

課題番号 50

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所)

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所)

西田 桂 (東北大学大学院生命科学研究所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

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た管状の繊維構造をとる細胞内骨格で、紡錘体形成、神経軸索形成や細胞内輸送など、細胞内で多様な働きをする。微小管の構造と機能の多様性を生み出す要因の一つが、チューブリンアイソタイプであり、ヒトでは α と β それぞれ 9 つの、線虫では 9 つの α と 6 つの β -チューブリンアイソタイプをもつ。ヒトでは、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。解析からそれぞれ組織特異的な発現パターンをもちその発現量も種類によって大きく異なっていることを示してきた (Honda, Y., et., al, *J. Cell Sci.*, 2017, Nishida, K., et., al, *Cell Struct. Funct.*, 2021)。本共同研究では、個々の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かを明らかにすることを目的とする。

これまでに、線虫由来の α/β -チューブリンの各アイソタイプを (1) 線虫の初期胚を用いた異所発現 (2) 同生物種アイソタイプが存在しないヒト細胞において発現させ、アイソタイプの様々な組み合わせにおける微小管機能への影響を調べてきた。その

結果、 α/β -チューブリンアイソタイプの種類によって、微小管への取り込みと微小管動態が異なることが明らかになった。さらに、線虫の初期胚を用いた異所発現では、神経特異的な α -チューブリンは、神経特異的な β -チューブリンを共発現すると、微小管への取り込みが亢進し、アイソタイプの組み合わせに特異性があることを示唆する結果を得ている (西田修論、発表 2, 4)。

本年度は、これらの結果をもとに (1) アイソタイプの性質が細胞種特異的に機能しているかどうか (2) アイソタイプの性質を決定する領域を同定する、ということを目指して研究を行った。(1) については、研究者代表の所属研究室にて線虫 *C. elegans* を用いて行い、(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なチューブリンアイソタイプの繊毛形成における寄与** 線虫の神経特異的な α -チューブリンアイソタイプである $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 9$ は、それぞれ異なる感覚繊毛神経細胞で特異的に発現している。これらのアイソタイプが、発現パターンの違いが細胞腫特異性を生み出すのか、あるいは、それぞれ細胞腫特異的にチューブリン機能の違いがあるのかがわからなかった。そこで、CRISPR-Cas9 法を用いて、ゲノム上の $\alpha 6$ 遺伝子のタンパク質コード領域をそのまま $\alpha 5$ 遺伝子にスワップしてその

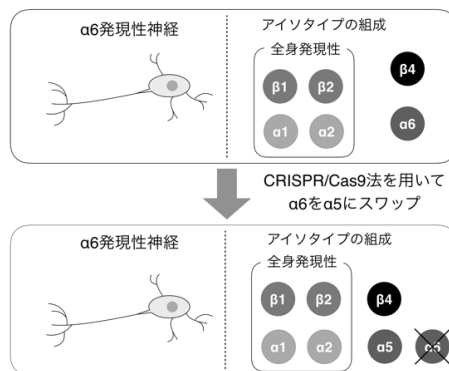


図1 感覚繊毛神経内での α -チューブリンのスワップ実験の概念図

影響を観察した (図1)。その結果、 $\alpha 6$ が本来発現している感覚繊毛神経細胞での $\alpha 5$ の発現は確認できたが、この神経細胞において繊毛形成は不全であった。この結果は、 $\alpha 5$ と $\alpha 6$ が、それぞれの感覚繊毛神経細胞における繊毛形成において特異的な機能をもっていることを強く示唆するものである。

(2) ヒト培養細胞を用いた線虫の感覚繊毛神経特異的チューブリンアイソタイプの特性解析

これまでに *C. elegans* の α/β -チューブリンを単独でヒト Hela 細胞に発現させた場合、全身発現性のチューブリンアイソタイプ ($\alpha 1$ および $\beta 2$) は高頻度でヒト微小管に取り込まれた一方、感覚繊毛神経特異的なアイソタイプ ($\alpha 5, \alpha 6, \alpha 9$ および $\beta 4$) はヒト微小管に取り込まれにくいことがわかった。

そこで、各チューブリンの微小管への取り込み量の違いがアミノ酸配列中のどの領域によるのかを調べるため、配列に最も違いがあった微小管形成時のチューブリン同士の間での結合領域 (H1-S2 ループと M ループ) に注目した (図2)。そこで、 $\alpha 1$ と $\alpha 9$ の H1-S2 ループと M ループに相当するアミノ酸配列を入れ替えたキメラチューブリンをヒト細胞に発現させ、微小管への取り込み量を調べた。その結果、 $\alpha 9$ の両ループを $\alpha 1$ のものに置き換えると、ヒト微小管へ取り込まれる割合が下がった一方、 $\alpha 1$ の両ループを $\alpha 9$ のものに置き換えてもヒト微小管への取り込まれやすさに大きな変化は見られなかった (図3)。これらの結果から、 $\alpha 1$ の H1-S2 ループと M ループはヒト微小管への取り込み量に関するものの、 $\alpha 1$ と $\alpha 9$ の性質の違いを説明することはできなかった。

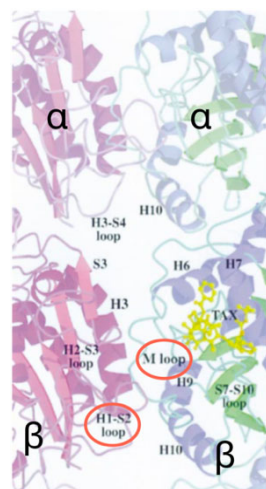


図2 微小管形成時のチューブリンおよび各ループ構造の位置関係 (Nogales et al., 1999 より改変)

固有の神経性疾患の原因遺伝子であることから、線虫のチューブリンアイソタイプ本研究で得た知見は、アイソタイプの多様性がどのように個々の細胞種特異機能を生み出すかという普遍的な理解へとつながることを期待している。

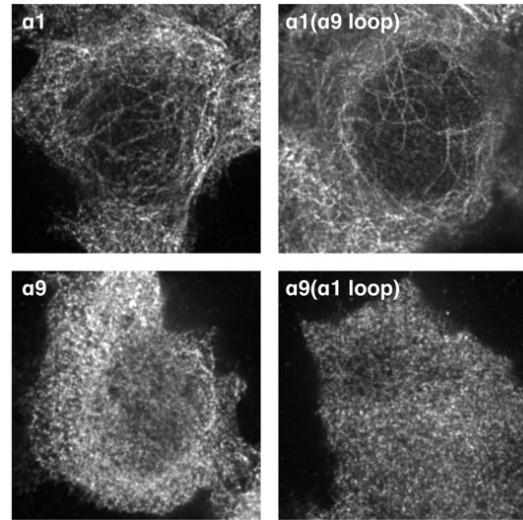


図3 $\alpha 1, \alpha 9$ およびキメラチューブリンのヒト細胞内での微小管への取り込み

[4] 成果資料

(1) 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) Nishida, K., Tsuchiya, K., Honda, Y., Obinata, H., Onodera, S., Haruta, N., Ikeda, I., Tanaka, K., and Sugimoto, A., Comprehensive expression analysis of tubulin isotypes using GFP-knock-in strains in *C. elegans*. EMBO/EMBL Symposia Microtubules, 2020.6

(3) Nishida, K., Tsuchiya, K., Honda, Y., Obinata, H., Onodera, Honda, Y., Lai, Y.-C., Haruta, N., and Sugimoto A. Expression pattern analysis of all tubulin isotypes in *C. elegans* adults using GFP knock-in strains, *Cell Struct. Funct.*, 2021

(4) ○西田桂、土屋賢汰、春田奈美、池田真教、田中耕三、杉本亜砂子 線虫 *C. elegans* を用いた組織特異的チューブリンアイソタイプ群の特性解析 Characteristic analysis of tissue-specific tubulin isotypes in *C. elegans* 第44回日本分子生物学会 2021. 12.1~3

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究から、神経特異的に発現しているチューブリンアイソタイプがそれぞれの細胞種特異的な機能を有していることが分かった。今後は、引き続き、線虫 *C. elegans* とヒト細胞を用いて、チューブリンアイソタイプ間のスワッピング実験と、キメラタンパク質の解析を続けることで、チューブリンの微小管への取り込まれやすさを決定する領域や、 α/β -チューブリンアイソタイプのヘテロ二量体形成時の選択性に関わる領域の探索をする予定である。特定のヒトチューブリンアイソタイプは、それぞれ