

課題番号 28

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 15 万円

[2] 研究経過

微小管は細胞分裂や軸索輸送、繊毛形成、軸索形成などの様々な生命現象に関わる細胞骨格の一種である。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の重合により管状の繊維構造をとり、伸長と退縮とを繰り返すダイナミックな挙動を示す。 α/β -チューブリンは多くの生物で複数のアイソタイプが存在する。ヒトでは α と β それぞれ9つのアイソタイプがあり、アイソタイプ特異的な変異により組織特異的な神経疾患を引き起こすことが報告されている。

我々はこれまで、線虫 *C. elegans* をモデルとして9つの α -チューブリンと6つの β -チューブリンの全アイソタイプに対して、CRISPR/Cas9法を用いてGFP標識を行い、網羅的な発現パターン解析を行った。

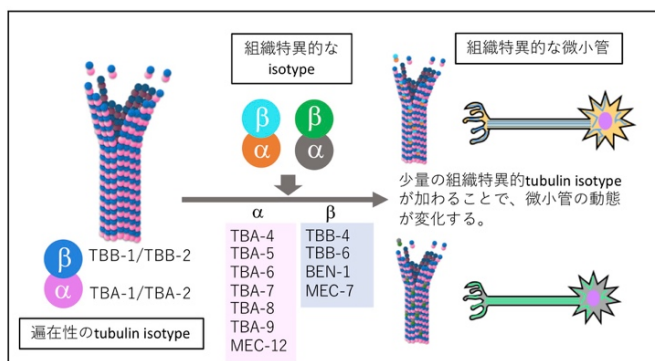


図1. 微小管動態を決定するチューブリンアイソタイプ

解析からそれぞれ組織特異的な発現パターンをもつこと、神経特異的に発現するチューブリンを線虫初期胚に異所発現することで、アイソタイプごとに微小管への取り込みが異なること、微小管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)。本共同研究では、チューブリンアイソタイプが組織特異的な微小管動態にどのように寄与し、さらにその特性は異なる生物でも保存されているのかを明らかにすることを目的とする。

これまでの研究より α/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、微小管動態に異なる影響を及ぼすという推測をしている。これを検証するために、

(1) 線虫の初期胚を用いたチューブリンアイソタイプの異所発現を行い、微小管の動態解析を行う。

(2) 同生物種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/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及ぼす影響を網羅的に調べる。

(1)については、研究代表者の所属研究室で行い、(2)については加齢医学研究所分子腫瘍学分野田中研究室にて日頃から議論しながら、実験を進めているところである。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) 感覚繊毛神経特異的に発現する α/β -チューブリン (α : TBA-5, TBA-6, TBA-9, β : TBB-4)の発現パターン解析 TBB-4は多くの感覚繊毛神経で発現し、細胞体に蓄積している一方、TBA-5, TBA-6, TBA-9はそれぞれ一部の感覚繊毛神経で重複なく発現しており、感覚繊毛領域に強く局在することがわかった。さらにこれらアイソタイプ群の発現量は全身発現性のアイソタイプTBA-1およびTBB-2の発現量よりも低いことがわかった。これらの結果から、感覚繊毛神経特異的なチューブリンアイソタイプは少量で組織特異的な微小管機能を生み出している可能性が示唆された。

(2) 感覚繊毛神経特異的な α -チューブリンアイソタイプの線虫初期胚での異所発現 感覚繊毛神経特異的なTBA-5, TBA-6, TBA-9が微小管動態に与える影響を調べるために、線虫初期胚に異所発現させてスピンドル微小管動態の変化を定量的に解析した。その結果、遍在性TBA-1を付加発現させた場合に比べて各神経特異的な α -チューブリンの発現する初期胚では、いずれも微小管の伸長速度が低下する傾向が見られた。この結果は、繊毛内の微小管は他の細胞質中の微小管と比べて伸長が抑えられているという先行研究とも合致する (Orbach *et al.*, *Nat. Commun.* 2019)。

また、GFP 標識した α -チューブリンを同様に初期胚に異所発現させ、紡錘体微小管への取り込み量を定量解析すると、TBA-1に比べてTBA-5, TBA-6, TBA-9はいずれも取り込まれにくいことがわかった。さらに、TBB-4存在下では、TBA-5とTBA-6の微小管への取り込みが亢進した一方、TBB-2存在下では変化しなかったことから、感覚繊毛神経特異的な α/β -チューブリンアイソタイプはヘテロダイマー形成における選択性を持っていることが示唆された。

(3) HeLa 細胞における線虫チューブリンアイソタイプの発現 遍在性および感覚繊毛神経特異的なアイソタイプの微小管への取り込み能と微小管動態に及ぼす影響を調べるために、他の線虫由来のチューブリンアイソタイプが存在しないヒトHeLa細胞内での動態解析を試みた。

本研究では、まず線虫 *C. elegans* のチューブリンアイソタイプを培養細胞内に発現させる実験系を確立した。まず、線虫の β -チューブリンアイソタイプであるTBB-2とTBB-4を単独で発現させると、TBB-2に比べてTBB-4は分裂期の紡錘体微小管および間期の細胞質中の微小管に取り込まれにくいことがわかった。本実験では、それぞれヒトの α -チューブリンとヘテロダイマーを形成していることになり、異種間のヘテロダイマー形成か形成されたヘテロダイマーの微小管への取り込み段階で差がでているのかは判別できないものの、TBB-2とTBB-4の性質の差が異種のチューブリンアイソタイプの性質よりも大きいことを示唆する。

そこで今後は、神経特異的な α -チューブリンアイソタイプの紡錘体微小管に取り込まれ量を比較し、さらに線虫の感覚繊毛神経特異的な α/β -チューブリンアイソタイプを共発現したときに各アイソタイプの微小管への取り込みがどのように変化するかを調べる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究では、繊毛特異的なチューブリンアイソタイプは、同種の異所発現および異種細胞内においても紡

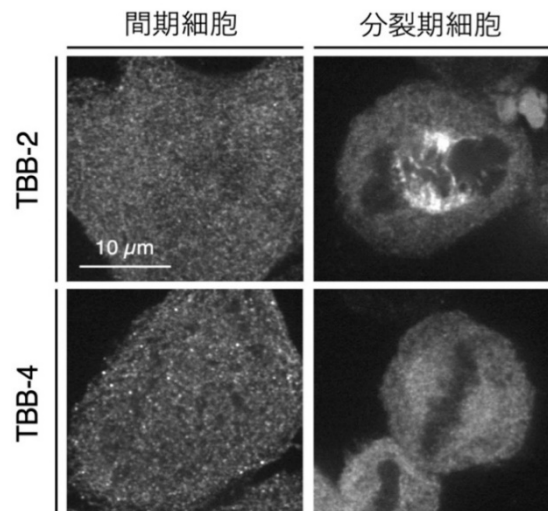


図2. *C. elegans* 由来の β -チューブリンをHeLa細胞で発現

錘体微小管へは取り込みにくいということが明らかになった。今後は、線虫のチューブリンアイソタイプに加え、ヒトの繊毛特異的な β -チューブリンアイソタイプ(TUBB4A, B)についても解析を行う予定である。特定のヒトチューブリンアイソタイプは、それぞれ固有の神経性疾患の原因遺伝子であることから、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。

[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) Kei Nishida, Kenta Tsuchiya, Yu Honda, Hiroyuki Obinata, Shizuka Onodera, Nami Haruta, Masanori Ikeda, Kozo Tanaka, Asako Sugimoto Comprehensive expression analysis of tubulin isotypes using GFP-knock-in strains in *C. elegans*. EMBO/EMBL Symposia Microtubules, 2020.6

(3) Expression pattern analysis of all tubulin isotypes in *C. elegans* adults using GFP knock-in strains, Kei Nishida, Kenta Tsuchiya, Hiroyuki Obinata, Shizuka Onodera, Yu Honda, Yen-Cheng Lai, Nami Haruta and Asako Sugimoto (submission)