

α -tubulin の SUMO 化による微小管動態の制御

武正 夏実 (Natsumi Takemasa) 指導：榊原 伸一

背景

微小管は、真核生物における主要な細胞骨格の一種であり、鞭毛・繊毛運動、細胞内物質輸送などの細胞機能に重要である。微小管は重合・脱重合を繰り返す動的な構造物であり、その動態は微小管の構成タンパク質である α および β -tubulinの修飾状態によって制御される。

Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) は翻訳後修飾因子であり α -tubulinはSUMO化の標的タンパク質である。微小管動態はアセチル化やリン酸化など様々な翻訳後修飾によって制御される為、SUMO化も動態制御に関わる可能性がある。しかし α -tubulinのSUMO化標的部位やSUMO化の機能的意義は不明な部分が多い。

そこで本研究ではライブイメージングとWestern blottingを用いて、 α -tubulinのSUMO化が微小管動態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。これにより、微小管機能を制御する細胞内メカニズムの理解が前進すると期待される。

方法

α -tubulinのSUMO化標的候補部位を3つ (K96, K304, K352) 同定し7種類のSUMO化不全変異体 (K96R, K304R, K352R, K96R+K304R, K96R+K352R, K304R+K352R, K96R+K304R+K352R) を作製した。1か所のみ変異を加えたものをSingle mutant, 2か所のものをDouble mutant, 3か所全てに変異を加えたものをTriple mutantと呼ぶ。野生型の α -tubulin (mKate2で標識されたもの) および上述の変異体と伸長中の微小管先端部に集積するEB1に蛍光標識を施したEB1-EGFPをNIH3T3に発現させライブイメージングを行った。MATLABのプログラム (plusTipTracker) を用いてEB1の移動速度と寿命を定量化し、微小管動態の指標とした。

Western blottingおよび免疫沈降には、野生型もしくはTriple mutantとHA-SUMO3を発現させたHEK293細胞から調製したサンプルを用いた。

結果

野生型のmKate2- α -tubulinとEB1-EGFPを発現したNIH3T3では、EB1が細胞中心部から周辺部へ向かって移動する様子が観察された。Triple mutantを発現した細胞でも同様にEB1の遠心性の移動が観測された一方で、微小管全長に渡ってEB1のシグナルが観察される場合もあった。このような異所的な局在を示した細胞では、EB1の移動は

ほとんど見られなかった。Single mutant, Double mutantを導入した細胞でもEB1の遠心性の移動が確認できた。野生型およびそれぞれの変異体を導入した細胞群間でEB1の移動速度および寿命を比較したところ、Triple mutantでは野生型に比べてEB1の移動速度が有意に低下していた。これに対し、Single mutantではいずれの変異体においても速度の有意な上昇が確認され、Double mutantではすべての群で野生型との有意な差は見られなかった。また、変異体導入によるEB1の寿命の変動は確認できなかった。

抗tRFP抗体 (mKate2を認識可能) を用いて免疫沈降を行ったサンプルのWestern blottingの結果、非常に高分子量のバンド濃度が野生型に比べてTriple mutant導入サンプルで低くなっていた。このバンドは脱SUMO化阻害剤であるNEMの添加により濃度が高くなったことから、Triple mutantで実際にSUMO化が阻害されていると考えられる。

考察

ライブイメージングにより、SUMO化不全変異体の導入による微小管動態の変化が明らかとなった。この結果は、これまで知られていたアセチル化やリン酸化などの翻訳後修飾に加えて、 α -tubulinのSUMO化も微小管機能の調節因子となり得ることを示している。さらに、Triple mutant導入によって微小管の伸長速度が減弱し、Single mutantによって伸長速度が増大したことは、微小管動態の適切な調節における α -tubulinのSUMO化状態の厳密な制御の重要性を強く示唆する。また、3種類のSingle mutantのいずれによっても微小管動態に変化が見られたことから、K96, K304, K352の3か所はSUMO化の標的部位であると考えられる。しかし、これら全てに変異を加えたTriple mutantを導入した場合でも、非常に高分子量のSUMO化tubulinが検出されたことから、上記3か所以外にも複数のSUMO化標的部位が存在すると推測される。今回置換した3か所以外の標的部位も対象とした研究を行うことで、 α -tubulinのSUMO化が微小管動態に及ぼす影響をより詳細に明らかにすることができると考えられる。微小管が関与する生理機能は多岐に渡る。今回の研究で明らかになった α -tubulinのSUMO化による微小管動態の制御は、細胞分裂や細胞の成長といった生命の発達・維持に関わる重要なはたらきを持つと考える。