

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06616

研究課題名(和文) 組織特異的な微小管ダイナミクスの制御機構

研究課題名(英文) Regulation of tissue-specific microtubule arrays

研究代表者

春田 奈美 (Haruta, Nami)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70381671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：微小管は、細胞分裂・細胞極性・形態形成など、多様な役割を果たす。本研究では、線虫*C. elegans*の生殖腺における微小管ネットワークの構築原理を理解するため、 γ -チューブリン複合体(γ -TuC)の新規構成因子で生殖腺特異的な役割をもつGTAP-1の解析を行った。その結果、*gap-1*変異体は若い成虫では異常は少ないが、加齢とともに表現型が悪化し、GTAP-1は生殖腺の微小管構造の維持に働いていることが分かった。GTAP-1および-2は生殖腺膜上への γ -チューブリンのリクルートに同程度に寄与するが、GTAP-1のみがさらに γ -TuCの活性化制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、 γ -チューブリン複合体(γ -TuC)構成因子であるGTAP-1とGTAP-2の生殖腺膜上の微小管形成中心における役割が明確に異なることが分かった。さらに γ -チューブリンの局在量と微小管の表現型とが一致しないことから、局在化と γ -TuCの制御機構を分けられることを強く示唆する。この結果は、線虫のみならず、他の動物種における組織特異的な γ -TuCによる微小管形成能の制御機構と組織形成に關与する微小管ネットワーク構造の構築原理の理解する上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Microtubule (MT) plays various roles in cellular functions such as cytokinesis, establishment of cell polarity and morphogenesis. The γ -tubulin complex (γ -TuC) is a major nucleation factor of MTs. We identified GTAP-1 and GTAP-2 as a novel component of *C. elegans* γ -tubulin complex (γ -TuC) for the efficient recruitment of γ -TuC to the centrosomes. To characterize the role of GTAP-1 and GTAP-2 in germline, we constructed the strain expressing fluorescent-tagged marker protein and observed with wild-type, *gap-1* and *gap-2* background. The *gap-1* mutant showed abnormal germline morphology and abnormal laid eggs in age-dependent manner. Even though both GTAP-1 and GTAP-2 involved in the efficient recruitment of the γ -tubulin onto plasma membrane of germline, only GTAP-1 might be involved the regulation of γ -TuC. These results indicate that GTAP-1 and GTAP-2 has different roles in the non-centrosomal MTOC in the specific tissues.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 γ -tubulin complex *C.elegans*

1. 研究開始当初の背景

動物は、1細胞の受精卵から、特定の時期に決まった配向に細胞分裂を繰り返し、個々の細胞が組織特異的に分化して様々な器官をもつ個体となる。細胞骨格である微小管は、細胞分裂時に紡錘体を形成するとともに、分化した細胞においては、神経細胞の軸索形成や細胞極性の確立、繊毛形成など、組織・細胞種特異的に非常に多様なネットワーク構造を構築することで、分化した細胞の機能獲得と形態形成に必須の働きをする。しかし、分裂期の紡錘体微小管に比べて、時期および組織特異的にノックダウンすることの難しさや個体内で実際に組織・器官の発生と分子の動きを高い時間空間分解能でリアルタイムに観察することの難しさから、分化した細胞における微小管動態制御の研究は立ち遅れている。

微小管の重要な制御因子の一つが、マイナス端に結合する γ -チューブリン複合体である。 γ -チューブリン複合体は、微小管形成中心に局在すると、形成の鋳型となって微小管形成を促進するとともに、そのまま微小管のマイナス端に結合し、微小管形成中心へのアンカーの役割を果たす。申請者らは、線虫 *C. elegans* の γ -チューブリン複合体の新規構成因子 GTAP-1, GTAP-2 を同定し、中心体への γ -チューブリンのリクルートに関与していることを明らかにしていた。

さらに *gtap-1* 変異体において、雌雄同体成虫に産卵数が減少するとともに、生殖腺内の微小管の配向が攪乱し、核配置および細胞膜の形成異常を見出していた。一方、*gtap-2* 変異体では、生殖腺の形態や産卵数は野生型と同程度であったため、GTAP-1 には、生殖腺特異的な役割が強く示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、線虫生殖腺をモデルに組織特異的な微小管ダイナミクスの制御機構を明らかにすることを旨とし、GTAP-1 の線虫生殖腺膜上の組織特異的な微小管形成中心 (MTOC: Microtubule Organizing Center) における役割と γ -チューブリンの生殖腺膜上 MTOC への局在化機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生殖腺特異的に蛍光融合タンパク質を発現する線虫株を作製し、共焦点顕微鏡を用いて 4D ライブイメージング観察を行った。野生型とともに、*gtap-1*, *gtap-2* 変異型バックグラウンドにおけるマーカートンパク質の局在解析および表現型観察を行った。

4. 研究成果

(1) *gtap-1* 変異体は、加齢依存的に表現型が強くなる
gtap-1 変異体は、雌雄同体成虫の生殖腺に異常が生じ、産卵数の低下が観察されていた。これらの異常が発生のどの時期からおこるかを mCherry::TBB-2(微小管)、mCherry:: γ -チューブリン、GFP::PH ドメイン (生殖腺膜) のライブイメージングで追跡した。その結果、生殖腺が発達をはじめる L4 期では大きな異常は確認できず、1 日目の成虫の生殖腺内の生殖細胞の形態は、比較的、野生型に近い形態が保たれていたが、2 日目以降、著しい微小管の攪乱や細胞核の異常な配置が確認できた。また、1 日目成虫の産卵数および胚性致死率は野生型と同程度であったが、2 日目以降に産卵数が著しく現象し、卵のサイズがばらつくとともに胚性致死率が上昇しており、生殖腺の形態異常の推移と一致していた。このことから、GTAP-1 が、生殖腺膜上の MTOC からの微小管ネットワーク構造の維持に関与していることが強く示唆された (Haruta, et al., 2023)。

(2) GTAP-1 と GTAP-2 の線虫生殖腺膜上 MTOC への γ -チューブリン局在化の定量

GTAP-1 と GTAP-2 の生殖腺膜上の γ -チューブリンの局在化への影響を定量的に調べるために、mCherry::ヒストンと mCherry:: γ -チューブリンを生殖腺で同時に発現する線虫株を作製し、*gtap-1* および *gtap-2* 変異体とかけあわせた株を樹立した。ヒストン量を内部コントロールとして、生殖腺膜上の γ -チューブリンの局在量を定量解析を行った結果、*gtap-1* 変異体では、野生型の 50%程度に、*gtap-2* 変異体においても 60%程度にまで γ -チューブリンの膜上の局在量が減少しており、GTAP-1 と GTAP-2 が、生殖腺膜上へ

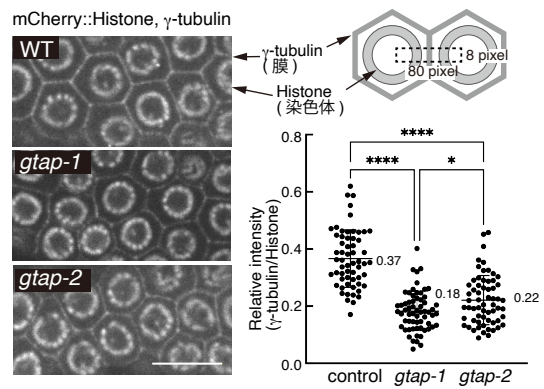


図 1. 生殖腺膜上の γ -チューブリン局在量

の γ -チューブリンのリクルートに寄与していることを定量的に示した(図 1, Haruta, et.al., 2023)。*gtap-2* 変異体では、*gtap-1* 変異体と同程度の γ -チューブリン局在量の低下はみられるものの、その他の表現型は野生型とほとんど変わらない。このことから、GTAP-1 の役割は、 γ -チューブリンのリクルートのみならず、 γ -チューブリン複合体の微小管形成能を活性化させるといった制御段階にも関与していることが推測された。

(3) 改良型 AID 法 (標的タンパク質分解法) の線虫株の作製

AID 法は、標的タンパク質に AID タグを導入し、*Arabidopsis* 由来の TIR タンパク質を発現させた株とかけ合わせることで、オーキシン依存的に AID タグ化標的タンパク質を分解することが可能となる。改良型 TIR を導入した線虫株を用いてオーキシン類似化合物を添加し、AID タグ化標的タンパク質を効率よく分解することを確かめた (Negishi, et.al., 2022)。さらにこの手法を元に、標的タンパク質の分解とその影響をリアルタイムで追跡できるように、ヒストンや微小管などの蛍光マーカータンパク質を TIR と同時に発現させる線虫株を作製した。*gtap-1*; *gtap-2* 二重変異体は、様々な表現型が生じる一方で、どの段階で影響が出ているのか定かではない。そのため、今後は、*gtap-2* 変異体下で GFP::AID::GTAP-1 時期特異的にノックダウンし、ライブイメージングで追跡することで、各発生段階における微小管や各配置の影響を調べる。

(4) タンパク質近接ラベル化法による γ -チューブリン複合体の生殖腺膜上 MTOC への局在化因子の探索

γ -チューブリン複合体の生殖腺膜 MTOC への局在化機構と微小管ネットワーク構造の構築機構を明らかにするために、局在化因子の探索を、タンパク質近接ラベル化法 (TurboID) 法を用いて行った。生殖腺膜上に局在化し γ -チューブリン複合体の活性化に関与する可能性が示唆されている NOCA-1 タンパク質にビオチン化酵素を融合させて生殖腺特異的に発現させ、ビオチン化したタンパク質を精製してマス解析を行った。その後、候補遺伝子を RNAi でノックダウンして表現型解析を行った結果、生殖腺内の微小管に大きな影響を与える因子としてカゼイン用キナーゼとチューブリンのシャペロンタンパク質を絞り込んだ。これらのタンパク質因子と γ -チューブリン複合体との関係性については今後の課題である。

5. 参考文献

- (1) Haruta, N., et al., Germline-specific role for unconventional components of the γ -tubulin complex in *Caenorhabditis elegans*. (2023) *J. Cell Science* (掲載受理)
- (2) Negishi, T., et al., Haruta, N (10人中5番目) The auxin-inducible degenron 2 (AID2) system enables controlled protein knockdown during embryogenesis and development in *Caenorhabditis elegans*. (2022) *Genetics*, 220(2)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 * Haruta, N., Sumiyoshi, E., Honda, Y., Terasawa, M., Uchiyama, C., Toya, M., Kubota, Y., and *Sugimoto, A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Germline-specific role for unconventional components of the γ -tubulin complex in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yugeta, A., Arai, H., Takahashi, D., Haruta, N., Sugimoto, A., and * Arimoto, H	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>C. elegans</i> ATG-5 mutants associated with ataxia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 MicroPub Bio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000792.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakajo, M., Kano, H., Tsuyama, K., *Haruta, N. and *Sugimoto, A.	4. 巻 135
2. 論文標題 Centrosome maturation requires phosphorylation-mediated sequential domain interactions of SPD-5.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Omura, S. Tsuyama, K., Haruta, N, and *Sugimoto A	4. 巻 -
2. 論文標題 Ransgenesis of the gonochoristic nematode <i>Caenorhabditis inopinata</i> by microparticle bombardment with hygromycin B selection.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micropublication	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Kei, Tsuchiya Kenta, Obinata Hiroyuki, Onodera Shizuka, Honda Yu, Lai Yen-Cheng, Haruta Nami, Sugimoto Asako	4. 巻 46
2. 論文標題 Expression Patterns and Levels of All Tubulin Isoforms Analyzed in GFP Knock-In <i>C. elegans</i> Strains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 51 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.21022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Negishi Takefumi, Kitagawa Saho, Horii Natsumi, Tanaka Yuka, Haruta Nami, Sugimoto Asako, Sawa Hitoshi, Hayashi Ken-ichiro, Harata Masahiko, Kanemaki Masato T	4. 巻 220
2. 論文標題 The auxin-inducible degron 2 (AID2) system enables controlled protein knockdown during embryogenesis and development in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/genetics/iyab218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Nami Haruta and Asako Sugimoto
2. 発表標題 The tissue-specific role of the unconventional components of the γ -tubulin complex in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 Naito conference 2023 "Microtubules and molecular motors" (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 N. Haruta, and A. Sugimoto
2. 発表標題 The germline-specific role of the unconventional components of the γ -tubulin complex in <i>C. elegans</i> .
3. 学会等名 Cold spring harbor Asia 2023 "Cilia and Centrosomes" (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春田奈美、生井聡史、佐々木大地、杉本亜砂子
2. 発表標題 紡錘体動態および非対称分裂の進化細胞生物学的解析
3. 学会等名 細胞分裂研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Nishida, Kenta Tsuchiya, Yu Honda, Hiroyuki Obinata, Shizuka Onodera, Nami Haruta, Masanori Ikeda, Kozo Tanaka, Asako Sugimoto
2. 発表標題 Distinct properties of broadly-expressed and tissue-specific tubulin isoforms examined by ectopic and heterologous expression
3. 学会等名 23rd international C. elegans conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shun Oomura, Shuichi Onami, Koji Kyoda, Nami Haruta, Asako Sugimoto
2. 発表標題 Comparative analysis of cellular dynamics of C. inopinata and C. elegans zygotes
3. 学会等名 23rd international C. elegans conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuhei Hatanaka, Yuki Hoshi, Nami Haruta, Taisei Kikuchi and Asako Sugimoto
2. 発表標題 Significant differences in the sex determination pathways between C. inopinata and C. elegans
3. 学会等名 23rd international C. elegans conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田 桂、土屋 賢汰、春田 奈美、池田 真教、田中 耕三、杉本 亜砂子
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> を用いた感覚神経特異的チューブリンアイソタイプ群の特性解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野呂美波、パン・ウィキュ、生井聡史、春田奈美、杉本亜砂子
2. 発表標題 線虫 <i>Pristionchus pacificus</i> における生殖顆粒構成因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春田奈美、中條桃江、杉本亜砂子
2. 発表標題 中心体と組織特異的な微小管形成中心
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中條桃江、狩野ひかる、春田奈美、杉本亜砂子
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> における中心体周辺物質の足場形成機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei Nishida, Kenta Tsuchiya, Yu Honda, Hiroyuki Obinata, Shizuka Onodera, Nami Haruta, Masanori Ikeda, Kozo Tanaka, Asako Sugimoto
2. 発表標題 Comprehensive expression analysis of tubulin isotypes using GFP-knock-in strains in C.elegans
3. 学会等名 EMBO/EMBL Symposia Microtubules (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shun Oomura, Yuki Matsumura, Nami Haruta and Asako Sugimoto
2. 発表標題 Early embryogenesis of Caenorhabditis inopinata, the closest species of Caenorhabditis elegans
3. 学会等名 Ecology, Evolution and Genomics of C. elegans and Other Nematodes (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------