

平成30年5月26日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04369

研究課題名(和文) チューブリンアイソタイプの網羅的機能解析によるマルチ-チューブリン仮説の検証

研究課題名(英文) Revisiting "the multi-tubulin hypothesis" through comprehensive analysis of tubulin isotypes

研究代表者

杉本 亜砂子 (Sugimoto, Asako)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80281715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では<チューブリンアイソタイプの違いが微小管動態の多様性に寄与する>という『マルチ-チューブリン仮説』を、線虫*C. elegans*をモデル系として検証した。*C. elegans*のすべてのチューブリンアイソタイプ(α：9種類；β：6種類)のノックアウト株とGFP標識株を作製し、発現パターンと表現型を網羅的に解析した。その結果、多くのアイソタイプが特定の細胞集団で特異的に発現されていることが示された。さらに、異所発現実験によりチューブリンアイソタイプの組成が微小管動態の多様性に寄与していることが示された。以上の結果から『マルチ-チューブリン仮説』が実証された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tested the "multi-tubulin hypothesis" in which multiple tubulin isotypes contribute to the diversity of microtubule dynamics, using the nematode *C. elegans* as a model system. Using genome editing, all tubulin isotype genes (9 alpha and 6 beta genes) were systematically knocked out and tagged with GFP, and their expression patterns and loss-of-function phenotypes were analyzed. Each isotypes were expressed in specific cell types, and ectopic expression experiments proved that composition of tubulin isotypes contribute to the diversity of microtubule dynamics.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 チューブリンアイソタイプ 線虫

1. 研究開始当初の背景

微小管はα-およびβ-チューブリンからなるヘテロダイマーを構成単位として形成される中空の管状の構造であり、重合・脱重合によりその構造をダイナミックに変化させることで細胞分裂、細胞内輸送、細胞形態の変化・維持などの多様な細胞内現象に関与している。

ゲノム配列解析から、多くの生物種はそれぞれ複数のα-およびβ-チューブリンアイソタイプを持つ。微小管の微細構造に多様性が存在することは古くから知られており、異なるチューブリンアイソタイプによって構築される特徴的な微小管構造が微小管の多彩な機能の発揮に寄与しているという『マルチ-チューブリン仮説』が約40年前に提唱された(Fulton & Simpson, 1976)。しかしながら、この仮説を厳密に検証できる実験系が存在しなかったため、その正否についてはいまだ確固たる結論が出ていない。

2. 研究の目的

線虫 *C. elegans* には9種類のα-チューブリンアイソタイプと6種類のβ-チューブリンアイソタイプが存在する(図1)。本研究では、線虫 *C. elegans* のα-およびβ-チューブリンのアイソタイプすべて(それぞれ9種および6種)の発現時期・発現組織・機能阻害表現型を網羅的に解析し、さらに各アイソタイプ間の互換性解析を行うことにより、『マルチ-チューブリン仮説』の検証を行うことを目的とした。

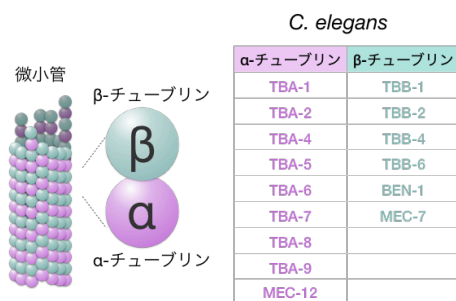


図1. α-, β-チューブリンには複数のアイソタイプが存在する

具体的には、以下の実験を行う。

(1) 線虫 α-, β-チューブリンアイソタイプの網羅的な発現・機能解析

線虫のα-チューブリンアイソタイプ9種、β-チューブリンアイソタイプ6種すべてについて、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いてGFP標識および遺伝子破壊を行い、発現時期・発現組織・機能破壊表現型の解析を網羅的に行う。

(2) 線虫チューブリンアイソタイプ間の互換性解析による『マルチ-チューブリン仮説』の検証

CRISPR/Cas9システムを用いて、線虫ゲノム上の各チューブリンアイソタイプ ORF 部分のみを入れ替えて表現型を観察することによりアイソタイプ間の機能互換性について調べ、それぞれのアイソタイプが特異的な機能を担っているか否かを検証する。

て調べ、それぞれのアイソタイプが特異的な機能を担っているか否かを検証する。

3. 研究の方法

(1) 線虫 α-, β-チューブリンアイソタイプの網羅的な発現・機能解析

本研究では Dickinson ら (2015) の手法を改変し、CRISPR/Cas9システムを用いて、α-チューブリンアイソタイプ9種、β-チューブリンアイソタイプ6種すべてについて以下の実験を行った。

① 各チューブリンアイソタイプの網羅的な遺伝子破壊線虫株の作製

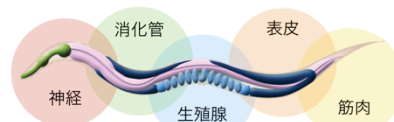
各チューブリンアイソタイプ遺伝子について、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いてORF領域の上流にGFP遺伝子と選択マーカー遺伝子カセットを挿入した(図2)。この株では、各アイソタイプ遺伝子のプロモーターからGFPが発現されるが、アイソタイプORFは翻訳されず、遺伝子破壊株となる。

得られた遺伝子破壊株について、胚発生・孵化後発生・運動能力に着目して表現型解析を行う。発生過程については微分干渉顕微鏡観察により、細胞数・細胞運命決定・細胞形態などの異常について調べた。

② 各チューブリンアイソタイプの網羅的なGFP標識株の作製

①で作成した遺伝子破壊株に対してヒートショック処理をすることで、Cre/loxPシステムにより、選択マーカーを切除した(図2)。その結果、GFPとORFが連結され、N末端にGFP標識されたチューブリンアイソタイプが発現することとなる。

得られたGFP標識株を用いて、各チューブリンアイソタイプの発現時期・発現組織・細胞内局在を高分解能スピニングディスク型共焦点顕微鏡によって解析した。



CRISPR/Cas9法によるゲノム編集 (Dickinson et al, Genetics, 2015)

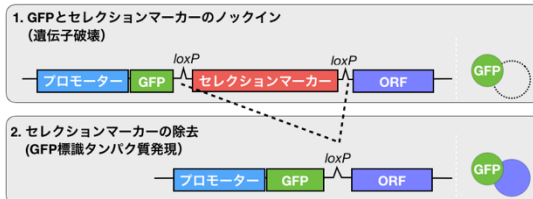


図2. CRISPR/Cas9法によるC. elegansチューブリンアイソタイプの網羅的解析

(2) 線虫チューブリンアイソタイプ間の互換性解析による『マルチ-チューブリン仮説』の検証

① 同一組織で発現しているチューブリンアイソタイプが形成する微小管の特徴の解析

これまでの解析から、α-チューブリンアイソタイプ TBA-1 と TBA-2、β-チューブリンアイソタイプ TBB-1 と TBB-2 は初期胚で発現

していることが明らかになっている。

TBB-1 と TBB-2 の特性の違いを解析するために、TBB-1 の ORF 領域が TBB-2 をコードするように 14 箇所の点変異を CRISPR/Cas9 法により導入した。逆に TBB-2 の ORF 領域が TBB-1 をコードするように 14 箇所の点変異導入した株も作製した。これらの株を用いて、紡錘体の挙動、および、GFP::EBP-2 (微小管プラス端マーカー) のトラッキングを用いて微小管動態の解析を行った。

② 異所発現によるチューブリンアイソタイプの機能特異性の検討

特定の神経特異的に発現しているチューブリンアイソタイプ (TBB-4, MEC-7) を、初期胚で強制発現するためのトランスジーンを miniMos 法でゲノムの特定の部位に挿入した。コントロールとして、初期胚で発現している TBB-1, TBB-2 も同様のトランスジーンを作製しゲノムに挿入した。各株における微小管動態を GFP::EBP-2 のトラッキングを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 線虫 α -、 β -チューブリンアイソタイプの網羅的な発現・機能解析

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、 α -チューブリンアイソタイプ 9 種、 β -チューブリンアイソタイプ 6 種すべての遺伝子破壊株・GFP 標識株を作製した。

GFP 標識株を用いて各チューブリンアイソタイプの発現時期・発現組織・細胞内局在を高分解能スピニングディスク型共焦点顕微鏡によって解析した結果、ユニバーサルかつ大量に発現しているアイソタイプ (TBA-1, TBA-2, TBB-1, TBB-2) と、組織・細胞種特異的に少量発現しているアイソタイプが存在することが明らかになった。とくに、TBA-5, TBA-6, TBA-9, TBB-4 は繊毛神経細胞のサブセットに特異的に発現していた。TBA-5, TBA-6, TBA-9 の 3 種の α -チューブリンアイソタイプを発現している繊毛神経細胞には重なりはなく (図 3)、各アイソタイプの組織特異性は厳密に区別されていることが示された。

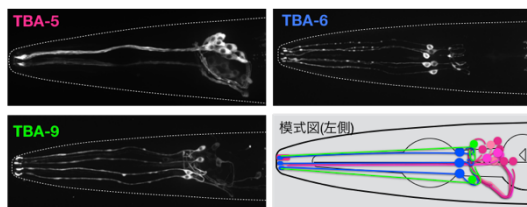


図3. 神経サブグループ特異的に発現する α -チューブリンアイソタイプ

遺伝子破壊株が致死性を示したのは TBA-2 変異のみであった。神経特異的に発現しているアイソタイプの一部は、行動異常などの表現型が観察された。

これらの結果から、それぞれの細胞は、ユニバーサルかつ大量に発現しているアイソタイプと、少量発現している組織・細胞種特

異的アイソタイプを含んでおり、それらが協調的に微小管を形成していると考えられる。以上より、発現しているチューブリンアイソタイプの組成の違いが細胞種特異的な微小管動態の多様性に寄与しているという仮説を提唱した。

(2) 線虫チューブリンアイソタイプ間の互換性解析による『マルチ-チューブリン仮説』の検証

① 同一組織で発現しているチューブリンアイソタイプが形成する微小管の特徴の解析

初期胚では TBB-1 と TBB-2 の 2 種類の β -チューブリンアイソタイプが発現している。TBB-1 の ORF に変異を導入して "TBB-2 化" した株、逆に TBB-2 の ORF に変異を導入して "TBB-1 化" した株を作製した。それぞれの株では、TBB-2 のみ、あるいは TBB-1 のみが発現していることになる。この株を用いて微小管の伸長速度と安定性を測定した結果、TBB-2 が形成する微小管のほうが顕著に安定性が高いことが示された。

さらに、TBA-1 (α) と TBB-1 (β) が形成する微小管と、TBA-2 (α) と TBB-1 (β) が形成する微小管を比較すると、後者は顕著に伸長速度が遅いことが明らかとなった。したがって、それぞれの $\alpha\beta$ -ヘテロダイマーごとに、微小管動態に及ぼす影響は異なることが示唆された。

② 異所発現によるチューブリンアイソタイプの機能特異性の検討

ユニバーサルに発現している β -チューブリンアイソタイプ TBB-1 および TBB-2 と、特定の神経細胞に発現しているアイソタイプ TBB-4 および MEC-7 が微小管動態におよぼす影響について、初期胚での異所発現実験によって検証した。このとき、異所発現させた量は、野生型株で通常発現している β -チューブリン総量の 1/10 程度である。

初期胚 (TBB-1 と TBB-2 を発現) で各アイソタイプを異所的に発現させた結果、MEC-7 の発現により安定な微小管が形成されることが示された。また、TBB-4 は紡錘体微小管に取り込まれにくく、プラス末端結合タンパク質 EB1 との相互作用も弱くなる傾向があることが示された。

以上より、組織・細胞種特異的な微小管が付加的に少量 (1/10 程度) 発現するだけで、微

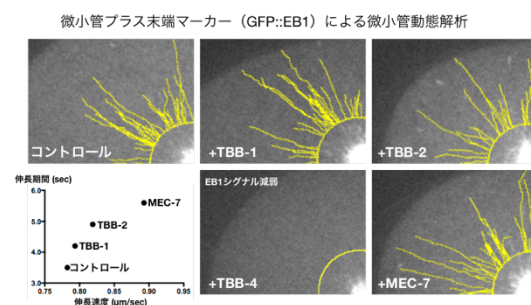


図4. 初期胚における神経特異的なチューブリンアイソタイプ強制発現による微小管動態の変化

小管動態に顕著な影響を与えうることが示された。

本研究の結果から、以下のようなモデルを提唱する(図5)。チューブリンアイソタイプにはユニバーサルに発現しているものと、組織・細胞種特異的に発現しているものがあり、それぞれの細胞種ごとに異なるチューブリンアイソタイプ組成を持っている。初期胚ではユニバーサル型のみ発現しているが、細胞分化により付加的に細胞種特異的アイソタイプが発現され、細胞種固有のアイソタイプ組成を持つようになる。その組成によって、細胞種ごとの微小管動態が作り出される。以上より、40年前に提唱された「マルチチューブリン仮説」が妥当であることが *in vivo* ではじめて証明された。

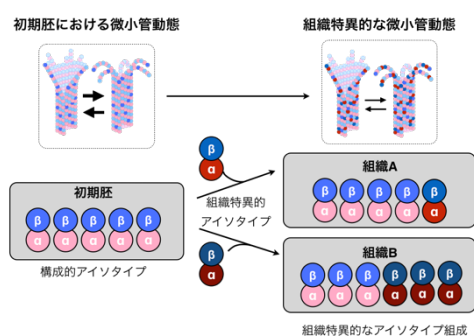


図5. 固有のチューブリンアイソタイプ組成により組織特異的な微小管動態が作り出される

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1件)

① Honda, Y., Tsuchiya, K., Sumiyoshi, E., Haruta, N. & Sugimoto, A. Tubulin isotype substitution revealed that isotype combination modulates microtubule dynamics in *C. elegans* embryos. *J. Cell Sci.* 130, 1652–1661 (2017).

[学会発表] (計13件)

① Sugimoto, A. Distinct regulatory mechanisms control the first asymmetric cell division of *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*. The 2nd Indian *C. elegans* Meeting (2018).

② Sasaki, D., Namai, S., & Sugimoto, A. Comparative analysis of polarity establishment mechanisms in *C. elegans* and *P. pacificus* zygotes. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (CnBio2017) (2017).

③ 小日向 寛之、土屋 賢汰、本多 優、杉本 亜砂子. 線虫 *C. elegans* におけるチューブリンアイソタイプの微小管機能多様性への寄与. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (CnBio2017) (2017).

④ Tsuchiya, K., Honda, Y., Obinata, H., & Sugimoto, A. Contribution of tubulin isotypes to diverse microtubule dynamics and function in vivo. 21st International *C. elegans* Meeting (2017).

⑤ Tsuchiya, K., Honda, Y., Obinata, H., & Sugimoto, A. Contribution of tubulin isotypes to diverse microtubule dynamics in vivo. 第69回日本細胞生物学会大会 (2017).

⑥ 小日向 寛之、土屋 賢汰、本多 優、杉本 亜砂子. 線虫 *C. elegans* におけるチューブリンアイソタイプの発現パターンおよび機能の網羅的解析. 第69回日本細胞生物学会大会 (2017).

⑦ Tsuchiya, K., Honda, Y., Obinata, H., & Sugimoto, A. Contribution of tubulin isotypes to diverse microtubule dynamics in vivo. International Symposium on Neural Precursor Cell Fate Determination, Differentiation and Neuronal Circuit Formation (2017).

⑧ 狩野 ひかる、春田 奈美、杉本 亜砂子. CRISPR/Cas9 システムを用いた線虫 *C. elegans* 中心体タンパク質 SPD-5 の *in vivo* ドメイン解析. 第39回日本分子生物学会 (2016).

⑨ Namai, S., & Sugimoto, A. Distinct microtubule behaviors in zygotes of *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. Evolutionary Biology of *Caenorhabditis* and other nematodes. (2016).

⑩ 土屋 賢汰、本多 優、杉本 亜砂子. 線虫 *C. elegans* におけるチューブリンアイソタイプの発現パターンおよび機能の網羅的解析. 第68回日本細胞生物学会 (2016).

⑪ Sugimoto, A. Distinct contribution of different tubulin isotypes to microtubule dynamics. 第54回日本生物物理学会年会 (2016).

⑫ Honda, Y., Sumiyoshi, E. & Sugimoto, A. Distinct contribution of different tubulin isotypes to microtubule dynamics. 19th International *C. elegans* Meeting (2015).

⑬ 本多 優、住吉 英輔、杉本 亜砂子. チューブリンアイソタイプの違いがひきおこす微小管ダイナミクスの多様性. 第67回日本細胞生物学会大会 (2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 亜砂子 (SUGIMOTO, Asako)
東北大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号: 80281715

(2) 連携研究者

久保田 幸彦 (KUBOTA, Yukihiro)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：70333325

(3) 研究協力者

春田 奈美 (HARUTA, Nami)
東北大学・大学院生命科学研究科・博士研究員

(4) 研究協力者

本多 優 (HONDA, Yu)
東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生

(5) 研究協力者

土屋 賢汰 (TSUCHIYA, Kenta)
東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生

(6) 研究協力者

小日向 寛之 (OBINATA, Hiroyuki)
東北大学・大学院生命科学研究科・大学院生