

令和元年6月14日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07334

研究課題名(和文) 構成因子間の相互作用を介した γ -チューブリン複合体の微小管形成能獲得メカニズム研究課題名(英文) The roles of the component proteins in the assembly and the recruitment of γ -tubulin complex in *C. elegans*

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： γ -チューブリン複合体(TuC)は、微小管の形成鋳型として働く。TuCの微小管形成中心への局在化と微小管形成能の獲得メカニズムを明らかにするために、線虫*C. elegans*の新規のTuC構成因子であるGTAP-1、GTAP-2および少タンパク質MOZART1の役割を調べた。その結果、MOZART1と複合体コア因子GIP-1のN末端との結合が、TuCの中心体局在化に必須であった。GTAP-1とGTAP-2は、線虫初期胚の中心体への局在化に関与するが、生殖腺膜上への局在化にはGTAP-1のみが必要であり、個々の因子が細胞の種類及び時期特異的に使い分けられていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、 γ -チューブリン複合体(TuC)構成因子間で明確な役割の差があり、微小管の形成する場所によって必要性も異なることがわかった。これは、細胞の種類と時期特異的にTuC複合体の構成とその制御機構が異なることを強く示唆する結果であり、線虫のみならず、動物における組織特異的なTuCによる微小管形成制御の分子基盤の理解にもつながる成果である。

研究成果の概要(英文)：The γ -tubulin complex (TuC) is a widely conserved microtubule (MT) nucleator, which serves as a template for MTs. To understand the molecular mechanism of the assembly and recruitment of TuC, we characterized several components of TuC; MOZART1, GTAP-1 and -2. We demonstrated that the interaction between MOZART1 and N-terminus of GIP-1 is essential for the centrosomal recruitment of TuC, while GTAP-1 and GTAP-2 are not essential but required for efficient recruitment of TuC. Moreover, GTAP-1 plays a crucial role in germline through controlling the localization of γ -tubulin onto gonad membrane, although GTAP-2 is dispensable. These data strongly indicated that the components of TuC are likely changed, depending on the cell cycles and types.

研究分野：細胞生物学

キーワード： γ -チューブリン複合体 *C. elegans* 微小管

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微小管の細胞内のネットワーク構造は、細胞周期に依存して大きく変化する。 γ -チューブリン複合体は、微小管の末端に結合し、形成鋳型として微小管の形成を促進する。そのため、 γ -チューブリン複合体の局在化および活性化のメカニズムを理解することは、微小管ネットワークの形成と動態を知る上で非常に重要である。

γ -チューブリン複合体には、 γ -チューブリンおよびGCP2とGCP3の3つの構成因子からなるY字型の γ TuSC (γ -Tubulin small complex)と、複数の γ TuSCが会合して環状構造をとる γ TuRC (γ -Tubulin ring complex)の2つの複合体が知られている。より微小管の重合活性が高い γ TuRCには、 γ TuSCの構成因子とともに γ TuRC特異的因子と呼ばれる複数の構成因子が含まれるが、これらの構成因子の役割は定かではなかった。

線虫の γ -チューブリン複合体の構成因子は、 γ TuSCの構成因子である γ -チューブリンおよびGIP-1/GCP3とGIP-2/GCP2の3つしか分かっていなかった。研究開始当初、我々は、 γ -チューブリンとの免疫沈降物の解析から、新規の構成因子としてGTAP-1, 2を同定していた。さらに小タンパク質であるMOZART1の線虫オルソログも同定し、 γ -チューブリン複合体のコアサブユニットの一つであるGIP-1/GCP3のN末端に結合し、 γ TuSCの複合体が安定化することを見出していた。

2. 研究の目的

MOZART1および γ -チューブリン複合体の新規構成因子GTAP-1, GTAP-2の γ -チューブリン複合体の微小管形成中心への局在化および活性化における役割を明らかにすることで、 γ -チューブリン複合体の会合から微小管形成能の獲得までの一連の制御メカニズムを統合的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) γ -チューブリン複合体の各構成因子の細胞内挙動を調べるために、蛍光タンパク質でタンパク質をラベルした発現線虫株および変異体株を CRISPR-Cas9 法や miniMos 法で作成し、共焦点顕微鏡を用いた 4D ライブイメージングによる解析を行った。

(2) 酵母ツーハイブリッド法を改良して、三者および四者の γ -チューブリン複合体構成因子存在下での構成因子間の相互作用を調べ、 γ -チューブリン複合体の構成について検討した。

4. 研究成果

(1) γ -チューブリン複合体の中心体局在化には、GIP-1/GCP3 の N 末端領域と MOZART1 の相互作用が必要である。

小タンパク質 MOZART1 と GIP-1/GCP3 の N 末端との相互作用が γ -チューブリン複合体の制御に関与するかどうかを調べるために、まず、MOZART1 が結合できない N 末端欠損 GIP-1 変異体 (GIP-1 Δ N) を発現する線虫株を作成し、*in vivo* での挙動を解析した。GIP-1 Δ N 変異体は、野生型 GIP-1 存在下では、中心体へリクルートされたが、野生型 GIP-1 を RNAi でノックダウンすると、局在できなくなった。つまり、GIP-1 Δ N でも他の構成因子と相互作用して、 γ -チューブリン複合体に取り込まれることは可能だが、GIP-1 の N 末端領域と MOZART1 との相互作用が、中心体への局在化には必須であることを示唆している。

次に、GIP-1/GCP3 の各ドメインと MOZART1 を融合させたタンパク質を線虫胚で網羅的に発現する系を確立し、内在性 GIP-1/GCP3 の存在下および非存在下での局在を解析した。その結果、GIP-1/GCP3 の N 末端領域と MOZART1 の融合タンパク質は、内在性 GIP-1/GCP3 非存在下でも中心体 PCM にリクルートされることが分かった。この結果は、 γ -チューブリン複合体の中心体へのリクルートには、GIP-1/GCP3 の N 末端領域と MOZART1 の相互作用が必要十分な条件であることを意味する。(図 1)

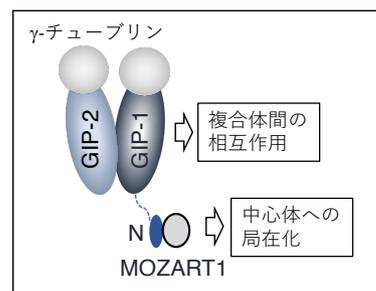


図1. GIP-1N-MOZART1の相互作用が中心体局在化に必要十分である。

(2) γ -チューブリン複合体因子間の相互作用ネットワークの解明。

酵母ツーハイブリッド法を改良することで、複数の構成因子存在下で、 γ -チューブリン複合体の構成因子間の相互作用について調べた。その結果、GTAP-1は、 γ -チューブリン存在下で γ -チューブリン複合体のコア因子であるGIP-2/GCP-2とそれぞれ結合することが分かった。GTAP-2およびGIP-1/GCP3もGIP-2/GCP-2と結合することから、これらの因子間での関係性を調べた。GTAP-2とGIP-1/GCP3は、GIP-2/GCP-2の同じ領域で相互作用するのに対し、GTAP-1は、GTAP-2やGIP-1/GCP3とは、GIP-2/GCP-2の異なる領域で結合していることが示唆された。

(3) 生殖腺膜上の γ -チューブリン複合体の局在化にはGTAP-1が関与する。

個体発生および器官形成における γ -チューブリン複合体に局在化と微小管形成を調べるために、 γ -チューブリン、MOZART1およびgtap-1およびgtap-2のヌル変異体をCRISPR-Cas9法で作成した。 γ -チューブリンおよびMOZART1の変異体は、ホモでは生存することができず、ヘテロの親から生まれたホモ接合体は、不稔性を示すことから、生存に必須である。

一方、gtap-1およびgtap-2のヌル変異体はホモで生存することが可能であるため、 γ -チューブリンやMOZART1に比べて必須性が低いことが示唆された。しかし、gtap-1変異体では、野生型に比べ産卵数が著しく減少し、卵の大きさのパラツキが顕著であった。そこで生殖腺を免疫染色し、共焦点顕微鏡観察したところ生殖腺系列の膜状に局在する γ -チューブリンの局在量が低下し、生殖腺膜の形成、微小管の配向および核の配置のいずれも異常な形態を示していた(図2)。このことから、GTAP-1が、生殖腺膜上への γ -チューブリン局在において重要な役割を果たしていることが分かった。しかし、gtap-2変異体では、生殖腺への影響はほとんどみられなかった。

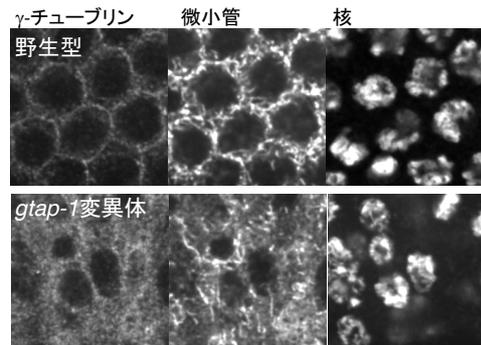


図2. gtap-1変異体は、生殖腺細胞膜上で γ -チューブリンの局在、微小管形成と配向、核の配置のいずれにも異常を示す。

これらの結果は、GTAP-1とGTAP-2には明確な役割の差があることを意味する。初期胚における γ -チューブリン複合体の中心体局在化には、GTAP-1とGTAP-2は同程度に γ -チューブリン複合体の局在化に関与する一方、生殖腺ではGTAP-1のみが γ -チューブリン複合体の微小管形成中心への局在化に必要である。これは、 γ TuRC特異的因子が微小管形成中心の場所によって使い分けられている可能性を強く示唆しており、 γ TuRC特異的因子の個々の役割が、組織特異的な微小管動態制御と密接に関与していることを意味する。この結果は、線虫のみならず、動物における組織特異的な γ -チューブリン複合体による微小管形成制御の分子基盤の理解にもつながる成果である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

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) 査読有り

[学会発表] (計16件)

- ① 中條 桃江、狩野 ひかる、春田 奈美、杉本 亜砂子 中心体形成に必要な *C. elegans* SPD-5 の *in vivo* ドメイン解析 第41回日本分子生物学会年会 (2018)
- ② 西田 桂、土屋 賢汰、小日向 寛之、小野寺 静、春田 奈美、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41回日本分子生物学会年会 (2018)
- ③ 春田 奈美、内山 智尋、杉本 亜砂子 線虫 *C. elegans* の卵形成における γ -チューブリン複合体構成因子の役割 *C. elegans* γ -tubulin ring complex-specific component is required for embryogenesis 日本遺伝学会第90回大会 (2018)

- ④ 春田奈美 遺伝子導入法・遺伝子編集法の進展：どのようにカスタマイズするか？ 線虫研究の未来を創る会 (2018)
- ⑤ Momoe Nakajo, Hikaru Kano, Nami Haruta and Asako Sugimoto Domain analysis of SPD-5 that is required for centrosome assembly in *C. elegans* 線虫研究の未来を創る会 (2018)
- ⑥ Kei Nishida, Kenta Tsuchiya, Yu Honda, Hiroyuki Obinata, Shizuka Onodera, Nami Haruta and Asako Sugimoto Analyzing the contribution of tubulin isotypes to the diversity in microtubules 線虫研究の未来を創る会 (2018)
- ⑦ Shunta Fukai, Chihiro Yoshii, Shinsuke Uchiya, Eisuke Sumiyoshi, Masashiro Terasawa, Nami Haruta and Asako Sugimoto How SAS-7 Contributes to Centriolar Protein Network 線虫研究の未来を創る会 (2018)
- ⑧ 春田奈美・生井聡史・津山研二・杉本亜砂子* (東北大学・生命科学研究科) *Caenorhabditis elegans* の近縁種における遺伝子操作法の開発 日本線虫学会 第26回大会 (2018)
- ⑨ Nami Haruta, Chihiro Uchiyama and Asako Sugimoto Gamma-tubulin ring complex-specific components are required for nuclear positioning in the *C. elegans* gonad 第70回日本細胞生物学会 (2018)
- ⑩ 春田奈美、本多優、住吉英輔、寺澤匡博、杉本亜砂子 Assembly and regulation of γ -tubulin complex in *C. elegans*, 生命科学系合同年次大会 第40会日本分子生物学会年会 (2017)
- ⑪ 春田奈美、本多優、住吉英輔、寺澤匡博、杉本亜砂子 Generality and specificity of γ -tubulin complex in *C. elegans* 日本遺伝学会 第89回大会(2017)
- ⑫ 春田奈美、吉井千尋、内谷進介、住吉英輔、寺澤匡博、杉本亜砂子 線虫 *C. elegans* SAS-7は、中心小体複製と間期PCMの形成に関与する 第69回日本細胞生物学会 (2017)
- ⑬ 春田奈美、吉井千尋、内谷進介、住吉英輔、寺澤匡博、杉本亜砂子 線虫 *C. elegans* の新規中心小体タンパク質 GTAP-3/SAS-7の局在と機能 第39会日本分子生物学会年会 (2016)
- ⑭ 狩野ひかる、津山研二、春田奈美、杉本亜砂子 CRISPR-Cas9システムを用いた線虫 *C. elegans* 中心小体タンパク質 SPD-5の in vivoドメイン解析 第39会日本分子生物学会年会 (2016)
- ⑮ Haruta, N., Chihiro Yoshii, Shinsuke Uchiya, Eisuke Sumiyoshi, Masahiro Terasawa, Asako Sugimoto, *C. elegans* GTAP-3 plays a critical role at the late step of centriole assembly by recruiting γ -tubulin to centrioles. The 28th CDB Meeting, (2016)
- ⑯ 春田奈美、内谷進介、吉井千尋、住吉英輔、寺澤匡博、杉本亜砂子 GTAP-3 plays a crucial role in centriole duplication in *C. elegans* 日本生化学会第89回大会 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：杉本 亜砂子

ローマ字氏名：(SUGIMOTO Asako)

研究協力者氏名：内山 智尋

ローマ字氏名：(UCHIYAMA Chihiro)

研究協力者氏名：中條 桃江

ローマ字氏名：(NAKAJO Momoe)

研究協力者氏名：斎藤 緩賀咲

ローマ字氏名：(SAITO Yuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。