

哺乳動物細胞におけるチューブリンアセチル化酵素の 細胞内局在動態の可視化

鈴木健史¹⁾、中倉敬²⁾、萩原治夫²⁾

¹⁾ 札幌医科大学医療人育成センター教養教育研究部門生物学

²⁾ 帝京大学医学部解剖学講座

Bio-Imaging of Alpha-Tubulin Acetyltransferase in Living Mammalian Cells

Takeshi Suzuki¹⁾, Takashi Nakakura²⁾, Haruo Hagiwara²⁾

¹⁾ Division of Biology, Center for Medical Education, Sapporo Medical University

²⁾ Department of Anatomy, Teikyo University School of Medicine

ラット線維芽細胞 3Y1-B、およびマウス培養 T 細胞 D10 に、GFP-Mec17/ α TAT1 遺伝子を導入した。その結果、いずれの細胞においても GFP-Mec17/ α TAT1 プローブは中心体に局在した。3Y1-B 細胞の細胞密度が低い部分では、中心体に加えて細胞接着面に強いシグナルが観察された。また、マイグレーション運動する 3Y1-B 細胞のリーディングエッジでは、リーディングエッジのやや後方で、リーディングエッジに平行な GFP シグナルの輝線が確認された。以上の結果は、本プローブが細胞内におけるチューブリンアセチル化部位を可視化することを示す。また、細胞のマイグレーション運動の際に、リーディングエッジで微小管細胞骨格のアセチル化が盛んに起きていることがわかった。

1 はじめに

微小管は、細胞内輸送や紡錘体形成および、細胞の形態形成や形態維持、増殖・分化などの多くの過程で柔軟かつ多様な制御を受けている。微小管の構造的・機能的な多様性は、様々な微小管結合蛋白質の結合に加えて、アセチル化やポリグルタミル化、ポリグリシル化などの翻訳後修飾によって保証されている。微小管は、 α および β チューブリンのヘテロ二量体がタンデムに配向したプロトフィラメント構造を取り、 α チューブリンはアセチル化を受けることによって β チューブリンとヘテロ二量体を形成し微小管を形成する。逆に、脱アセチル化によってヘテロ二量体が解離し、微小管が脱重合される^{1,2)}。微小管のアセチル化は、これまで構造安定化の指標と見なされてきたが、近年になって微小管結合蛋白質や各種モータータンパク質の結合特異性や活性を変化させ、細胞内極性形成や細胞内物質輸送を制御することが明らかになってきている³⁾。

クラミドモナス鞭毛の α チューブリン分子に見つかった 40 番目のリシン残基のアセチル化は、多くの

動物種に保存的な翻訳後修飾で、鞭毛微小管の安定化に機能していると考えられている。鞭毛（線毛）以外では、神経細胞軸索内の微小管も同様にアセチル化しており、細胞極性形成にも関与していると考えられている^{4,5)}。このリシン残基は、微小管の内腔面に面しているが⁶⁾、チューブリンのアセチル化を促す酵素が同定されていなかったため、チューブリンアセチル化の分子制御機構や機能がわからず、どのタイミングで、細胞内のどこでアセチル化が起きているかについては長らく不明であった。

近年、Gaertig らのグループは、線虫の触感受容体神経の機能に、ヒストンアセチル化酵素 Gcn5 のアイソフォームとして同定されていた Mec17 が重要であることを報告した⁷⁾。彼らは、ゼブラフィッシュで Mec17 遺伝子をノックダウンした場合に、神経-筋接合が正常に機能しなくなることを見いだすとともに、生化学的な検証から Mec17 がヒストンではなく α チューブリンをアセチル化する酵素であることを明らかにし、これを α TAT1 (α -tubulin acetyltransferase 1) と命名した⁷⁾。さらに、テトラヒメナで Mec17/ α TAT1 が線毛微小管に局在することを示し、Mec17/

α TAT1 が線毛微小管の内腔に局在し機能することも明らかにした⁷⁾。最近になって別のグループが、ラットの脳皮質発生過程における神経細胞のマイグレーションに Mec17/ α TAT1 が重要であることを示し、チューブリンのアセチル化が、細胞運動の制御にも関与するらしいことがわかってきた⁸⁾。

しかし、Mec17/ α TAT1 の細胞内分子動態が確認されているのはテトラヒメナなどの単細胞原生動物だけで、多細胞の後動物細胞内における Mec17/ α TAT1 のライブセルイメージングは未だなされておらず不明な点が多い。上述したように神経細胞のマイグレーションに重要であるらしいことが報告されているが、マイグレーションする細胞のリーディングエッジや神経細胞の成長円錐における分子局在動態については報告がなく、チューブリンアセチル化の細胞内分子制御機構の詳細はわかっていない。本研究では、生きた哺乳動物細胞内におけるチューブリンのアセチル化がどのタイミングで、また細胞内のどこで起こっているのか探るため、Mec17/ α TAT1 を GFP で標識した分子プローブを作製し、ライブセルイメージングを試みた。

2 方 法

2.1 cDNA と培養細胞

マウス Mec17/ α TAT1 遺伝子の cDNA は、OpenBiosystems 社から購入した (Clone ID = 4007862、GeneBank Accession No. BC028847、Catalog No. MMM1013-7510854)。ラット線維芽細胞株 3Y1-B は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した。3Y1-B 細胞は、10% FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma D5671) で培養した。マウス T 細胞株 D10 は、National Jewish Medical and Research Center の Abraham Kupfer 博士より供与していただいた。D10 細胞は、10% FBS を含む Click's Medium (Sigma C5572) で培養した。pEhyg レトロウイルスベクターおよび pCLeco ヘルパーベクター、レトロウイルスパッケージング細胞 Ψ eco は、National Jewish Medical and Research Center の Philippa Marrack 博士に供与していただいた⁹⁾。

2.2 分子プローブ

Mec17/ α TAT1 遺伝子を含むマウス cDNA から ORF 領域を PCR 増幅するため、制限酵素サイトを付加した Mec17-MluI-plus (5'-ATA TAC GCG TAT GGA GTT CCC GTT CGA TGT GGA TGC GCT GTT CCC G-3') と Mec17-NotI-minus (5'-ATA TGC GGC CGC CCA AGG CCT GGT GCT GCG

GCG TTC CTG CAG GTT T-3') のプライマーを作製した。また、EGFP-XhoI-plus (5'-ATA TCT CGA GAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT GTT CA-3') と EGFP-MluI-minus (5'-ATA TAC GCG TCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC CGA GAG TGA-3') を作製し、pEGFP-C1 (クロンテック) をテンプレートに用いて EGFP 遺伝子の ORF を PCR 増幅した。PCR 増幅は、KOD-plus 酵素 (TOYOBO) を用い、(95°C 15 秒 - 48°C 30 秒 - 68°C 2 分) \times 15 サイクル、および (95°C 15 秒 - 55°C 30 秒 - 68°C 2 分) \times 15 サイクルの合計 30 サイクルを行った。Mec17/ α TAT1 の PCR 産物は MluI と NotI で、EGFP の PCR 産物は XhoI と MluI でそれぞれ消化し、pBluescriptII+ ベクターに組み込み、EGFP-Mec17/ α TAT1 融合遺伝子を作製した。大腸菌コロニーを数個ピックアップし、プローブ遺伝子の全長についてシーケンスチェックを二重に行い、PCR 増幅による意図しない変異を含まない、設計通りのクローンを選抜した。定法により大腸菌からプラスミド DNA を単離し (Qiagen, Spin Kit)、XhoI と NotI で消化し EGFP-Mec17/ α TAT1 融合遺伝子を含む DNA フラグメントを切り出し、pEhyg レトロウイルスベクターに組み込んだ (pEhyg-EGFP-Mec17/ α TAT1)。なお、pEhyg レトロウイルスベクターは、遺伝子組み込み領域の背後に IRES 配列を挟んでハイグロマイシン耐性遺伝子が繋がっており、導入遺伝子と耐性遺伝子の発現量が同じになるように設計されている⁹⁾。

2.3 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

Lipofectamine 2000 Reagent を用い (Invitrogen)、pEhyg-EGFP-Mec17/ α TAT1 をヘルパーベクター pCLeco とともに、 Ψ eco レトロウイルスパッケージング細胞に導入した。ベクター DNA は高純度のものを準備し (Qiagen, Plasmid Plus Kit)、レトロウイルスベクターとヘルパーベクターがモル比で 1:1 になるように濃度調整し、 2×10^5 cells/2 ml/ ϕ 3.5 cm ディッシュに対して 20 μ g を使用した。2 日間培養後に培地を回収し、0.45 μ m のフィルターを通して、レトロウイルス粒子を含む培養上清を得た。培養上清をレトロネクチン (タカラバイオ) でコートした ϕ 3.5 cm 培養ディッシュに移し 3 時間静置し、培養ディッシュをウイルス粒子でコートした。ウイルス粒子をコートした培養ディッシュに、3Y1-B 細胞あるいは D10 細胞を加え 3 日間培養し、ウイルスを感染させた。培養 3 日目から培地にハイグロマイシン B (200 μ g/ml) を加え、選抜培養を行った。10 日間の選抜培養

以後は、ハイグロマイシン濃度を $50 \mu\text{g/ml}$ に落とし継代培養した。3Y1-B 細胞の継代培養は 1 週間毎に行い、0.25% トリプシン-EDTA を 3 分間作用させて細胞を単離し、約 1/10 量の細胞を新しい培地に継代し培養した。D10 細胞の継代培養は 2~3 日毎に行い、約 1/10 量の細胞を新しい培地に移し培養した。

2.4 蛍光顕微鏡観察

3Y1-B 細胞は、観察時点において完全な細胞シートを形成させるため、観察の 2 日前にコンフルエント相当数の細胞をガラスボトムディッシュに移し培養した。D10 細胞は、観察時に適量をガラスボトムディッシュに移し観察した。3Y1-B 細胞のリーディングエッジの観察には、観察直前にニードルで線状に細胞を掻き取り、細胞が引っ掻き傷上に戻ってくる過程をタイムラプス撮影した。3Y1-B 細胞の観察には、100 倍の油浸対物レンズ (NA=1.38) と超高感度冷却 EM-CCD カメラ Cascade 512F (Photometrics, binning 1×1 で使用) を装備した IX71 倒立型蛍光顕微鏡 (オリンパス) を用いた。D10 細胞の観察は、60 倍の油浸対物レンズ (NA=1.40) と高感度冷却 CCD カメラ CoolSnapHQ (Photometrics, binning 4×4 で使用) を装備した IX81 倒立型蛍光顕微鏡 (オリンパス) を用いた。いずれも、蛍光フィルターは GFP-3035B-OMF (オプトライン) を用いた。撮影および解析には、SlideBook ソフトウェア (Intelligent Imaging

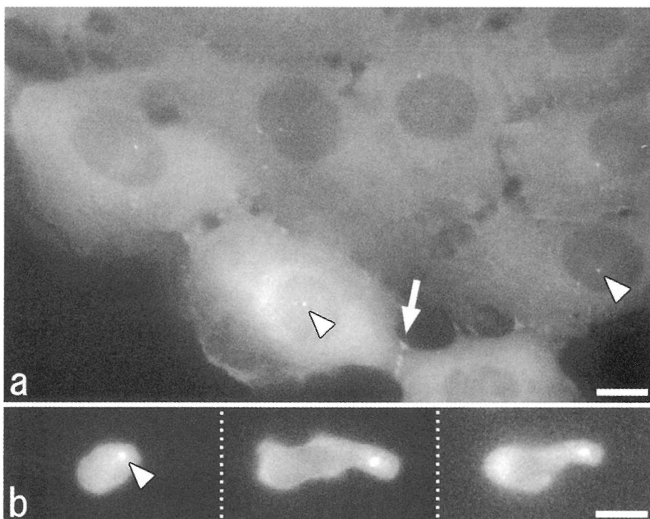


図 1. 生きた哺乳細胞内における Mec17/ α TAT1 の局在。a. 3Y1-B 細胞。各細胞で中心体に局限したシグナルが認められた (矢頭)。細胞密度が低い場所では、細胞接着部位に GFP シグナルが局在した (矢印)。バーは $10 \mu\text{m}$ 。b. D10 細胞。3 枚のパネルはそれぞれ別個に撮影した細胞を示す。各細胞で中心体に局限した GFP シグナルが認められた (矢頭)。バーは $10 \mu\text{m}$ 。

Innovations) を用いた。タイムラプス撮影は 10 分間隔で行い、すべて顕微鏡培養装置によって培養環境 (37°C 、湿度 100%、炭酸ガス濃度 = 5%) が保たれた状態で観察・撮影した^{10,11)}。

3 結 果

ラット線維芽細胞 3Y1-B に GFP-Mec17/ α TAT1 遺伝子を導入した結果、コンフルエントの 3Y1-B 細胞では、GFP の蛍光シグナルは細胞核の上、あるいは核周辺部の小さい輝点として観察された。この輝点は基本的に一つの細胞に 1 コに限られていた (図 1a、矢頭)。また、マウス培養 T 細胞株 D10 に導入した場合も同様に、一つの細胞内に一つの輝点が観察された (図 1b)。これは、典型的な中心体の染色パターンで、GFP-Mec17/ α TAT1 プローブが線維芽細胞および T 細胞において中心体に局在することを示す。

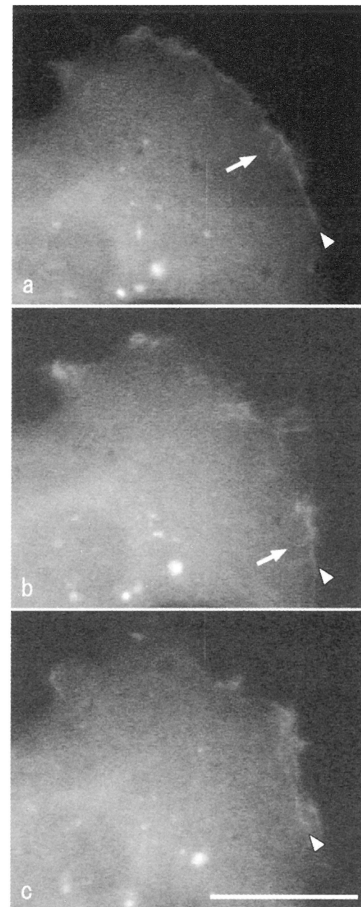


図 2. 3Y1-B 細胞リーディングエッジにおける Mec17/ α TAT1 の局在動態。a、b、c は同じ視野を 10 分間隔でタイムラプス撮影した結果を示す。矢頭でリーディングエッジに平行な輝線 GFP シグナルの輝線を示す。矢印は、細胞中心部からリーディングエッジに放射状に伸びる GFP シグナルの輝線 (矢印)。バーは $10 \mu\text{m}$ 。

しかし、3Y1-B 細胞では、一次線毛微小管のシグナルは認められなかった。また 3Y1-B 細胞の細胞密度が低い部分では、細胞接着面に強いシグナルが観察された (図 1a、矢印)。この細胞接着面のシグナルは、完全にコンフルエントになっている細胞密度が高い部分ではまったく観察されなかった。

続いて、マイグレーション運動する細胞のリーディングエッジでの機能局在を調べるため、ガラスボトムディッシュの培養面全面にコンフルエントに増殖した 3Y1-B の細胞シートを、針で引っ搔いて線状に細胞を剥離し、培養顕微鏡下で細胞シートの回復過程、すなわちマイグレーションにより剥離領域に這い出してくる細胞の様子をタイムラプス撮影した。細胞は剥離後直ちに剥離領域を埋めるべくマイグレーション運動を開始し、細胞の進行方向前縁にリーディングエッジが形成された。GFP-Mec17/ α TAT1 プロローブは、リーディングエッジに平行な輝線を形成した (図 2a-c、矢頭)。GFP-Mec17/ α TAT1 の輝線は、リーディングエッジの進行に伴い、リーディングエッジに沿ってダイナミックに動いていた (図 2a-c)。また、細胞中心部からリーディングエッジに放射状に伸びる GFP シグナルの輝線も観察された (図 2ab、矢印)。以上の結果は、細胞のマイグレーション運動の際に、リーディングエッジで微小管細胞骨格のアセチル化が盛んに起きていることを示す。

4 考 察

線毛や中心体の微小管はアセチル化により安定化されている。GFP-Mec17/ α TAT1 プロローブは、コンフルエントの 3Y1-B 細胞および D10 細胞において中心体に局限し、細胞内のほかの細胞構造への局在は認められなかった。シグナルが特定の細胞構造に局限することは、本プロローブの分子局在が細胞内で機能的に制御されていることを示す。

また、本研究では 3Y1-B 細胞の一次線毛のシグナルが認められなかった。一次線毛は細胞周期の静止期に形成され、細胞が機能的に分化した状態での細胞機能に関与する。このため、本研究で観察した細胞が増殖静止期になく一次線毛自体が存在しなかった可能性が考えられる。ただし、一次線毛と中心体で別のチューブリンアセチル化酵素が働いている可能性も否定できない。これは、コンフルエントになってから十分に時間を置いた静止状態の細胞を用いて、アセチル化チューブリン抗体などを使って、一次線毛の同時染色を行えばわかるので、将来試みたい。また、D10 細胞でも中心体のみシグナルが確認されたが、リンパ球には一次線毛が存在しないので矛盾しない。以上の

結果から、本プロローブが細胞内におけるチューブリンアセチル化部位を反映していると考えられる。

3Y1-B 細胞で細胞密度が低い部分では、細胞接着面にもやや強いシグナルが認められた。これは、細胞接着の構築に微小管のアセチル化が関与する可能性を示唆する。これまで微小管は細胞間接着とはあまり関係ないと考えられていたが、最近になって細胞間接着装置が微小管と相互作用して細胞の形態維持に関与していることが明らかになっている¹²⁾。

本研究では、マイグレーションする細胞のリーディングエッジ部分で、リーディングエッジに並行して走る GFP-Mec17/ α TAT1 プロローブの輝線を確認した。この輝線は、常にリーディングエッジにあるのではなく、リーディングエッジの伸張運動に伴ってダイナミックに動いていた。リーディングエッジでは、アクチン線維が形態形成と細胞運動の両方に働いているが、微小管が Mec17/ α TAT1 の働きによりリーディングエッジ部で重合と脱重合をくり返すことで細胞運動の方向性を制御していると考えられる。

本研究で開発した GFP-Mec17/ α TAT1 プロローブは、細胞内におけるチューブリンアセチル化部位を反映していた。本プロローブを用いて、細胞の分裂増殖過程や一次線毛形成過程、さらには神経細胞の成長円錐などさまざまな状況下での分子動態を解析すれば、細胞の機能分化や運動、形態形成に微小管アセチル化がどのように関わっているのかについて確認することが可能になる。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究補助金 (24590261) の支援を受けた。

文 献

1. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 417: 455-458. 2002
2. Westermann S, Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4: 938-947. 2003
3. Itoh G, Kanno S, Uchida KS, Chiba S, Sugino S, Watanabe K, Mizuno K, Yasui A, Hirota T, Tanaka K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J*. 30: 130-144. 2011
4. L'Hernault SW, Rosenbaum JL. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified in the

- flagella during flagellar assembly. *J Cell Biol.* 97: 258-263. 1983
5. LeDizet M, Piperno G. Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* alpha-tubulin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 5720-5724. 1987
 6. Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. *Cell.* 96: 79-88. 1999
 7. Akella JS, Wloga D, Kim J, Starostina NG, Lyons-Abbott S, Morrissette NS, Dougan ST, Kipreos ET, Gaertig J. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature.* 467: 218-222. 2010
 8. Li L, Wei D, Wang Q, Pan J, Liu R, Zhang X, Bao L. MEC-17 deficiency leads to reduced α -tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. *J Neurosci.* 32: 12673-12683. 2012
 9. Schaefer BC, Mitchell TC, Kappler JW, Marrack P. A novel family of retroviral vectors for the rapid production of complex stable cell lines. *Anal Biochem.* 297: 86-93. 2001
 10. Suzuki T, Matsuzaki T, Hagiwara H, Aoki T, Takata K. Recent advances in fluorescent labeling techniques for fluorescence microscopy. *Acta Histochem Cytochem.* 40: 131-137. 2007
 11. 鈴木健史, 高田邦昭. 蛍光タンパク質の基礎と実際. 日本組織細胞化学会編 組織細胞化学2008. pp. 101-109. 2008
 12. Meng W, Mushika Y, Ichii T, Takeichi M. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 135: 948-959. 2008

