

微小管内構造の動的変化と生理機能の解析

タンパク質の構造変化と生理機能（課題番号：167103）

研究期間：平成28年7月27日－平成31年3月31日

研究代表者：香月美穂

研究者：福田将虎

研究成果

背景と目的

真核生物の細胞骨格の一種である微小管は直径約25 nm の円筒状の繊維で、チューブリンと呼ばれるタンパク質が重合して作られる。チューブリンは、 α/β チューブリンからなるヘテロダイマーで、そのアミノ酸配列はよく保存されており酵母からヒトまで高い相同性を示す。微小管は、細胞周期にともない重合と脱重合を繰り返すダイナミックな性質をもつ。また、微小管のダイナミクスは温度にも著しく影響を受けることが分かっている（温度感受性）。例えば、哺乳類の微小管は37℃では重合するが、4℃では完全に脱重合してしまう。

微小管のダイナミクスは、細胞分裂や細胞内輸送など、生理的に非常に重要な役割を果たしている一方、その分子メカニズムはいまだ解明されていない。そこで、本プロジェクトでは、チューブリンタンパク質の構造変化と生理機能を解明するため、人工的に遺伝子改変を導入した様々な変異チューブリンを作成し、その機能を解析した。

まず、チューブリン分子のどの構造が微小管ダイナミクスに関与しているかヒントを得る為、氷点下の南極海環境で生息している魚類と比較的温暖的な環境に生息する生物間の微小管の一次構造（Detrich 3rd, et al., 2000）を比較した。我々は、i). α/β チューブリンの M-loop と呼ばれる微小管中でチューブリン分子が隣り合う領域と、ii). α チューブリン分子内の疎水性の上昇を伴うアミノ酸変異に注目した。

本研究では、発現系由来の内在性チューブリンを厳密に排除する必要がある。そのため、実験には出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）のタンパク質発現系を用いた。酵母は、チューブリン遺伝子が少なく、また哺乳類で見られるような翻訳後修飾が見つからない。し

たがって、単一のアイソフォームからなるチューブリンの発現系が構築可能で、この系から精製されるチューブリンは単一性が極めて高い。このチューブリンを用いることで、変異の効果を感度良く解析できる。

チューブリン変異株の作成

出芽酵母は α チューブリンをコードする遺伝子として *TUB1* と *TUB3* を、 β チューブリンをコードする遺伝子として *TUB2* を持つ。*TUB1* および *TUB2* は必須遺伝子である一方、*TUB3* は必須ではないので、*TUB3* をノックアウトした株を用い様々なチューブリン変異株を作成した。*TUB1* と *TUB2* をそれぞれ異なる栄養要求性を持つプラスミドに組み込み、プラスミドシャッフリングにより（Uchimura et al., 2006）、変異チューブリン遺伝子を導入した。

本研究で使用した酵母株（MNY00, MNY39, MNY49, MNY59）の変異の組み合わせを Table 1 に示す。野生型酵母チューブリンをもつ MNY00 株に、南極海生息の魚類に特有にみられる変異を導入し、MNY39, 49, 59 株の三種類の変異チューブリン株を得た。MNY39, 49, 59 株はいずれも α/β チューブリンの M-loop 領域に変異をもち、MNY49, 59 株では、それに加え、 α チュー

Table 1. 本プロジェクトに使用した変異チューブリン酵母株。M-loop 領域や疎水性アミノ酸に変異を導入した株には○を記した。導入した疎水性アミノ酸はL、ロイシン、F、フェニルアラニンを示している。

strain	M-loop	疎水性の上昇
MNY00		
MNY39	○	
MNY49	○	○(L)
MNY59	○	○(F)

ブリンの疎水性の上昇が伴うアミノ酸置換を導入した (MNY49株ではロイシンへ、59株ではフェニルアラニンへの置換)。

倍加時間

横軸に培養時間、縦軸に細胞数の自然対数をとったグラフに測定結果をプロットし、対数増殖期の点の線形近似直線の傾きから比増殖速度 μ を求めた。倍加時間は次のように算出した。 $td = \ln 2 / \mu \dots$ (式1)

(td : 倍加時間、 μ : 比増殖速度)

MNY00、MNY39、MNY49、MNY59株の倍加時間は、それぞれ 2.87 ± 0.25 時間、 2.57 ± 0.35 時間、 2.07 ± 0.46 時間、 4.80 ± 1.57 時間であった。MNY59株の倍加時間は、MNY00株と比較すると、約1.7倍と著しく長かったけれども、t検定では3回の測定結果のばらつきが大きく、これらの値に有意差があるとは言えなかった。ただし、ここでは、3回の測定でMNY59株はいずれもMNY00株に対して倍加時間が大きかったことから、定性的には信頼に足る結果であると考えている。他の変異チューブリン株では、倍加時間に大きな違いは見られなかった。

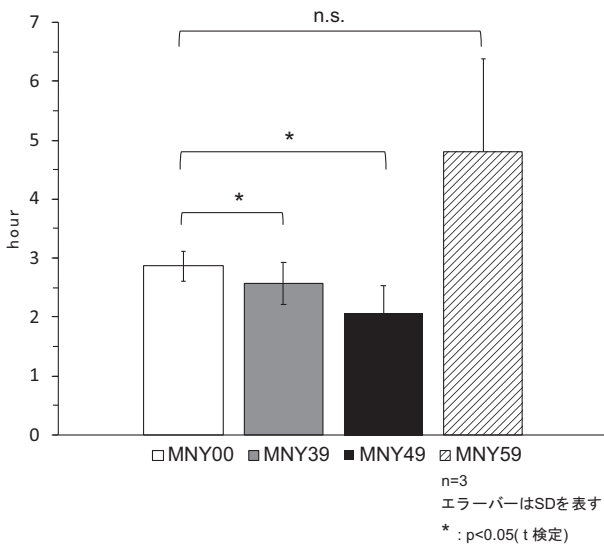


Fig. 1 倍加時間

MNY00、MNY39、MNY49、MNY59の3回測定した倍加時間の平均値はそれぞれ 2.87 ± 0.25 時間、 2.57 ± 0.35 時間、 2.07 ± 0.46 時間、 4.80 ± 1.57 時間であった。

温度感受性

次に、増殖への温度の影響を調べた。対数増殖期の酵母株培養液を様々な希釈系列でYPAD寒天培地プレート上にスポットし、18℃、25℃、30℃、32℃、36℃で3日間培養した (Fig. 2)。

それぞれの酵母株での増殖速度の差を踏まえ、各温度で培養したプレートを比較したところ、MNY39は低温

温度	酵母株	希釈倍率					
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
36℃	MNY00	[Spot image]					
	MNY39	[Spot image]					
	MNY49	[Spot image]					
	MNY59	[Spot image]					
32℃	MNY00	[Spot image]					
	MNY39	[Spot image]					
	MNY49	[Spot image]					
	MNY59	[Spot image]					
30℃ control	MNY00	[Spot image]					
	MNY39	[Spot image]					
	MNY49	[Spot image]					
	MNY59	[Spot image]					
25℃	MNY00	[Spot image]					
	MNY39	[Spot image]					
	MNY49	[Spot image]					
	MNY59	[Spot image]					
18℃	MNY00	[Spot image]					
	MNY39	[Spot image]					
	MNY49	[Spot image]					
	MNY59	[Spot image]					

Fig. 2 低温、高温下での各酵母株の増殖

対数増殖期の各酵母の1、10、10²、10³、10⁴、10⁵倍の希釈系列を作成し、YPADプレートへスポットした。18℃、25℃、30℃(コントロール)、32℃、36℃で3日間培養した。

下 (18℃、25℃)、高温下 (32℃、36℃) のいずれも、30℃で培養した時との生育度合がMNY00と同程度であった。ところが、MNY49は高温下では、MNY00より生育度が高かった。一方、低温の25℃では、MNY00より生育度が低く、18℃では、MNY00よりも生育度が高かった。したがって、低温下でのMNY49の増殖への影響については、今回の実験からは不明である。MNY59は高温、低温下の両方でMNY00よりも生育度が低かった。

以上より、MNY39株は、低温、高温の両方でMNY00株と同様に増殖したことから、 α/β チューブリンのM-loop領域に導入したアミノ酸変異は、酵母の増殖に関して温度依存性に影響しないことがわかった。一方、MNY49株、MNY59株では、少なくとも高温下での増殖に影響を与えたことから、 α チューブリンの疎水性上昇を伴う変異は、温度感受性に何らかの関係があると示唆された。特に α チューブリン中のフェニルアラニンへ

の変異は、重要であるとみられる。

benomyl (ベノミル) 耐性

benomyl は、遊離状態のチューブリン分子に結合して重合を阻害すると考えており、細胞内でおこる生理イベントへの微小管の関与を確認するためによく用いられる薬剤である。benomyl 濃度が 0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプレート上での各酵母株の増殖を比較し、増殖不能になる benomyl 濃度を Fig. 3 に示した。MNY00 株の benomyl 耐性は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対し、MNY39 株、MNY49 株では 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、MNY59 株は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

MNY39、MNY49、MNY59 株のいずれも benomyl 耐性が低下したことは、本実験で導入した微小管への変異が、酵母株の増殖に影響を及ぼしたと示唆している。特に MNY59 株では、benomyl 耐性が MNY00 株の半分しかなく、M-loop への変異に加え、疎水性アミノ酸であるフェニルアラニンへの変異が存在すると、特に benomyl の効果に対して脆弱であることがわかった。benomyl のチューブリン結合部位はこれまでに明らかにされており、これは本実験で導入した部位とは異なる。このことから、単純な benomyl 結合親和性の低下による影響とは考えにくい。

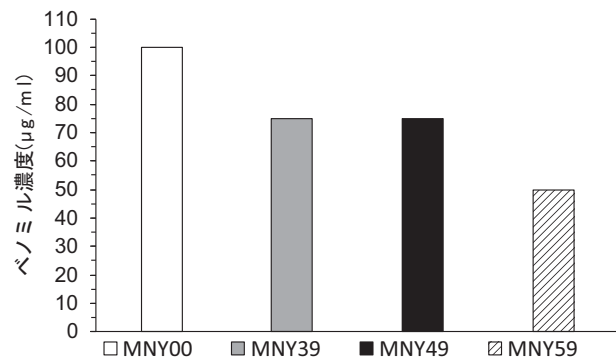


Fig. 3 benomyl 耐性
0、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の benomyl プレート上で 30 $^{\circ}\text{C}$ 、3 日間培養した。各酵母株がコロニーを形成できなくなるベノミル濃度を示した。

細胞の大きさ

対数増殖期の酵母株の大きさを調べた。出芽している細胞は、母細胞の直径を測定した (Fig. 4)。それぞれ、MNY00 株 4.58 \pm 1.02 μm 、MNY39 株 4.46 \pm 0.85 μm 、MNY49 株 5.01 \pm 0.90 μm 、MNY59 株 5.96 \pm 0.83 μm であった。これより、MNY39 株は MNY00 株と細胞の大きさは変わらないが、疎水性アミノ酸への置換を含む MNY49 と MNY59 株の細胞は、約 10%~30% 大きいということがわかった。これらの株では細胞周期のプロセスに変化が起きている可能性が強く示唆される。

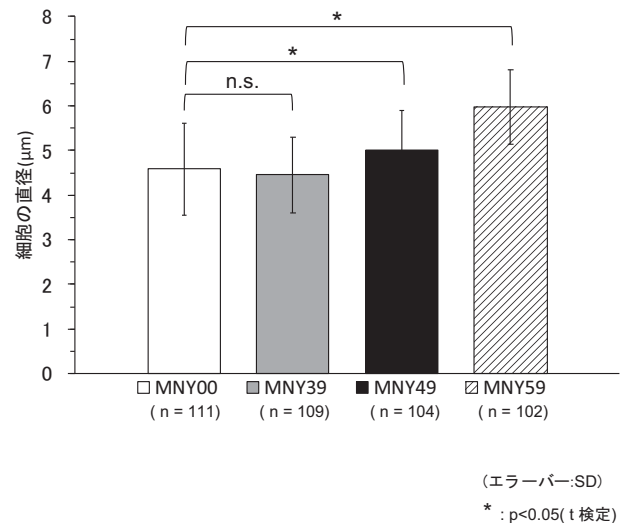


Fig. 4 細胞の大きさ
細胞の直径の平均値は MNY00 株 4.58 \pm 1.02 μm 、MNY39 株 4.46 \pm 0.85 μm 、MNY49 株 5.01 \pm 0.90 μm 、MNY59 株 5.96 \pm 0.83 μm であった。

芽の形態

一般的に出芽酵母の細胞周期には G1 期、DNA 合成期 (S 期)、分裂期 (M 期) はあるが、はっきりとした G2 期はない。また、G1 期では no bud、DNA 合成期 (S 期) では small bud、分裂期 (M 期) では large bud を持つことが多いことが知られている。そこで、これらの酵母株の細胞周期の概要をつかむ為、出芽の状態の分布を調べた。酵母の最も長い径を直径とし、出芽途中の娘細胞が母細胞の直径の半分より大きな芽を「large bud」、小さな芽を「small bud」とし、その割合を解析した。その結果、MNY00 では no bud 72.1%、small bud 2.7%、large bud 25.2% であった。MNY39 では no bud 68.8%、small bud 5.5%、large bud 25.7% であった。MNY49 では no bud 61.5%、small bud 2.9%、large bud 35.6%

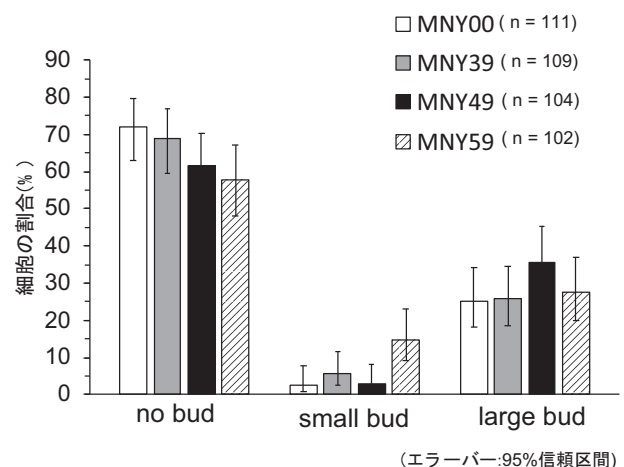


Fig. 5 酵母株の芽の形態分布
酵母の最も長い径を直径とし、娘細胞の直径が母細胞の半分より小さいものを「small bud」、大きいものを「large bud」とした。出芽していないものは「no bud」とした。

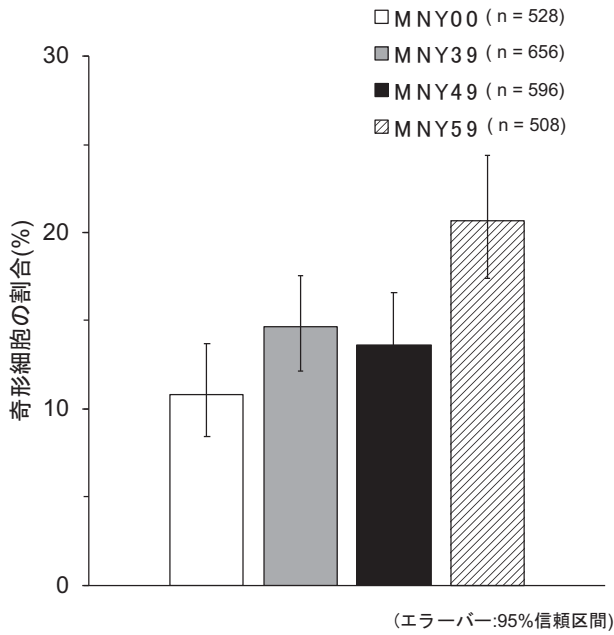


Fig. 6 各酵母株の奇形率
各酵母株の奇形細胞の割合は、MNY00 10.8%、MNY39 14.6%、MNY49 13.6%、MNY59 20.7%であった。

であった。MNY59では no bud57.8%、small bud14.7%、large bud27.5%であった (Fig. 5)。

これより、MNY59株では、他の株に比べ small bud の割合が高く、一方 MNY49株では large bud の割合高いことがわかった。変異酵母株でも同様の表現系を持つと仮定すると、MNY59株はS期には入るものの、核の娘細胞への移動などに問題があり、M期への進行に問

題が生じているのかもしれない。また、MNY49株では、large bud を持つ細胞が多く、スピンドルの伸長には問題はないと考えられるが、細胞の分離に遅延が生じている可能性がある。

その上、MNY59株では、奇形の細胞の割合が高かった。各酵母株の奇形細胞の割合は、MNY0010.8%、MNY3914.6%、MNY4913.6%、MNY5920.7%であった (Fig. 6)。奇形細胞には複数箇所から出芽し、母細胞と娘細胞がくびり切られていないものや、芽が球状ではないオタマジヤクシ様の細胞が多く見られた (Fig. 7)。これらの芽の形態分布の変化や、奇形のメカニズムの解明には、直接微小管や核の局在の情報を得ることが必須となる。

Summary

今回の実験で、M-loop 領域のアミノ酸変異のみを持つ MNY39株では、大きな表現型の変化は見られなかった。一方で、 α チューブリン内部の疎水性アミノ酸であるフェニルアラニンへの変異をもつ MNY59株では、温度感受性の変化、benomyl 耐性、細胞の大きさ、細胞の形態に大きな差が見られた。また、娘細胞である芽の大きさの分布から、細胞周期のプロセスの異常が示唆された。これまで M-loop 領域は、分子の表面に存在し、隣接するチューブリン分子に面しているため、重合、脱重合などの微小管ダイナミクスに重要な役割を果たしていると考えられていた。しかしながら、今回の実験によ

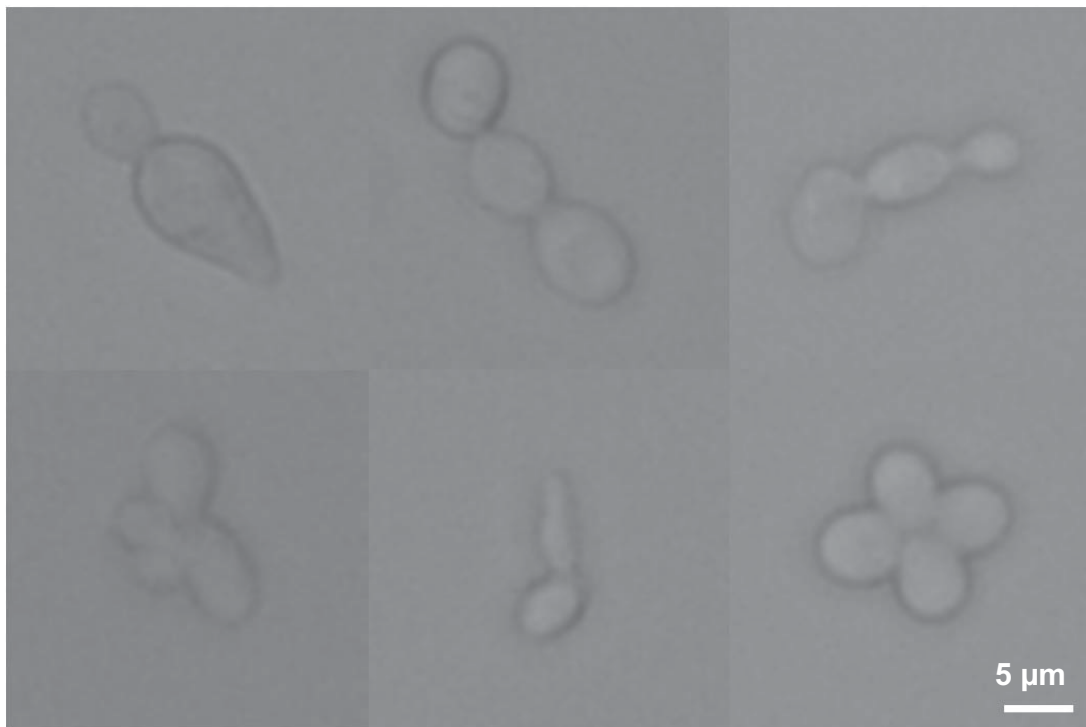


Fig. 7 MNY59株でみられた奇形酵母細胞
スケールバーは 5 μ m。

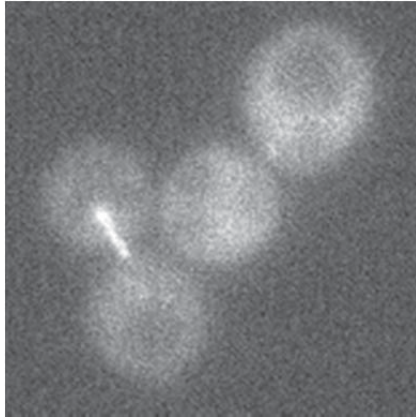


Fig. 8 G2期とみられる分裂中のGFP変異チューブリン酵母。スピンドル微小管が形成されている(左)。

り、この領域はあまり大きな影響を示さないことが明らかになった。そして、我々は新たに微小管ダイナミクスの鍵となる候補サイトを発見することが出来た。今後は、より明確にどの構造が重要なのかを同定するため、さらに変異チューブリン酵母株の作成を続けるとともに、細胞内での微小管の動態観察、そして精製した変異チューブリンを用いた *in vitro* での微小管ダイナミクス再構成系での詳細なパラメーターの解析へと発展させる。GFP融合チューブリンを発現させる酵母株も既に作成済みである (Fig. 8)。

参考文献

- Detrich HW 3rd, Parker SK, Williams RC Jr, Nogales E, Downing KH.: Cold Adaptation of Microtubule Assembly and Dynamics. *J Biol Chem* 275(47), 37038, 2000
- Uchimura S, Oguchi Y, Katsuki M, Usui T, Osada H, Nikawa J, Ishiwata S, Muto E.: Identification of a strong binding site for kinesin on the microtubule using mutant analysis of tubulin. *EMBO J.* 13; 25(24): 5932, 2006

研究業績

- 福田 将虎 : RNA 修飾機構を利用した RNA 編集技術の開発 : 実験医学2018年12月号, 羊土社, 2018
- 野瀬可那子、福田将虎 : RNA 情報を編集する新たな遺伝子改変・制御技術実験医学2018年5月号, Next Tech Review, 羊土社, 2018
- Okuma K., Oba A., Kuramoto R., Iwashita H., Nagahora N., Shioji K., Noguchi R., Fukuda M.: Synthesis and Fluorescence Property of 1,1-Dimethyl-1,4-Dihydrodibenzo [b,h] [1,6] naphthyridinium Iodides: Turn-on Type Detection of DNA. *Eur. J. Org. Chem.* 6885, doi: 10.1002/ejoc.201701277, 2017
- von Loeffelholz O, Venables NA, Drummond DR, Kat-

suki M, Cross R, Moores CA.: Nucleotide- and Mal3-dependent changes in fission yeast microtubules suggest a structural plasticity view of dynamics. *Nature communications*, 8: 2110, 2017

Fukuda M, Umeno H, Nose K, Nishitarumizu A, Noguchi R, Nakagawa H.: Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. *Scientific reports*, 7: 41478, 2017

香月美穂 : 微小管中の seam (継ぎ目) は脱重合を引き起こす。生物物理, 56 : 230-1, 2016