Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-06-18

Structural Insights into the Altering Function of CRMP2 by Phosphorylation

Sumi, Takuya

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2018-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第7155号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007155

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Structural Insights into the Altering Function of CRMP2 by Phosphorylation

CRMP2 のリン酸化が誘導する機能変化の構造基盤

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
生体構造解剖学
（指導教員：仁田亮教授）

鷲見　拓哉

微小管結合蛋白質 Collapsin Response Mediator Protein 2（CRMP2）は、神経細胞の発生段階において、軸索突起の形成および伸長（軸索誘導）に関わる重要な分子である。CRMP2 は微小管の構成単位であるチューブリン二量体（α チューブリンとβ チューブリンのヘテロ二量体）に直接結合し、効率良く軸索特有の形態を持つ軸索型微小管形成を誘導することにより、軸索誘導に貢献する。

一方で CRMP2 はセマフォリンシグナル経路の下流因子である。この経路を介して CRMP2 の C 末端ドメインが、cyclin-dependent kinase 5（CDK5）によってセリン（S）522、glycogen synthease kinase 3β（GSK-3β）によってトレオニン（T）509 及び T514、S518 がリン酸化される。CRMP2 はリン酸化を受けると、成長円錐の崩壊といった正反対の作用（軸索反発）を示す。CRMP2 のリン酸化が、CRMP2 と微小管との親和性を低くすることが報告されているが、リン酸化及び非リン酸化 CRMP2 の正反対の作用がどのような分子機構により誘導されるのかはよくわかっていない。そこで我々は擬似リン酸化 CRMP2 を作成し、その生化学的及び構造生物学的解析を行い、その分子機構解明を試みた。

リン酸化 CRMP2 とチューブリン間の相互作用

我々はこれまでに、野生型 CP525（CP525-wt）は溶液中でホモ四量体を形成するが、チューブリン二量体との相互作用により四量体が崩壊し、CP525 単体とチューブリンヘテロ二量体からなるヘテロ三量体を形成することを報告した。そこで、CRMP2 の C 末端ドメインのリン酸化によりヘテロ三量体構成能に変化があるかを明らかにするため、ゲル濾過クロマトグラフィー（SEC）及び動的光散乱（DLS）解析を用いて CP525-4D とチューブリン間の相互作用を評価した。

SEC 解析では、CP525-4D は CP525-wt と同様に四量体形成が観察された。CP525-4D とチューブリンを等モル比で混ぜたところ、チューブリンの溶出分画に変化は見られなかったが、CP525-4D はわずかに低分子量側に溶出位置が変化した。このことから両者の間では弱い相互作用が生じていることが示唆された。

一方 DLS 解析では、CP525-wt と CP525-4D は共に低い多分散性（polyd）と四量体に相応な流体力学半径（RH）を示した。また、チューブリンは高い polyd と RH を示し、その重合または凝集が示唆された。そして、CP525-wt とチューブリンをモル比 1:1 の割合で混合すると、ヘテロ三量体形成を示唆する polyd および RH の減少が観察された。しかし、CP525-4D とチューブリンを同様に等モル比で混ぜた場合、CP525-wt と比較して非常に大きな RH を示した。よって CD525-4D とチューブリンは、CP525-wt で観察されるようなコンパクトで安定なヘテロ三量体を形成しないことが示唆された。

さらに、サブチリシン処理したチューブリン（チューブリン S）の CP525-wt 及び CP525-4D の四量体構成への影響を調べた。チューブリン S はチューブリンの C 末端にある負電荷残基のクラスターが欠損している。これと CP525-wt 及び CP525-4D それぞれを混ぜ、同様の方法で解析したところ、有意に高い polyd と RH を示した。このことからチューブリンの C 末端の負電荷クラスターは、CP525-wt と GTP チューブリンとのヘテロ三量体構成に重要であることが示唆された。

擬似リン酸化 CRMP2 の結晶構造解析

我々は CP525-4D と CP525-S522D の結晶構造を明らかにした。結晶構造でも CP525-4D と CP525-S522D はホモ四量体を形成し、SEC 及び DLS 解析の結果と矛盾しない。CRMP2 は、N 末端の球状ドメイン（M1-R487）と、特定の構造を持たない C 末端ドメイン（L488-G572）からなる。C 末端ドメインは、四量体中で隣接した分子へと伸び、球状ドメインを包み込むことで四量体形成を安定化する。CP525-4D と CP525-S522D、および

CP525-wt のホモ四量体の配置を比較したところ、わずかな変化が見られた。CP525-S522D の Mol1 に隣接する分子 Mol2 は、分子 Mol1 に対して 1 Å 程度並進し、CP525-4D の Mol2 は、Mol1 に対して 2 ° 反時計回りに回転した。CP525-4D と CP525-S522D の構造において C 末端ドメインは V506 まで可視化できたが、それ以降の電子密度は観察できず、T509D 以降の 4 つのリン酸化部位の構造決定には至らなかった。

GSK-3β と擬似リン酸化 CRMP2 の共結晶化

そこで、C 末端ドメインを結晶構造内で可視化するため、キナーゼとの複合体形成による C 末端ドメインの安定化を試みた。CDK5 及び GSK-3β の 2 つのキナーゼと CP525 との結合親和性を評価した。GST-CP525-wt と CDK5-p25 activator をそれぞれ 5 μM で混合したが、これらの結合は同濃度では検出できなかった。一方 GSK-3β を 5 μM で 3 種類の CP525 と混合すると、モル比で 1:1 に近い結合が検出された。GSK-3β と 3 種の CP525 それぞれとの結合性に明確な違いを認めないことから、CP525-4D と GSK-3β を共結晶化させ、再び C 末端ドメインの可視化を試みた。しかしながら、GSK-3βに相当する電子密度は観察されず、GSK-3βの有無にかかわらず CP525-4D の構造にはほとんど変化が見られなかった。

擬似リン酸化 CRMP2 の詳細構造

CP525-S522D と CP525-4D の全体構造は CP525-wt と非常に類似する。特に、これらの球状ドメインは、CP525-wt と基本的に同じ構造をとる。C 末端ドメインは球状ドメインの H19 ヘリックスから伸びるが、その最初の 1 / 4 (L488-V506) までの構造を明らかにした。擬似リン酸化 CP525 の C 末端ドメインは隣接した Mol2 の H5-H6 ループ、H10-H11 ループ、H13 ヘリックスにより形成された疎水性の溝にはまり込んでいた。擬似リン酸化 CRMP2 で C 末端ドメインの主鎖の小さな構造変化が観察されたが、Mol1 の C 末端ドメインと Mol2 の疎水性溝との側鎖による結合はほとんど保存されていた。

前述のように、CP525-S522D と CP525-4D の結晶構造では CP525-wt と比較して、四量体内で 1 Å 程度の並進と 2 ° の回転が観察された。GSK-3βの有無にかかわらず CP525-4D の四量体の配置に変化がないことから、C 末端ドメインのリン酸化による負電荷の付加が、Mol1 の C 末端ドメインと Mol2 の球状ドメインとの間の相互作用の変化に関わり、C 末端ドメインの最初の 1 / 4 部分の構造変化を誘導することが示唆された。

以上の生化学的・構造生物学的解析を以下にまとめ、その意義を考察する。擬似リン酸化 CRMP2 は野生型 CRMP2 と同様にホモ四量体を形成する。C 末端ドメインのリン酸化は CRMP2 の球状ドメインの大きな構造変化は起こさないことがわかった。C 末端ドメインは隣接した分子に伸び、CRMP2 のホモ四量体構成を安定化する。リン酸化による負電荷の付加は C 末端ドメインと隣接した球状ドメイン間の相互作用を変化させ、C 末端ドメインの小さな構造変化及び四量体における単体同士の相互作用のわずかな再配列にも関わる。

生化学的解析により、C 末端ドメインのリン酸化が CRMP2 単体とチューブリンヘテロ二量体によるヘテロ三量体形成を阻害すること、またチューブリンの E-hook の欠損が非リン酸化 CRMP2 のヘテロ三量体形成の阻害に関与することが示唆された。CRMP1 と CRMP2 のアミノ酸配列を比較すると、C 末端ドメインのリン酸化領域周辺に 3 つのリシン残基が保存されている。特に、S522 は 2 つのリシン残基に囲まれ、チューブリンの E-hook は酸性残基が豊富に存在する。したがって、塩基性 C 末端ドメインと酸性 E-hook 間の静電的相互作用が CRMP2 とチューブリン間の相互作用を誘導し、軸索型微小管の伸長、軸索誘導が起こる。一方で、C 末端ドメインのリン酸化が起こると、リシン残基間の側鎖に負電荷が付加され、リン酸化 C 末端尾と E-hook 間に反発作用が誘発され、それらの相互作用を抑制し、軸索反発へと転じる。

このような分子機構により、C 末端ドメインのリン酸化は CRMP2 によって誘導された軸索型微小管形成及び微小管の安定化を負に制御する。またこの制御の破綻がアルツハイマー病の発症にも関わるとの報告もある。それ故、我々が可視化を試みたリン酸化 CRMP2 の C 末端ドメインの構造情報は、CRMP2 による微小管ダイナミクスを制御する分子メカニズムを理解し、またアルツハイマー病の病態解明への鍵となり得る。CP525 と GSK-3β との結合は確認されたものの、GSK-3β の結合は C 末端ドメインの不安定性を十分に抑制できず、C 末端ドメインの構造決定には至らなかった。今後は、化学的な架橋やコンストラクトの変更、またリン酸化 CRMP2 を用いるなど、C 末端ドメインを安定化するためのさらなる手法の改善が必要となる。これにより、セマフォリンシグナル下流にある CRMP2 のリン酸化が、軸索伸長から軸索反発作用へのスイッチを切り替える分子機構の全貌を明らかにすることが期待され、アルツハイマー病などの分子機構の解明にもつながる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2779 号	氏　名	鷲見　拓哉
論文題目 Title of Dissertation	Structural Insights into the Altering Function of CRMP2 by Phosphorylation CRMP2 のリン酸化が誘導する機能変化の構造基盤		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 片岡 徹 副　査 Vice-examiner 匂坂 敏朗 副　査 Vice-examiner 南 康博		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

微小管結合蛋白質 Collapsin Response Mediator Protein 2（CRMP2）は、神経細胞の発生段階において軸索誘導に関わる重要な分子である。一方で CRMP2 は、セマフォリンシグナル経路の下流因子として CDK5 および GSK3βにより C 末端部位のリン酸化を受けると、成長円錐の崩壊といった軸索反発を誘導することが知られており、またその過度なリン酸化はアルツハイマー病の発症にも関連する。本研究は、CRMP2 リン酸化による軸索への作用の変化がどのような分子機構により起こるのかにつき、生化学的および構造生物学的解析による解明を試みたものである。

本学位申請者は、野生型 CRMP2 と擬似リン酸化 CRMP2 変異体を作成し、Tubulin 二量体との結合をゲル濾過クロマトグラフィーおよび動的光散乱法により解析した。野生型 CRMP2、擬似リン酸化 CRMP2 変異体とも、Tubulin 非存在下では溶液中でホモ四量体を形成した。野生型 CRMP2 と Tubulin 二量体とを混合すると、CRMP2 単体と Tubulin 二量体とのヘテロ三量体が形成された。一方、擬似リン酸化 CRMP2 変異体と Tubulin 二量体とでは、弱い相互作用を認めたものの安定なヘテロ三量体形成を認めなかった。さらに Tubulin 二量体の C 末端にある負電荷残基のクラスター（E-hook）を除去した Tubulin-S 二量体を用いると、CRMP2 との相互作用は見られなくなることから、CRMP2 と Tubulin 二量体とのヘテロ三量体形成には、E-hook を介する静電的結合が必要であることが示唆された。

続いて、2 種類の擬似リン酸化 CRMP2 変異体の結晶構造解析を遂行した。しかし、C 末端のリン酸化部位はその構造不安定性により構造決定に至らなかった。そこで、C 末端の構造決定を目指し、2 種類のキナーゼ（CDK5 と GSK3β)と CRMP2 との相互作用解析を行い、GSK3 βが CRMP2 と比較的高い結合能を有していることを確かめ、擬似リン酸化 CRMP2 と GSK3 との共結晶化を試みた。しかしやはり、GSK3 βに相当する電子密度は認められず、C 末端のリン酸化部位の構造決定はできなかった。

擬似リン酸化 CRMP2 変異体の結晶構造解析からは、野生型 CRMP2 と同様にホモ四量体を形成すること、四量体内での分子同士の位置関係が若干変化すること、C 末端ドメインの主鎖の小さな構造変化が誘導されることが示された。CRMP2 のアミノ酸配列をみると、C 末端ドメインのリン酸化領域周辺には 3 つのリシン残基が保存されている。特に、S522 は 2 つのリシン残基に囲まれ、チューブリンの E-hook は酸性残基が豊富に存在する。CRMP2 と Tubulin とのヘテロ三量体形成には E-hook を介する静電的相互作用が必須であることを考慮すると、野生型 CRMP2 では、その塩基性 C 末端ドメインと Tubulin の酸性 E-hook との間の静電的相互作用が、CRMP2 とチューブリン間の相互作用を誘導し、それにより軸索型微小管の伸長が促される。一方で、C 末端ドメインのリン酸化が起こると、リシン残基間の側鎖に負電荷が付加され、リン酸化 C 末端ドメインと E-hook との間に反発作用を誘発、CRMP2 と微小管との相互作用を抑制することで微小管安定化能を阻害し、軸索形成への反発が誘導されることが示唆された。

本研究は、C 末端ドメインのリン酸化が CRMP2 の機能変化を誘導するメカニズムについて、その構造基盤を解析したものであるが、C 末端ドメインのリン酸化が三次元構造の大きな構造変化は伴わず、微小管との結合部位の静電的反発を誘導することによって軸索誘導から反発へとシグナルを切り替えることを示唆するなど重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。