

課題番号 31

ヒトと線虫におけるチューブリンアイソタイプの進化細胞生物学的解析

[1] 組織

代表者：西田 桂
(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)

分担者：杉本 亜砂子 (東北大学生命科学研究科)
春田 奈美 (東北大学生命科学研究科)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

微小管は細胞骨格の一種で、紡錘体形成、神経形成および繊毛形成など、多様な役割を担う。微小管は α - β -チューブリンからなるヘテロ二量体が重合した管状の繊維構造をしている。微小管の多様な働きを可能とする要素の1つが、 α - β -チューブリンの多様性である。多くの真核生物ではゲノム上に α -および β -チューブリンをコードする遺伝子が複数存在する。これらはチューブリンアイソタイプと呼ばれ、それぞれ組織特異的な発現パターンを示すことや、特定のアイソタイプの変異が組織特異的な疾患—小頭症や脳回肥厚症など—を引き起こすことが報告されている。我々はこれまでに線虫 *Caenorhabditis elegans* をモデルに、チューブリンアイソタイプの発現組織および発現量を網

羅的に解析してきた。*C. elegans* では、多量の全身発現性のチューブリンと少量の組織特異的なチューブリンが共発現しており、組織特異的な α - β -チューブリンは特定のペアで選択的に微小管に取り込まれやすくなることを見出した (Nishida et al., 2021, 西田修論 2021)。

本研究では、*C. elegans* で見出されたチューブリンアイソタイプの特性がヒトなどの別の生物でも保存されているかを調べるため、ヒト培養細胞中で線虫由来の α -および β -チューブリンアイソタイプを発現させる系を構築し、微小管特性に与える影響を調べてきた。研究をすすめるにあたり、加齢医学研究所の田中耕三教授から細胞やプラスミドを提供していただき、定期的に議論を行ってきた。

[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。

まず、*C. elegans* の α - β -チューブリンアイソタイプをヒト培養細胞に発現させ、各アイソタイプの微小管への取り込まれやすさを調べた。本研究では、*C. elegans* の全身発現性のアイソタイプ ($\alpha 1, \beta 2$) および感覚繊毛神経特異的なアイソタイプ ($\alpha 5, \alpha 6, \alpha 9, \beta 4$) で比較した。その結果、全身発現性のアイソタイプの

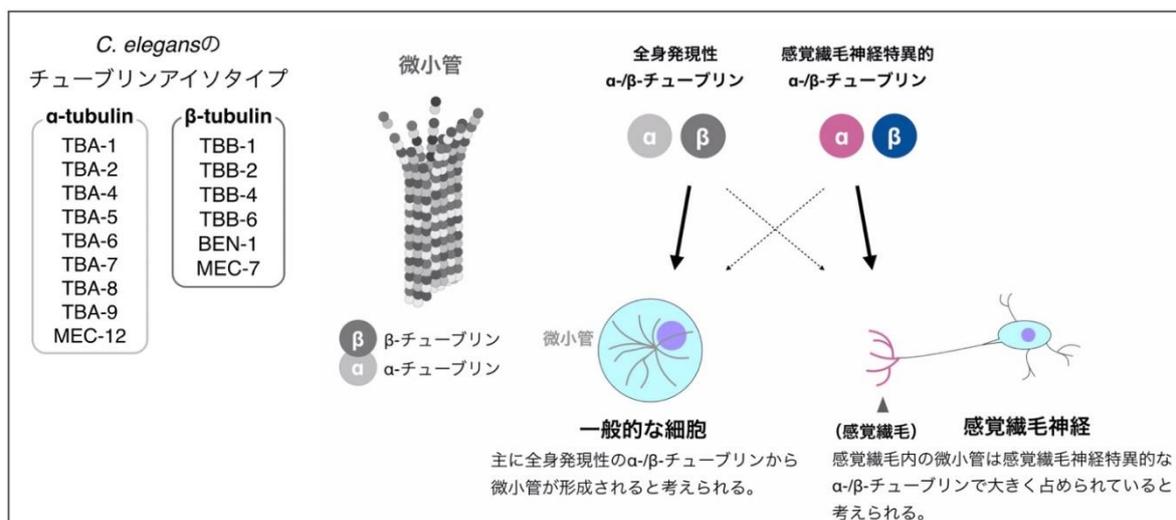


図1. *C. elegans*におけるチューブリンアイソタイプが微小管機能を制御するモデル

$\alpha 1$ と $\beta 2$ が微小管に取り込まれやすかったのに比べて、感覚繊毛特異的なアイソタイプはいずれも微小管への取り込みは低く、細胞質中に拡散していた。この結果は、これまでの線虫初期胚での各アイソタイプの取り込み効率を調べた結果と一致していた。このことから、アイソタイプの機能分化はヒトと線虫との種間よりも線虫種内で大きくなることが示唆された (図 1)。今後はヒトの繊毛特異的なアイソタイプの微小管への取り込まれやすさを調べることで、アイソタイプの機能分化についてさらに調べる予定である。

次に、それぞれ感覚繊毛神経の異なるサブグループ特異的に発現している $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$ の機能互換性について、*C. elegans* を用いて調べた。これらアイソタイプが感覚繊毛神経において繊毛形成など各神経特異的な機能を担っているのかを調べるため、ゲノム編集を用いて $\alpha 6$ 遺伝子を、 $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ の各 α -チューブリン遺伝子と置き換えた。これにより本来 $\alpha 6$ が発現する神経細胞で、 $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 9$ が発現することで機能を補完できるかどうかを繊毛形成の有無などで調べた (図 2)。その結果、 $\alpha 9$ は $\alpha 6$ と同程度感覚繊毛に蓄積していた一方で、 $\alpha 5$ は弱い蓄積を示し、 $\alpha 1$ は蓄積が見られなかった。この結果から、感覚繊毛神経特異的な α -チューブリンが選択的に感覚繊毛に蓄積する仕組みがあることが示唆された。今後は繊毛を形成するヒト培養細胞 (RPE1 など) に $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 9$ を発現し、これら α -チューブリンがヒト細胞の繊毛に蓄積するかを調べる予定である。

これまでの結果から、*C. elegans* では、チューブリンアイソタイプごとの微小管への取り込みや細胞内での分布の違いが、形成される微小管の多様性を生み出していることが示された。

(3-2) 波及効果と発展性など

申請者は線虫をモデルに、チューブリンアイソタイプの発現組織および発現量を網羅的に解析した論文を発表した(Nishida et al., 2021)。当研究室で作製した線虫株について、これまで多くの研究室からリクエストされ、分与してきたことから、今後幅広い研究分野の発展に貢献できると期待している。

本共同研究についても、周辺の研究分野の発展につながることを期待している。チューブリンアイソタイプの変異により生じる疾患 (チューブリノパシー) は複数報告されているものの、細胞レベルでの疾患の発症メカニズムについては不明な点が多い。そのため、本共同研究が線虫を用いた個体レベルでの研究とヒト培養細胞を用いた臨床的な研究の橋渡しをする位置づけとなり、チューブリノパシーのさらなる理解そしてアイソタイプによる細胞分化の仕組みの理解につながることを期待している。

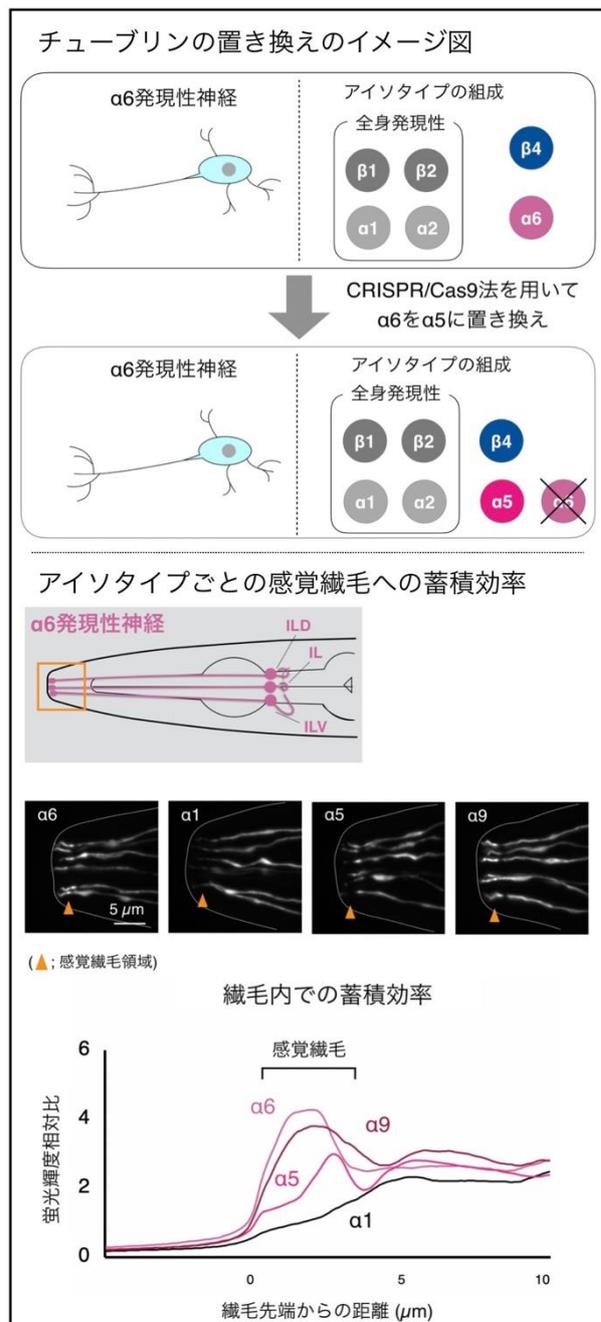


図2. アイソタイプの互換性

[4] 成果資料

(1) Kei Nishida, Kenta Tsuchiya, Hiroyuki Obinata, Sizuka Onodera, Yu Honda, Yen-Cheng Lai, Nami Haruta and Asako Sugimoto. Expression pattern analysis of all tubulin isotypes in *C. elegans* adults using GFP knock-in strains *Cell Structure and Function* Volume 46 Issue 1 Pages 51-64, 2021

(2) 西田桂, 土屋賢汰, 春田奈美, 杉本亜砂子
Distinct properties of ciliated neuron-specific α -tubulin isotypes examined by in vivo live imaging and swapping isotypes

(第4回線虫研究の未来を作る会 (オンライン) 2022年8月) (ポスター発表)