

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770191

研究課題名(和文)ポリグリシン化による微小管の機能制御

研究課題名(英文)Microtubule regulation by polyglycylation

研究代表者

堤 弘次(TSUTSUMI, KOJI)

北里大学・理学部・助教

研究者番号：50569853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：細胞骨格は細胞の形態、極性形成に重要である。本研究では微小管ポリグリシン化による微小管多様性の形成(1)、FilGAPによるアクチン細胞骨格の時空間制御機構の解析を行った(2)。(1)グリシン化酵素TTL8のノックアウトマウスの精巣、鞭毛ではチューブリンのポリグリシン化が低下し、グルタミン酸化が増加していた。この結果からポリグリシン化とグルタミン酸化の拮抗的な制御が微小管の多様性を生み出していると考えられた。(2)クラスリンによるFilGAPの活性抑制がアクチン細胞骨格再編成を時空間的に制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytoskeleton is crucial for cell morphology and cell polarity. I have studied (1) the role of polyglycylation of tubulin and (2) a novel regulatory mechanism of FilGAP, key regulator of actin cytoskeleton remodeling. I found decreased polyglycylation and higher glutamylation level of tubulin in TTL8 knockout mice testes and spermatozoa. Antagonistic regulation between glycylation and glutamylation of tubulins may generate tubulin diversity. (2) I found that Clathrin regulates actin cytoskeleton remodeling through the direct inhibition of FilGAP.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：微小管 翻訳後修飾 アクチン細胞骨格 細胞極性 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 複雑な生物の個体が形成される機構の解明は現代の生物学の根底的な問題である。細胞生物学的には、細胞という単位に着目してほぼ対称な卵から複雑な細胞の形態が生み出される機構の解明として捉えなおすことが一般的である。細胞の形態形成には細胞骨格が重要である。

細胞の形態形成のモデル系として、神経細胞の軸索と樹状突起という極性に着目して古典的な解析がなされてきた。これまでに極性の分子基盤となる微小管細胞骨格の相違として、微小管結合蛋白質(Tau や MAP2 や KIF モータータンパク質)が同定されている。では、微小管が細胞内の場所によって結合している MAPs や KIFs といった分子の種類が異なる理由は何であろうか？これは一般には、MAPs や KIFs のリン酸化状態が細胞内の場所によって異なることで、微小管との結合が制御されているからであるとなんとなく考えられていた。最近、チュプリンの翻訳後修飾のひとつポリグルタミン酸化酵素が同定され、その酵素のサブユニットのミュータントマウスを解析することで、微小管のポリグルタミン酸化が神経細胞内の場所(細胞体と突起)によって異なっており、上流シグナルとして下流のモータータンパク質(KIF1)の細胞内分布を制御しているという結果が報告されている(Ikegami, K et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007)。さらに最近、微小管のチロシン化が軸索と樹状突起で異なっており、現在知られている極性制御機構で最も上流のシグナルとして下流のモータータンパク質(KIF5)の分布を制御していることが報告されている(Konishi and Setou, Nature Neurosci. 2009)。

微小管は以前より、アセチル化、ポリグルタミン酸化、チロシン化、ポリグリニン化といった様々な翻訳後修飾を受けることは知られていた。ポリグルタミン酸化はタンパク質の特定のグルタミン酸残基に一つあるいは複数のグルタミン酸を直鎖状に付加する反応である。グリニン付加は特定のグルタミン酸残基に一つあるいは複数のグリニンを直鎖状に付加する反応である。こうした細胞内の微小管の翻訳後修飾が細胞内の微小管の位置、たとえば鞭毛の中と外、などによって異なっていることも知られていた。しかし、これまで責任酵素が同定されていなかったことからそれ以上の修飾の解析は進んでいなかった。また、アセチル化は MAPs の下流で変化することが分かっていることから、同様に他の修飾も下流で変化していると漠然と類推されることで、これら修飾の重要性が見過ごされてきたのではないかと考えられる。

浜松医科大学の瀬藤らは世界で初めて Tubulin tyrosine ligase like protein 10 (TTLL10)がポリグリニン化酵素であるこ

とを同定した(Ikegami, K et al., FEBS Lett. 2008)。また、チュプリンが、TTLL8 でモノグリニン化されたのち、TTLL10 でポリグリニン化されることも明らかにしている(Ikegami & Setou, FEBS Lett. 2009)。それに続く形でフランス、アメリカのグループも TTLL3、8、10 がグリニン化酵素として働くことを報告している(Cell 2009, Dev Cell 2009)。しかしながらポリグリニン化が微小管自身の性質や結合する MAPs に与える影響についてはまったく調べられていない。

(2)2012年6月より研究開始当初所属していた浜松医科大学から北里大学に転任した。移籍に伴い、使用出来る実験動物や実験設備の変更にともない当初の研究計画の変更を余儀なくされた。移籍後はアクチン細胞骨格による細胞の極性形成制御機構の研究を開始した。本研究課題が最終的に目指す細胞骨格による細胞の形態、極性形成の分子基盤の解明であるために研究を続行した。低分子量 G タンパク質 RhoA と Rac1 は細胞内にそれぞれ異なる形態のアクチン繊維を形成することで細胞内に極性を形成する。FilGAP は RhoA の下流で活性化するキナーゼ ROCK によりリン酸化され活性化する Rac1 の不活性化因子である。FilGAP は RhoA と Rac1 の活性のバランスを調整することでアクチン細胞骨格を時空間制御することにより細胞内に極性を形成する。ROCK による FilGAP のリン酸化はアクチン細胞骨格による極性形成に重要であると考えられるが、リン酸化による活性化の詳細な分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的はポリグリニン化とよばれる機能未知のユニークな翻訳後修飾による微小管の多様性創出機構を明らかにすることである。

(2)アクチン細胞骨格の時空間制御による細胞極性形成シグナル伝達経路の解明。

3. 研究の方法

(1)微小管ポリグリニン化の役割を明らかにするため、ポリグリニン化酵素 TTLL8 のノックアウト(KO)マウスの解析を行った。TTLL8KO マウスの精巣、精子鞭毛、および精巣における微小管翻訳後修飾の状態を各種抗体を用いたウェスタンブロット、および免疫染色により解析した。また、グリニン化が精子鞭毛の構造に与える影響を調べるために、TTLL8KO マウスの精子を電子顕微鏡で観察した。TTLL8 に対する特異的抗体を作製するために、リコンビナント TTLL8 を大腸菌に発現、精製し、ウサギに免疫を行った。作製した抗体はアフィニティー精製後にウェスタンブロットで評価を行った。

(2) リン酸化依存的に FilGAP に結合する因子を同定する為に非リン酸化型および擬似リン酸化型 Flag-FilGAP を HEK293 細胞に導入し、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い Flag ペプチドで結合タンパク質を溶出した。結合タンパク質は電気泳動後に銀染色を行い、質量分析により同定を行った。

4. 研究成果

(1) 微小管のポリグリシン化の研究

TTLL8 は精巣で高い発現を示すこと、そして精子鞭毛軸系微小管は高度にポリグリシン化されていることが知られている。そこで TTLL8KO マウスの精巣および精子における微小管の翻訳後修飾をウェスタンブロットおよび免疫染色で解析した。TTLL8KO マウスの精巣ではポリグリシン化が大きく減少していた(図 1)。一方でグルタミン酸化は TTLL8KO マウスで増加していたことから、ポリグリシン化とグルタミン酸化は拮抗的に働くことで微小管に異なる性質を付与していることが示唆された。

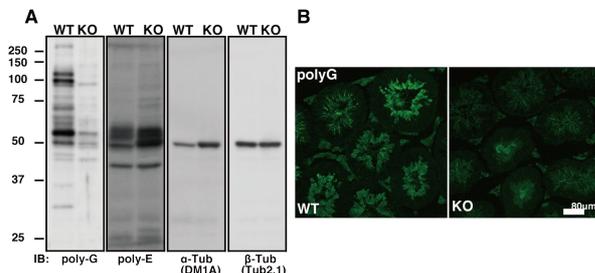


図 1、TTLL8KO マウス精巣ではポリグリシン化が顕著に低下していた。

同様に TTLL8KO マウスの精子のチュブリン翻訳後修飾の解析も行った。TTLL8KO マウスの精子鞭毛ではαチュブリンのポリグリシン化が減少していたが、βチュブリンのポリグリシン化は変化しなかった。ポリグリシン化の減少により鞭毛軸系の構造に影響がある可能性を考え、電子顕微鏡で観察を行った(図 2)。TTLL8KO マウスの軸系の構造は正常であったことから、αチュブリンのポリグリシン化の低下は鞭毛軸系の構造には大きな影響を与えないことが示唆された。

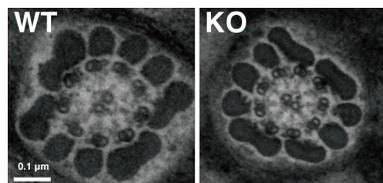


図 2、TTLL8KO マウスの鞭毛軸系の電子顕微鏡像。

グリシン化酵素の発現と細胞内局在の解析を行うために TTLL8 に対する抗体の作製を行った。作製した抗体は細胞に発現した TTLL8 を認識することが確認出来た。また精巣を遠心法で細胞分画を行い作製した抗体でウェスタンブロットを行ったところ、鞭毛

軸系が含まれる分画において TTLL8KO マウスで消失するバンドが検出されたことから、TTLL8 は精子鞭毛軸系に局在する可能性が示唆された。

(2) アクチン細胞骨格の空間制御による細胞極性形成機構の研究

非リン酸化型 FilGAP 結合タンパク質としてクラスリン重鎖を単離した(図 3)。

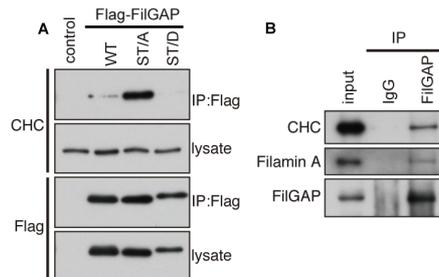


図 3、非リン酸化型 FilGAP 結合タンパク質の単離

GST プルダウンアッセイによって FilGAP がクラスリン重鎖に直接結合することを明らかにした。組み替えタンパク質を用いた結合部位のマッピングにより詳細な結合に必要な領域を同定することにも成功した。また、in vitro においてクラスリン重鎖は野生型および非リン酸化型 FilGAP の RacGAP 活性を阻害するが、擬似リン酸化型 FilGAP は阻害しないことを明らかにした。さらに細胞内においてクラスリン重鎖の発現抑制によって FilGAP の RacGAP 活性が増加しコラーゲンコートしたカバーガラス上での細胞伸展を抑制したことから、クラスリン重鎖は細胞内においても FilGAP の RacGAP 活性を抑制することが示唆された。非リン酸化型 FilGAP は wound healing assay における細胞運動を低下させたが、クラスリン重鎖の発現抑制によって細胞運動の低下が回復した。クラスリン重鎖の発現抑制は FilGAP の活性化を介してコラーゲンゲル上で培養した乳がん細胞の形態を細長い間葉型から丸いアメーバ型へと変換を促進することが分かった。以上の結果からクラスリン重鎖は脱リン酸化型 FilGAP に結合し FilGAP の RacGAP 活性を抑制することにより、アクチン細胞骨格を時空間的に制御することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 堤 弘次、Clathrin regulates actin remodeling through the direct inhibition of FilGAP、第 66 回日本細胞生物学会、2013 年 06 月 11 日-13 日、奈良

(2) 堤 弘次、Role of mono-glycine ligase TTLL8 in male reproductive system、第 64

回日本細胞生物学会、2012年05月28日-31日、神戸

(3) 堤 弘次、Role of mono-glycine ligase TTLL8 in male reproductive system、第63回日本細胞生物学会、2011年06月27日-29日、札幌

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

堤 弘次 (TSUTSUMI KOJI)

北里大学・理学部・助教

研究者番号：50569853

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし