが報告されている (McNally and Vale, 1993; Roll-Mecak and Vale, 2005)。さらに、White ら (2007) は、6 量体 spastin が ATP 依存的に tubulin C 末端を認識することを示した。そこで、tubulin の C 末端は、酸性残基が豊富で構造をとっていない領域であることに加え (Nogales *et al.*, 1998; 1999)、図 34A に示した SPAS-1 の 6 量体

リング構造から pore 周辺に塩基性残基が多いことに着目し、表面に露出している塩基性残基にアラニンを導入した変異体を作製し、微小管切断活性を評価した。その結果、SPAS-1 による微小管の切断には、pore 周辺に位置する塩基性残基 K257, R260, R286, R295 および R296 が重要であることを明らかにした (図 34C)。さらに、これらの残基はすべて、ヒト、マウス、ショウジョウバエおよび線虫で保存されていた (図 9)。また、表面プラズモン共鳴法により、SPAS-1 による α -tubulin の C 末端の認識を検出した (図 35)。以上の結果から、SPAS-1 は FaceA の pore で tubulin を認識していると考えられる。

さらに興味深いことに、培養細胞で K257A 変異体を発現させると、SPAS-1 が微小管と共局在することを示し (図 34C)、257 番目のリジンが微小管からの解離に重大な役割をもつことを見出した。FtsH において、ATP 加水分解のサイクルが pore の構造変換を起こし、基質の translocation を促進することが報告されている (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。SPAS-1 においても、pore の芳香族残基である 251 番目のトリプトファンが、ATP の結合により構造変化することを蛍光スペクトルの変化により示した (図 28)。257 番目のリジンは、251 番目のトリプトワンの近傍に位置しており、257 番目のリジンは pore の構造変換が引き起こす微小管切断へのエネルギーの移行過程に関与している可能性が考えられる。さらに、K257A 変異による SPAS-1 と微小管の共局在が、tubulin を認識する他の pore 残基 W251 および R260 との二重変異体では解除された (図 37)。一方、同じ tubulin を認識する R286 および R295 との二重変異体では、SPAS-1 と微小管の共局在は解除されなかった (図 37)。興味深いことに、SPAS-1 と微小管の共局在の解除に関与した 251 番目のトリプトファンおよび 260 番目のアルギニンは、立体構造上 FaceA の表面に露出しており、微小管との共局在の解除に関与しなかった 286 番目および 295 番目のアルギニンは pore 内部に位置する (図 34A, B)。そして、296 番目のアルギニンは、ちょうど pore 表面と内部の中間的なところに位置しており (図 34A, B)、K257A/R296A 二重変異体については約 80% の細胞で微小管との共局在が解除された (図 37)。以上の結果から、SPAS-1 による微小管の認識には、pore 表面と内部の少なくとも二つの認識サイトがある可能性が示唆された。さらに、pore 内部の認識は、pore 表面の認識に依存すると考えられる。このような pore による二段階の基質認識 (Two-Step model) に関しては、ごく最近、ClpX においても報告されており (Martin *et al.*, 2008)、他の AAA タンパク質にも共通する新しい知見である可能性が示唆される。

8)-6 SPAS-1 による微小管切断モデル

以上の結果から、以下に示す二つの「SPAS-1 による微小管切断のモデル」を提唱する (図 43)。

【Dissociation model】 (図 43A)

まず、(1) SPAS-1 単量体あるいは 2 量体が MTBD を介して微小管と結合し、微小管上で局所的に SPAS-1 の濃度が高くなることにより 6 量体を形成しやすくなる。続いて、(2) SPAS-1 の pore 周辺に位置する露出した塩基性残基が tubulin の C 末端を認識し、さらに pore 内部の塩基性残基が tubulin C 末端をトラップする。そして、(3) SPAS-1 の ATP 依存的な構造変化により、(4) SPAS-1 自身の 6 量体の脱会合が起こり、同時に微小管から tubulin が外される。(5) これらのステップが繰り返され、微小管脱会合が起こる。この場合、tubulin はほとんど unfold されず、そのままサイクルされると考えられる。

【Translocation model】 (図 43B)

(1) SPAS-1 の 6 量体形成および (2) pore 周辺の塩基性残基による tubulin の認識のステップは Dissociation model と同様に起こる。しかしながら、その後、(3) SPAS-1 の ATP 依存的な構造変化により、(4) tubulin が pore 内部に引っ張り込まれる (translocation)。その結果、tubulin は少なくとも部分的に unfold され、微小管から放出される。(5) これらのステップが繰り返され、微小管脱会合が起こる。

前者は、spastin と同じ微小管切断活性をもつ katanin や普遍的な膜融合装置を構成する NSF、ペルオキシソーム形成因子である PEX1 および PEX6 で提唱されている (Hanson *et al.*, 1997; McNally and Vale, 1993; Platta *et al.*, 2005)。後者は、代表的な AAA プロテアーゼである FtsH や ClpXP, ClpAP, あるいはタンパク質の分解を行う巨大な酵素複合体である 26S プロテアソームの活性調節因子である 19S RP (regulatory particle) で提唱されている (Ishikawa *et al.*, 2001; Voges *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。後者は共通して、プロテアーゼと共役した unfoldase である。一方で、最近、spastin や Vps4 でも後者のモデルが提唱されている (Kieffer *et al.*, 2008; Roll-Mecak and Vale, 2008)。これら二つのモデルの最も大きな違いは、ATP のエネルギーの変換先にある。Dissociation model では、SPAS-1 の ATP 依存的な構造変化を SPAS-1 自身の 6 量体の脱会合に費やし、結果として tubulin を微小管から脱会合する。一方、translocation model では、ATP 依存的な構造変化を基質である tubulin の unfolding と translocation に費やす。また最近、ClpB において、基質である凝集体の中のポリペプチドを translocation し、次にトラップされた基質を ClpB の 6 量体の不安定化により遊離するという translocation model と dissociation model を組み合わせたようなモデルも提唱されている (Haslberger *et al.*, 2008)。Spastin による微小管切断のモデルについては、上記のどちらであるかはまだ議論の余地があり、今後の更なる検討が必要であると考えられる。

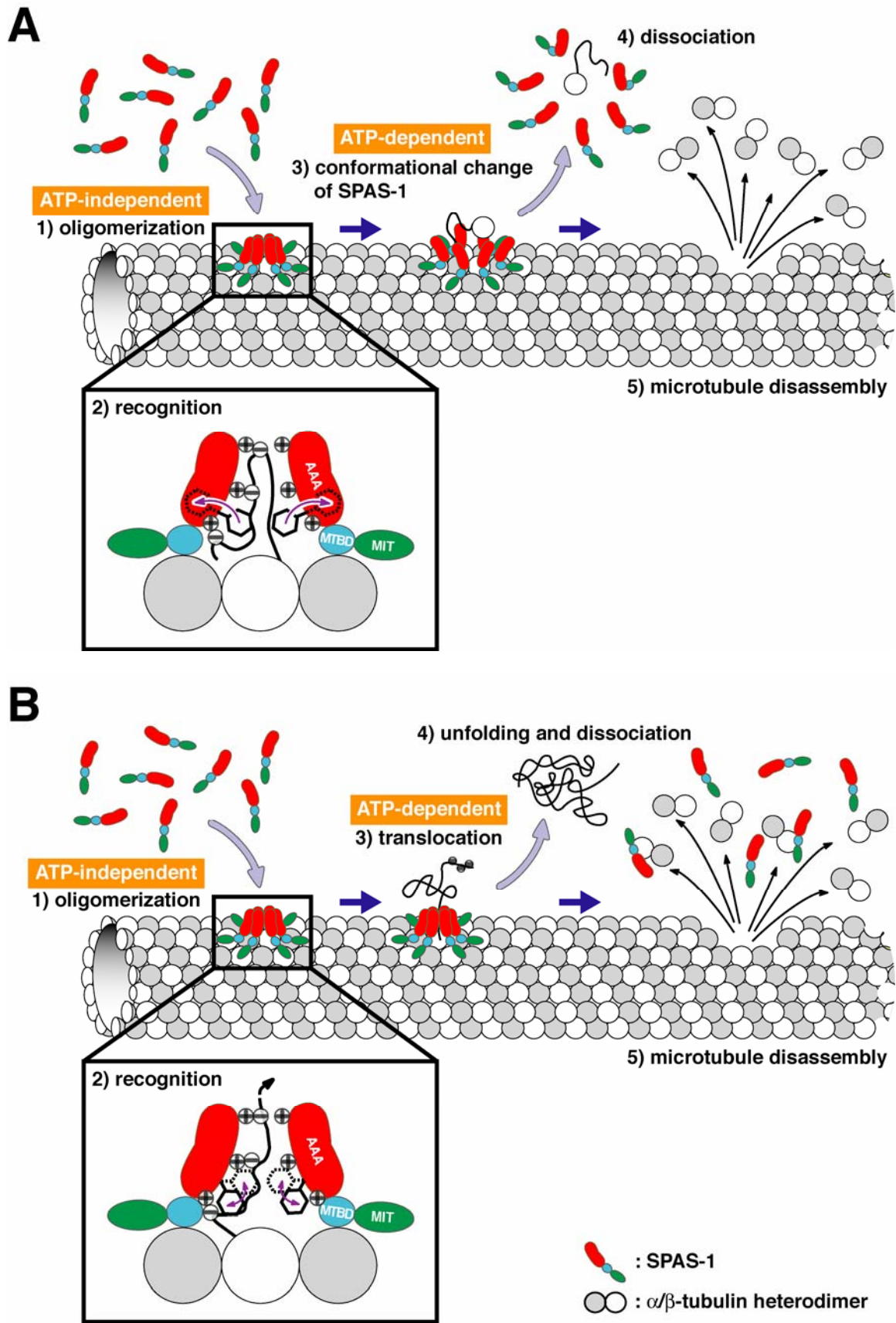


図 43. SPAS-1 による微小管切断のモデル。A) Dissociation model。B) translocation model。詳細は本文を参照。

8)-7 微小管切断におけるヒト疾患由来 SPAS-1 変異の影響

本論で解析した各種 SPAS-1 変異のなかで、K224R および R296A 変異が HSP の患者で報告されている spastin 変異に相当する。K224R 変異体では、ATPase 活性を欠損することによる微小管切断活性の消失が認められた (図 12A, 14A)。また、R296A 変異体についても、pore による tubulin の認識に欠損が生じ、微小管切断活性の消失が認められた (図 34C)。以上のように、ヒト患者由来 SPAS-1 変異は spastin の微小管切断活性を消失させ、結果として疾患を発症していると考えられる。

HSP の患者で同定された spastin 変異は 150 以上にもなり、その変異の多くは AAA ドメイン内に存在する (図 44)(Fonknechten *et al.*, 2000)。一方で、N 末端領域の変異も同定されており、ATPase 活性の欠損だけではなく、基質への結合障害、タンパク質の不安定化などが原因となり、微小管切断活性の低下を引き起こし、結果として疾患を発症することが考えられる。しかし興味深いことに、ヒト患者において、MTBD 内には nonsense 変異しか同定されておらず、今までに missense 変異の報告はない。これは、MTBD の微小管結合には、複数のアミノ酸残基が関与しており、一残基のアミノ酸置換では微小管の結合に影響を及ぼさないことを示唆しているのかもしれない。

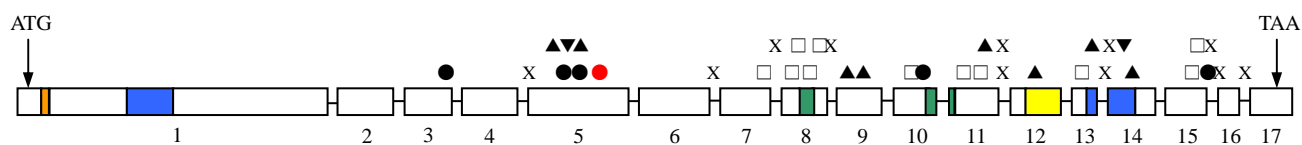


図 44. ヒト患者で同定された spastin 変異 (Fonknechten *et al.*, 2000)。Spastin 遺伝子モデル上にヒト患者で同定された 39 の変異を示す。7-11 アミノ酸残基, 推定上の核局在シグナル (橙); 50-78, 508-529 アミノ酸残基, ロイシンジッパーモチーフ (青); 382-389 アミノ酸残基, ATP 結合サイト Walker A モチーフ (緑); 437-442 アミノ酸残基, Walker B モチーフ (緑); 480-498 アミノ酸残基, SRH モチーフ (黄)。□は missense 変異, ●は nonsense 変異 (MTBD 内の変異は赤で示す), ▲は exon skipping 変異, ▼は frameshift 変異, X は splicing 変異を表す。なお, Intron の長さは不正確である。

最近, Yu ら (2008) によって, spastin が軸索の分岐点周辺の微小管を切断し, さらに軸索の分岐形成を促進することが示された。このことから, spastin 変異が軸索周辺の微小管の集積を引き起こし, 異常な軸索が形成されることにより HSP が発症すると考えられた。一方, 軸索輸送に着目すると, 軸索輸送には速いものと遅いものが存在することが知られており, 速い軸索輸送が行われるためには, 長い微小管は短く切断されなければならないことが報告されている (Baas *et al.*, 2005; Baas and Qiang, 2005; Wang and Brown, 2002)。したがって, spastin 変異により軸索周辺の微小管が切断されなくなり, 結果として軸索輸送に欠損が生じ, HSP を発症する可能性も考えられる。

9) 結語

本研究において、生化学的・構造生物学的解析を駆使し、得られた結果を統合して、線虫 spastin ホモログ SPAS-1 による微小管切断機構についてモデルを提唱するに至った。具体的に明らかにした項目を以下に示す。

- (1) Pull down assay により、SPAS-1 の微小管結合領域 (MTBD) を同定した。また、NMR 解析により、MTBD は特定の構造をもたない領域であることを明らかにした。さらに、NMR 測定における滴定実験により、SPAS-1 は MTBD 領域で tubulin と強く相互作用し、さらに MIT ドメインを介して弱く相互作用している可能性が示唆された。
- (2) ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、SPAS-1 が濃度依存的に 6 量体を形成することを見出した。
- (3) ショウジョウバエ spastin の AAA ドメインの構造および p97 D1 ドメインの 6 量体構造を鋳型とし、SPAS-1 AAA ドメインの 6 量体リング構造のホモロジーモデリングを行った。得られた構造をもとに、変異導入実験を行った結果、SPAS-1 による微小管切断には、pore の保存された芳香族残基および塩基性残基が重要であることを見出した。さらに、表面プラズモン共鳴法により、これらが α -tubulin C 末端を認識している可能性が示唆された。さらに、SPAS-1 6 量体リング構造の pore による tubulin の認識には、pore 表面と内部の少なくとも二つの認識サイトがある可能性が示唆された。

本研究で得られた spastin による微小管切断の分子機構に関する知見は、単に微小管ダイナミクス的一端を明らかにするにとどまらず、AAA タンパク質全体の生物学的 (生化学的) 理解に貢献する。また、ヒト spastin と SPAS-1 の相同性は高く、線虫で明らかになる機構がヒト細胞で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、今回得られた結果は、spastin 遺伝子に変異をもつ遺伝性痙性対麻痺の病因解明および治療法の開発にも役立つものと考えられる。さらに、SPAS-1 N 末端については、構造生物学的観点においても興味深い知見を得ることができ、天然変性タンパク質といった新しい分野の発展にも貢献することが期待できる。

10) 参考文献

- Akiyama, Y., Kihara, A., Tokuda, H. and Ito, K. (1996) FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J Biol Chem*, **271**, 31196-31201.
- Azmi, I., Davies, B., Dimaano, C., Payne, J., Eckert, D., Babst, M. and Katzmann, D.J. (2006) Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J Cell Biol*, **172**, 705-717.
- Azmi, I.F., Davies, B.A., Xiao, J., Babst, M., Xu, Z. and Katzmann, D.J. (2008) ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Dev Cell*, **14**, 50-61.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J. and Emr, S.D. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J*, **17**, 2982-2993.
- Baas, P.W., Karabay, A. and Qiang, L. (2005) Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol*, **15**, 518-524.
- Baas, P.W. and Qiang, L. (2005) Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends Cell Biol*, **15**, 183-187.
- Bross, P., Naundrup, S., Hansen, J., Nielsen, M.N., Christensen, J.H., Kruhoffer, M., Palmfeldt, J., Corydon, T.J., Gregersen, N., Ang, D. *et al.* (2008) The Hsp60-(p.V98I) mutation associated with hereditary spastic paraplegia SPG13 compromises chaperonin function both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **283**, 15694-15700.
- Burger, J., Fonknechten, N., Hoeltzenbein, M., Neumann, L., Bratanoff, E., Hazan, J. and Reis, A. (2000) Hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the SPG4 gene. *Eur J Hum Genet*, **8**, 771-776.
- Carlton, J.G. and Martin-Serrano, J. (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*, **316**, 1908-1912.

Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R. *et al.* (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, **93**, 973-983.

Casari, G. and Rugarli, E. (2001) Molecular basis of inherited spastic paraplegias. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 336-342.

Charvin, D., Cifuentes-Diaz, C., Fonknechten, N., Joshi, V., Hazan, J., Melki, J. and Betuing, S. (2003) Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus. *Hum Mol Genet*, **12**, 71-78.

Ciccarelli, F.D., Proukakis, C., Patel, H., Cross, H., Azam, S., Patton, M.A., Bork, P. and Crosby, A.H. (2003) The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics*, **81**, 437-441.

Connell, J.W., Lindon, C., Luzio, J.P. and Reid, E. (2009) Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic*, **10**, 42-56.

Cornilescu, G., Delaglio, F. and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR*, **13**, 289-302.

Cox, G.A., Mahaffey, C.L., Nystuen, A., Letts, V.A. and Frankel, W.N. (2000) The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat Genet*, **26**, 198-202.

Crosby, A.H. and Proukakis, C. (2002) Is the transportation highway the right road for hereditary spastic paraplegia? *Am J Hum Genet*, **71**, 1009-1016.

de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhon, N., Lombes, A. *et al.* (2001) A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet*, **29**, 57-60.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR*, **6**, 277-293.

Depienne, C., Stevanin, G., Brice, A. and Durr, A. (2007) Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr Opin Neurol*, **20**, 674-680.

Ebbing, B., Mann, K., Starosta, A., Jaud, J., Schols, L., Schule, R. and Woehlke, G. (2008) Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet*, **17**, 1245-1252.

Errico, A., Ballabio, A. and Rugarli, E.I. (2002) Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum Mol Genet*, **11**, 153-163.

Errico, A., Claudiani, P., D'Addio, M. and Rugarli, E.I. (2004) Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet*, **13**, 2121-2132.

Evans, K., Keller, C., Pavur, K., Glasgow, K., Conn, B. and Lauring, B. (2006) Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10666-10671.

Evans, K.J., Gomes, E.R., Reisenweber, S.M., Gundersen, G.G. and Lauring, B.P. (2005) Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol*, **168**, 599-606.

Fonknechten, N., Mavel, D., Byrne, P., Davoine, C.S., Cruaud, C., Bonsch, D., Samson, D., Coutinho, P., Hutchinson, M., McMonagle, P. *et al.* (2000) Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, **9**, 637-644.

Francke, F., Buck, F., Bachner, D. (2005) MYND domain specific interaction of the melanin-concentrating hormone receptor 1 interacting zinc-finger protein with α - and β -tubulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **334**, 1292-1298.

藤木幸夫. (2004) ペルオキシソームの形成とペルオキシソーム病. *蛋白質核酸酵素* **42**, 1136-1142.

Gerega, A., Rockel, B., Peters, J., Tamura, T., Baumeister, W. and Zwickl, P. (2005) VAT, the thermoplasma homolog of mammalian p97/VCP, is an N domain-regulated protein unfoldase. *J Biol Chem*, **280**, 42856-42862.

Hanna, M.C. and Blackstone, C. (2009) Interaction of the SPG21 protein ACP33/masparidin with the aldehyde dehydrogenase ALDH16A1. *Neurogenetics*, **10**, 217-228.

Hansen, J.J., Durr, A., Cournu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M.N., Davoine, C.S., Brice, A., Fontaine, B., Gregersen, N. *et al.* (2002) Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet*, **70**, 1328-1332.

Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. and Heuser, J.E. (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, **90**, 523-535.

Hanson, P.I. and Whiteheart, S.W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 519-529.

Hartman, J.J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R.D., and McNally, F. J. (1998) Katanin, a Microtubule-Severing Protein, Is a Novel AAA ATPase that Targets to the Centrosome Using a WD40-Containing Subunit. *Cell*, **93**, 277-287.

Hartman, J.J. and Vale, R.D. (1999) Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin. *Science*, **286**, 782-785.

Hartmann, C., Chami, M., Zachariae, U., de Groot, B.L., Engel, A. and Grutter, M.G. (2008) Vacuolar protein sorting: two different functional states of the AAA-ATPase Vps4p. *J Mol Biol*, **377**, 352-363.

Haslberger, T., Zdanowicz, A., Brand, I., Kirstein, J., Turgay, K., Mogk, A. and Bukau, B. (2008) Protein disaggregation by the AAA+ chaperone ClpB involves partial threading of looped polypeptide segments. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 641-650.

Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C.S., Cruaud, C., Durr, A., Wincker, P. *et al.* (1999) Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*, **23**, 296-303.

Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y.H., Fujikake, N., Matsukage, A. and Kakizuka, A. (2002) Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ*, **9**, 264-273.

Hinson, J.T., Fantin, V.R., Schonberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F. *et al.* (2007) Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *N Engl J Med*, **356**, 809-819.

Huyton, T., Pye, V.E., Briggs, L.C., Flynn, T.C., Beuron, F., Kondo, H., Ma, J., Zhang, X. and Freemont, P.S. (2003) The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J Struct Biol*, **144**, 337-348.

Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M.R. and Steven, A.C. (2001) Translocation pathway of protein substrates in ClpAP protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4328-4333.

Jouet, M., Rosenthal, A., Armstrong, G., MacFarlane, J., Stevenson, R., Paterson, J., Metzberg, A., Ionasescu, V., Temple, K. and Kenwrick, S. (1994) X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet*, **7**, 402-407.

Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J. and Sundquist, W.I. (2008) Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev Cell*, **15**, 62-73.

- Kim, Y.I., Burton, R.E., Burton, B.M., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2000) Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol Cell*, **5**, 639-648.
- Landsberg, M.J., Vajjhala, P.R., Rothnagel, R., Munn, A.L. and Hankamer, B. (2009) Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure*, **17**, 427-437.
- Long, A.R., Yang, M., Kaiser, K. and Shepherd, D. (1998) Isolation and characterisation of smallminded, a Drosophila gene encoding a new member of the Cdc48p/VCP subfamily of AAA proteins. *Gene*, **208**, 191-199.
- Lottridge, J.M., Flannery, A.R., Vincelli, J.L. and Stevens, T.H. (2006) Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6202-6207.
- Makyio, H., Niwa, H., Motohashi, K., Taguchi, H. and Yoshida, M. (2002) Stabilization of FtsH-unfolded protein complex by binding of ATP and blocking of protease. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 8-12.
- Mannan, A.U., Boehm, J., Sauter, S.M., Rauber, A., Byrne, P.C., Neesen, J. and Engel, W. (2006) Spastin, the most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon 1 an endoplasmic reticulum protein. *Neurogenetics*, **7**, 93-103.
- Martin, A., Baker, T.A. and Sauer, R.T. (2008) Diverse pore loops of the AAA+ ClpX machine mediate unassisted and adaptor-dependent recognition of ssrA-tagged substrates. *Mol Cell*, **29**, 441-450.
- Matsushita-Ishiodori, Y., Yamanaka, K. and Ogura, T. (2007) The C. elegans homologue of the spastic paraplegia protein, spastin, disassembles microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 157-162.
- McNally, F.J. and Vale, R.D. (1993) Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, **75**, 419-429.

McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R. and Yoon, Y. (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci*, **25**, 115-120.

Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K. and Sundquist, W.I. (2007) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J*, **26**, 4215-4227.

西川建. (2009) 天然変性タンパク質とは何か? *生物物理* **49**, 4-10.

Nishikori, S., Yamanaka, K., Sakurai, T., Esaki, M. and Ogura, T. (2008) p97 Homologs from *Caenorhabditis elegans*, CDC-48.1 and CDC-48.2, suppress the aggregate formation of huntingtin exon1 containing expanded polyQ repeat. *Genes Cells*, **13**, 827-838.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. and Downing, K.H. (1999) High-resolution model of the microtubule. *Cell*, **96**, 79-88.

Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K.H. (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, **391**, 199-203.

Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D.J., Perisic, O., Emr, S.D. and Williams, R.L. (2007) Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature*, **449**, 735-739.

Ogura, T. and Wilkinson, A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells*, **6**, 575-597.

Pallanck, L., Ordway, R.W. and Ganetzky, B. (1995) A *Drosophila* NSF mutant. *Nature*, **376**, 25.

Pantakani, D.V., Swapna, L.S., Srinivasan, N. and Mannan, A.U. (2008) Spastin oligomerizes into a hexamer and the mutant spastin (E442Q) redistribute the wild-type spastin into filamentous microtubule. *J Neurochem*, **106**, 613-624.

Platta, H.W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W. and Erdmann, R. (2005) Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol*, **7**, 817-822.

Rainier, S., Chai, J.H., Tokarz, D., Nicholls, R.D. and Fink, J.K. (2003) NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet*, **73**, 967-971.

Raskind, W.H., Pericak-Vance, M.A., Lennon, F., Wolff, J., Lipe, H.P. and Bird, T.D. (1997) Familial spastic paraparesis: evaluation of locus heterogeneity, anticipation, and haplotype mapping of the SPG4 locus on the short arm of chromosome 2. *Am J Med Genet*, **74**, 26-36.

Reid, E., Connell, J., Edwards, T.L., Duley, S., Brown, S.E. and Sanderson, C.M. (2005) The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet*, **14**, 19-38.

Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svenson, I.K., Graham, F.L., Gaskell, P.C., Dearlove, A., Pericak-Vance, M.A. *et al.* (2002) A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet*, **71**, 1189-1194.

Roll-Mecak, A. and Vale, R.D. (2005) The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Curr Biol*, **15**, 650-655.

Roll-Mecak, A. and Vale, R.D. (2008) Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature*, **451**, 363-367.

Salinas, S., Carazo-Salas, R.E., Proukakis, C., Cooper, J.M., Weston, A.E., Schiavo, G. and Warner, T.T. (2005) Human spastin has multiple microtubule-related functions. *J Neurochem*, **95**, 1411-1420.

Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J.W., Schultz, P.G. *et al.* (2004) Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 607-615.

- Scott, A., Chung, H.Y., Gonciarz-Swiatek, M., Hill, G.C., Whitby, F.G., Gaspar, J., Holton, J.M., Viswanathan, R., Ghaffarian, S., Hill, C.P. *et al.* (2005a) Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J*, **24**, 3658-3669.
- Scott, A., Gaspar, J., Stuchell-Brereton, M.D., Alam, S.L., Skalicky, J.J. and Sundquist, W.I. (2005b) Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13813-13818.
- Shirane, M. and Nakayama, K.I. (2006) Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*, **314**, 818-821.
- Simpson, M.A., Cross, H., Proukakis, C., Pryde, A., Hershberger, R., Chatonnet, A., Patton, M.A. and Crosby, A.H. (2003) Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Hum Genet*, **73**, 1147-1156.
- Stuchell-Brereton, M.D., Skalicky, J.J., Kieffer, C., Karren, M.A., Ghaffarian, S. and Sundquist, W.I. (2007) ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, **449**, 740-744.
- Takasu, H., Jee, J.G., Ohno, A., Goda, N., Fujiwara, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. (2005) Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochem Biophys Res Commun*, **334**, 460-465.
- Trotta, N., Orso, G., Rossetto, M.G., Daga, A. and Broadie, K. (2004) The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr Biol*, **14**, 1135-1147.
- Tsang, H.T., Edwards, T.L., Wang, X., Connell, J.W., Davies, R.J., Durrington, H.J., O'Kane, C.J., Luzio, J.P. and Reid, E. (2009) The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum Mol Genet*, **18**, 3805-3821.
- Vajjhala, P.R., Nguyen, C.H., Landsberg, M.J., Kistler, C., Gan, A.L., King, G.F., Hankamer, B. and Munn, A.L. (2008) The Vps4 C-terminal helix is a critical determinant for assembly and ATPase activity and has elements conserved in other members of the meiotic clade of AAA ATPases. *FEBS J*, **275**, 1427-1449.

- Vajjhala, P.R., Wong, J.S., To, H.Y. and Munn, A.L. (2006) The beta domain is required for Vps4p oligomerization into a functionally active ATPase. *FEBS J*, **273**, 2357-2373.
- Valdmanis, P.N., Meijer, I.A., Reynolds, A., Lei, A., MacLeod, P., Schlesinger, D., Zatz, M., Reid, E., Dion, P.A., Drapeau, P. *et al.* (2007) Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet*, **80**, 152-161.
- Visapää, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J.L., Kumar, V., Payne, G.S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R.W. *et al.* (2002) GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet*, **71**, 863-876.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 1015-1068.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, **1**, 945-951.
- Wang, L. and Brown, A. (2002) Rapid movement of microtubules in axons. *Curr Biol*, **12**, 1496-1501.
- Wang, Q., Song, C., Yang, X. and Li, C.C. (2003) D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP. *J Biol Chem*, **278**, 32784-32793.
- Wang, X., Shaw, W.R., Tsang, H.T., Reid, E. and O'Kane, C.J. (2007) Drosophila spichthyn inhibits BMP signaling and regulates synaptic growth and axonal microtubules. *Nat Neurosci*, **10**, 177-185.
- Watts, G.D., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P. and Kimonis, V.E. (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*, **36**, 377-381.
- White, S.R., Evans, K.J., Lary, J., Cole, J.L. and Lauring, B. (2007) Recognition of C-terminal

amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *J Cell Biol*, **176**, 995-1005.

Wu, D., Chen, P.J., Chen, S., Hu, Y., Nunez, G. and Ellis, R.E. (1999) *C. elegans* MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death. *Development*, **126**, 2021-2031.

Wüthrich, K., 京極好正, 小林祐次, "タンパク質と核酸のNMR-二次元NMRによる構造解析", 東京化学同人 (1991).

Yamada-Inagawa, T., Okuno, T., Karata, K., Yamanaka, K. and Ogura, T. (2003) Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. *J Biol Chem*, **278**, 50182-50187.

Yamanaka, K., Okubo, Y., Suzaki, T. and Ogura, T. (2004) Analysis of the two p97/VCP/Cdc48p proteins of *Caenorhabditis elegans* and their suppression of polyglutamine-induced protein aggregation. *J Struct Biol*, **146**, 242-250.

Yang, D., Rismanchi, N., Renvoise, B., Lippincott-Schwartz, J., Blackstone, C. and Hurley, J.H. (2008) Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 1278-1286.

Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Yamamoto, Y., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, F., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Sasaki, H., Takeda, K., Ichijo, H. and Kakizuka, A. (1999) Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes Cells*, **4**, 743-756.

Yool, D.A., Edgar, J.M., Montague, P. and Malcolm, S. (2000) The proteolipid protein gene and myelin disorders in man and animal models. *Hum Mol Genet*, **9**, 987-992.

Yoshimori, T., Yamagata, F., Yamamoto, A., Mizushima, N., Kabeya, Y., Nara, A., Miwako, I., Ohashi, M., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **11**, 747-763.

Yu, W., Qiang, L., Solowska, J.M., Karabay, A., Korulu, S. and Baas, P.W. (2008) The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell*, **19**, 1485-1498.

Yu, Z., Gonciarz, M.D., Sundquist, W.I., Hill, C.P. and Jensen, G.J. (2008) Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *J Mol Biol*, **377**, 364-377.

Zhang, D., Rogers, G.C., Buster, D.W. and Sharp, D.J. (2007) Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J Cell Biol*, **177**, 231-242.

Zhao, X., Alvarado, D., Rainier, S., Lemons, R., Hedera, P., Weber, C.H., Tükel, T., Apak, M., Heiman-Patterson, T., Ming, L. *et al.* (2001) Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet*, **29**, 326-331.

Zhu, P.P., Soderblom, C., Tao-Cheng, J.H., Stadler, J. and Blackstone, C. (2006) SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum Mol Genet*, **15**, 1343-1353.

Züchner, S., Wang, G., Tran-Viet, K.N., Nance, M.A., Gaskell, P.C., Vance, J.M., Ashley-Koch, A.E. and Pericak-Vance, M.A. (2006) Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet*, **79**, 365-369.