

# チューブリン遺伝子破壊株による微小管機能の順遺伝学・逆遺伝学的研究

## はじめに

微小管はα-およびβ-チューブリンのヘテロダイマーが規則的に配列した管状重合体である。微小管阻害剤は細胞分裂を抑制するので、抗がん剤として広く用いられる。また、チューブリン遺伝子の異常と、がんやてんかん、脳症との関連も指摘されている。したがって、これらの疾病のメカニズムの解明や新たな抗がん剤開発のために、チューブリンの分子構造と機能に関する基礎的知見の獲得が本質的に重要である。

緑藻クラミドモナスは微小管を主要構成成分とする鞭毛を使って遊泳するので、微小管の重合状態を高感度で検定できる強力なモデル生物である。また、鞭毛の構造や機能に関わる多数の変異株が単離され、膨大な知見が蓄積している。ただし、この生物にはα-およびβ-チューブリン遺伝子が2つずつ (*tua1*と*tua2*, *tub1*と*tub2*) 存在する。そこで申請者らは、薬剤耐性遺伝子の発現カセットをゲノム内にランダムに挿入した約8,000の変異株ライブラリーをスクリーニングし、各チューブリン遺伝子が破壊された株を複数獲得することに成功した。本研究では、これらの破壊株を出発材料とし、チューブリン機能の順遺伝学的・逆遺伝学的アプローチ双方向からの解析を試みる。

## これまでの経過

### (1) 各チューブリン遺伝子破壊株の基本性質の解析

申請者らが単離した*tua2*、*tub1*、*tub2*の各破壊株に加え、*tua1*の破壊株を入手し、これらの株のチューブリン遺伝子領域の塩基配列を解析、薬剤耐性遺伝子の挿入部位を特定した(図1)。これらの株の平常時チューブリン発現量、鞭毛長、鞭毛形成能に異常は認められなかった(図2)。

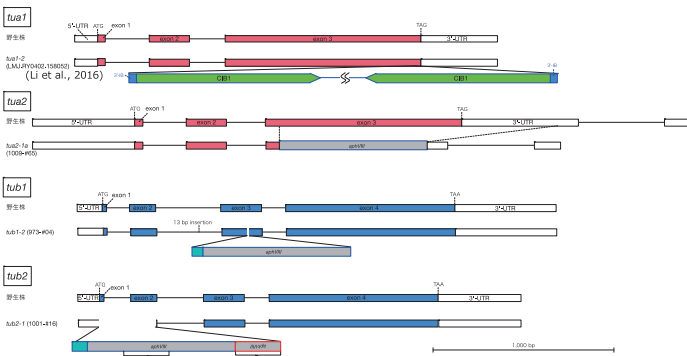


図1) 野生株(上段)と各破壊株(下段)のチューブリン遺伝子の構造

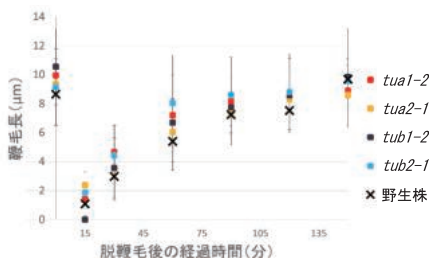


図2) 鞭毛長と鞭毛再生活性

## 研究代表者 箕浦 高子 研究員

*tub1*破壊株は微小管重合阻害剤コルヒチンに耐性を示し、*tub2*破壊株は逆の感受性を示した(図3)。この性質は、2つのβ-チューブリン遺伝子の発現制御の違いに起因している可能性がある。

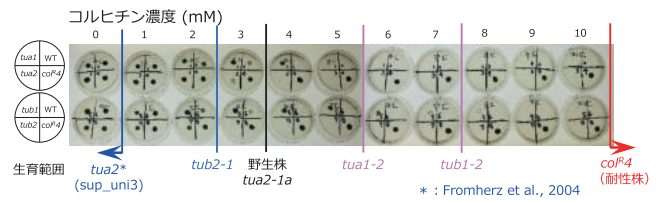


図3) 各破壊株のコルヒチン耐性

### (2) *tua/tub* 二重破壊株を親株とする新規微小管阻害剤感受性異常変異株の獲得

得られたプロピザミド耐性株7株のうち、4株がβ-チューブリン遺伝子の変異株だった。このうち*pyz2*は、β-チューブリン遺伝子にQ134H変異が生じた新規の変異株である。β-チューブリンのQ134H変異は、プロピザミド耐性とコルヒチン感受性をもたらすユニークな変異であることが判明した。引き続き、他の微小管阻害剤への感受性異常等を指標に、新規チューブリン遺伝子変異株の獲得を目指す。

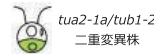
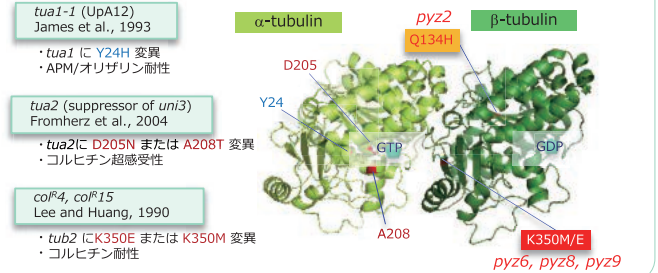


表1) 単離した各チューブリン遺伝子変異株の性質

	鞭毛長	遊泳速度	コルヒチン	プロピザミド
野生株	10.7±1.3 (n=200)	137.3±42.8 (n=20, 21.1°C)	+ / - (< 2.5 mM)	+ / - (< 10 mM)
<i>tua2-1a/tub1-2</i>	7.3±1.5 (n=200)	117.9±32.0 (n=20, 22.6°C)	+ / - (< 2.5 mM)	N.A.
<i>pyz2</i> (Q134H in <i>tub2</i> )	8.8±1.9 (n=200)	115.0±21.8 (n=20, 21.7°C)	< 1.25 mM	(耐性)
<i>pyz6</i> (K350M in <i>tub2</i> )	9.9±2.5 (n=200)	84.1±20.5 (n=11, 22.2°C)	< 20 mM	(耐性)
<i>pyz8</i> (K350E in <i>tub2</i> )	no flagella	-	> 40 mM	(耐性)
<i>pyz9</i> (K350E in <i>tub2</i> )	no flagella	-	> 40 mM	(耐性)
<i>coR4</i> <sup>1</sup> (K350E in <i>tub2</i> )	~10 mm	~140 mm/s	< 20 mM	< 200 mM
<i>pyz6</i> ... <i>tub2</i> にK350M変異 ( <i>coR15</i> と同じ)	~8 mm	~100 mm/s	> 20 mM	> 500 mM
<i>tub1-2/coR4</i> <sup>1</sup>	~8 mm	~100 mm/s	> 20 mM	> 500 mM
<i>pyz8</i> ... <i>tub2</i> にK350E変異 ( <i>coR4</i> と同じ)				

参考) これまでに単離されたチューブリン遺伝子変異株とその変異部位



### 共同研究者

- 岩館 満雄 (研究員、理工学部准教授)
- 荻原 由太郎 (準研究員、理工学研究科生命科学専攻博士課程前期課程1年)
- 鈴木 涼介、向山征利、市橋菜南 (理工学部生命科学科2018年卒業)
- 神谷 律 (客員研究員、理工学部共同研究員)