

チューブリンアイソタイプの選択性と微小管動態への寄与

[1] 組織

代表者：春田 奈美
 (東北大学大学院生命科学研究科)
 対応者：田中 耕三
 (東北大学加齢医学研究所)
 池田 真教
 (東北大学加齢医学研究所)
 分担者：杉本 亜砂子
 (東北大学大学院生命科学研究科)
 西田 桂
 (東北大学大学院生命科学研究科)

研究費：物件費 10 万

[2] 研究経過

[研究目的]

細胞骨格である微小管は、細胞分裂時の紡錘体形成、極性確立、神経軸索など、細胞の増殖および発生・分化に伴い多様な構造体を形成する。微小管は、 α -チューブリンと β -チューブリンからなるヘテロダイマーが重合して形成される管状の繊維構造で、重合・伸長・安定化・縮退というダイナミックな動態を示す。 α -および β -チューブリンはそれぞれ多くのアイソタイプが存在し、ヒトの神経疾患の病態も原因遺伝子となるアイソタイプの種類によって異なる。我々は、これま

で線虫 *C. elegans* をモデルとして用いた研究から、各チューブリンアイソタイプがそれぞれ組織特異的な発現パターンをもち、神経特異的に発現するアイソタイプを異所発現すると微小管への取り込みとその動態に大きな影響を与えることを見出してきた (Y. Honda, *et. al*, *J.Cell Sci.*, 2017, 土屋修論 2018)。

本課題では、チューブリンアイソタイプの特異性がどのようにもたらされ、それが組織特異的な微小管動態にどのように寄与しているのかについて理解することを目的としている。これまでの *in vivo* 発現パターン解析から、 α -と β -チューブリンのヘテロダイマー形成には各アイソタイプ間で選択性があり、ヘテロダイマーを形成するアイソタイプの組み合わせによって、微小管動態に与える影響が異なるのではないかと推測している。その検証するために、線虫の初期胚を用いた異所発現の実験を進めるとともに、同生物種のアイソタイプが存在しないヒト細胞を用いて、線虫由来の α -および β -チューブリンの各アイソタイプを発現し、アイソタイプの様々な組み合わせにおける微小管への取り込みおよび微小管動態に与える影響を網羅的に調べることを目的として進めている。

[研究活動状況]

研究代表者の研究室ではヒト細胞を用いた経験がなかったため、田中耕三研究室において、田中先生、池田先生にご助言をいただきながら、ヒト細胞におけ

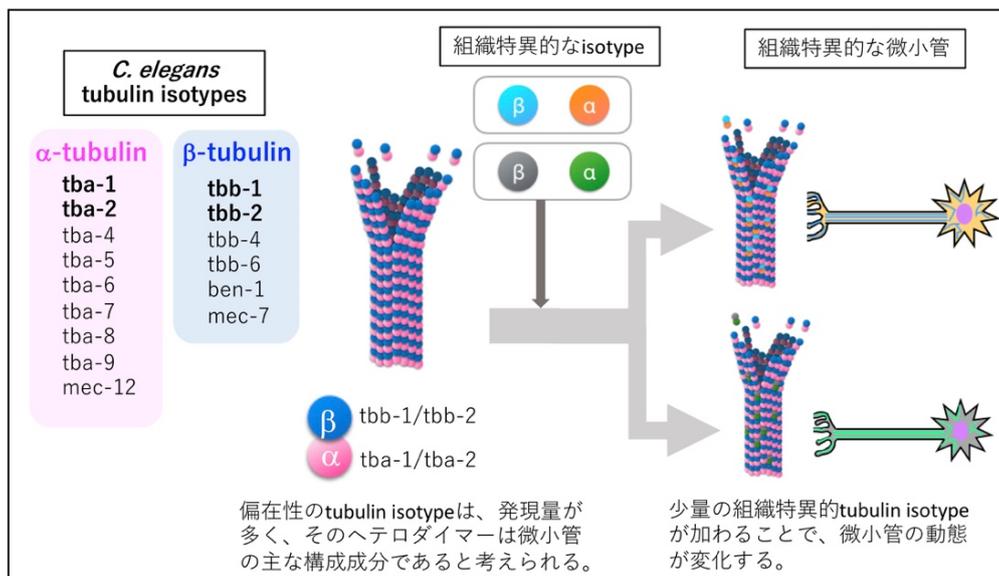


図1. 微小管動態を決定するチューブリンアイソタイプ

る線虫由来の α -および β -チューブリン発現系の確立を行った。さらに田中研の蛍光顕微鏡を用いて微小管動態解析も進めており、研究の進行状況についての打ち合わせを常時行っている。

研究費は、主に細胞培養を行う上で必要な培地、ディッシュ、ピペットなどの消耗品の購入等に用いた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

まず線虫 *C. elegans* 由来のチューブリンアイソタイプをヒト培養細胞(HeLa 細胞)に発現させ、各アイソタイプがヒト由来の微小管へ取り込まれる割合を調べる実験系の確立を、分子腫瘍学研究分野の田中研究室との共同研究で行った。線虫の α -および β -チューブリンの各アイソタイプに、それぞれ蛍光タンパク質 GFP と RFP を N 末端に融合したタンパク質を発現させるため、ベクターの種類や蛍光タンパク質とのリンカーを検討し、安定発現株の樹立を目指した。

樹立したヒト細胞において、蛍光タグした α -および β -チューブリンの発現と微小管への取込みをイブイメージングおよび免疫染色法にて調べた。まず線虫由来の α -チューブリンのみをそれぞれ発現させた結果、線虫個体において遍在性でかつ最も発現の強い TBA-1 よりも、神経特異的なアイソタイプである TBA-9の方が、HeLa 細胞で主にヒト由来のチューブリンで構成された微小管へ取り込まれていることが観察された(図2上)。TBA-9 と比べ TBA-1の方が、タンパク質全体のアミノ酸相同性はよりヒトの α -チューブリンに近い。しかしチューブリンの側方結合に関与する M ループと H1-S2 ループの領域が、TBA-1 ではヒトのアイソタイプと大きく異なっており、TBA-9の方がヒトのアイソタイプの配列に近かった(図2下)。そこで、このループ領域を TBA-9 の配列と交換したキメラタンパク質を発現させると、ヒト細胞が形成する微小管への取込み量がより増加した(図2上)。これらの結果は、生物種間の微小管特異性がこの側方結合領域で生じている可能性を強く示唆するものであった。

(3-2) 波及効果と発展性など

今回の結果は、チューブリンアイソタイプの微小管への取り込みに生物種特異性が高いことと、同一種のアイソタイプの種類によってもその性質に多様性がある可能性を示唆している。今後は、他のチューブリンアイソタイプについても、ヒト細胞における取り込みと線虫初期胚を使った異所発現の系を用いてさらなる解析を進めていく。さらにアイソタイプ間の α -と β -チューブリンヘテロダイマー間の組み合わせによる効果についても検討していく予定である。

特定のヒトチューブリンアイソタイプが、それぞれ

固有の神経性疾患の原因遺伝子ともなっており、本研究で得た知見は、チューブリンアイソタイプの多様性がどのように個々の細胞特異的な微小管動態を生み出すかという普遍的な理解へとつながると期待している。

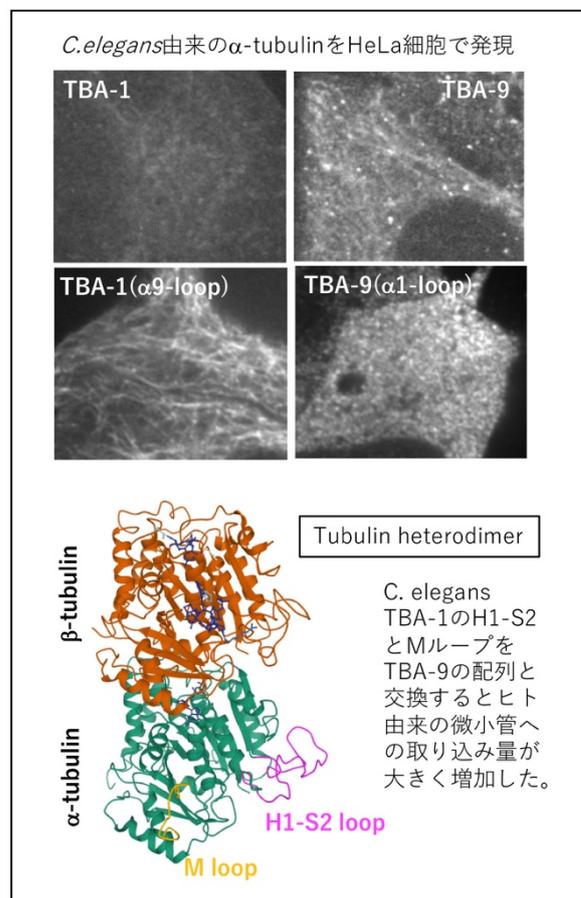


図2. H1-S2、Mループ領域と微小管への取込み

[4] 成果資料

(1) Y. Honda, Y., Tsuchiya, K., Sumiyoshi, E., Haruta, N., and Sugimoto, A., Tubulin isotype substitution revealed that isotype combination modulates microtubule dynamics in *C. elegans* embryos. *J.Cell.Sci.*, 130 (30) 1652-1661, (2017)

(2) 「線虫 *C. elegans* におけるチューブリンアイソタイプの発現パターンおよび機能の網羅的解析」西田桂、土屋賢汰、本多優、小日向寛之、小野寺静、春田奈美、池田真教、田中耕三、杉本亜砂子 (第 71 回日本細胞生物学会大会 (神戸) ポスター発表 2019 年 6 月)

(3) 「線虫 *C. elegans* における神経特異的チューブリンアイソタイプの機能解析」、西田桂、土屋賢汰、本多優、小日向寛之、小野寺静、春田奈美、池田真教、田中耕三、杉本亜砂子 (著者確認) (第 42 回日本分子生物学会年会 (福岡) ポスター発表 2019 年 12 月)