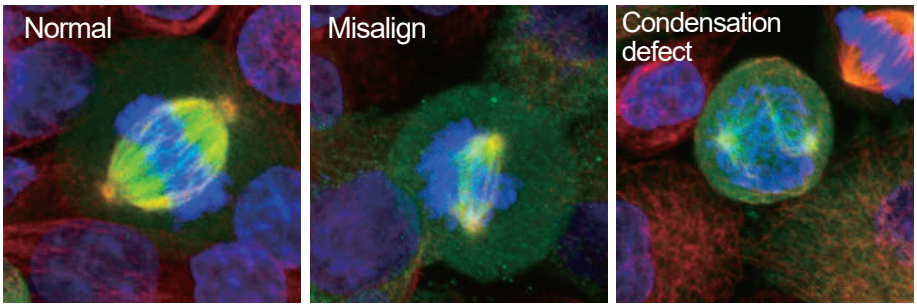
20　新規チューブリン翻訳後修飾Δ3化による紡錘体制御	池上　浩司

【目的】細胞分裂では微小管からなる紡錘体が染色体を正確に娘細胞に分配する。微小管はαチューブリンとβチューブリンで構成されるチューブリン二量体が管状に数珠つなぎになることで形成される。微小管を構成するチューブリンは多数のユニークな翻訳後修飾を受ける。その中にαチューブリンのカルボキシ末端のチロシンが切断除去される脱チロシン化、さらに次のグルタミン酸が切断除去されるΔ2化がある。我々は以前、Δ2化されたチューブリンからさらに次のグルタミン酸が切断除去されるΔ3化を発見同定した。本研究は、この新規の翻訳後修飾Δ3化が微小管、特に細胞分裂時の紡錘体微小管に与える影響を検証することを目的として行われた。

【方法】αチューブリンΔ3化の影響を検証するために、膵癌細胞株PANC-1細胞に対してΔ3化したαチューブリンを導入した。対照として未修飾状態のαチューブリンを導入したPANC-1細胞を用意した。導入方法は一過性の過剰発現と、ゲノム編集技術を用いてゲノム上のαチューブリン遺伝子座にノックインする方法の2種類を用いた。Δ3α化チューブリンを発現させたPANC-1細胞、未修飾αチューブリンを発現させたPANC-1細胞の紡錘体の形態を解析し、紡錘体に対するαチューブリンΔ3化の影響を検証した。さらに、Δ3化αチューブリン、未修飾αチューブリンをノックインしたPANC-1細胞を培養し、1日毎の細胞数を計測し、細胞の分裂能に対するαチューブリンΔ3化の影響を検証した。また、Δ3化αチューブリン、未修飾αチューブリンをノックインしたPANC-1細胞の核の大きさを定量解析し、染色体分配に対するαチューブリンΔ3化の影響を検証した。

【結果】一過性過剰発現、ノックインによる安定恒常発現いずれにおいても、Δ3化αチューブリンの発現により、PANC-1細胞において異常な形態を示す紡錘体の発生頻度が上昇した。さらに、Δ3化αチューブリンのノックイン安定恒常発現により、PANC-1細胞の分裂増殖が減少した。紡錘体の形態異常発生頻度の増加に合致して、Δ3化αチューブリンのノックイン安定恒常発現によりPANC-1細胞において核の肥大化が観察された。以上のことから、αチューブリンのΔ3化は紡錘体の構造を不安定化し、染色体の分配異常、それらに起因する細胞分裂の異常による細胞増殖の低下を引き起こすことが示唆された。

Δ3化αチューブリンの発現による紡錘体の形態不安定化



20. 新規チューブリン翻訳後修飾Δ3化による紡錘体制御

池上　浩司

広島大学 大学院医系科学研究科 解剖学及び発生生物学

Key words：細胞分裂，紡錘体，微小管，チューブリン，翻訳後修飾

緒　言

細胞分裂時に形成される紡錘体は染色体を正確に分離分配するために必須の構造である。紡錘体の形態異常や機能障害は染色体分配に問題を引き起こし癌や様々なヒト疾患の原因となったり、細胞分裂の失敗を招き細胞死を引き起こしたりする。紡錘体の大部分は微小管から構成されている。

微小管はαチューブリンとβチューブリンの二量体が重合して作られており、動的不安定性と呼ばれる重合と脱重合の平衡状態を特徴とする。微小管の過度の不安定化や安定化はともに微小管機能を阻害する。微小管を構成するチューブリンは数多くの翻訳後修飾を受け、それらの多くは微小管の動的不安定性と強い関連を持つ［1］。翻訳後修飾の多くは、微小管表面に露出しているチューブリンのカルボキシ末端に集中する［1］。αチューブリンのカルボキシ末端のチロシンは可逆的に切断除去され、脱チロシン化αチューブリンとなる。脱チロシンαチューブリンは更に次のグルタミン酸が不可逆的に切断除去されΔ2化αチューブリンとなる。Δ2化αチューブリンは神経細胞や繊毛鞭毛など特に安定化された微小管で強く検出される［1］。

我々は近年Δ2化αチューブリンが酵素によりさらに次のグルタミン酸が切断除去され、Δ3化αチューブリンになることを発見報告した［2］。Δ3化αチューブリンもΔ2化αチューブリンと同様に神経細胞など強く安定化された微小管で検出される［3］。しかしながら、現在までΔ3化αチューブリンが微小管に与える影響は不明である。本研究では、特に制御された動的不安定性が重要な紡錘体に対するαチューブリンのΔ3化の影響を検証した。

方　法

1. 細胞培養と遺伝子導入

ヒト膵臓がん PANC-1 細胞株は、理研バイオリソース細胞バンクから購入し、10%ウシ胎児血清（FBS）を添加した RPMI-1640 を用い、37℃ 5%CO_2の条件下で培養した。細胞の増殖は 60-mm 培養ディッシュに 7,000 細胞/cm^2の密度で細胞を播種し、48 時間後と 96 時間後に培養皿からトリプシン-EDTA 溶液で細胞を全て剥がし取り血球計算盤で実際の細胞数を計測して定量した。遺伝子導入にはポリエチレンイミン（PEI）を用い、PEI とプラスミド DNA の重量比を 3：1 に調製して細胞に投与した。

2. 安定恒常発現細胞株の作製

ヒトαチューブリン 1B (TUBA1B) の 5'-UTR に緑色蛍光タンパク質融合αチューブリン (EGFP-αチューブリン) あるいは同融合Δ3 化αチューブリン（EGFP-Δ3 化αチューブリン）をノックインした安定恒常発現細胞株は CRISPR-Cas9、gRNA、ドナーベクターを用いて樹立した［4］(図 1)。TUBA1B の 5'-UTR をターゲットとする PAM 配列付き gRNA 標的配列（CCTCGACTCTTAGCTTGTCGGGG）は Broad Institutes GPP sgRNA Designer で選択した。20-bp の標的配列を CMV-Cas9-2A-GFP プラスミドにサブクローニングし、PANC-1 細胞にドナーベクターとともに導入し、1.5 mg/mL の G418 で EGFP 融合チューブリン配列がノックインされた細胞を選択した後、フローサイトメーターを用いて蛍光強度が一定以上の細胞を分取した。

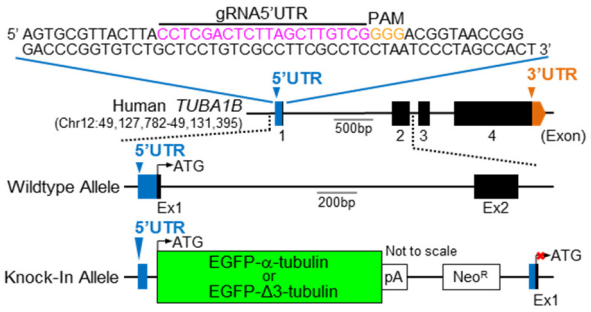


図 1. 安定恒常発現細胞株樹立に使用された TUBA1B 5'-UTR の gRNA 配列
EGFP-αチューブリンおよび EGFP-Δ3 化αチューブリンの安定恒常発現細胞株の樹立に用いられたヒト TUBA1B の 5'-UTR を標的とした gRNA 配列とノックイン後の TUBA1B 遺伝子座の構造を示す。

3. 免疫蛍光染色および顕微鏡撮影

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 37℃で 20 分間固定した。0.1% Triton X-100 を含む 5%正常ヤギ血清を用いて、室温で 1 時間ブロッキングおよび細胞膜透過処理を行った。次に、ブロッキング液で希釈した一次抗体で 4℃で一晩インキュベートし、Alexa Fluor 標識二次抗体および DAPI (1μg/ml) で 1 時間染色した。サンプルを VECTASHIELD でスライドガラスにマウントした。蛍光画像は 60 倍（NA 1.35）の油浸対物レンズを装着したレーザー走査型共焦点顕微鏡（FV1000-D、オリンパス）を用いて得た。GFP 陽性細胞および DAPI 染色核は ImageJ のツールを用いてカウントした。蛍光強度は ImageJ の“Oval”ツールを用いて測定した。核の面積は ImageJ の「analytics particles」ツールを用いて測定した。GFP 強度は 1 つの細胞につき細胞質内の 3 つの領域で測定した。細胞質の平均 GFP 強度≧120 の細胞を GFP 陽性群に分類した。

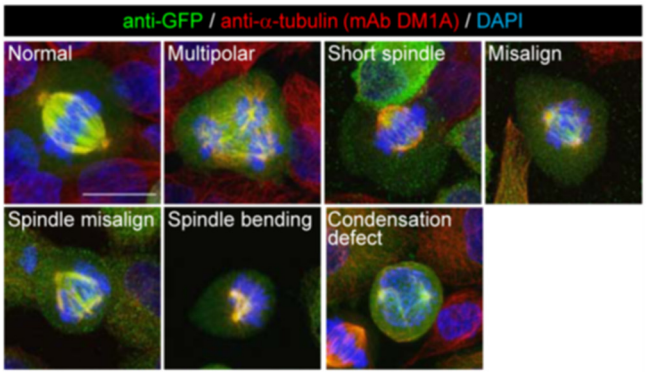
結　果

1. Δ3 化αチューブリンの発現による紡錘体の不安定化

HA タグを結合させたαチューブリンおよびΔ3 化αチューブリンを一過性に強制発現させ、紡錘体の形態に対する影響を検証した。紡錘体の形態は Goshima らの研究に従って 7 つの表現型に分類した（図 2a）[5]。HA-Δ3 化αチューブリン過剰発現は、HA-αチューブリン過剰発現に比べ、異常紡錘体形態の割合が増加した（68%対 45%、p=0.0314）。6 つの異常紡錘体の形態のうち、紡錘体の屈曲は HA-Δ3 化αチューブリン過剰発現の PANC-1 細胞で有意に増加した（18%対 5%、p=0.0439）。紡錘体の短縮と不正列は、HA-Δ3 化αチューブリン過剰発現 PANC-1 細胞で増加する傾向を示したが、統計値は 0.05 を下回らなかった（短縮：5%対 0%、p=0.1526；不正列：32%対 18%、p=0.1396）。

次に EGFP 融合αチューブリンおよびΔ3 化αチューブリンを安定恒常的に発現させ、紡錘体の形態に対する影響を検証した。EGFP-Δ3 化αチューブリンを生理的レベルで安定発現させると、未修飾 EGFP-αチューブリンの場合と比較して異常紡錘体の割合が著しく増加した（図 2b；54%対 35%、p=0.0028）。異常紡錘体のうち、2 種類の形態が EGFP-Δ3 化αチューブリン発現 PANC-1 細胞で有意に増加した。屈曲紡錘体の発生率は EGFP-αチューブリン発現細胞では 0%であったのに対し、EGFP-Δ3 化αチューブリン発現細胞では 6.7%となった（p=0.0040）（図 2b）。また、未修飾αチューブリン発現細胞に比べ、Δ3 化αチューブリン発現細胞では凝縮不全が増加した（図 2b；3.3%対 0%、p=0.0437）。紡錘体不正列の発生率は EGFP-Δ3 化αチューブリン発現細胞の方が未修飾 EGFP-αチューブリン発現細胞よりも高い傾向にあった（図 2b；16.7%対 10%、p=0.1287）。

a)



b)

	Knock-in into 5'UTR (EGFP-tagged)		
	α-tubulin (n=120)	Δ3-tubulin (n=120)	*p* value
Normal	78 (65.0%)	55 (45.8%)	**0.0028**
Abnormal			
Multipolar	10 (8.3%)	14 (11.7%)	0.3894
Short spindle	8 (6.7%)	6 (5.0%)	0.5818
Misalign	12 (10.0%)	20 (16.7%)	0.1287
Spindle misalign	12 (10.0%)	13 (10.8%)	0.8326
Spindle bending	0 (0%)	8 (6.7%)	**0.0040**
Condensation defect	0 (0%)	4 (3.3%)	**0.0437**

図 2.　Δ3 化αチューブリンの発現による紡錘体の不安定化

a）正常な紡錘体（Normal）と EGFP-Δ3 化αチューブリンの発現によって観察される不安定化して異常な紡錘体を示す。スケールバーは 20μm。

b）安定恒常発現細胞株で観察される紡錘体形態の数と比率を示す。*P* 値はカイ二乗検定の結果を示す。

2.　Δ3 化αチューブリンの発現による細胞分裂増殖の低下

Δ3 化αチューブリン発現が PANC-1 細胞の分裂増殖に与える影響を評価するため、EGFP-Δ3 化αチューブリン安定恒常発現細胞と未修飾の EGFP-αチューブリン安定恒常発現細胞との細胞数の比較を行った。EGFP-Δ3 化αチューブリン発現 PANC-1 細胞は、48 時間後、96 時間後ともに未修飾 EGFP-αチューブリン発現細胞よりも増殖が遅い傾向が見られた（図 3）。

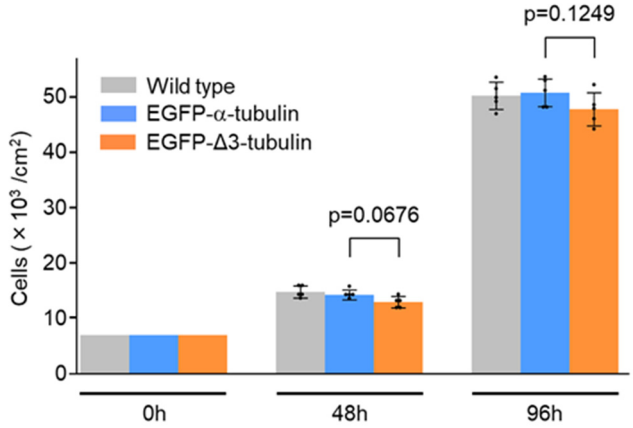


図 3.　Δ3 化αチューブリンの発現による細胞分裂増殖の低下傾向

EGFP-Δ3 化αチューブリンの安定恒常発現細胞株は、未修飾 EGFP-αチューブリンの安定恒常発現細胞株に比べて、分裂増殖が低下傾向にあることを示す。*P*値はスチューデント t 検定の結果を示す。

3.　Δ3 化αチューブリンの発現による細胞核の拡大

Δ3 化αチューブリンの発現が核の大きさに与える影響を検証した。EGFP-Δ3 化αチューブリンの安定恒常発現 PANC-1 細胞は、未修飾の EGFP-αチューブリン安定恒常発現 PANC-1 細胞よりも頻繁に拡大した核を有していた。この監察結果を定量的に評価するために、EGFP-Δ3 化αチューブリン発現細胞および EGFP-αチューブリン発現細

胞の最大核断面積を測定した。最大核断面積は EGFP-Δ3 化αチューブリン発現細胞の GFP 陽性細胞では、未修飾 EGFP-αチューブリン発現細胞のそれよりも有意に増加した（250.7±84.2μm^2 対 222.1±74.7μm^2、p=0.0005）。Δ3 化αチューブリンの発現量と細胞核の大きさの比例関係を検証した結果、EGFP-Δ3 化αチューブリン発現細胞では最大核断面積が EGFP の蛍光強度と正の相関を示した（図 4）。

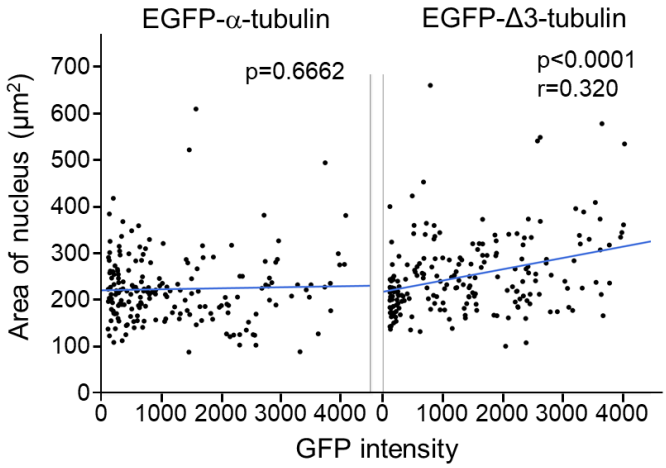


図 4.　Δ3 化αチューブリンの発現による細胞核の拡大
EGFP-Δ3 化αチューブリンの安定恒常発現細胞株は、GFP の蛍光強度に正に相関する細胞核の拡大を示す。未修飾の EGFP-αチューブリン発現細胞株ではそのような相関は見られない。

考　察

紡錘体微小管はチューブリン翻訳後修飾の中でも特に脱チロシン化に富んでおり、この修飾は紡錘体の形態や機能のみならず染色体分離の制御にも関連することが報告されている。先行研究では、脱チロシン化が染色体分配の維持や有糸分裂におけるエラー修正に関与することなどが報告されている。αチューブリンΔ3 化はΔ2 化と同様に非可逆であることが示されており、Δ3 化αチューブリンの増加が相対的に脱チロシン化αチューブリンを減少させ、紡錘体の形態異常を引き起こしている可能性が考えられる。また、カルボキシ末端領域の酸性度が低いαチューブリンサブタイプを発現させると紡錘体の位置がずれるという報告もある。Δ3 化αチューブリンではαチューブリンのカルボキシ末端から負に帯電した 2 つのグルタミン酸が除去されるため、カルボキシ末端低酸性度αチューブリンの発現と同様にメカニズムを介してΔ3 化αチューブリンの発現による紡錘体の位置ずれが起きている可能性が考えられる。一方、本研究で観察された紡錘体の屈曲や凝縮不全などの形態異常は、これまでチューブリン翻訳後修飾の変化との関連は報告されておらず、Δ3 化αチューブリンに特異的な現象である可能性が考えられる。

我々は本研究において、Δ3 化αチューブリンが有糸分裂紡錘体の形態異常、細胞増殖抑制傾向、核の巨大化を引き起こすことを実証した。Δ3 化αチューブリンの形成は不可逆的な反応であるため、紡錘体微小管上に過剰に蓄積する可能性がある。翻訳後修飾の異常蓄積と疾患との関係はこれまでにも報告されており、今回の発見は少なくとも染色体分配の異常という観点から、Δ3 化αチューブリンの異常蓄積と疾患という新しい概念を提示するものとなりうる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学大学院医系科学研究科外科学教室の馬場健太、広島大学大学院医系科学研究科解剖学及び発生生物学教室の中里亮太、Faryal Ijaz である。

文　献

1) Ikegami K, Setou M. Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. Cell Struct Funct. 2010;35(1):15-22. Epub 2010 Feb 27. PMID: 20190462 DOI: 10.1247/csf.09027

2) Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Burd B, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD. Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing α- and ß-tubulin. J Biol Chem. 2012 Feb 24;287(9):6503-6517. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22170066 DOI: 10.1074/jbc.M111.309138

3) Aillaud C, Bosc C, Saoudi Y, Denarier E, Peris L, Sago L, Taulet N, Cieren A, Tort O, Magiera MM, Janke C, Redeker V, Andrieux A, Moutin MJ. Evidence for new C-terminally truncated variants of α- and ß-tubulins. Mol Biol Cell. 2016 Feb 15;27(4):640-53. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26739754 DOI: 10.1091/mbc.E15-03-0137

4) Ijaz F, Ikegami K. Knock-in of labeled proteins into 5'UTR enables highly efficient generation of stable cell lines. Cell Struct Funct. 2021 Mar 16;46(1):21-35. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33504736 DOI: 10.1247/csf.21002

5) Goshima G, Wollman R, Goodwin SS, Zhang N, Scholey JM, Vale RD, Stuurman N. Genes required for mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. Science. 2007 Apr 20;316(5823):417-21. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17412918 DOI: 10.1126/science.1141314