

■原 著■ 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 扁形動物の微小管結合蛋白質の同定

ミンイゴウ<sup>1</sup> 越智拓海<sup>1,2</sup> 小谷 享<sup>1,2,3</sup>

Identification of microtubule-binding proteins in flatworms

Yihao Min<sup>1</sup>, Takumi Oti<sup>1,2</sup> and Susumu Kotani<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: kotani-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Microtubule-associated proteins (MAPs) interact with microtubules and regulate cell division, cell morphogenesis, cell motility, spindle formation, and intracellular transport. Mammalian MAPs, MAP2, MAP4, and tau, have a repeat of the assembly-promoting (AP) sequence at the center of their microtubule-associating sites that bind directly to microtubules. Recently, genetic analysis revealed that molecules with repeating AP sequences exist throughout the animal kingdom, but it remains unclear whether these molecules function as MAPs. The purpose of this study was to identify primitive MAP molecules and examine species of the universality of their function in the animal kingdom using a primitive bilateria, the flatworm. First, protein expression vectors were created based on *Stylochoplana pusilla* MAPs (SpMAP\_4R and SpMAP\_5R) cDNA that differs in the number of AP sequence repeats. Next, we cloned the MAP-like gene of *Dugesia ryukyuensis*, which belongs to the same phylum of flatworms as *Stylochoplana pusilla*. Finally, the protein structures were compared based on the predicted amino acid sequences of SpMAPs and *Dugesia* MAPs. We found that the tail site of MAPs, which is present in *Dugesia* MAP-like protein and mammalian MAPs, is absent in SpMAPs. It has been reported that the tail site of MAPs is involved in microtubule polymerization and stability, but the details are unknown. Future studies of the functions MAPs in *Stylochoplana pusilla* and *Dugesia* might clarify the effect of the presence or absence of the tail site on microtubule polymerization.

**Keywords:** microtubule-associated proteins (MAPs), assembly-promoting (AP) Sequence, tail, flatworm

## 序論

微小管は真核生物の細胞骨格の一種であり、細胞分裂、細胞内輸送、細胞の複雑な形態の維持などの重要な細胞機能の発現に関わる。これらの機能を発現するためには、微小管が様々な微小管結合タンパク質 (MAPs) と相互作用する必要がある。中でも、微小管の形成や微小管の束化、他の細胞骨格との架橋など、微小管の基本構造に関わる哺乳類 MAPs として MAP2/MAP4/Tau スーパーファミリーが知られる。MAP2、MAP4、Tau はいずれも N 末端側に突起部位 (Projection domain)、C 末端側に微小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもち、微

小管結合部位はプロリンに富む Pro-rich 領域、繰り返し領域、尾部 tail に分けられる (図 1)<sup>1)</sup>。繰り返し領域には、微小管結合活性をもつ 18 アミノ酸残基の基本構造 “Assembly-Promoting (AP) 配列” が複数個あり、選択的スプライシングにより AP 配列の繰り返し数に違いが生じる。哺乳類の MAP2 (AP 配列の繰り返し数; 3 個)、MAP4 (5 個)、Tau (4 個) の間では AP 配列の相同性が高く、分子進化の過程で、1 個の AP 配列をもつ祖先分子が重複した結果、繰り返しをもつ始原 MAP 分子が誕生し、その後、複数の分子に分岐したと考えられる<sup>1)</sup>。哺乳

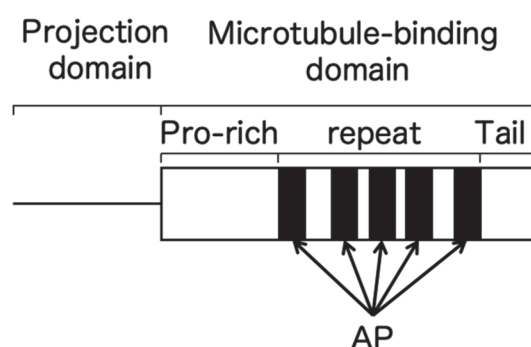


図1. microtubule-associated protein (MAP) の基本構造。N 末端側に突起部位 (Projection domain), C 末端側に微小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもつ。Microtubule-binding domain はプロリンに富む (Pro-rich) 領域, 微小管結合活性を持つ assembly-promoting 配列の繰り返し (repeat) 領域, 尾部 (tail) 領域に分けられる。

類 MAP4 の AP 配列のアミノ酸配列情報を元にした相同性検索により、AP 配列に類似した領域をもち、哺乳類 MAPs と類似する MAPs 遺伝子が硬骨魚類ゼブラフィッシュや両生類アフリカツメガエル、軟体動物ジャンボアメフラシ、線形動物の線虫など様々な生物種に存在することを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。新口動物、旧口動物で共通して AP 配列をもつ分子が存在したことから、MAPs の祖先分子は新口動物、旧口動物に分岐する前に出現し、その基本的な分子構造と機能が進化的に保存されている可能性は高い。

我々はこれまでに、新口動物、旧口動物の分岐点近くに位置する最も原始的な左右相称動物で、中枢化された神経 (原型脳) をもつ扁形動物カイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) を用いて AP 配列を含む MAP-like 遺伝子 (SpMAP) を同定している<sup>2)</sup>。SpMAPs は AP 配列の数が異なる 2 種が同定され、

SpMAP\_4R は SpMAP\_5R の 4 番目の AP 配列がない構造をとっていた<sup>2)</sup>。扁形動物は最も原始的な左右相称動物であることから、扁形動物の MAPs が左右相称動物における始原 MAPs である可能性が高い。しかし、SpMAPs の AP 配列の繰り返し数の違いが機能にどのような影響を与えるのかはわかっていない。また、SpMAPs を含む動物界 MAPs ファミリーの分子系統樹解析では無脊椎動物の MAPs が 2 つのクレードルに分かれるなど、同定した SpMAP の妥当性には不明な点が残っている。そこで、カイヤドリヒラムシと同じ扁形動物門に属し、より飼育・繁殖が容易で、系統が確立されているリュウキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) から AP 配列をもつ分子をクローニングし、左右相称動物における始原 MAP を同定し、SpMAPs とリュウキュウナミウズムシ MAP-like 蛋白質の機能を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 実験動物とサンプリング

神奈川県足柄郡真鶴町および神奈川県三浦郡葉山町芝崎海岸で採取したカイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) からクローニングした SpMAPs のクローニングベクターを用いて実験を行った。また、慶應義塾大学 松本 緑 准教授から分与いただいたリュウキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) を用いた。

### SpMAP 蛋白質発現ベクターの作製

先行研究<sup>2)</sup>で作製した SpMAP\_4R と SpMAP\_5R の cDNA を制限酵素認識配列を付加するプライマー

プライマー配列		
RNAseq	ATGGAACCGTTGTGACGAGCGTATCCGATCTG	33
SpMAP_4R	GAAGGAGATATAGTACCATGGAACCGTTGTGACGAGCGTATCCGATCTG	50
SpMAP_5R	GAAGGAGATATAGTACCATGGAACCGTTGTGACGAGCGTATCCGATCTG	50
RNAseq	GAATCTGTGACCGTGGTGCAGCAACTTCAACTGAGAAGCGTGCACGG	83
SpMAP_4R	GAATCTGTGACCGTGGTGCAGCAACTTCAACTGAGAAGCGTGCACGG	100
SpMAP_5R	GAATCTGTGACCGTGGTGCAGCAACTTCAACTGAGAAGCGTGCACGG	100
RNAseq	ATCGACGGGTCAACGCAGTCGCATTCTGTTATGGCAAGTCGATTCCGA	133
SpMAP_4R	ATCGACGGGTCAACGCAGTCGCATTCTGTTATGGCAAGTCGATTCCGA	150
SpMAP_5R	ATCGACGGGTCAACGCAGTCGCATTCTGTTATGGCAAGTCGATTCCGA	150
RNAseq	AGCTGAAACCTCTTGGACACCGGTATCGCTGGGCGGCCCTGCCTCGATG	183
SpMAP_4R	AGCTGAAACCTCTTGGACACCGGTATCGCTGGGCGGCCCTGCCTCGATG	200
SpMAP_5R	AGCTGAAACCTCTTGGACACCGGTATCGCTGGGCGGCCCTGCCTCGATG	200
RNAseq	GGTTCACGCTCACACGGCTCGCTTGCCTCCGACGATATGCCCGTGTTCGG	233
SpMAP_4R	GGTTCACGCTCACACGGCTCGCTTGCCTCCGACGATATGCCCGTGTTCGG	250
SpMAP_5R	GGTTCACGCTCACACGGCTCGCTTGCCTCCGACGATATGCCCGTGTTCGG	250
RNAseq	ACGTCCAACCTCTCTGGACTACCGCGACAACCTCCGACTCCTCCTCGTACG	283
SpMAP_4R	ACGTCCAACCTCTCTGGACTACCGCGACAACCTCCGACTCCTCCTCGTACG	300
SpMAP_5R	ACGTCCAACCTCTCTGGACTACCGCGACAACCTCCGACTCCTCCTCGTACG	300
RNAseq	CTACCTCCAACGGACGACGACACCACTCTCGCCAACGTCGTCAGGAGCT	333
SpMAP_4R	CTACCTCCAACGGACGACGACACCACTCTCGCCAACGTCGTCAGGAGCT	350
SpMAP_5R	CTACCTCCAACGGACGACGACACCACTCTCGCCAACGTCGTCAGGAGCT	350

図2. SpMAPs 蛋白質発現ベクターの設計。上段: カイヤドリヒラムシのトランスクリプトームデータ。中段: SpMAP\_4R。下段: SpMAP\_5R。開始コドンの前に NcoI、終始コドンの位置に XhoI 酵素認識部位が付加されるようにプライマーを設計した。

AP配列		
RNAseq	TCTGGACCGCGGGCTCCGATTCGAATCGAAAGTGAATCTTTCTCGCAACTT	383
SpMAP_4R	TCTGGACCGCGGGCTCCGATTCGAATCGAAAGTGAATCTTTCTCGCAACTT	400
SpMAP_5R	TCTGGACCGCGGGCTCCGATTCGAATCGAAAGTGAATCTTTCTCGCAACTT	400
RNAseq	CAATCACTCGCCGGGTGGAGGCAAGGTGAAAGTGTATCACAAGAAGATCG	433
SpMAP_4R	CAATCACTCGCCGGGTGGAGGCAAGGTGAAAGTGTATCACAAGAAGATCG	450
SpMAP_5R	CAATCACTCGCCGGGTGGAGGCAAGGTGAAAGTGTATCACAAGAAGATCG	450
RNAseq	ACGTGAAAGATGTGTCCAGCAAGTGTGGATCTCGAAAAACCTCAAACAT	483
SpMAP_4R	ACGTGAAAGATGTGTCCAGCAAGTGTGGATCTCGAAAAACCTCAAACAT	500
SpMAP_5R	ACGTGAAAGATGTGTCCAGCAAGTGTGGATCTCGAAAAACCTCAAACAT	500
RNAseq	CAAGCTGGCGGTGGCAACGTTCAAATTTTCGACGACAAACCAAAATTTAA	533
SpMAP_4R	CAAGCTGGCGGTGGCAACGTTCAAATTTTCGACGACAAACCAAAATTTAA	550
SpMAP_5R	CAAGCTGGCGGTGGCAACGTTCAAATTTTCGACGACAAACCAAAATTTAA	550
RNAseq	GGAGACCCCTCTTCGAAGATGGATCATTGAAGAATACGAAACACGTGG	583
SpMAP_4R	GGAGACCCCTCTTCGAAGATGGATCATTGAAGAATACGAAACACGTGG	600
SpMAP_5R	GGAGACCCCTCTTCGAAGATGGATCATTGAAGAATACGAAACACGTGG	600
RNAseq	CTGGTGGCGGGGATGTTAAGATAGAAACACAAAACTAAATTTGGGAA	633
SpMAP_4R	CTGGTGGCGGGGATGTTAAGATAGAAACACAAAACTAAATTTGGGAA	650
SpMAP_5R	CTGGTGGCGGGGATGTTAAGATAGAAACACAAAACTAAATTTGGGAA	650
RNAseq	GGATCACGTGTGGCTCTTGGCAAAATGTTAAACACAAAGCTGGCGGTGG	683
SpMAP_4R	GGATCACGTGTGGCTCTTGGCAAAATGTTAAACACAAAGCTGGCGGTGG	700
SpMAP_5R	GGATCACGTGTGGCTCTTGGCAAAATGTTAAACACAAAGCTGGCGGTGG	700
RNAseq	TGATCTGAAGATAGAAACACTACAGTTGAATTTGGGATCTGGATCTCGTG	733
SpMAP_4R	TGATCTGAAGATAGAAACACTACAGTTGAATTTGGGATCTGGATCTCGTG	750
SpMAP_5R	TGATCTGAAGATAGAAACACTACAGTTGAATTTGGGATCTGGATCTCGTG	750
RNAseq	TGGGCTCTTGGCAAAATATAAAACACAAGCCAGGCGGTGGTTCGAGCAC	777
SpMAP_4R	TGGGCTCTTGGCAAAATATAAAACACAAGCCAGGCGGTGGTTCGAGCAC	800
SpMAP_5R	TGGGCTCTTGGCAAAATATAAAACACAAGCCAGGCGGTGGTTCGAGCAC	810
RNAseq	TGGGCTCTTGGCAAAATATAAAACACAAGCCAGGCGGTGGTTCGAGCAC	830
SpMAP_4R	CACCACCCACCACTGAGATCCGGCTGCT	740
SpMAP_5R	CACCACCCACCACTGAGATCCGGCTGCT	830



(Forward; 5' - GTACCATGGAAACCGTTGTGAC -3' , Reverse; 5' - GACCTCGAGACCACCGCCTGG -3' , 産物サイズ; SpMAP\_4R 687bp, SpMAP\_5R 777bp) を用いて PCR 法で増幅した。その際、開始コドンに合わせて NcoI の制限酵素認識配列を加え、終止コドンの直前に XhoI の認識配列を加え、開始コドンから終止コドンの直前までを切り出せるように設計した (図 2)。pET21d (+) の His タグを使用するために終止コドンを削除した。PCR 産物をゲルから切り出し、pET21d (+) (Takara bio, Tokyo, Japan) と共に制限酵素 NcoI, XhoI (Takara bio, Tokyo, Japan) で消化し、DNA リガーゼ (DNA Ligation kit Takara bio, Tokyo, Japan) で繋ぐことで、SpMAP の下流にヒスチジン (His) タグを付加した。組み換えたプラスミドを DH5  $\alpha$  コンピテントセル (Takara bio, Tokyo, Japan) にトランスフォーメーションし、濃度 100mg/ml の Amp が 20  $\mu$  l 塗った LB プレートに 18 時間培養した。得られたコロニーを LB 液体培地に植え継ぎ、18 時間培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Strassel, Germany) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミド DNA を制限酵素 (NcoI, XhoI) で消化し、電気泳動により確認した。このプラスミド DNA のシーケンスを行い、塩基配列を確認した後、identity X (ver. 14.3.3, <https://home.hiroshima-u.ac.jp/kei/IdentityX/index.html>) を使ってアミノ酸配列を予測した。

### リュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* MAP (DrMAP) 遺伝子の探索

リュウキュウナミウズムシのトランスクリプター

ムデータから、他の動物の MAP ファミリー遺伝子配列と相同性を持つものを BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて探索し、DrMAP 候補遺伝子とした。

### DrMAP 遺伝子のクローニング

先行研究に従って遺伝子クローニングを行った 3)。具体的には次のように行った。カイヤドリヒラムシの total RNA を NucleoSpin RNA Kit (Takara bio) を用いて抽出した。Total RNA の濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて測定した。この Total RNA から Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) を用いて、最終濃度 10 ng/ $\mu$ L になるように一本鎖 cDNA を合成した。Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (Takara bio) と SpMAP 遺伝子に特異的なプライマー (Forward; 5' -GAAACGTATGTGAGGAACAG-3' , Reverse; 5' -TTAATTCGACCGGTGCTGC-3' , 産物サイズ; DrMAP 1209 bp) を用いて PCR を行った。PCR を行ったサンプルは 2% アガロースゲルで泳動し、Ez-Capture II (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。泳動後、目的のバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nihon Genetics, Tokyo, Japan) を用いて、アガロースゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA を p-GEM-T Easy Vector System (Promega, WI, USA) を用いて p-GEM-T Easy Vector に組み込んだ。このベクターを *E. coli* DH5  $\alpha$  Competent Cells (Takara bio) のプロトコルに従い、*E. coli* DH5  $\alpha$  に組み込んだ。目的インサートをもつベクターが組み込まれた *E. coli* DH5  $\alpha$  を LB 培地で培養し、増幅した大腸菌から FastGene

RNAseq	METVVTSVSDLEICDRRSTTSTENSVDGSTGQSRIPVMASRI PK	45
SpMAP_4R	RRYSTMETVVTSVSDLEVCDDRRSTTSTENSVDGSTGQSRIPVMASRI PK	50
SpMAP_5R	RRYSTMETVVTSVSDLEICDRRSTTSTENSVDGSTGQSRIPVMASRI PK	50
RNAseq	LKPLGPPVSLGGPASMGSSSHGSLASDDMPVFGRPSTLDYRDNSDSSSYA	95
SpMAP_4R	LKPLGPPVSLGGPASMGSSSHGSLASDDMPVFGRPSTLDYRDNSDSSSYA	100
SpMAP_5R	LKPLGPPVSLGGPASMGSSSHGSLASDDMPVFGRPSTLDYRDNSDSSSYA	100
RNAseq	TSNGRTTPLSPTSSGASGPRAP IQSKVKSFNFNHSPPGGGKVVKVYHKKID	145
SpMAP_4R	TSNGRTTPLSPTSSGASGPRAP IQSKVKSFNFNHSPPGGGKVVKVYHKKID	150
SpMAP_5R	TSNGRTTPLSPTSSGASGPRAP IQSKVKSFNFNHSPPGGGKVVKVYHKKID	150
RNAseq	VKD VSSKCGSRKLNKHQAGGGNVQIFDDKPKFKET ASSKIGSLKNTKHVA	195
SpMAP_4R	VKD VSSKCGSRKLNKHQAGGGNVQIFDDKPKFKET ASSKIGSLKNTKHVA	200
SpMAP_5R	VKD VSSKCGSRKLNKHQAGGGNVQIFDDKPKFKET ASSKIGSLKNTKHVA	200
RNAseq	GGGDVKIETQKLNWE VGSRVGSWQNVKHKAGGGDLK IETLQLNWD TGSRV	245
SpMAP_4R	GGGDVKIETx-----XQLNWD TGSRV	221
SpMAP_5R	GGGDVKIETQKLNWE VGSRVGSWQNVKHKAGGGDLK IETLQLNWD TGSRV	250
RNAseq	GSWQNIKHKPGGG*DPAA	259
SpMAP_4R	GSWQNIKHKPGGGLEHHHHHDPAA	247
SpMAP_5R	GSWQNIKHKPGGGLEHHHHHDPAA	276

図 3. 作製した SpMAPs 蛋白質発現ベクター。上段：カイヤドリヒラムシのトランスクリプタームデータ。中段：SpMAP\_4R。下段：SpMAP\_5R。終始コドンの前にヒスチジン (His) タグが 6 個付加される。

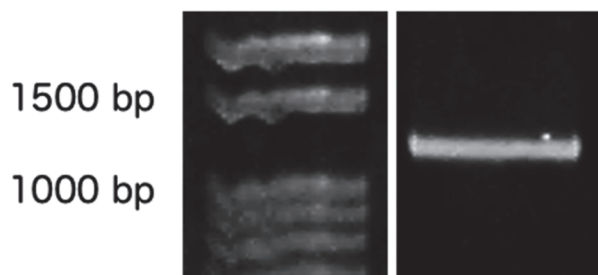


図4. リュウキュウナミウズムシ MAP-like 遺伝子のクローニング。リュウキュウナミウズムシ MAP-like 遺伝子特異的なプライマーを用いた RT-PCR により、1200 bp 付近にバンドが観察された。左：マーカー、右：RT-PCR 産物。

Plasmid Mini Kit (Nihon Genetics) を用いてプラスミド DNA を精製した。このプラスミド DNA のシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

#### 予測アミノ酸配列の構造と分子系統解析

既報<sup>4)</sup>を参照し、Gene Bank に登録されている MAP ファミリーのアミノ酸配列と SpMAP、DrMAP、ナミウズムシのゲノムから探索した DjMAP 候補遺伝子の予測アミノ酸配列 (*Dugesia japonica*) を用いて分子系統解析を行った。解析には MEGA X (ver. 10.1.8) を用いた。

## 結果

#### SpMAP 蛋白質発現ベクターの予測アミノ酸配列

シーケンスにより解析した SpMAPs 発現ベクターの塩基配列をもとに予測したアミノ酸配列を図3に示す。SpMAP の下流に His タグが6個付加されたアミノ酸を発現させることができるベクターの作製に成功した。

#### DrMAP のクローニング

DrMAP 遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、1200 bp 付近にバンドが観察された (予想バンドサイズ:1209 bp) (図4)。バンドを切り出し、クローニングベクターに載せ替えて増幅させ、塩基配列を解析した。結果、インサートチェック時にはベクターに PCR 産物遺伝子が組み込まれていたものの、シーケンス解析では AP 配列を含む遺伝子が確認されなかった。

#### DjMAP 候補遺伝子の探索と分子系統樹解析

ナミウズムシのゲノム情報をもとに AP 配列を含む遺伝子を探索した結果、AP 配列の繰り返しを4個もつ遺伝子が見つかった。そこで、DjMAP の予測アミノ酸配列と先に同定した2つの SpMAP の予測アミノ酸配列、既知の MAP ファミリーのアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った (図5)。その結果、脊椎動物神経性 MAPs のクレード (橙) と脊椎動物全身性 MAP のクレード (緑)、無脊椎動物 MAP のクレード (青) に分かれた。脊椎動物神経性 MAPs のクレードでは神経系特異的に発現する MAP2 や tau が配置され、概ね進化系統樹と類似した結果を示した。脊椎動物全身性 MAP のクレード内では魚類と哺乳類で分かれた。無脊椎動物 MAP のクレードでは扁形動物の MAP 候補配列は同じクレードに配置されていた。

#### SpMAP と DjMAP の予測アミノ酸配列の比較

SpMAPs と DjMAP の予測アミノ酸配列をウシの MAP4 配列と比較し、アライメントを行い、その構造を比較した (図6)。DjMAP は339アミノ酸残基

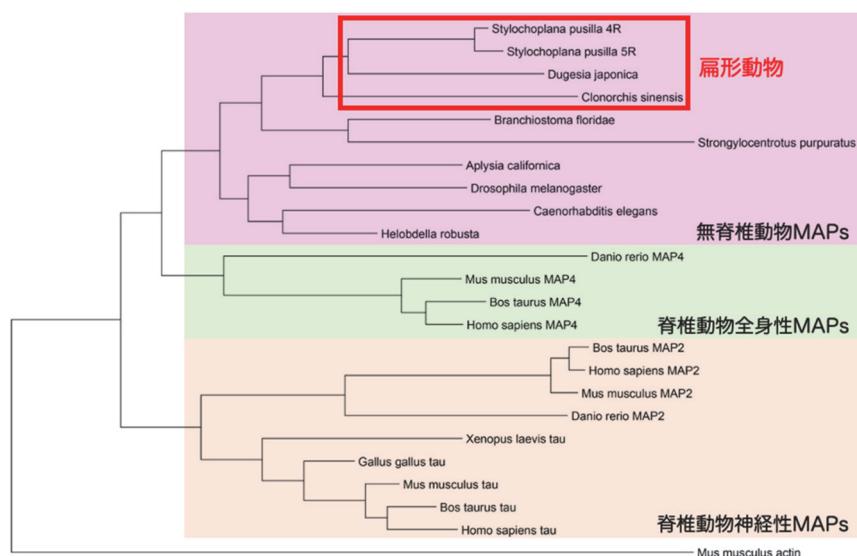


図5. MAPs ファミリーの分子系統樹解析。脊椎動物神経性 MAPs ファミリー (橙) と脊椎動物全身性 MAPs ファミリー (緑)、無脊椎動物 MAPs ファミリー (ピンク) に分かれた。赤枠：扁形動物 MAPs。

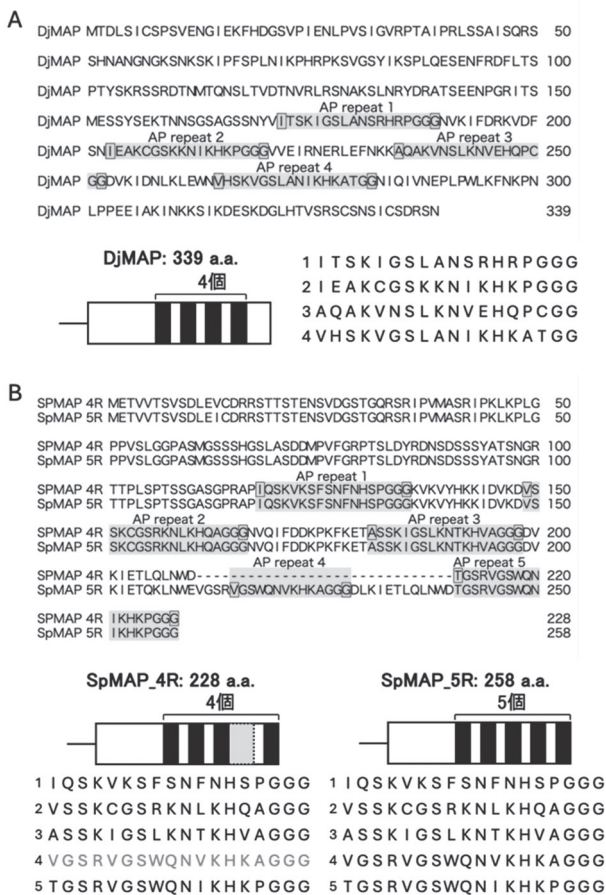


図6. ナミウズムシ MAP-like 遺伝子と SpMAP の予想アミノ酸配列の比較. (A) ナミウズムシ (*Dugesia japonica*) のゲノムから予想したナミウズムシ MAP-like 蛋白質の予想アミノ酸配列. (B) SpMAP\_4R, SpMAP\_5R の予想アミノ酸配列.

からなり、哺乳類 MAP4 同様に AP 配列や Tail 部位を有していた (図 6A)。SpMAP 4R は 228 アミノ酸残基、SpMAP 5R は 258 アミノ酸残基からなり、SpMAP 4R は SpMAP 5R の 3 番目の AP 配列の終わりから 4 番目の AP 配列の末端までが欠失した構造であった (図 6B)。また、SpMAP は哺乳類 MAP4 や DjMAP と異なり、C 末端側の Tail 部位が存在しなかった (図 6)。

## 討論

今回、我々は 2 種の SpMAP の蛋白質発現ベクターの作製に成功した。また、プラナリアの MAP 遺伝子の配列解析により、カイヤドリヒラムシでは MAP 配列が知られている他の動物種には存在する Tail 部位が存在しないことを明らかにした。今後、これら扁形動物の MAPs の微小管重合能を測定することで Tail 部位が MAP のどのような機能に関わるのかを明らかにできると考えている。また、より下等な生物の MAP 遺伝子における Tail 部位の有無を調べることで、Tail 部位を獲得した生物学的意味に迫るこ

とができると考えている。

哺乳類 MAP ファミリーでは各 AP 配列の相同性が高く、MAP4 は 5 個の AP 配列をもち、MAP2 と Tau は最大で 4 個の AP 配列をもち、哺乳類 MAP2 と Tau は MAP4 の 2 番目の AP 配列がない構造をとる<sup>1)</sup>。中間の AP 配列が失われた構造をとるという点では、哺乳類 MAP ファミリーとカイヤドリヒラムシの MAP ファミリーには共通性がある。哺乳類 MAP4 は全身の細胞で発現する一方で、MAP2 と Tau は神経細胞特異的に発現し、MAP2 は樹状突起マーカー、Tau は軸索マーカーとして知られている。扁形動物は中枢化された神経系を初めて獲得した動物と考えられており、もしかしたら SpMAP\_4R が神経細胞特異的に発現し、SpMAP\_5R は全身性に発現しているのかもしれない。今後、これらの SpMAP の発現局在を解析し、全身性と神経性のような局在の違いを明らかにすることで、左右相称動物における始原 MAP の機能と神経性、全身性の分化を明らかにしていきたい。

MAPs の Tail 部位は微小管の重合や安定性に関わるという報告がある<sup>5)</sup>。一方で、我々が明らかにした SpMAP の配列には Tail 部位が存在しなかった。カイヤドリヒラムシは血管・循環器系を獲得しておらず、いわゆる内分泌系が存在しない。そのため、神経細胞由来の内分泌物質は開口放出により体内に放出され、拡散により作用すると考えられる。Tail 部位の獲得が体内の「管」の形成を促し、高度な中枢神経系や血管・循環器系を促したのかもしれない。ヒラムシとプラナリアは同じ扁形動物でありながら、MAPs には Tail 部位の有無という違いを示す。そのため、Tail 部位の研究にうってつけのモデルなのかもしれない。

## 謝辞

本研究は、2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202305) を受けて行われた。リュウキュウナミウズムシは慶應義塾大学 松本 緑 准教授から分与いただいた。神奈川大学理学部 日野 晶也 名誉教授、神奈川大学 化学生命学部 細谷 浩史 教授に松本先生との橋渡しをしていただいた。また、室蘭工業大学 徳楽 清孝 教授、倉賀野 正弘 助教に蛋白質発現ベクターの作製法をご教授いただいた。記して感謝する。

## 文献

- 1) 小谷 享, 松島一幸, 久永眞市 (2006) 微小管結合蛋白質の構造と機能. *蛋白質 核酸 酵素* **51**:535-542.
- 2) T. Oti SI, P.T. Nghiem, Y. Hashi, N. Tsutsui, S. Kotani

- (2022) Identification of Primitive Microtubule-Associated Protein Genes using the Marine Planarian, *Stylochoplana pusilla*. *Sci. J. of Kanagawa Univ.* **33**: 85-90.
- 3) Hirooka A, Hamada M, Fujiyama D, Takanami K, Kobayashi Y, Oti T, Katayama Y, Sakamoto T, and Sakamoto H (2021) The gastrin-releasing peptide/bombesin system revisited by a reverse-evolutionary study considering *Xenopus*. *Sci. Rep.* **11**: 13315.
- 4) Hashi Y, Kotani Y, and Tkuraku K (2015) Molecular Evolution of a Group of Microtubule-Associated Proteins Sharing Partial Similarities in Their Primary Structures. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 1-6.
- 5) Seeger MA, and Rice SE (2010) Microtubule-associated protein-like binding of the kinesin-1 tail to microtubules. *J. Biol. Chem.* **285**: 8155-8162.