

博士論文

論文題目 中心体タンパク質 γ -tubulin2の機能解析

氏名 大橋 翼

要旨	2
序文	3
方法	14
結果	22
第1節 癌細胞株では γ -tubulin2が発現し細胞増殖に寄与している	22
第2節 癌細胞株では新規 γ -tubulin2スプライスバリエントが転写されている	27
第3節 γ -tubulin1と γ -tubulin2は紡錘体形成において異なる機能を持つ	38
第4節 γ -tubulin2は微小管ダイナミクスを減少させ微小管を安定化させる	52
考察	56
引用文献	64
謝辞	??

要旨

γ -tubulinは中心体における主要なタンパク質で微小管の重合核形成を促進する。本研究では初期胚で発現している γ -tubulin2がある種の癌細胞株で異所的に発現していることが明らかとなった。またその癌細胞株では γ -tubulin2の新規スプライスバリエントが転写されていることを同定したが、 γ -tubulinタンパク質としての機能は失われており、細胞内でもほとんど発現していないことが明らかになった。また γ -tubulin2は γ -tubulin1発現抑制による単極性紡錘体形成を回復できず紡錘体形成に異なる機能を持つと考えられ、 γ -tubulin2は微小管のダイナミクスを減少させ安定化することが示唆された。

序文

細胞骨格の一つである微小管は細胞形態や、紡錘体形成、細胞運動などの様々な細胞機能に深く関わり、微小管をレールとしてモータータンパク質が移動し、物質輸送を行っている。微小管は α -tubulinと β -tubulinのヘテロダイマー（チューブリンダイマー）からなるポリマーで、チューブリンダイマーがhead-to-tailで長軸方向に結合して1本のプロトフィラメントを形成し、生体内では13本のプロトフィラメントが円筒状に配置された中空状の構造をしている(図 1a)[1]。微小管上で α -tubulinと β -tubulinは交互に並び β -tubulin側をプラス端、 α -tubulin側をマイナス端と呼ぶ。

微小管の重合は*in vitro*でも再現可能な反応だが、*in vivo*に比べて最初の重合核形成のステップが、微小管伸長の速度に比べて遅い反応のため律速となっている[2]。生体内では微小管形成中心(microtubule-organizing center; MTOC)を重合核とすることで速やかな微小管形成を行っている。MTOCでは γ -tubulinなどから構成される γ -tubulin環状複合体(γ -tubulin ring complex, γ -TuRC)が微小管重合の足場としてはたらくことで、MTOCにおける微小管重合機能の実態を担っている[3]。

微小管は伸長・短縮を繰り返しており、これを微小管の動的不安定性(dynamic instability)と呼ぶ[4]。微小管のダイナミクスは4つのパラメーターに分解できる。すなわち、伸長、短縮、そして伸長から短縮への転換（カタストロフ）と短縮から伸長への転換（レスキュー）である[5]。この微小管のダイナミクスは細胞内の様々なプロセスにおいて重要である。例えば分裂期においてキネトコアと微小管が結合する際に、微小管ダイナミクスによって正しい二極紡錘体結合が確立される[6]。

α -tubulinと β -tubulinはともにGTPとの結合能を有し、GTP結合型チューブリンダイ

マーが微小管先端に付加するため、この部分をGTPキャップと呼ぶ。微小管内に組み込まれると、 α -tubulinはGTPとの結合が維持されるが、 β -tubulinに結合したGTPは加水分解しGDPに変換される[7, 8]。 β -tubulinに結合したGTPの加水分解によってチューブリンダイマーの立体構造が変化することでカタストロフを引き起こし、微小管の脱重合時にはGTP結合型チューブリンダイマーが微小管末端から放出される。精製した微小管を用いた*in vitro*の系では微小管の両端で重合・脱重合が起こるが、生体内では γ -TuRCがマイナス端をキャップし、様々なタンパク質が微小管に結合することで動的不安定性を制御しているので、*in vitro*よりも速くプラス端側に微小管が伸長していく[9, 10]。

微小管にはtauやMAP2, MAP4などの微小管結合タンパク質(microtubule associated proteins, MAPs)が結合し、微小管の安定化や束化にはたらいっている[11]。特にtauやMAP2は、微小管が多く存在する神経細胞で高発現し、微小管の安定化にはたらいっている。MAPsのなかでも特に微小管プラス端に結合するものを総称して、微小管プラス端集積因子(microtubule plus-end tracking proteins, +TIPs)と呼ぶ[12]。CLIP170は最初に+TIPsとして発見された分子量170 kDaのMAPsであり、微小管ダイナミクスにおけるレスキュー時にはたらいてカタストロフの発生を抑制している[13]。EB (end-binding)1も代表的な+TIPsであり伸長している微小管先端に結合し、CLIP170と同様にカタストロフの発生を抑制している[14]。

微小管ダイナミクスを制御するうえで重要であるのが、チューブリンダイマーの翻訳後修飾である。 α -tubulinおよび β -tubulinは細胞内において様々な翻訳後修飾を受けることが知られているが、特に微小管ダイナミクスとの関連が報告されているものに、アセチル化と脱チロシン化/チロシン化がある[15]。アセチル基転移酵素

α TAT1は、 α -tubulinの40番目のリジン(K40)残基を特異的にアセチル化する[16]。アセチル化は安定な微小管上に多く存在することから、微小管安定化の指標としてよく用いられている[17, 18]。しかし、このリジン残基は微小管上では管腔内に位置し立体構造に影響を与えることはなく、またアセチル化自体が*in vitro*における微小管の重合・脱重合には影響を及ぼさない[19, 20]。したがって、おそらくアセチル化自体が直接微小管を安定化させているわけではなく、安定な微小管が結果的にアセチル化されると考えられている。反対に脱アセチル化時には、HDAC6とSIRT2が複合体を形成して微小管を脱アセチル化する。HDAC6を阻害すると微小管の伸長と短縮の頻度が減少する[21]。脱チロシン化／チロシン化は、チューブリンに特徴的な α -tubulinのC末端におこる翻訳後修飾である。ヒトの α -tubulinには5種類のサブタイプが存在するが、そのうち3つはチロシン残基で終わっている。このチロシン残基は酵素的に除去されたり、反対に付加されたりする[22, 23]。脱チロシン化 α -tubulinもまた安定な微小管に多いと考えられている。

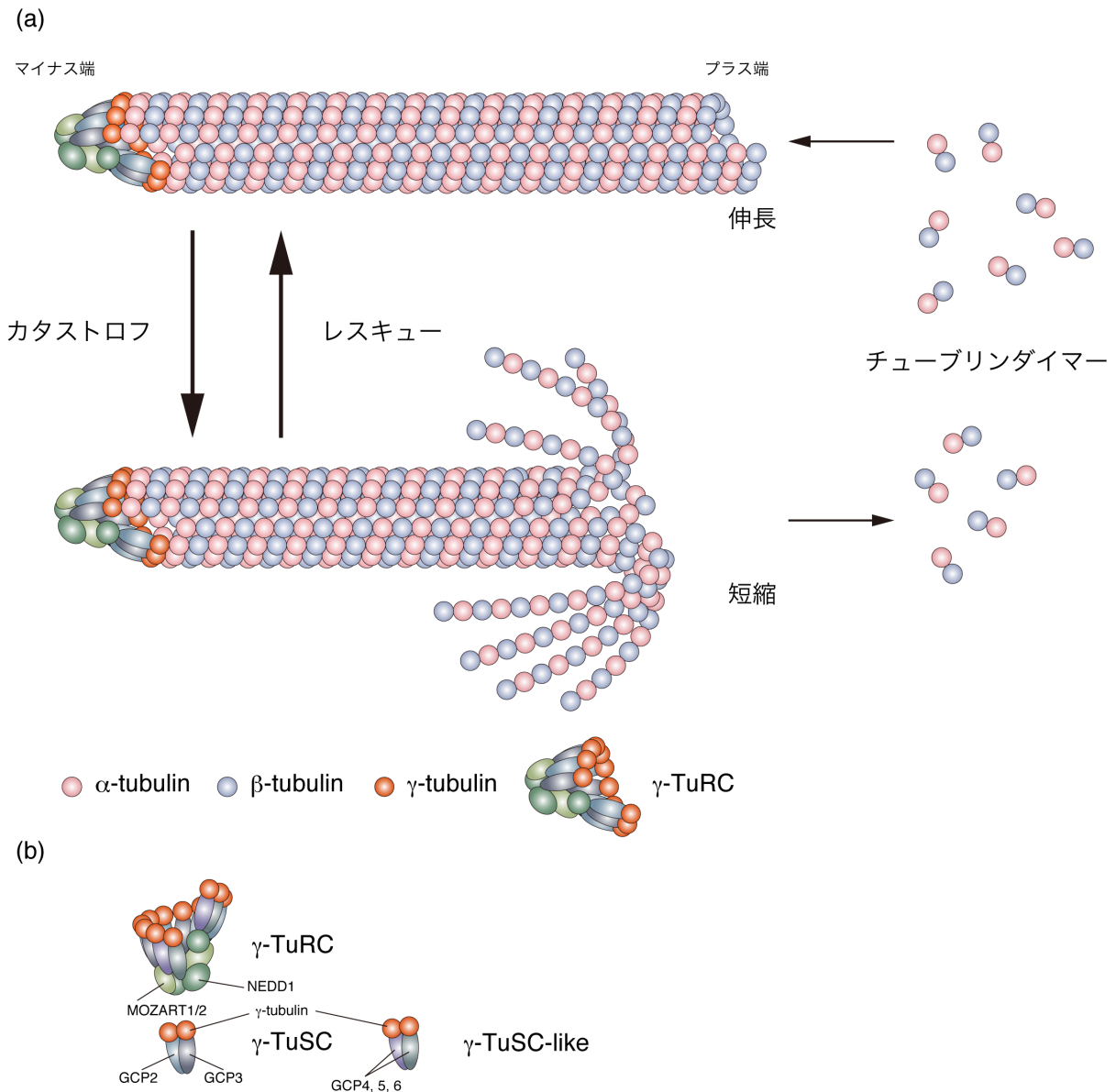


図1. 微小管と γ -tubulin環状複合体の模式図 (a)微小管ダイナミクスの模式図。微小管のマイナス端は γ -TuRCによりキャッピングされているが、プラス端は伸長と短縮を繰り返す。伸長時にはチューブリンダイマーが結合し、反対に短縮時にはチューブリンダイマーが放出される。伸長から短縮への転換をカタストロフ、その反対に短縮から伸長への変換をレスキューと呼ぶ。(b) γ -tubulin複合体の模式図。 γ -TuRCは γ -tubulin, GCP2, GCP3からなく γ -TuSCを核にしてNEDD1やMOZART1/2などが結合し形成する。GCP4, 5, 6も γ -TuSC様複合体を形成し、 γ -TuRC形成に関わっている。

中心体は核に近接した細胞内小器官の一つであり、動物細胞における主要なMTOCとしてはたらく、1対の中心小体 (centriole) とそれを取り囲む中心体周辺物質 (Pericentriolar material, PCM) から構成されている。中心小体は中心体の核であり、9つの三連微小管が放射状に配置され、中心体の維持や複製に重要な構造体である[24]。中心体には様々なタンパク質が集積しており、中心小体の近位にはCep135やCep68が、遠位にはCentrinやCP110が局在している。PCMにはPericentrin, CG-NAP, Cep192などcoiled-coilを含むスキヤフォールドや、Plk1, Aurora Aなどのキナーゼ、PP2AやPP4Cなどのホスファターゼ、 γ -tubulinやchTOGなどの微小管重合を制御するタンパク質など、200種類を超えるタンパク質より構成されている[25]。これまでPCMは、PericentrinやCG-NAPなどの高分子タンパク質を多量に含むことから網状構造をしていると考えられてきたが、近年の報告でPCMは実は秩序立ったレイヤー構造をしていることが明らかとなっている(図2)[26]。

中心体は細胞内に1つあるいは2つ存在する細胞内小器官で、その数は厳密に制御されている。G1期の細胞には中心体は1つだけしか存在しないが、細胞周期を通じて染色体複製と協調的にG1後期からS期にかけて1回だけ複製される。中心体の複製時にはPlk4が活性化し、母中心小体にSas6やCep135によってカートホイール構造が構築されることで新規に中心小体を形成する[27, 28, 29, 30]。分裂期に入ると中心体は紡錘体極としてはたらく[31]。分裂期の開始時には中心体成熟と呼ばれるPCMの膨大化が起こり、中心体から紡錘体微小管の形成に必要なMTOC活性を上昇させる[32, 33]。中心体成熟時にはCep192を介して γ -tubulinやpericentrin, Aurora Aなどが集積する。

多くの癌細胞では、中心体複製の過程に変異が入ることで数の異常がしばしば観察され、p53やBRCA1などの癌関連遺伝子の変異は中心体の過剰複製を引き起こす[34, 35]。また中心体異常は染色体不安定性(chromosome instability, CIN)と呼ばれる染色体数や構造の異常を引き起こすことが報告されている[36, 37]。そのため正確な染色体分配を行うためには中心体が正しく制御されることが必須である。

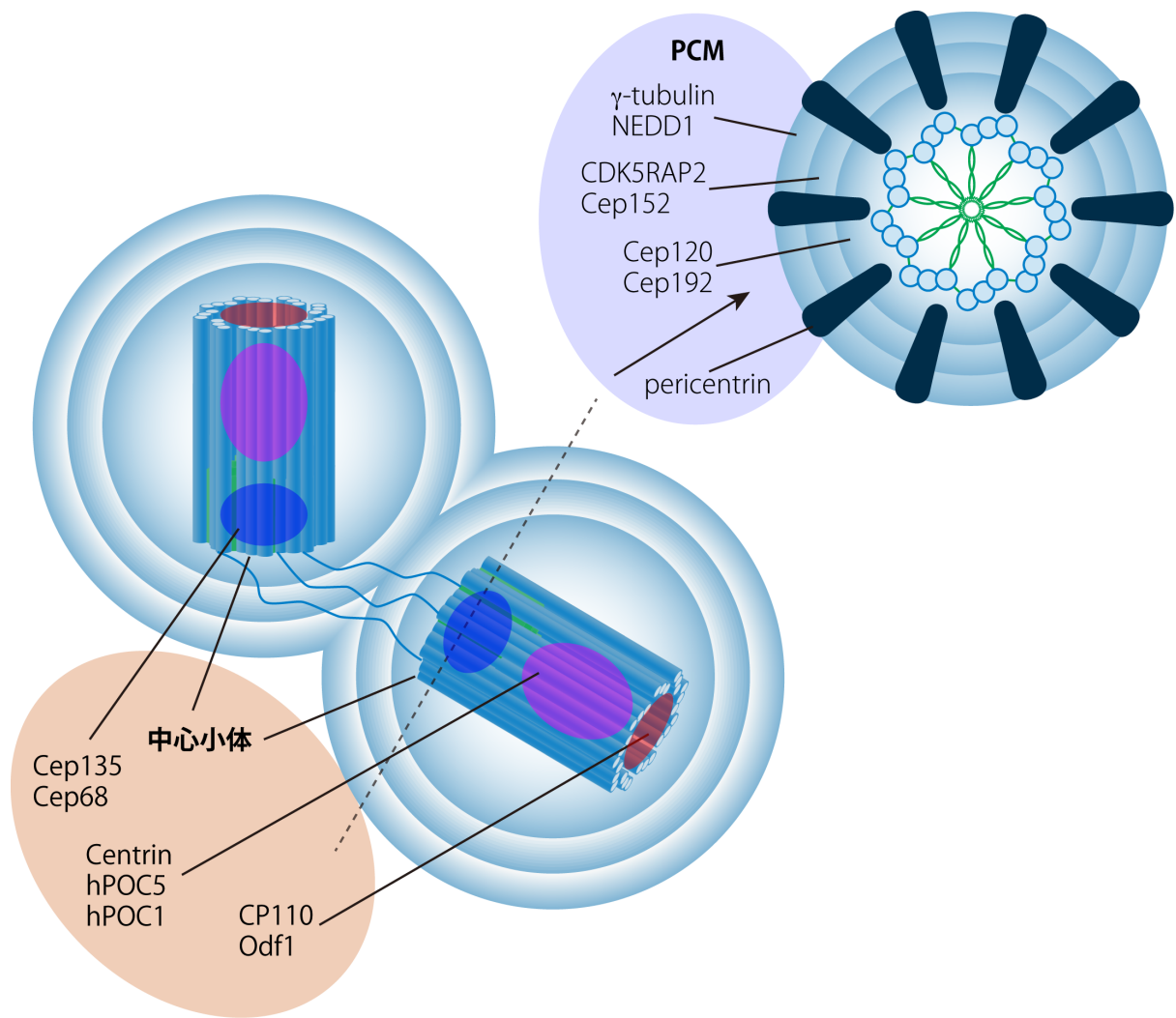


図2. 中心体の構造と局在するタンパク質 中心体は1対の中心小体とそれを取り囲むPCMから構成される。

γ -TuRCは、 γ -tubulinを含む複合体で主にPCMに局在して、微小管の重合核形成に寄与している[38]。 γ -TuRCは二つの γ -tubulin, GCP2(γ -tubulin complex protein2), GCP3からなる4量体の γ -tubulin小複合体(γ -tubulin small complex, γ -TuSC)が核となり、さらにGCP4, 5, 6, NEDD1(GCP-WD)などが結合して環状の複合体を構成する(図 1b)[39, 40, 41]。GCP2, 3, 4, 5および6はGripモチーフを持つ互いによく似たファミリーであり、構造も似ていることからGCP4, 5, 6も γ -TuSC様の構造をとることが推定されている[42, 43]。 γ -TuRCにはGCPモチーフを含まないNEDD1やMOZART1/2なども結合しており、NEDD1は γ -TuRCの形成に必須ではないが、分裂期に γ -tubulinを介して γ -TuRCを中心体に輸送する[44]。

γ -tubulinは酵母からヒトまで真核生物では広く保存されたタンパク質である[45]。哺乳動物以外の脊椎動物では γ -tubulin遺伝子は1種類しか存在しないが、哺乳類では2種類の γ -tubulin遺伝子(*TUBG1*, *TUBG2*)が存在する(図 3a)。 γ -tubulin1と γ -tubulin2は相同性が非常に高くヒトでは98%のアミノ酸が同一で、保存された γ -tubulin1と2の相違はC末端に位置する6アミノ酸のみである(図 3b)。 γ -tubulin1と2では発現組織に違いがあり γ -tubulin1は生体組織でユビキタスに発現しているが、 γ -tubulin2は初期胚と脳のみで発現している[46]。そのため γ -tubulin2に対する研究はほとんど進んでおらず、 γ -tubulin1と同様にGCP2やGCP4と結合して γ -TuRC複合体を構成し中心体に局在できるが、 γ -tubulin1との機能的な違いは明らかになっていない[47]。

γ -tubulin2のように、主に初期胚特異的に発現し、体細胞ではほとんど発現が見られない遺伝子は多数存在するが、このようなタンパク質は癌化すると異所的に発現が向上する例が知られている。分裂期キナーゼのAurora-Cはマウスの精子と卵母細胞から同定されたAuroraキナーゼの一種で、機能的にほぼ同一のAurora-Bがユビキタスに発現しているがAurora-Cは精巣と4細胞期胚までの初期胚でしか発現が認められない[48]。しかし、一部の癌細胞株では生殖細胞由来ではないにも関わらずAurora-Cが高発現し、Aurora-C依存的に増殖している[49]。

γ -tubulin2もAurora-Cと同様に主に初期胚で発現して多くの体細胞では発現が見られないが、癌細胞での発現は解析されていない。また γ -tubulin1と2の機能の違いはも未だ明らかではない。そこで、本研究ではこれらを解明するため、以下の2点を目的とした。

1. 癌細胞における γ -tubulin2の発現を確認する
2. γ -tubulin1と γ -tubulin2の機能の違いを明らかにする

まず癌細胞株における γ -tubulin2の発現解析を行った結果、一部の癌細胞株では γ -tubulin2が異所的に高発現していることを明らかにした。さらに、癌細胞株では γ -tubulin2の新規スプライスバリエントが発現していたが、 γ -tubulinとしての機能を有しておらず、タンパク質への翻訳もされていないことを示した。次に γ -tubulin1と γ -tubulin2の機能の違いを解析するため、細胞内の γ -tubulin量を変動させると、 γ -tubulin1の発現抑制した時に双極性紡錘体が形成されず単極性になることが分かり、

さらに γ -tubulin1と2では微小管ダイナミクスに与える影響が異なることで、双極性紡錘体形成において異なる機能を有することを明らかにした。

方法

抗体

抗 γ -tubulin (GTU-88), 抗 α -tubulin (DM1A), 抗GCP2 (SAB1410131), 抗GCP3 (SAB1100887), 抗GCP4 (SAB1407343), 抗GCP5 (SAB4500262), 抗FLAG (M2)抗体はSigma社より購入した。抗 γ -tubulin (H-183)抗体はSanta Cruz Biotechnologies社より購入した。pericentrin抗体はCovance社より購入した。抗mouse HRP抗体はGE healthcare社より購入した。Alexa Fluoro 488抗ウサギ抗体, Alexa Fluoro 555抗マウス抗体はInvitrogen社より購入した。

細胞培養

HeLa, A431, CaR-1, K119, TCO2, KOA2, HepG2, WI38, IMR90は10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, ニッスイ) を用い37 °C、5% CO₂の環境下で培養した。HCT116, Saos2, Panc-1, KP-1N, SKBR3, MDAMB468, NUGC-3, MDAMB453, HCC1143, ZR-75-1, HCC1937, U2OS, BT474, MCF7, MDAMB436, HCC1395は10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地 (Wako) を用い37 °C、5% CO₂の環境下で培養した。

発現プラスミド

γ -tubulinにFLAGタグを付加した形で発現させるため、TUBG1 cDNAはTUBG1_Fw: 5'-GTTGGGCGGCCGCATGCCGAGGGAAATCATCACC-3' 及びTUBG1_Rv: 5'-GTACAGTCGACTCTGCTCCTGGGTGCCCCAG-3' を用いて、TUBG2A/B cDNAはTUBG2_Fw: 5'-

GTTGGGCGGCCGCATGCCCCGGGAGATCATCAC-3' 及びTUBG2_Rv: 5'-

GTACAGTCGACACTGCTCCTGGGTGCCC-3' を用いてPCRによって増幅した。PCR産物は*NotI*および*SaI*による制限酵素処理後、pCMV-Tag4Cベクター (Stratagene)に導入し使用した。 γ -tubulinは当研究室が保有していたpME18Sベクター[50]に組み込まれたもの、もしくはpCMV-Tag4Cに組み込まれたものをcDNAとFLAG配列の間が終止コドンとなるよう変異を導入したものを使用した。

遺伝子導入

2.5×10⁵個の細胞を35 mm dishに播種し一晩培養した。6 μ lのTransIT-LT1(TaKaRa)と2 μ gのプラスミドを100 μ lのOpti-MEM (Gibco)に懸濁し15分間静置した後に培地へ添加した。

RNAi

使用するsiRNAの設計にはsiDirect(<http://sidirect2.rnai.jp/>)を利用して標的配列を決定した。設計したsiRNAは日本バイオサービス社に依頼し、標的遺伝子に対するsiRNAを合成・アニーリングした。以下に、今回の実験において使用したsiRNAの配列について示す。なお図 14から18ではcontrol siRNAとしてTUBG2 siRNA #2を使用した。

TUBG2 #1 sense	GGACAGGUCUAGGGAGGUUTT
antisense	AACCUCCCUAGACCUGUCCTT
TUBG2 #2 sense	GGAAGCGGGAUGCCUUCCTT
antisense	AGGAAGGCAUCCCGCUUCCTT
TUBG2 #3 sense	UCCUCGAGCAGUUCGUAATT
antisense	UUACGGAACUGCUCGAGGATT
TUBG2 #4 sense	GCAGUUCGUAAGGAGGACTT

	antisense	GUCCUCCUUACGGAACUGCTT
TUBG1 #1	sense	GGACAUUUUUGACAUCAUATT
	antisense	UAUGAUGUCAAAAUGUCCUC
TUBG1 #2	sense	CCUCUUAUGAGACUAUUUATT
	antisense	UAAAUAGUCUCAUAAGAGGAG

siRNAの導入は図4の通りに行った。Day -3では、15 μ lの20 μ M siRNAと15 μ lのLipofectamine RNAiMax (invitrogen)を、100 mmディッシュ上の2 mlのOpti-MEMに懸濁し15分間静置した。ディッシュに 3.0×10^5 cells/8.0 mlとなるように希釈した細胞を加えて、37°Cで3日間培養した。Day 0では、3 μ lの20 μ M siRNAと3 μ lのLipofectamine RNAiMaxを、35 mmディッシュ上の500 μ lのOpti-MEMに懸濁し15分間静置し、トランスフェクションした細胞を 2.0×10^5 cells/1.5 mlになるよう希釈して加え、37°Cで再度培養した。レスキュー実験ではDay 0でのsiRNA導入10時間後に培地を交換し、その1時間後に遺伝子導入を行った。

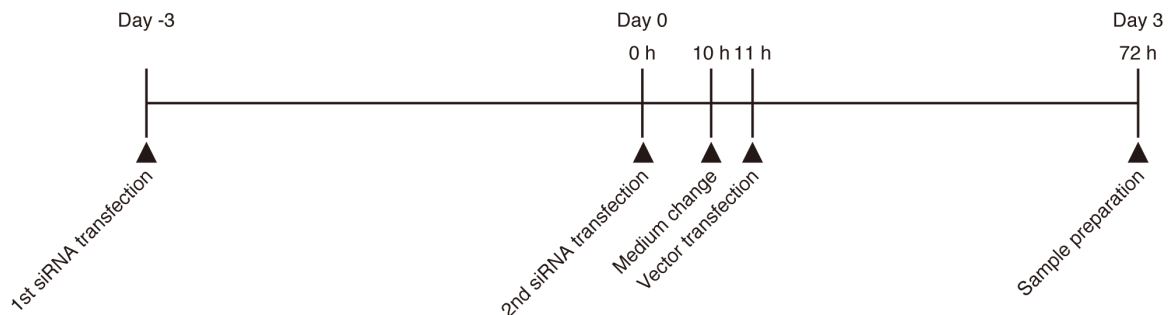


図 4. siRNA導入の概略図

ウェスタンブロッティング

細胞は 2.0×10^5 個回収し、PBS(-)で3回洗浄して1×SDS-PAGE sample buffer(62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue, 10% glycerol)に懸濁した後、10分間煮沸した。ヒト脳ライセートはabcam社より購入した。マウス脳は、摘出した後PBS(-)で洗浄してTNE buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 150

mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40)を加えホモジナイズした。抽出液は15,000回転、4°Cで30分間遠心して上清を回収し、等量の2×SDS-PAGE sample buffer(125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 0.2% Bromophenol Blue, 20% glycerol)に懸濁した後、5分間煮沸した。SDS化サンプルは、SDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により定電圧120 mAで約90分間泳動した。SDS-PAGEに用いたゲルは目的に応じて異なる組成のものを使用した。ミニゲルでのヒト γ -tubulinの検出には10% low-bisゲル(9.9% アクリルアミド:0.1% N, N'-メチレンビスアクリルアミド)を、マウス γ -tubulinの検出には4 M尿素入り10% low-bisゲル(9.95% アクリルアミド:0.05% N, N'-メチレンビスアクリルアミド)を用いた。ラージゲルでの γ -tubulinの検出には、10% low-bisゲルまたは12.5% low-bisゲル(12.3% アクリルアミド:0.2% N, N'-メチレンビスアクリルアミド)を用いた。 α -tubulinの検出には10%ゲルを用いた。泳動後、ゲルをTransfer buffer (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20% (v/v) Methanol)で10分間振盪し、同様に処理したImmobilon-P (Millipore)、濾紙を用いてセミドライ方式で、ミニゲルの場合は100 mAでラージゲルの場合は250 mAの定電圧で60分間転写した。転写終了後、メンブレンをTBS(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl)で5分間洗浄し、ブロッキング溶液 (3%スキムミルク/0.05% TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 0.05% Tween-20)) で室温2時間で振盪しブロッキングを行った。0.05% TBSTで3回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体液と4°Cで18時間反応させた。0.05% TBSTで3回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体と室温1時間反応させた。0.05% TBSTで3回洗浄し、Western Lightning Plus-ECL (Parkin Elmer)またはImmobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を用いて検出した。Rf値

の測定にはImageJ (National Institute of Mental Health)を用いて算出した。なお一次抗体は、マウス抗 γ -tubulin抗体 (GTU-88) 1:2000, マウス抗 α -tubulin抗体 (DM1A) 1:4000の濃度で用いた。

免疫沈降法

細胞をPBS(-)で洗浄し、TNE buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, protease inhibitor (Roche))で溶解した。 γ -tubulinの免疫沈降は、細胞抽出液に抗 γ -tubulin抗体(H-183)を加え、4°Cで2時間ローテートした。さらに15 μ lのProtein G Sepharose 4 Fast Flow (GE healthcare)を加え、再度4°Cで1時間ローテートした。FLAGタグ融合タンパク質は、抗FLAG M2アフィニティーゲル (Sigma)を加えて4°Cで2時間ローテートした。TNE bufferで3回洗浄後、1 \times SDS-PAGE bufferを加えて5分間煮沸した。遠心後、上清をウェスタンブロッティングに使用した。

二次元電気泳動

細胞をPBS(-)で洗浄後、Lysis buffer (8 M Urea, 20 mM DTT, 1% Triton X-100, Protease inhibitor)で溶解した。15,000 rpm, 4°Cで30分間遠心し、上清を回収した。得られたサンプルは2D Clean-Up Kit (GE healthcare)を用いて沈殿させ、IPG buffer (pH 4-7, GE healthcare)を加えたDeStreak Rehydration Solution (GE healthcare)で可溶化した。12,000 rpm, 4°Cで10分間遠心後、上清はImmobiline DryStrip (pH 4-7, 13 cm)およびEttan IPGphor 3 IEF System (GE healthcare)を使用し等電点電気泳動を行った。20°Cで11時間インキュベートしてストリップを膨潤させた後、次のプログラムで泳動した。

ステップ1: 500 V, 1時間

ステップ2: 1000 V, 1時間
ステップ3: 8000 V, 2時間30分
ステップ4: 8000 V, 55分
ステップ5: 500 V, ∞

泳動終了後、ストリップをequilibration buffer A (0.25% DTT / equilibration buffer base(50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6M Urea, 30% Glycerol, 1% SDS, 0.002% Bromophenol blue))に浸し、10分間振盪した。続いてストリップをequilibration buffer B (4.5% Iodoacetamide / equilibration buffer base)に移し10分間振盪した。ストリップは二次元用コウム(日本エイドー)を用いて作製されたSDS-PAGEゲルにのせ、0.5%アガロースで固定した後、電気泳動を行った。

免疫蛍光染色

培養細胞の免疫染色では、まずPBS(-)で洗浄し-20°Cメタノールで3分間固定した。再びPBS(-)で5分間3回洗浄した後、一次抗体と室温1時間で反応を行った。PBS(-)で5分間3回洗浄した後、二次抗体および5 µg/ml Hoechst33342と室温1時間で反応を行った。TBSTで3回洗浄後、包埋剤を用いてスライドガラスに固定した。

卵母細胞の免疫染色では、全ての作業をLow well plate (IWAKI)を用いて行った。回収した卵母細胞は0.5% polyvinylpyrrolidone/PBSで洗浄し、酸性タイロードで透明帯を除去した。

なお一次抗体は、マウス抗 γ -tubulin抗体 (GTU-88) 1:2000, マウス抗 α -tubulin抗体 (DM1A) 1:1000, ウサギ抗pericentrin抗体 1:1000, ウサギ抗CEP135抗体 1:500, ウサギ抗FLAG抗体(D-8) 1:250, マウス抗FLAG抗体 (M2) 1:200の濃度で、二次抗体は全て1:1000の濃度で用いた。

ライブイメージング

タイムラプス観察はDeltaVision SoftWorx (Applied Precision)によって制御されたOlympus IX-70 inverted microscope (Olympus)で行い、レンズは60x 1.30 NA silicone oil objective lens (Olympus)を使用した。全ての画像はSoftWorxでdeconvolutionを行い、必要に応じてmaximum intensity projectionを行った。EB1-GFPの解析にはImageJ (NIH)を使用した。

RT-PCR

各癌細胞株からRNAqueous Kit (Ambion)を用いてTotal RNAを抽出した。得られたTotal RNAはDNase I (TaKaRa)を用いてDNase処理を行い、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)およびOligo d(T) primerを用いてcDNAライブラリーを作製した。合成したcDNAを元にBlend Taq (TOYOBO)を用いてPCR反応を行った。RT-PCRには表1に記したプライマーを用いた。PCR反応産物は8%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ゲルはエチジウムブロマイドで染色した。

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Size
<i>TUBG2A</i>	GATGGAAGTGACAGTTTGGAGGG	CTGTCATTCAGTCGCTCCAGG	101
<i>TUBG2B</i>	AGCTCCAGAACAGCTCCAGA	CGTTCTGCGTCAGCCTCTTG	225
<i>TUBG2A/B</i>	AACTGGGCCAGCGGATTCTC	CTGTCATTCAGTCGCTCCAGG	173, 200
<i>TUBG2</i>	AACCACACCAGCATCTCCTC	CGAGGCTGTGGTTACCATCT	268
<i>TUBG1</i>	AACCACACCAGCATCTCCTC	CAGTAAGGCAGATGAGGGTCC	254
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	46

表 1. 本実験のRT-PCRで使したプライマー

TUBG2のクローニング

HeLa細胞のcDNAライブラリーから*TUBG2* cDNAを特異的に増幅させるため、Primer 1 (5'-ATT CGT CTC AGC CGT GAC TC)とPrimer 2 (5'- ATG GTC GAG GCT GTG GTT AC-3')を用いてPCRを行った。このPCR産物を鋳型として、PCR産物の内側を認識するプライマーPrimer 3 (5'-TCT GAG ATA TCA TGC CCC GGG AGA TCA TCA C-3')およびPrimer 4 (5'-GTG GGG CGG CCG CTC ACT GCT GGG TGC CCC-3')を用いてnested PCRを行った。得られたPCR産物はQIAGEN II Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精製し、*EcoRV*および*NotI*で切断後pBlueScript II SK (+)にサブクローニングした。

卵母細胞の回収

MII卵の採卵は、生後8~10週齢の雌個体に対して5 IUの妊馬血清性腺刺激ホルモン(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)を腹腔内投与し、その48時間後に5 IUの胎盤性性腺刺激ホルモン(human chronic gonadotropin, hCG)を腹腔内投与することにより過排卵を誘起した。hCG投与16時間後に卵管を採取し、100 µg/mlヒアルロニダーゼを含むM2培地中で、卵管膨大部を裂き卵丘卵子複合体を引き出した。卵母細胞はガラスピペットを用いてM2培地(Sigma)中で卵丘細胞を外し、M16培地(Sigma)のドロップで3回洗浄した後に37°Cで培養した。

GV卵の採卵には、生後8週齢の雌個体に対してPMSGを投与し、その48時間後に卵巣を採取した。0.2 µM dbcAMPを含むMII培地中で卵巣をニードルで裂き、GV卵を回収した。

結果

第1節 癌細胞株では γ -tubulin2が発現し細胞増殖に寄与している

γ -tubulin2は胚盤胞期胚および脳で発現していることが報告されている[46]。一方癌細胞との関連では、非小細胞性肺癌で γ -tubulin2のmRNA発現が上昇している報告がある[51]。しかし癌細胞での発現が、タンパク質レベルで解析された例はない。 γ -tubulinは癌と強く関連し癌細胞でタンパク質の発現が上昇することが知られているが、 γ -tubulin2の検出が困難なこともあり(後述)、癌細胞で発現している γ -tubulinタンパク質は1と2のどちらかなのかは検討されていなかった。

そこで癌細胞株においてどちらの γ -tubulinが発現しているのかを解析した。

1-1 一部の癌細胞株では γ -tubulin2が異所的に発現している

癌細胞株における γ -tubulin2の発現をタンパク質レベルで調べるためには、 γ -tubulin1と2を区別して検出する必要がある。タンパク質発現の検出には γ -tubulin2のみを認識する抗体があればウェスタンブロッティングにより発現量を調べることが可能だが、これまでに市販されている抗 γ -tubulin抗体は γ -tubulin1と2の共通部位を認識するため、従来の方法では γ -tubulin1と2の発現をそれぞれに検出できなかった。また分子量が異なればSDS-PAGEにより分離することが出来るが γ -tubulin1と2はともに451アミノ酸からなり分子量がほぼ同じであることから、これまでの方法では分子量による分離が困難であった。そこでまず γ -tubulin2の発現を検出する手法の開発を行った。 γ -tubulin1および2を過剰発現させた細胞抽出液を電気泳動すると、わずかながら移動度に差があったことからSDS-PAGEゲルの組成を変化させることにより、移動度の違いを増幅することを試みた。分子量の異なるタンパク質を分離する場合、

一般的にSDS-PAGEゲルに含まれるアクリルアミドの濃度を調節して分離を行うが、今回のように近接した分子量のタンパク質を分けることは難しい。そこで、リン酸化タンパク質の検出などに用いられるlow-bisゲルを用いることにした。タンパク質がリン酸化などの翻訳後修飾を受けると、SDS-PAGE上のバンドがわずかにシフトすることがある。low-bisゲルはゲル作製時に使用するN,N'-メチレンビスアクリルアミドの割合(%C, ビスアクリルアミドの重量/アクリルアミドとビスアクリルアミドの総重量)を通常の3.3%(ビスアクリルアミド:アクリルアミド=1:29)よりも下げたアクリルアミド溶液を用いて作製されたゲルで、近接したバンドの分離能を向上させることでバンドシフトを検出する。ゲル濃度(%T)を10%に固定し% Cを0.5%から3.3%までの条件で、 γ -tubulin1および γ -tubulin2を過剰発現させたHeLa細胞の抽出液を泳動しウェスタンブロッティングを行った。その結果 γ -tubulin1と2は% Cが1.0%のゲルで最もよく分離した(図 5a)。コントロールとして γ -tubulin2が発現しているヒト脳サンプルでも同様の解析をしたところ、同じ位置に二つのバンドが検出された。 γ -tubulin2を発現させた時のみ上側のバンドが検出されることから、下側のバンドが γ -tubulin1で上側のバンドが γ -tubulin2であると結論した。

次にこの方法を用いてヒト癌細胞株における γ -tubulinの発現パターンを解析した。25種類のヒト癌細胞株について検討した。一部の細胞では γ -tubulin2よりも高分子量側に非特異的なバンドが検出されたが、15種類の細胞株ではコントロールの γ -tubulin2と同一の位置にバンドが検出された(図 5b, 表 2)。

以上の結果から、 γ -tubulin2は一部の癌細胞株で異所的に発現していることが示唆された。

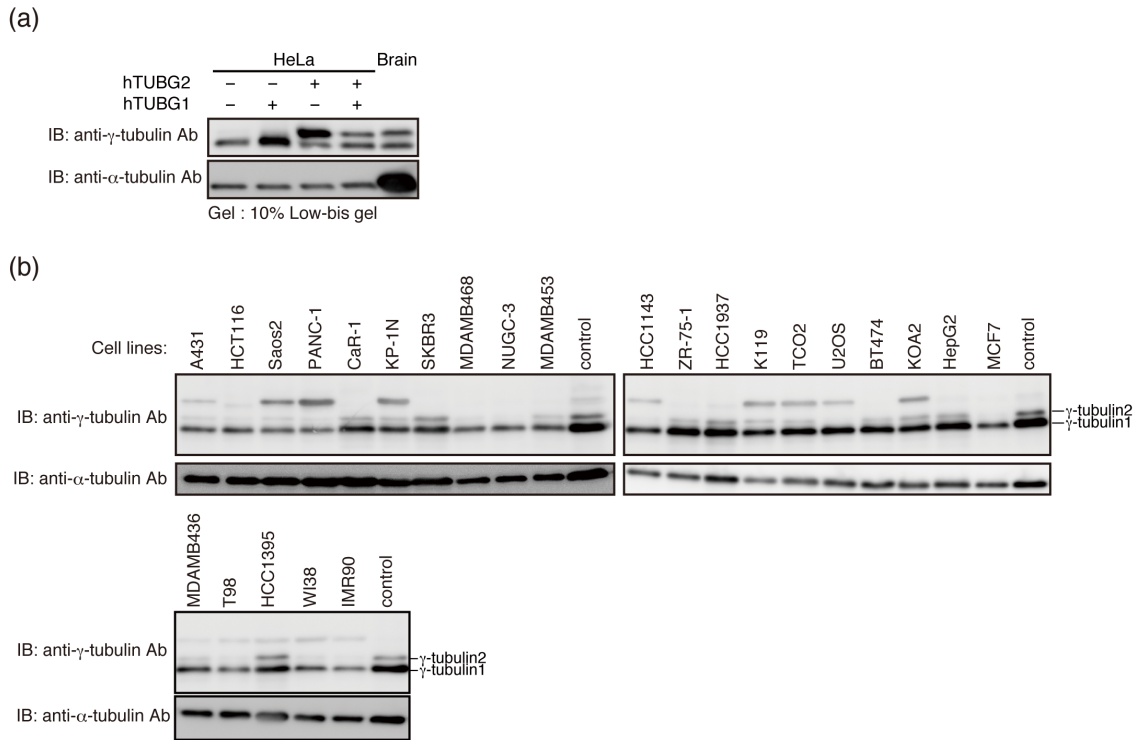


図 5. γ -tubulin2の発現解析 (a) γ -tubulin1, 2を導入したHeLa細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロッティングにより γ -tubulinまたは α -tubulinを検出した。SDS-PAGEのゲルにはlow-bis gelを使用した。(b) ヒト癌細胞株における γ -tubulinのウェスタンブロッティング。

γ -tubulin2 expressing cell lines	A431	Saos2	CaR-1	KP-1N	SKBR3
	epidermoid cancer	osteosarcoma	rectum cancer	pancreatic cancer	breast cancer
	MDAMB453	ZR-75-1	HCC1937	K119	TCO2
	breast cancer	breast cancer	breast cancer	thyroid cancer	cervix cancer
	BT474	KOA2	HepG2	MDAMB436	HCC1395
breast cancer	thyroid cancer	liver cancer	breast cancer	breast cancer	
γ -tubulin2 non-expressing cell liens	HCT116	PANC-1	MDAMB468	NUGC-3	HCC1143
	colorectal cancer	pancreatic cancer	breast cancer	gastric cancer	breast cancer
	U2OS	MCF7	T98	W138	IMR90
	osteosarcoma	breast cancer	glioblastoma multiforme	lung fibroblast	lung fibroblast

表 2. γ -tubulin2発現および非発現細胞株 図 5bより γ -tubulin2のバンドが検出された細胞およびされなかった細胞を表にまとめた

1-2 癌細胞株での γ -tubulin2の発現抑制

続いて、癌細胞株で検出された上側のバンドが本当に γ -tubulin2であることを確認するため、 γ -tubulin2に対するsiRNAを用いて発現抑制実験を行った。 γ -tubulin2のみを特異的に発現抑制するため、 γ -tubulin1と相同性の高い配列を含まないようにsiRNAを設計した。 γ -tubulin2の発現が示唆された3種類の癌細胞株(HCC1395, CaR-1, SKBR3)にsiRNAを導入して4日間培養した後、細胞を回収しlow-bisゲルを用いてウェスタンブロッティングを行った。設計した4種類のsiRNAのうち#2を除く3種類で上側のバンド強度が減少していた(図 6a)。下側の γ -tubulin1の発現量にはほぼ影響がなかったことから、これらのsiRNAはTUBG2 mRNAを特異的に認識・分解すること、及び上側のバンドが γ -tubulin2であることが支持された。このことから、 γ -tubulin2は本来発現していないはずの癌細胞株で異所的に発現していることが示された。

続いて、癌細胞で発現する γ -tubulin2が細胞内で機能しているかどうかを調べるため、 γ -tubulin2の発現抑制による細胞増殖速度に対する影響を調べた。上記の3種類の γ -tubulin2発現細胞株にTUBG2 siRNAを導入した後の細胞数を計測したところ、 γ -tubulin2のタンパク質量が減少しなかったTUBG2 siRNA#2を導入した細胞に比べて、TUBG2 siRNA #1, 3, 4を導入したHCC1395細胞では有為に増殖を抑制していた。CaR-1およびSKBR3細胞では、#3を導入した細胞で増殖速度への影響が認められなかったが、#1, 4を導入した細胞で増殖速度が有為に抑制された(図 6b)。これらの結果から、一部の癌細胞株で異所的に発現する γ -tubulin2は細胞の増殖に寄与していることが示唆された。

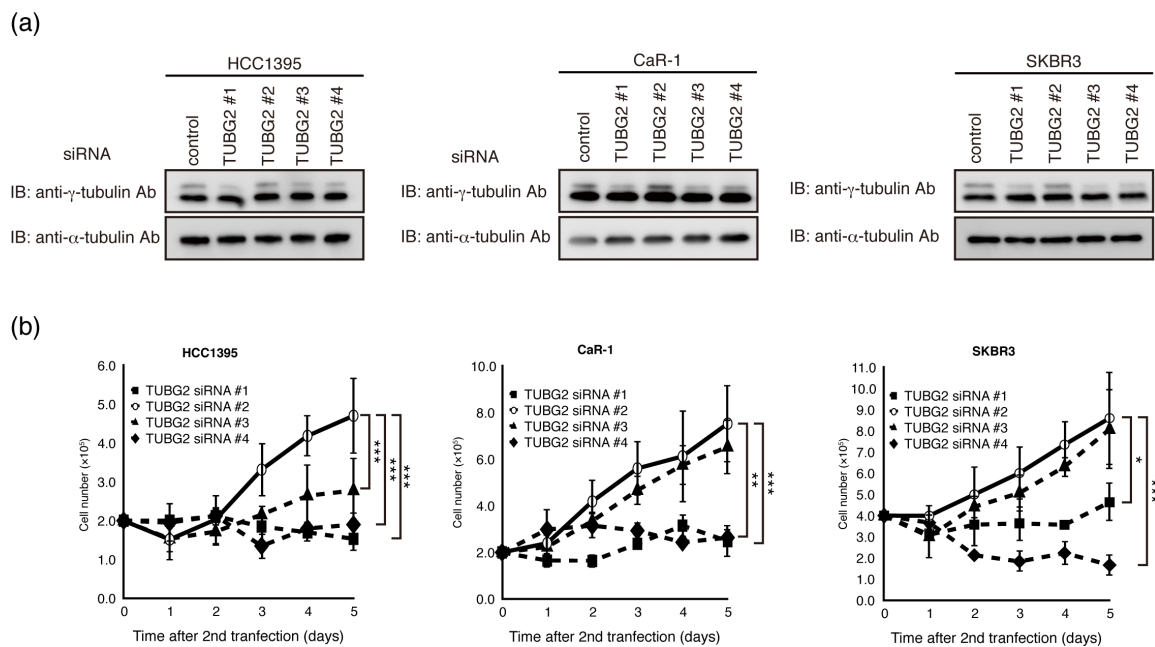


図 6. γ -tubulin2の発現抑制 (a) γ -tubulin2の発現を抑制したHCC1395, CaR-1, SKBR3細胞のウェスタンブロットティング。細胞はsiRNAをトランスフェクション後96時間で回収し図5と同様の方法で解析した (b) γ -tubulin2を発現抑制したHCC1395, CaR-1, SKBR3細胞の増殖曲線。細胞数は2回目のトランスフェクションから5日間カウントした。独立した実験を3回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。有意差はStudent's t-testで算出した。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

第2節 癌細胞株では新規 γ -tubulin2スプライスバリエントが転写されている

2-1 癌細胞株で発現している γ -tubulin2の解析

癌細胞では遺伝子に変異が生じることで悪性の形質を獲得することが知られている。そこで癌細胞株で発現している γ -tubulin2に変異が存在するかについて解析を行った。HeLa細胞より*TUBG2*のcDNAをクローニングし配列を確認したところ、2種類の*TUBG2*遺伝子を同定した。一方はデータベース上に登録されている既知の配列 (accession number: NM_016437.2) と同一であったが、もう一方の配列は既知の*TUBG2* cDNA内部に27塩基の挿入配列が含まれていた(図 7a)。これら2種の*TUBG2*配列を区別するため、既知のものを*TUBG2A* (γ -tubulin2A)、新規に同定した*TUBG2*を*TUBG2B* (γ -tubulin2B) と命名した。*TUB2B*挿入配列のゲノム上の位置を確認したところ、*TUBG2A*のエキソン4とエキソン5の間のイントロン内に存在することが分かった。イントロンはGTで始まりAGで終わるというGT-AG則があるが、この挿入配列の直前にAG、直後にはGTが存在することから前後の配列がイントロンとして認識され、この領域が新規エキソン(エキソン4B)になったと考えられる(図 7b)。エキソン4Bを含むイントロン4を哺乳動物間で比較してみると、霊長類ではいずれも約2 kbpであり、全てにエキソン4Bと相同な配列が含まれていた。一方、霊長類以外の哺乳動物のイントロン4はどれも600 bp未満と霊長類に比べて短く、またエキソン4Bと相同な塩基配列も存在しなかった(図 7c)。これらの結果から、HeLa細胞よりクローニングされた*TUBG2B*(γ -tubulin2B)は新規 γ -tubulin2スプライスバリエントであり、*TUBG2B*は霊長類で特異的に転写されていることが示唆された。

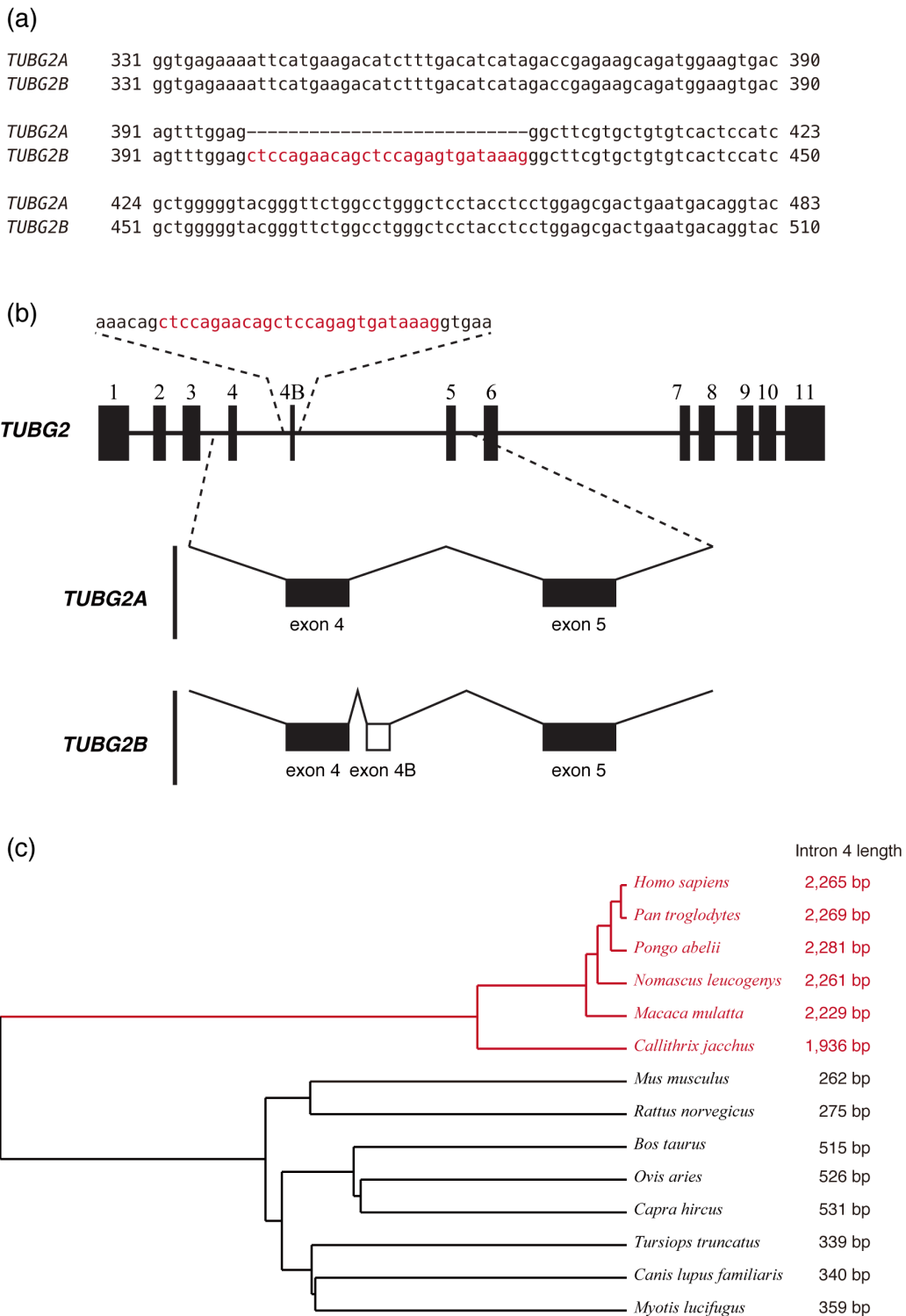


図 7. γ -tubulin2B新規スプライスパリアント (a) *TUBG2* mRNAの塩基配列。赤字は*TUBG2B*に特異的な挿入配列。(b) *TUBG2*のエキソン構造の模式図。赤字は*TUBG2B*に特異的な挿入配列。*TUBG2A*は11のエキソンから構成されるが*TUBG2B*に特異的な配列はエキソン4と5の間に位置する (c) *TUBG2*イントロン4の系統樹。赤線は霊長類を示す。右側の数値はイントロン4の長さ。

2-2 TUBG2Bは癌細胞株および脳で転写されている

*TUBG2B*はHeLa細胞よりクローニングされたが、HeLa細胞以外の癌細胞株や生体組織でも転写されている可能性がある。そこで*TUBG2B*が他の癌細胞株でも転写されているかを調べた。各細胞株より抽出したtotal RNAからcDNAを合成し*TUBG2A*または*TUBG2B*を特異的に増幅させるプライマーセットによりRT-PCRを行った(図 8a)。 γ -tubulin2タンパク質の発現が確認された5細胞株(CaR-1, HCC1937, HCC1395, SKBR3, HeLa)および発現が確認されなかった2細胞株(U2OS, MCF7)について検討したところ、全ての癌細胞株で*TUBG2B*の転写が示唆された(図 8b)。 γ -tubulin2は生体組織では、脳でも発現していることから脳における*TUBG2*の転写を確認したところ、癌細胞株と同様に転写産物が確認された(図 8c)。

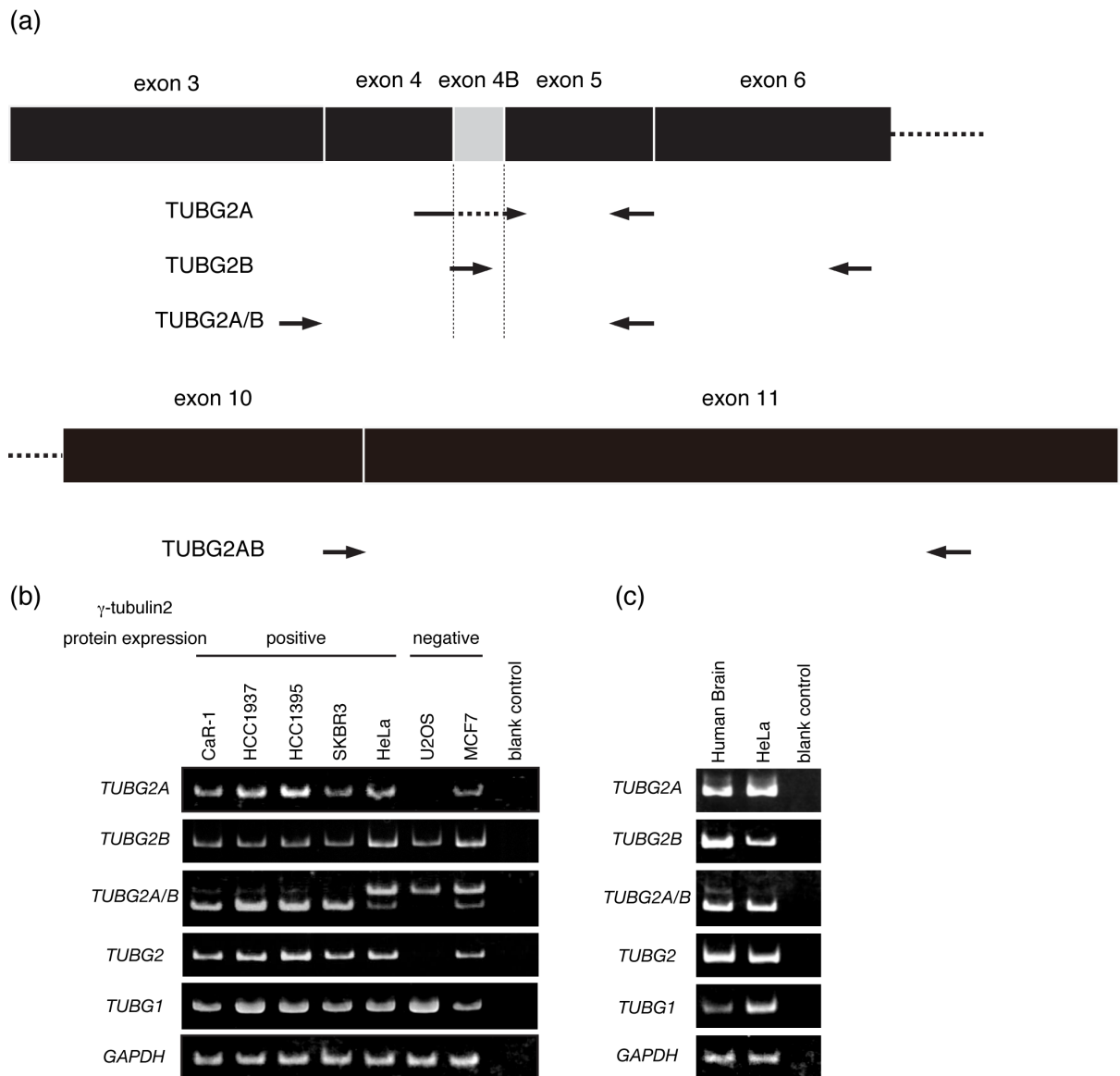


図 8. *TUBG2B* の mRNA は癌細胞および脳で転写されている (a) *TUBG2* mRNA の構造と (b) と (c) の RT-PCR で使用したプライマーセットの模式図。TUBG2A および TUBG2B プライマーセットはそれぞれを特異的に増幅するプライマーセットとして、TUBG2A/B プライマーセットは TUBG2B の挿入配列を含む領域を TUBG2A と 2B とともに増幅するプライマーセットとして、TUBG2 プライマーセットは TUBG2A と 2B の共通配列を増幅するプライマーセットとして設計した。黒矢印はそれぞれのプライマーセットのフォワードおよびリバースのプライマーを設計した位置を示す。TUBG2A プライマーセットの破線はプライマー内部に含まれない領域を示す。(b) γ -tubulin2 発現細胞株および非発現細胞株における RT-PCR。TUBG1 および GAPDH はコントロールとして用いた。(c) ヒト脳における RT-PCR。プライマーセットは (a) と同じものを使用した。

2-3 γ -tubulin2Bは既知の機能を有さない

γ -tubulinが中心体において微小管重合の足場として機能するためには、GCP2~5などと結合して複合体(γ -TuRC)を形成する必要がある。そこで、 γ -tubulin2BがGCP2などと結合し複合体を形成しているかを検討した。HeLa細胞にFLAGタグを付加した γ -tubulin1, 2Aおよび2B (TUBG1/2A/2B-FLAG) を発現させ、抗FLAG抗体を用いた共免疫沈降法により γ -TuRC因子との結合をウェスタンブロッティングにて確認した。その結果、コントロールの γ -tubulin1, 2A-FLAGを用いて免疫沈降を行った画分ではGCP2, 3, 4, 5および内在性 γ -tubulin1のバンドが検出されたが、 γ -tubulin2B-FLAGの画分では γ -TuRC構成因子のバンドは検出されなかった(図 9)。この結果から、 γ -tubulin2Bは γ -tubulin1, 2Aとは異なり γ -TuRC複合体を形成しないことが示唆された。

γ -tubulinは γ -TuRCを形成することで中心体に運ばれる[52]。そこで γ -tubulin2Bの細胞内局在を調べるため、 γ -tubulin1/2A/2B-FLAGをHeLa細胞に発現させ抗FLAG抗体を用いて免疫染色を行った。同時に、抗Pericentrin抗体で中心体、抗 α -tubulin抗体で微小管、Hoechst33342でDNAを染色した。

γ -tubulin1および γ -tubulin2Aを発現させた間期の細胞では、pericentrinと共局在するFLAGのシグナルが1つまたは2つ観察され、分裂期の細胞ではFLAGのシグナルが紡錘体極に位置していたことから、 γ -tubulin1, 2A-FLAGは中心体に局在していることが明らかとなった。しかし γ -tubulin2Bはタンパク質として細胞内に存在しているにも関わらず、間期の細胞でも分裂期の細胞でも中心体には局在が認められなかった(図 10a, b)。これらの結果から γ -tubulin2Bは、 γ -tubulin1や2Aとは異なり γ -TuRCを形成出来ず、中心体にも局在しないことが明らかとなった。したがって中心体における微小管の重合核として働かないことが推察される。

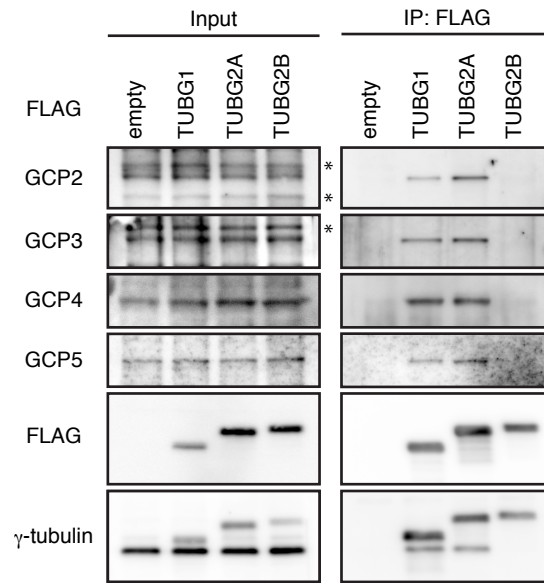


図9. γ -tubulin2Bは γ -TuRC構成因子と結合しない γ -tubulin-FLAGの共免疫沈降。HeLa細胞にFLAGタグを付加したTUBG1, 2A, 2Bをトランスフェクションした。48時間後に細胞を回収し抗FLAG M2抗体を用いて免疫沈降した。示した γ -TuRC構成因子との結合はウェスタンブロッティングにより解析した。

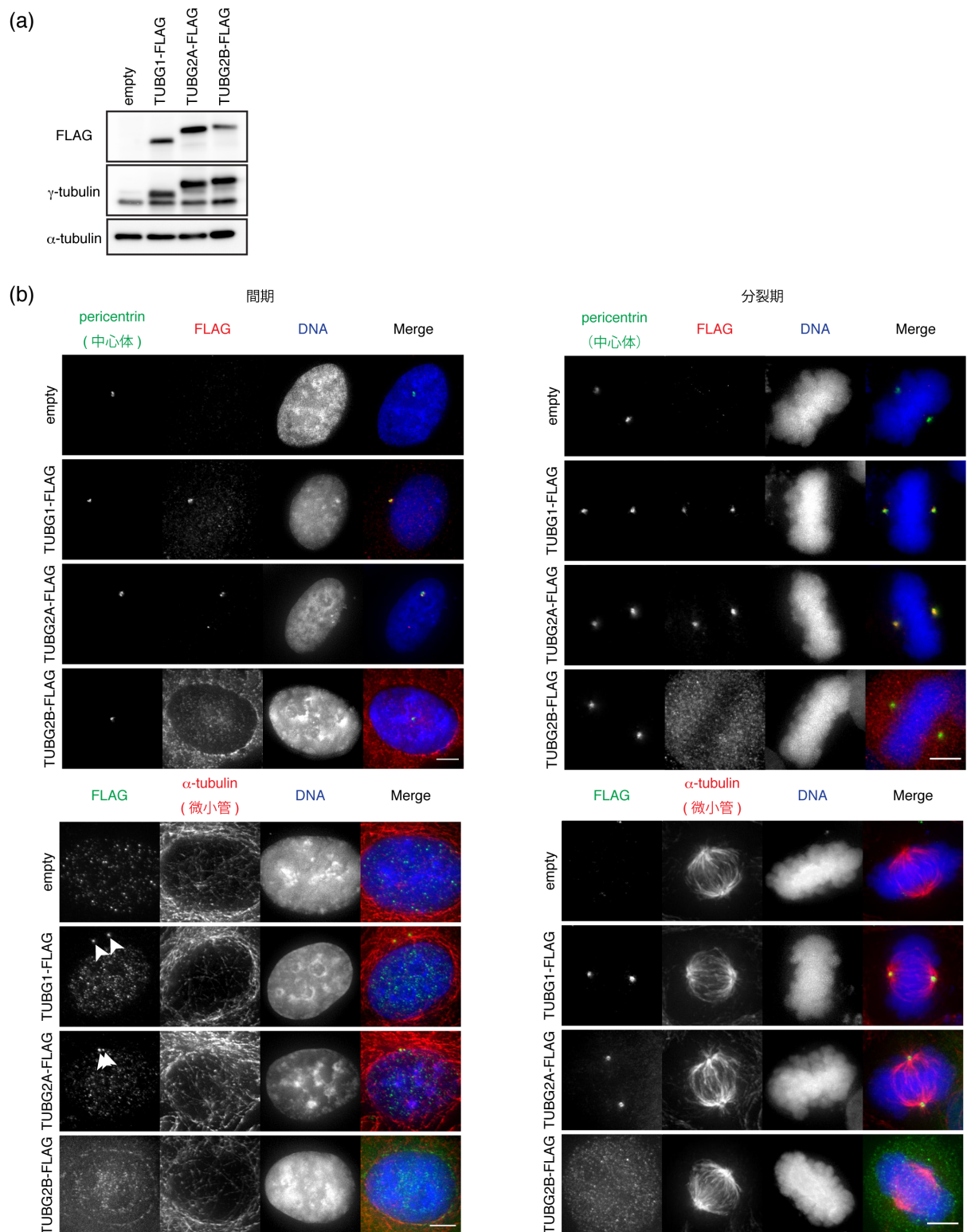


図 10. γ -tubulin2Bは中心体に局在しない (a) γ -tubulin1, 2A, 2B-FLAGを発現させたHeLa細胞のウェスタンブロッティング。細胞はトランスフェクション後24時間で回収し図1と同様の方法で解析した (b) γ -tubulin1, 2A, 2B-FLAGを発現させたHeLa細胞の免疫蛍光染色。細胞はpericentrin (緑)とFLAG (赤, 上段)もしくはFLAG (緑)と α -tubulin (赤, 下段)およびHoechst33342 (DNA, 青)で染色した。左側は間期、右側は分裂期の細胞。Scale bar = 10 μ m (左), 5 μ m (右)

2-4 細胞内では主に γ -tubulin2Aが翻訳されている

癌細胞株では*TUBG2A*と*TUBG2B*の両方のmRNAが転写されているが、それらが両方ともタンパク質に翻訳されているのかを検討した。 γ -tubulin2Aと2Bは9アミノ酸の違いがあるが、ミニゲル(10 cm×10 cm)を用いたウェスタンブロッティングでは移動度の違いがわずかであるため、内在性の γ -tubulin2がどちらであるかを判別するのは困難であった(図 11a)。そこで、 γ -tubulin2Aと2Bの等電点の違い(表 3)を利用して、二次元電気泳動による分離を試みた。HEK293細胞に γ -tubulin2A, 2Bをそれぞれ発現させて泳動したところ、 γ -tubulin2Aは γ -tubulin1よりも酸性側に、2Bは γ -tubulin1とほぼ同じ等電点の位置にスポットが検出された(図 11b)。同様にして γ -tubulin2が発現しているHCC1937細胞の細胞抽出液を二次元電気泳動で解析したところ、 γ -tubulin2のスポットは γ -tubulin1よりも酸性側に位置した(図 11c)。

次に、移動度の差を拡大させるためラージゲル(16 cm×16 cm)を用いたlow-bisゲル(12.5%T, 1.7%C)で電気泳動を行った。癌細胞株では γ -tubulin1量が多いため γ -tubulin2の検出が困難であることから、抗 γ -tubulin抗体(H-183)を用いて免疫沈降を行い γ -tubulin2の濃縮を行った(図 12a)。この抗体は γ -tubulin1と2に共通の配列(269から451番目のアミノ酸)を抗原として作製されているが、予備的な実験により免疫沈降実験では γ -tubulin2を強く認識することが分かっている。

その結果、コントロールとしてHEK293細胞に γ -tubulin2Aまたは2Bを発現させそれぞれの移動度(Rf値, Rf_{TUBG2})を計算すると、 γ -tubulin2Aは0.364、 γ -tubulin2Bは0.355であった。内在性 γ -tubulin1のRf値(Rf_{TUBG1})から γ -tubulin1と2の解離度(1/

[Rf_{TUBG2}/Rf_{TUBG1}])を算出すると、 γ -tubulin2Aの解離度は1.05となり γ -tubulin2Bでは1.08となった。 γ -tubulin2が発現していたHCC1937やHeLa細胞の解離度はどちらも1.05であり(表4)、この値は γ -tubulin2Aを発現させたサンプルとの値と一致した。さらに、 γ -tubulin2が発現している脳サンプルにおいても同様の実験を行ったところ、 γ -tubulinの解離度は γ -tubulin2Aを発現させた細胞サンプルと一致した(図12b, 表4)。

これらの結果から癌細胞株や正常組織の脳では γ -tubulin2Aタンパク質は存在するが、*TUBG2B*は翻訳されていないか、もしくはタンパク質としての発現量が著しく低いことが示唆された。

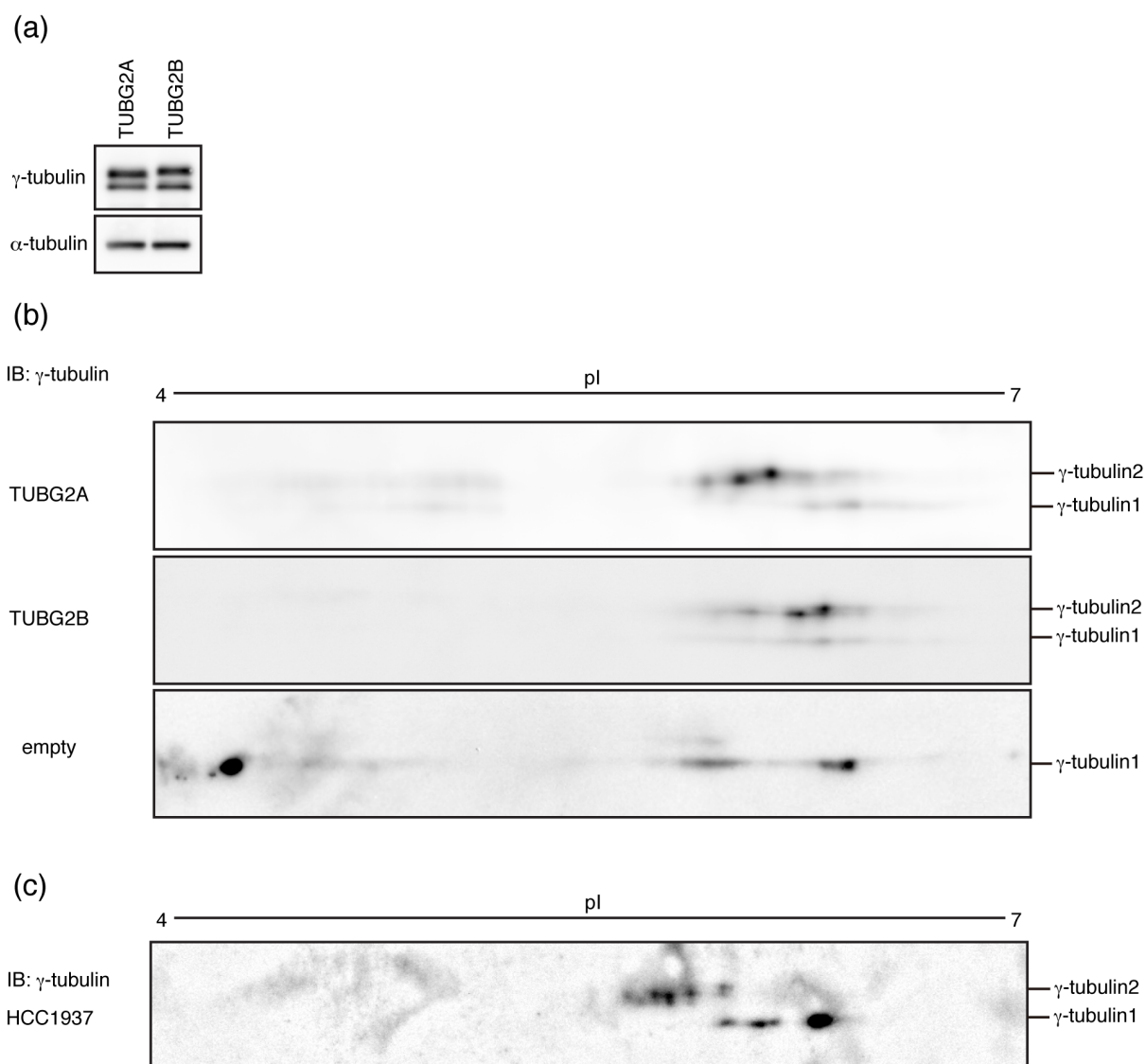


図 11. γ -tubulin2ABの二次元電気泳動 (a) γ -tubulin2Aまたは2Bを発現させたHEK293細胞のウェスタンブロットティング。細胞はトランスフェクション後24時間で回収し図5と同様の方法で解析した (b, c) TUBG2A, 2B,発現ベクター,空ベクターをトランスフェクションしたHEK293細胞(b)またはHCC1937細胞(c)の二次元電気泳動。等電点電気泳動後、low-bis gelを用いて二次元目を泳動し、抗 γ -tubulin抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。

	pI
TUBG1	5.75
TUBG2A	5.50
TUBG2B	5.66

表 3. γ -tubulin1, 2Aおよび2Bの理論的な等電点 等電点の値はExPASy Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/)を用いて計算した。

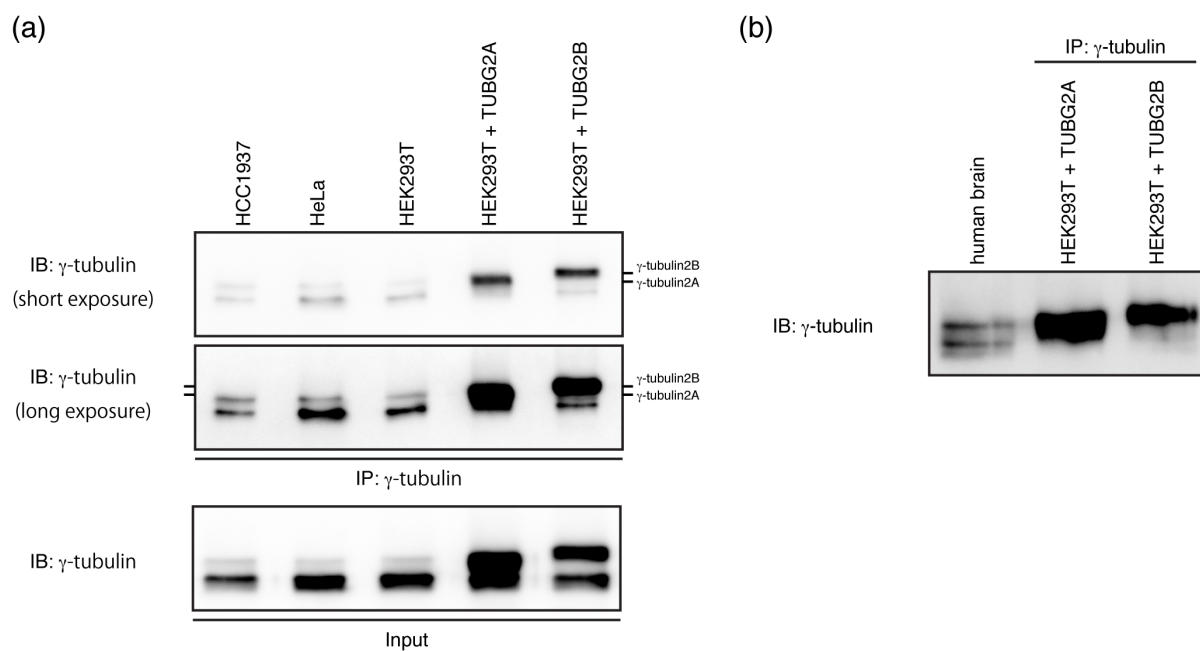


図 12. TUBG2Bはタンパク質に翻訳されていない (a) それぞれの細胞の抽出液に対して抗 γ -tubulin抗体を用いて免疫沈降し、ウェスタンブロッティングにより解析した。コントロールとしてHEK293細胞にTUBG2Aまたは2Bをトランスフェクションし24時間後に回収したものを用いた。 (b) ヒト脳サンプルのウェスタンブロッティング。コントロールとして(a)で用いたTUBG2AまたはTUBG2BをトランスフェクションしたHEK293細胞サンプルを使用した。

	Rf_{TUBG1}	Rf_{TUBG2}	$1/(Rf_{TUBG2}/Rf_{TUBG1})$
HCC1937	0.394	0.375	1.049
HeLa	0.394	0.374	1.052
HEK293T	0.390	0.368	1.058
HEK293T + TUBG2A	0.383	0.364	1.051
HEK293T + TUBG2B	0.384	0.355	1.080
Brain	0.480	0.455	1.057
HEK293T + TUBG2A	0.481	0.455	1.057
HEK293T + TUBG2B	0.481	0.434	1.108

表5. 図 12より算出した γ -tubulin1および γ -tubulin2のRf値と分離度

第3節 γ -tubulin1と γ -tubulin2は紡錘体形成において異なる機能を持つ

3-1 γ -tubulin1は γ -tubulin2の機能を補完できる

マウス初期胚における解析から、 γ -tubulin2は胚盤胞期胚で発現しているにも関わらず、*Tubg2*欠損マウスは正常に発生することが報告されている[46]。そこで*Tubg2*欠損マウスの初期胚における γ -tubulinの発現について解析した。マウスの γ -tubulin1と2のバンドはヒトの γ -tubulin解析に用いたのと同じSDS-PAGEゲル組成では分離しなかったことから、改めてマウス γ -tubulin2を検出できるゲル組成を探索した。 γ -tubulin2が発現しているマウス脳抽出液を4 M尿素を含む10% low-bisゲル (%C=0.5)を用いて泳動し、 γ -tubulinに対するウェスタンブロッティングを行うと、野生型マウスでは2本のバンドが検出されたが、*Tubg2*欠損マウスでは下側のバンドが消失していた(図 13a)。この結果から上側のバンドが γ -tubulin1、下側のバンドが γ -tubulin2であることが分かった。

続いて、上記の方法を用いてマウス初期胚における γ -tubulin発現パターンを調べた。胚盤胞期は分化が始まる時期で体細胞に近いと考えられるため、胚盤胞期よりもさらに未成熟な卵母細胞での γ -tubulinの発現を解析した。野生型マウスおよび*Tubg2*欠損マウスより未成熟卵母細胞 (GV卵) および成熟卵母細胞 (MII卵) をそれぞれ回収しウェスタンブロッティングを行った。その結果、野生型マウスのGV卵およびMII卵では、どちらも γ -tubulin1よりも γ -tubulin2の発現量が高かった。*Tubg2*欠損マウスではGV卵・MII卵ともに γ -tubulin2は検出されず、 γ -tubulin1の発現量が野生型マウスに比べて増加していた(図 13b)。

次にマウス卵母細胞における紡錘体の様子を観察した。野生型および*Tubg2*欠損

マウスのMII卵を抗 γ -tubulin抗体, 抗 α -tubulin抗体, 抗pericentrin抗体およびHoechst33342で4重染色した。その結果、野生型および*Tubg2*欠損マウス卵母細胞のどちらにも樽型の紡錘体が形成されており形態に大きな違いはなかった。図 13cで検出される γ -tubulinのシグナルは図 13bの結果から、野生型マウスでは γ -tubulin2、*Tubg2*欠損マウスでは γ -tubulin1だと考えられる。しかし野生型マウスと*Tubg2*欠損マウスとの間でこれらのシグナルの局在に違いは観察されなかった(図 13c)。

これらの結果から、*Tubg2*欠損マウスでは γ -tubulin2の代わりに γ -tubulin1の発現量が増大し、 γ -tubulin2の機能を相補していることが示唆された。

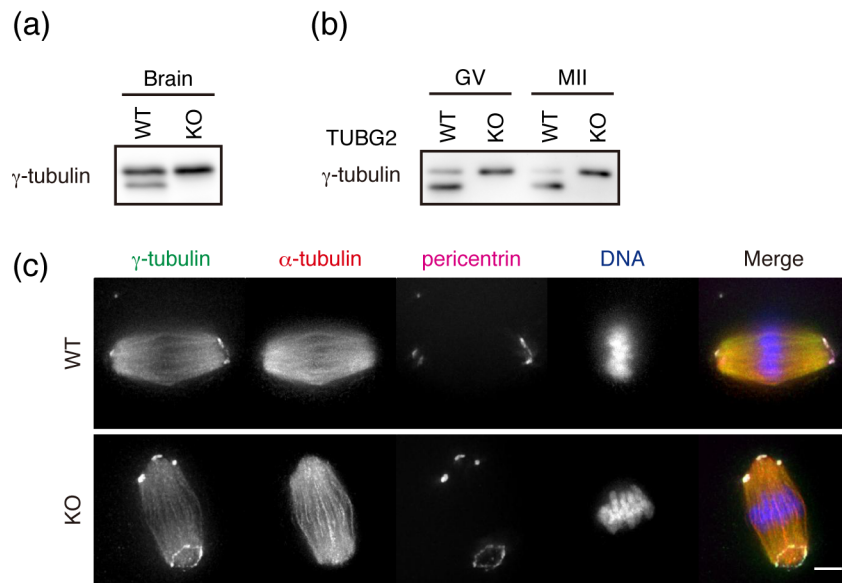


図 13. *Tubg2*欠損マウス卵母細胞では γ -tubulin1が機能を代替する

(a) 野生型および*Tubg2*欠損マウスの脳のウェスタンブロットティング。抗 γ -tubulin抗体でブロットすると野生型では2本のバンドが検出される。一方、*Tubg2*欠損マウスでは上側のバンドのみが検出される。(b) 野生型および*Tubg2*欠損マウスのGVおよびMII卵のウェスタンブロットティング。野生型マウスの卵母細胞では γ -tubulin2の発現量が高いが*Tubg2*欠損マウスでは γ -tubulin1が高発現している。(c) 野生型および*Tubg2*欠損マウスMII卵の免疫蛍光染色。*Tubg2*欠損マウスのMII卵でも野生型マウスと同様の樽型の紡錘体を形成している。Scale bar = 5 μ m

3-2 γ -tubulin1の欠損は γ -tubulin2の発現を誘導するが細胞増殖速度を低下させる

次に γ -tubulin1と γ -tubulin2の機能の違いを検討するため、TUBG1特異的siRNAを用いてHeLa細胞における γ -tubulin1の発現抑制をした(図 14a)。発現量の変化をウェスタンブロッティングにより確認すると、トランスフェクション後72時間 (Day 0)で γ -tubulin1発現量が約20%にまで減少したが、この時点では細胞増殖速度への明確な影響は見られなかった(図 14b)。そこでTUBG1特異的siRNAを追加導入し、 γ -tubulin1のさらなる発現抑制による増殖速度への影響を検討した。その結果、 γ -tubulin1発現抑制細胞ではコントロール細胞に比べて増殖速度が著しく抑制された(図 14c)。興味深いことにDay 0からDay 5の間の γ -tubulin量をウェスタンブロッティングで確認すると γ -tubulin1は減少し続けたが代わりに γ -tubulin2量の増加が認められ、 γ -tubulinの総量はほとんど変化がなかった(図 14d, e)。これらの結果から、 γ -tubulin1の発現抑制により γ -tubulin2の発現が誘導され、増殖速度が抑制されることが明らかとなった。

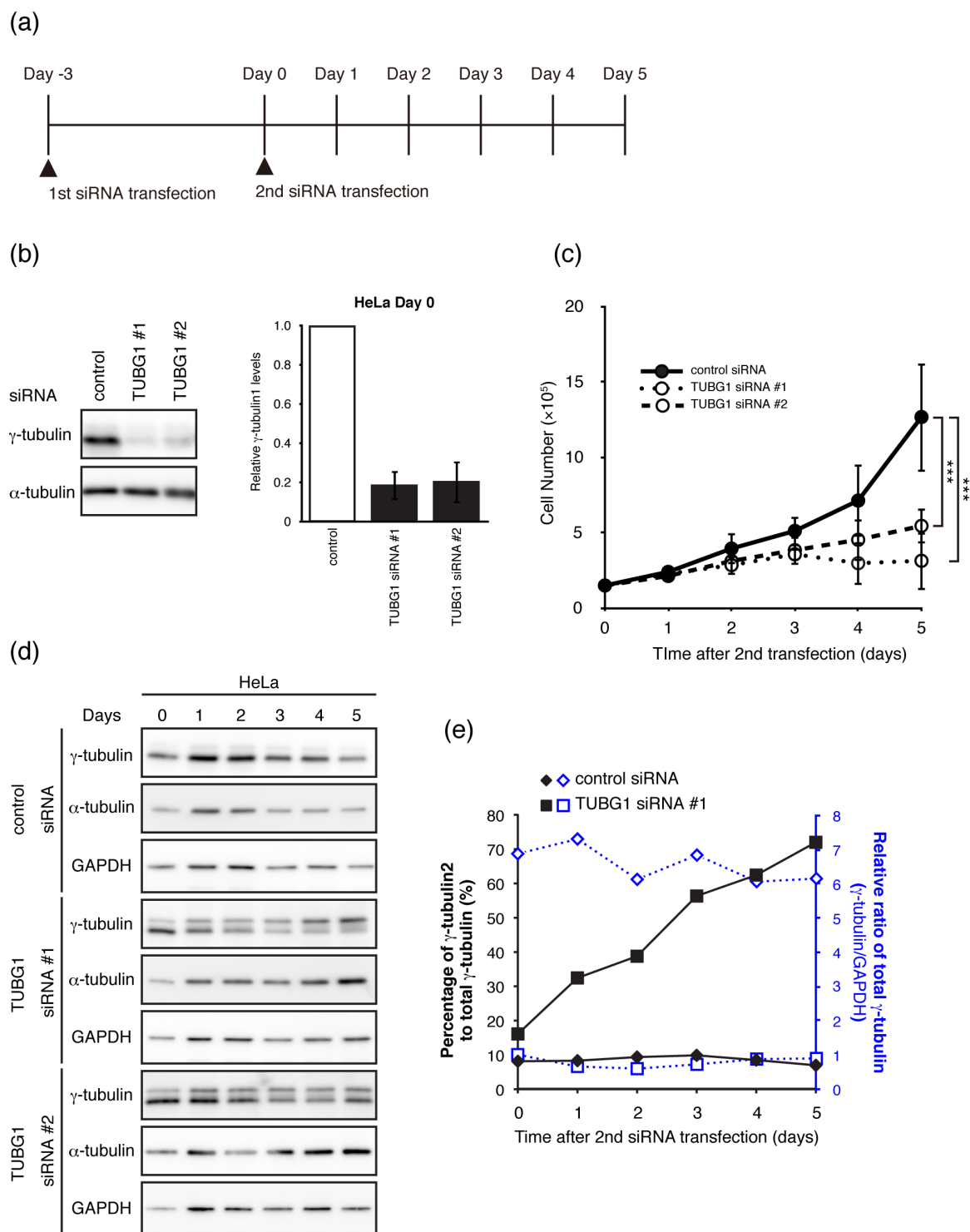


図 14. γ -tubulin1の発現抑制 (a) TUBG1 siRNA導入実験の模式図。Day 0~5は二回目のsiRNAトランスフェクションからの日数を示す (b) γ -tubulin1発現抑制細胞のウェスタンブロッティング。細胞はcontrolまたは2種類のTUBG1 siRNA(#1, #2)をトランスフェクション後72時間で回収し図1と同様の方法で解析した。棒グラフは γ -tubulinの発現量を定量した結果を示す。独立した実験を3回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。 (c) γ -tubulin1発現抑制細胞の増殖曲線。独立した実験を4回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。有意差はStudent's t-testで算出した。***, $p < 0.001$ (d) Day 0から5に

における γ -tubulin1発現抑制細胞のウェスタンブロッティング。細胞は2回目のsiRNAをトランスフェクション後から継時的に回収し図5と同様の方法で解析した(e)(d)より算出した各時期における総 γ -tubulinに対する γ -tubulin2の割合(黒線, 左軸)および γ -tubulinの総タンパク質量の相対比(青線, 右軸)

3-3 γ -tubulin1の欠損は単極性紡錘体形成を引き起こす

γ -tubulin1の発現抑制による増殖速度が抑制された原因を解析するため、 γ -tubulin1を発現抑制した細胞の免疫染色を行った。発現抑制後のDay 0では γ -tubulin1発現抑制細胞において γ -tubulin1の発現量が8割程度も減少しているにも関わらず、コントロール細胞と同じように双極性紡錘体が形成された。ところがDay 0の γ -tubulin1と同程度に γ -tubulin2が発現しているDay 5の γ -tubulin1発現抑制細胞においては単極性紡錘体を持つものが多く観察された(図 15a, b)。

そこで、 γ -tubulin1と2の発現量が拮抗する時期であるDay 3において分裂期の細胞の形態を観察すると、コントロール細胞ではほぼ全てが双極性紡錘体であったのに対して、 γ -tubulin1発現抑制細胞では7割以上が単極性紡錘体であった(図 15c)。この時の細胞の中心体間の距離を測定すると有為に減少していたことから、中心体が正常に分離していないことが明らかになった(図 15d)。

γ -tubulin1発現抑制細胞の単極性紡錘体の中には中心体数が異常な細胞が観察された。正常な双極性紡錘体をPCMマーカーのpericentrinで染色すると二つのスポットが観察される。 γ -tubulin1発現抑制細胞では単極性紡錘体を持つ場合でも二つのスポットが観察される例の他、二つ以上のPericentrinスポットが観察される例もあった(図 15e)。

Pericentrinスポット数の異常の原因としては、中心体の過剰複製、中心小体の断片化、PCMの断片化などが考えられる。そこで中心小体マーカーのCEP135を用いて γ -tubulin1発現抑制細胞を染色したところ、分裂期の細胞ではpericentrinと同様に三つ以上のスポットを持つ細胞が観察された。間期の細胞では三つ以上のスポットを持

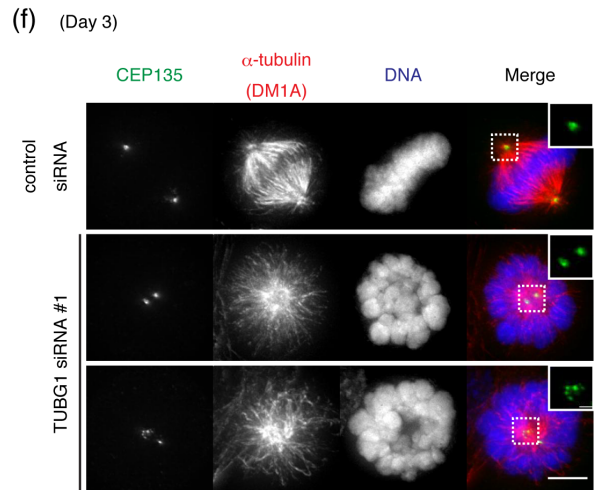
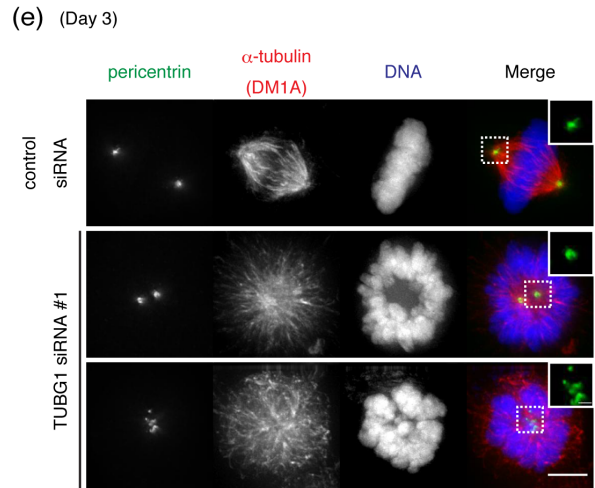
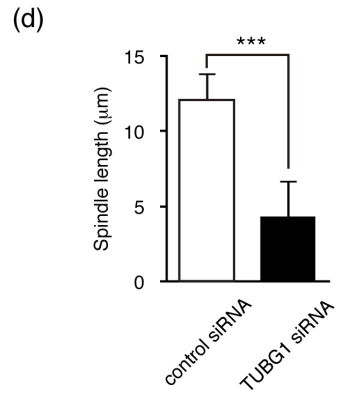
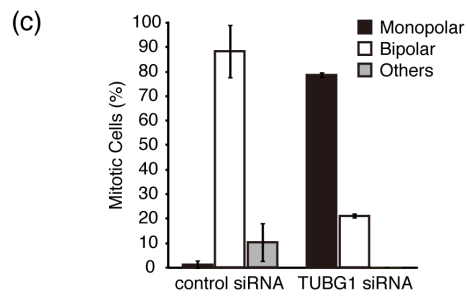
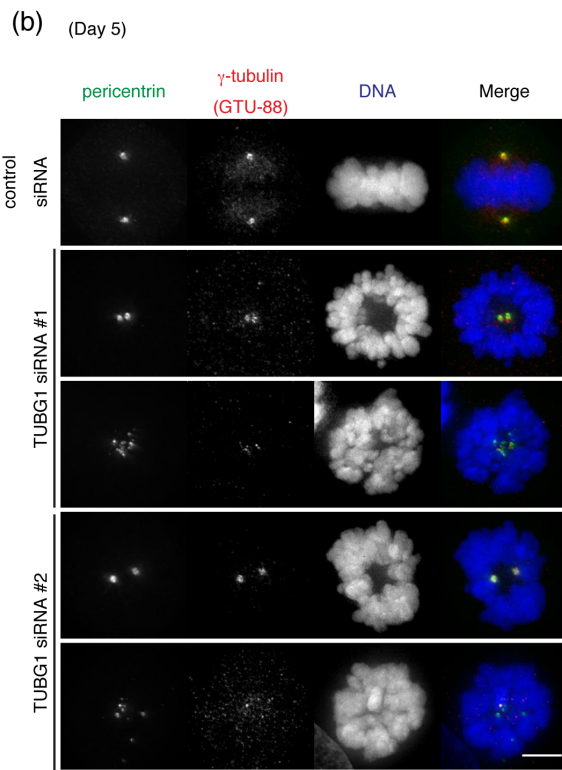
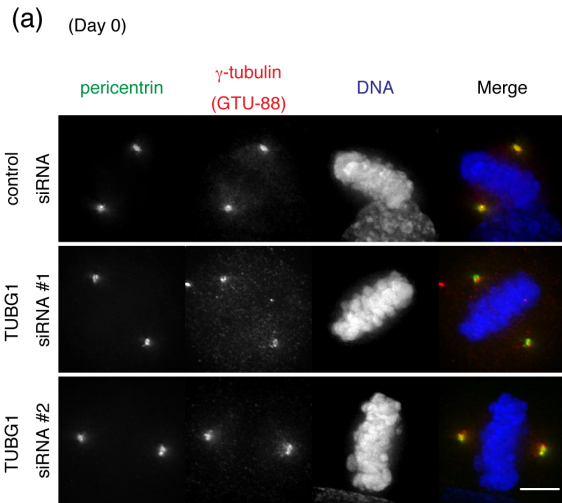
つ細胞は認められなかったことから、pericentrinおよびCEP135スポット数の異常は分裂期特異的な表現型であり、主に間期で生じる中心体の過剰複製が原因である可能性は低い。従って γ -tubulin1発現抑制細胞では中心小体が断片化していることが示唆された(図 15f)。

次に γ -tubulin1発現抑制による細胞分裂への影響を観察した。 γ -tubulin1を発現抑制したHeLa細胞の染色体をHoechst33342で染色し、分裂期の様子をタイムラプスビデオを用いて観察した。 γ -tubulin1発現抑制細胞において正常に分裂した細胞では、核膜崩壊後90分程度で染色体分配が完了し娘細胞が出来ていたが、異常な分裂を示した細胞では核膜崩壊後、染色体の凝縮は見られるが正しく赤道面に整列せず、分裂期のまま細胞が停止していた(図 15g)。

さらに間期の細胞を観察すると、コントロール細胞では単核であったが、 γ -tubulin1発現抑制細胞では、複数の核が円状に並んでいる細胞やドーナツ状の形態をした核を持つ細胞が多く観察された(図 15h, i)。分裂期で停止した細胞はアポトーシスを起こして細胞死に至る場合と、mitotic slippageと呼ばれるG1期へ移行する場合があることが知られている[53]。 γ -tubulin1発現抑制細胞で見られる異常な形態をした核の形が単極性紡錘体と似ていることから、これらの細胞は単極性紡錘体を形成した細胞がmitotic slippageによりG1期へと移行した結果生じたと考えられ、改めて分裂期紡錘体形成異常を起こしていることが示唆された。

これらの結果から、 γ -tubulin1の発現抑制細胞では紡錘体形成において中心体が分離しないため単極性となり、中心小体の断片化を引き起こすことが明らかとなった。これらの紡錘体形成異常はDay 0からDay 5まで総 γ -tubulin量に大きな変化がなかったことから、細胞内の γ -tubulin量が減少したことによるものではなく、細胞内で

発現している γ -tubulinが γ -tubulin1から γ -tubulin2へと変化したことによるものと考えられる。つまり、体細胞では γ -tubulin2は γ -tubulin1の機能を完全には相補できないことが原因であり、 γ -tubulin1と γ -tubulin2には双極性紡錘体形成において機能的な違いがあることが示唆された。



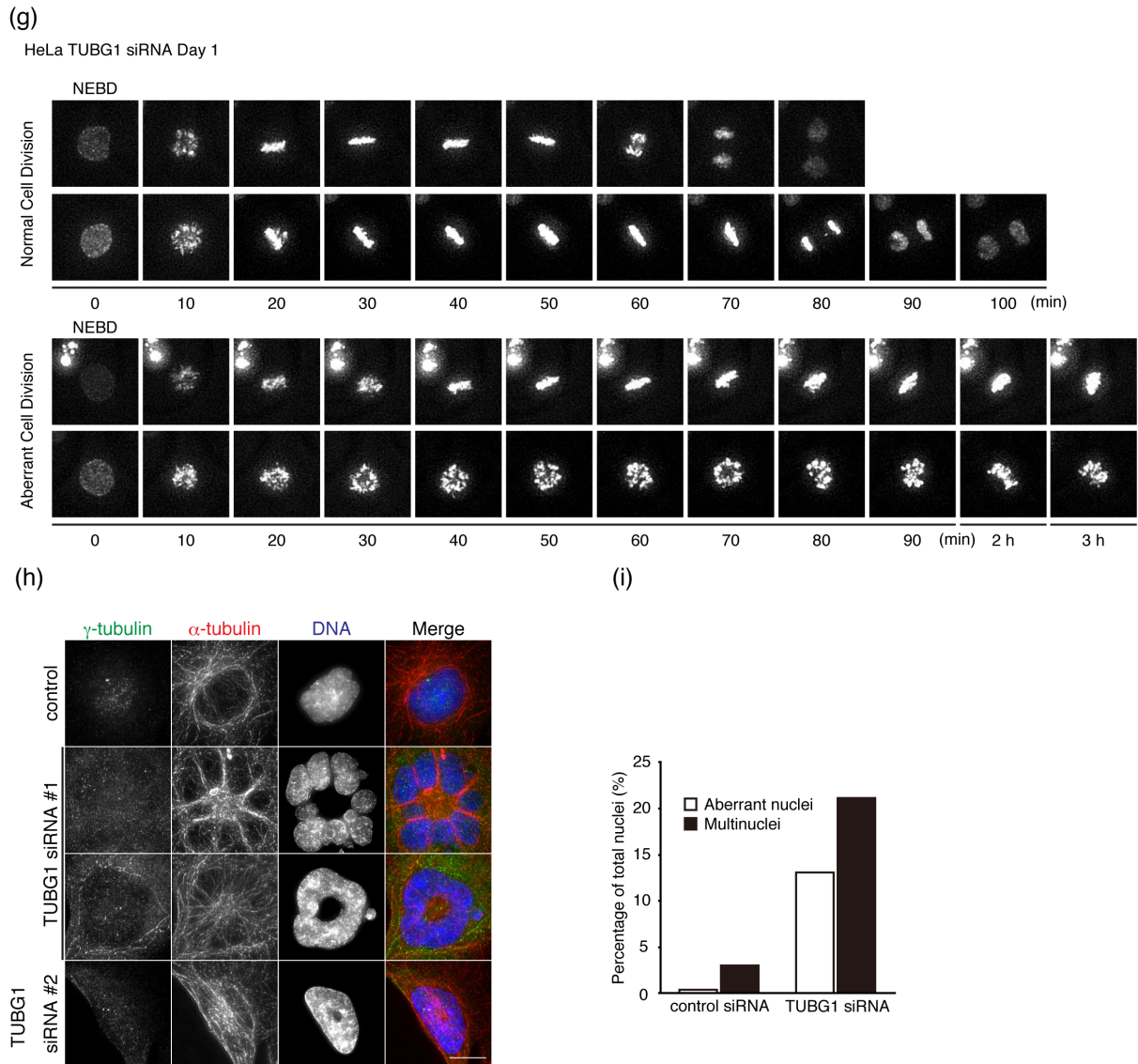


図 15. γ -tubulin1 の発現抑制は単極性紡錘体形成および中心体の崩壊を引き起こす (a, b) 分裂期の γ -tubulin1 発現抑制細胞の免疫染色。Control もしくは TUBG1 siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞を Day 0 (a) および Day 5 (b) で固定し、pericentrin (緑) γ -tubulin (赤) Hoechst33342 (DNA, 青) で染色した。Scale bars = 5 μ m. (c) 分裂期細胞における単極性および双極性紡錘体の割合 (d) 分裂期 γ -tubulin1 発現抑制細胞の中心体間の距離。Control もしくは γ -tubulin1 siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞を pericentrin で染色し中心体間の距離を測定した。独立した実験を 3 回行い、標準偏差をエラーバーとした。有意差は Student's t-test で算出した。***, $p < 0.001$ (e, f) 分裂期の γ -tubulin1 発現抑制細胞の免疫染色。(g) TUBG1 発現抑制細胞のタイムラプス観察。HeLa 細胞に TUBG1 siRNA をトランスフェクションし、Day 1 の細胞を Hoechst33342 で染色した。画像は 10 分間おきに撮影を行い、核膜崩壊 (NEBD) を 0 分とした。(h) 間期の γ -tubulin1 発現抑制細胞の免疫染色。Control もしくは TUBG1 siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞を Day 3 で固定し、pericentrin (緑) γ -tubulin (赤) Hoechst33342 (DNA, 青) で染色した。Scale bars = 10 μ m. (i) γ -tubulin1 発現抑制細胞における異常な形態をした核もしくは多核の細胞の割合

3-4 γ -tubulin2の過剰発現は γ -tubulin1欠損下で双極性紡錘体形成を回復出来ない

γ -tubulin1と2では双極性紡錘体形成における機能が異なっていることが示唆されたため、 γ -tubulin1発現抑制による単極性紡錘体形成の表現型を、 γ -tubulin1あるいは2で相補できるかについてより直接的な検討を行った。まずコントロール実験として、 γ -tubulin1発現抑制細胞にFLAGタグを付加したsiRNA抵抗性 γ -tubulin1(TUBG1r-FLAG)を発現させた。ウェスタンブロッティングにより発現量を確認すると、内在性の γ -tubulin1は減少し、 γ -tubulin1r-FLAGが過剰発現していた(図 16a)。この細胞の分裂期の様子を免疫染色により観察すると双極性の紡錘体が観察され、FLAGのシグナルがpericentrinのシグナルと一致したことから、 γ -tubulin1r-FLAGは中心体に局在することが分かった(図 16b)。 γ -tubulin1発現抑制細胞は分裂期で停止する。コントロールsiRNAを導入した細胞の分裂期の細胞の割合を計測すると3%であったが、 γ -tubulin1発現抑制細胞では35%に増加した。しかし、 γ -tubulin1r-FLAGを発現させた細胞では14%まで低下したことから、 γ -tubulin1r-FLAGの発現により双極性紡錘体形成が回復したことが示唆された(図 16c)。

続いて γ -tubulin1発現抑制細胞にFLAGタグを付加した γ -tubulin2 (TUBG2A/B-FLAG)を発現させた。ウェスタンブロッティングの結果から、 γ -tubulin2-FLAGはコントロール細胞の内在性 γ -tubulin1以上に発現していた(図 17a)。免疫染色の結果から、 γ -tubulin2A-FLAGは中心体に局在していたが、分裂期の細胞は単極性紡錘体を示した(図 17b)。また分裂期細胞の割合も γ -tubulin1発現抑制細胞と同程度であった(図 17c)。これらの結果から γ -tubulin2は γ -tubulin1を相補できず、 γ -tubulin1と2は双極性紡錘体形成において異なる機能を有することが示唆された。

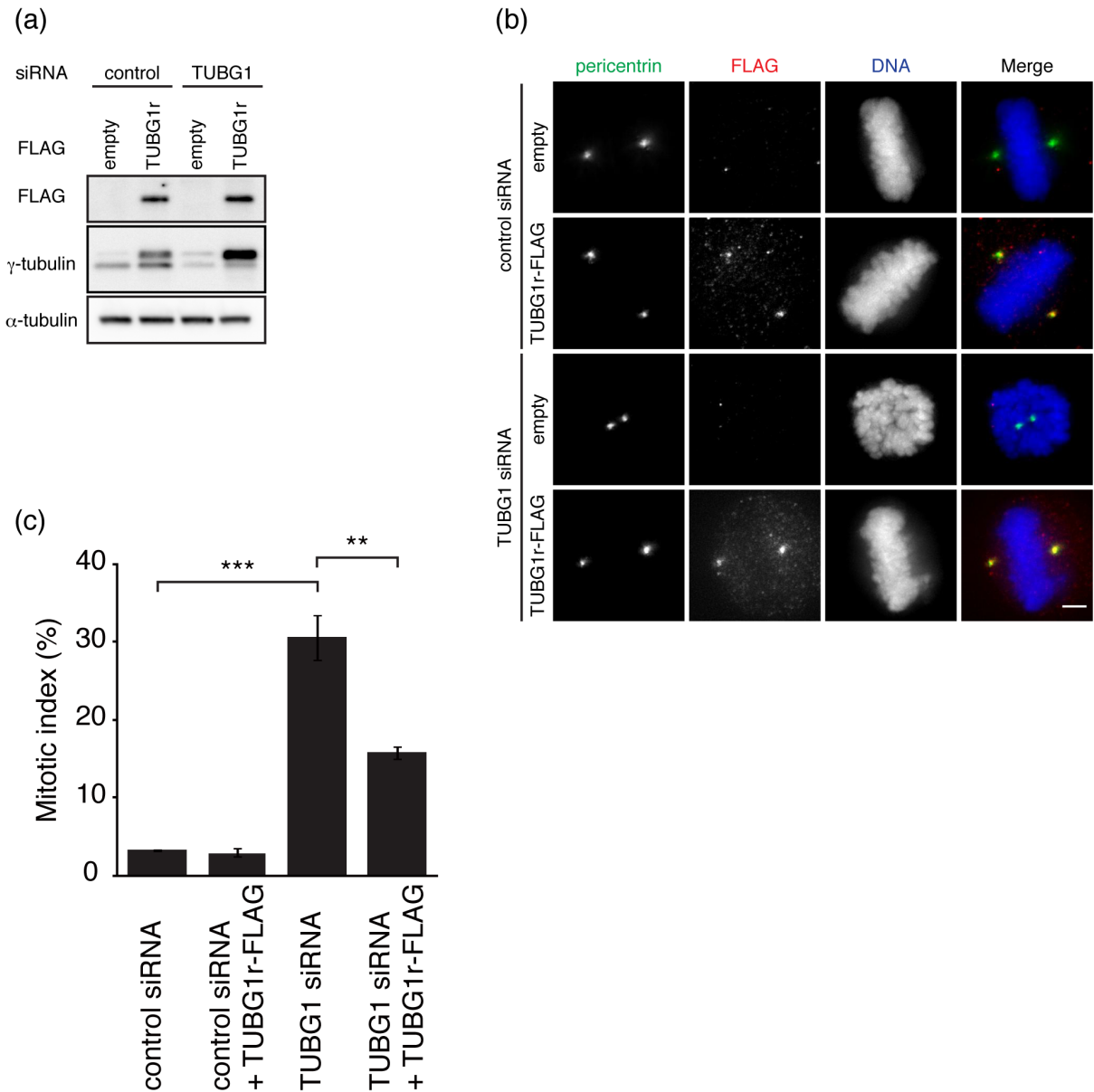


図 16. γ -tubulin1 発現抑制細胞に siRNA 抵抗性 γ -tubulin1 を発現させると双極性紡錘体を形成し分裂期停止を解除する (a) γ -tubulin1 発現抑制し siRNA 抵抗性 γ -tubulin1 (γ -tubulin1r-FLAG) を発現させた HeLa 細胞のウェスタンブロッティング。HeLa 細胞に Control もしくは TUBG1 siRNA の 2 回目のトランスフェクション後、空ベクターもしくは TUBG1r-FLAG 発現ベクターをトランスフェクションした。細胞は 2 回目の siRNA をトランスフェクションから 72 時間後の Day 3 で回収し、図 1 と同様の方法で解析した (b) γ -tubulin1 発現抑制し siRNA 抵抗性 γ -tubulin1 (γ -tubulin1r-FLAG) を発現させた細胞の免疫染色。(a) と同様の方法でトランスフェクションした細胞を Day 3 で固定し、pericentrin (緑), FLAG (赤) Hoechst33342 (DNA, 青) で染色した。Scale bar = 5 μ m (c) γ -tubulin1 発現抑制し siRNA 抵抗性 γ -tubulin1 (γ -tubulin1r-FLAG) を発現させた細胞の分裂期の割合。(a) と同様の方法でトランスフェクションした細胞を Day 3 で固定 Hoechst33342 で染色し、分裂期の細胞の割合を計測した。独立した実験を 4 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。有意差は Student's t-test で算出した。**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

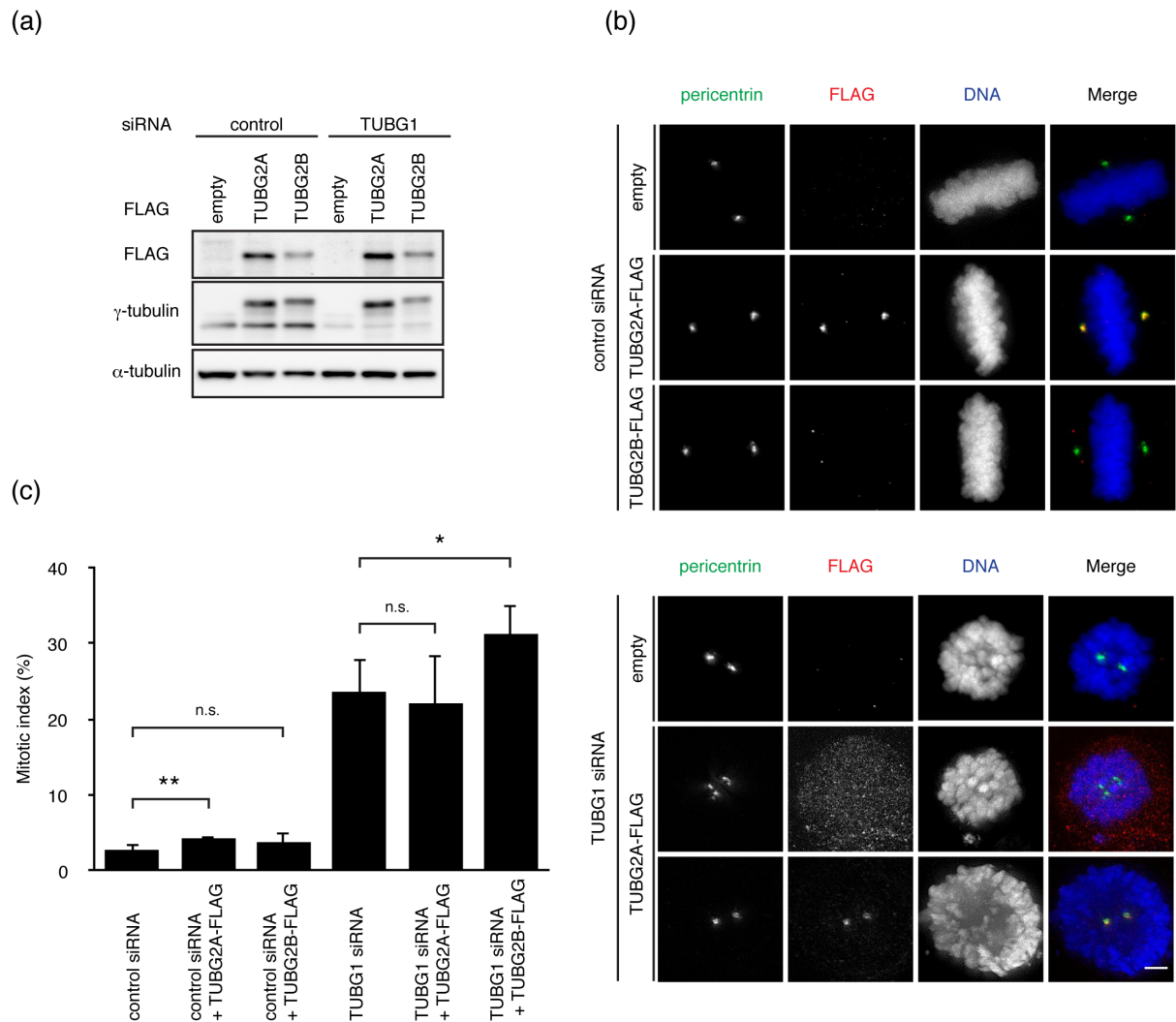


図 17. γ -tubulin1 発現抑制細胞に γ -tubulin2 を発現させても双極性紡錘体形成は回復しない (a) γ -tubulin1 を発現抑制し γ -tubulin2 (γ -tubulin2A/B-FLAG) を発現させた HeLa 細胞のウェスタンブロッティング。HeLa 細胞に Control もしくは TUBG1 siRNA の 2 回目のトランスフェクション後、空ベクターもしくは TUBG2A/B-FLAG 発現ベクターをトランスフェクションした。細胞は 2 回目の siRNA をトランスフェクションから 72 時間の Day 3 で回収し、図 1 と同様の方法で解析した (b) γ -tubulin1 を発現抑制し γ -tubulin2 (γ -tubulin2A/B-FLAG) を発現させた細胞の免疫染色。(a) と同様の方法でトランスフェクションした細胞を Day 3 で固定し、pericentrin (緑), FLAG (赤) Hoechst33342 (DNA, 青) で染色した。Scale bar = 5 μ m (c) γ -tubulin1 を発現抑制し γ -tubulin2A/B-FLAG を発現させた細胞の分裂期の割合。(a) と同様の方法でトランスフェクションした細胞を Day 3 で固定 Hoechst33342 で染色し、分裂期の細胞の割合を計測した。独立した実験を 4 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。有意差は Student's t-test で算出した。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

第4節 γ -tubulin2は微小管ダイナミクスを減少させ微小管を安定化させる

分裂期において中心体が分離して染色体の両側へそれぞれ移行するためには、主に二つの力がはたらくと考えられている。一つ目はそれぞれの中心体から伸長している微小管を、モータータンパク質のEg5/キネシン-5が逆平行にスライドさせる力である。このためEg5を阻害すると単極性紡錘体を形成する。この過程は微小管ダイナミクス非依存的であると考えられている。もう一つは中心体から動原体に向けて伸びる動原体微小管(キネトコアファイバー, k-fiber)による染色体を押し出す力である。k-fiberの確立には微小管ダイナミクスが重要で、このダイナミクスの異常も単極性紡錘体形成に結びつく[54]。 γ -tubulin1は γ -TuRCとして微小管マイナス端に結合するタンパク質であり、 γ -TuRCの欠失は微小管ダイナミクスに影響を及ぼすことから、 γ -tubulin1の発現抑制による単極性紡錘体形成は微小管ダイナミクスの減少によるものであると考えられた[55]。そこで、 γ -tubulin1および γ -tubulin2が微小管のダイナミクスに与える影響について解析を行うこととした。

4-1 γ -tubulin2 の減少はアセチル化微小管を減少させる

微小管を構成している α -tubulinの40番目のリジンのアセチル化は安定な微小管上に多く見られることから、微小管の安定性をはかる指標として用いられている。 γ -tubulin2の発現に対する微小管の安定性を評価するため、 γ -tubulin2を高発現しているHCC1937細胞で γ -tubulin2を発現抑制し、アセチル化 α -tubulinの量をウェスタンブロッティングで測定した。その結果、 γ -tubulin2を発現抑制した細胞でアセチル化 α -tubulinの量が2割ほど減少した(図 18)。この結果から γ -tubulin2が微小管を安定化していることが示唆された。

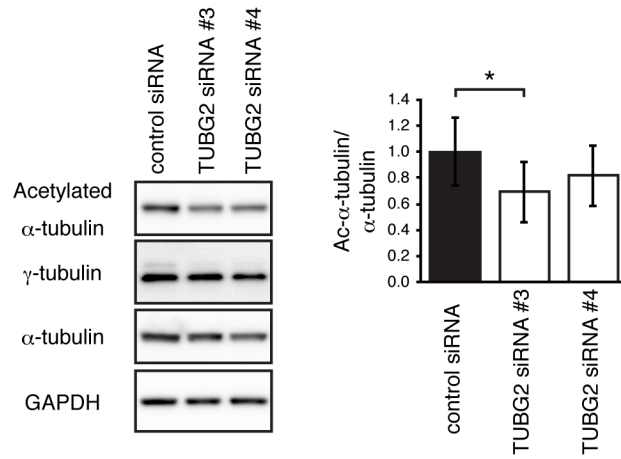


図 18. γ -tubulin2の発現抑制はアセチル化微小管を減少する γ -tubulin2を発現抑制したHCC1937細胞のウェスタンブロッティング。細胞は2回目のsiRNAをトランスフェクション後72時間で回収し図 1と同様の方法で解析した。棒グラフは γ -tubulin2を発現抑制した細胞におけるアセチル化 α -tubulinのシグナル強度を示す。値は α -tubulinによって標準化した。有意差はStudent's t-testで算出した。*, $p < 0.05$

4-2 γ -tubulin2の発現は微小管ダイナミクスを減少させる

次に、 γ -tubulin1および2の微小管ダイナミクスに与える影響について解析するため、EB1-GFPを用いて微小管の動態を観察した。EB1は+TIPsの一種で伸長している微小管の先端に結合する。 γ -tubulin1のみが発現しているMCF7細胞に γ -tubulin1または2AとEB1-GFPを共発現させ、1秒ごとのtime-lapse観察を行い、発現したEB1-GFPコメットの動きを微小管伸長の速度と時間として解析した(図 19a)。 γ -tubulin1を発現させた細胞では、コントロール細胞と比べて微小管の伸長速度や時間に違いは見られなかったことから、 γ -tubulin量の増加は微小管ダイナミクスに影響を及ぼさないことが示唆された。しかし γ -tubulin2Aを発現させた細胞では微小管の伸長速度が減少し、伸長継続時間が増大した(図 19b)。カイモグラフを作製して解析すると、コントロール細胞では微小管が中断を挟み数回に分けて伸長するのに対して、 γ -tubulin2を発現させた細胞では微小管が継続して伸長し続けることが分かった(図 19c)。つまりコントロール細胞では頻繁にカタストロフとレスキューが発生しているが γ -tubulin2A発現細胞ではカタストロフが生じにくいことが示唆された。

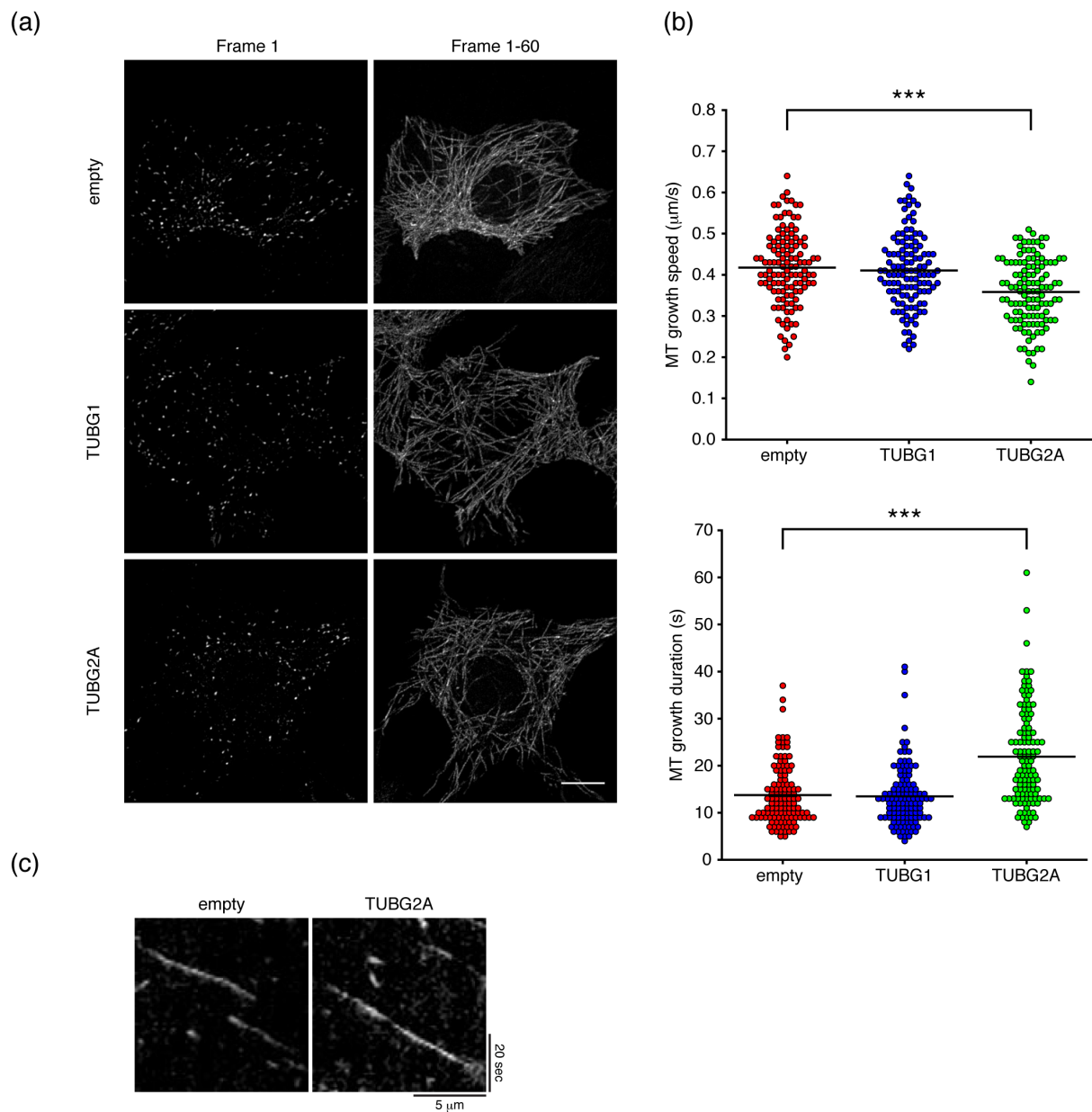


図 19. γ -tubulin2は微小管ダイナミクスを減少する (a) γ -tubulin2およびEB1-GFP発現細胞の生細胞観察。MCF7細胞にベクターのみもしくは γ -tubulin1, 2A発現ベクターをトランスフェクションした。画像は1秒おきに60秒間撮影した。最初の画像(左)と60秒間のプロジェクション画像(右)からEB1-GFPの移動軌跡が示される。Scale bar = 10 μ m (b) (a)のタイムラプス画像より算出した微小管の伸長速度および伸長継続時間。120個のEB1-GFPコメットを測定した。有意差はStudent's t-testで算出した。***, $p < 0.001$ (c) (a)の画像より作製した空ベクターまたはTUBG2A発現ベクターをトランスフェクションしたMCF7細胞におけるEB1-GFPのカイモグラフ

考察

本研究では癌細胞株における γ -tubulin2の発現を解析し、一部の癌細胞株では異所的に γ -tubulin2が発現し、増殖に寄与していることが明らかとなった。これまでに報告のあった癌細胞での γ -tubulinの発現上昇は、 γ -tubulin1と2の区別がされておらず、mRNA量の増加を検出しているのみであった[51]。本研究により、ウエスタンブロットティングに用いるゲル組成を変更するのみで簡便に γ -tubulin1と γ -tubulin2の発現を検出することができる実験系が確立でき、癌細胞株で初めて γ -tubulin2タンパク質の増加を明らかにした。 γ -tubulin2が発現していた癌細胞株の種類は乳癌由来(HCC1395, HCC1937など)が多かったが、 γ -tubulin2の発現が見られない乳癌(MDAMB468など)もあり、また直腸癌(CaR-1)や骨肉腫(Saos2)など乳癌以外の細胞でも γ -tubulin2が発現していたことから、 γ -tubulin2の異所的発現は原発巣によらず生じると考えられる。乳癌由来の細胞株に限れば γ -tubulin2の発現が高かったMDAMB436やHCC1937細胞は癌遺伝子のBRCA1に変異があることが知られている。BRCA1は γ -tubulin1をユビキチン化し中心体における微小管形成に阻害的に働くことから、 γ -tubulin2もBRCA1と相互作用する可能性が高く、結合やユビキチン化の修飾などによりタンパク質の発現や安定性が変化する可能性がある[56, 57]。つまりBRCA1の変異により γ -tubulin2が安定的に発現出来るのではないかと考えている。

γ -tubulin2の発現抑制により細胞の増殖速度が減少したが(図 6b)、 γ -tubulin2発現抑制細胞では γ -tubulin1が十分量発現しているため γ -tubulin2の発現が減少しても分裂期紡錘体の形態には大きな異常は観察されず、増殖速度が減少した直接的な原因については不明なままである。またTUBG2 siRNA #3はCaR-1およびSKBR3細胞では増殖抑制が見られなかったが、他の2種類のsiRNAでは増殖抑制が認められたので、こ

の結果はオフターゲット効果だと考えている。Aurora-Cキナーゼの例にみられるように本来なら発現していない γ -tubulin2が異所的に発現したことにより、細胞が γ -tubulin2に一部依存的な増殖をするように変化したと考えられる。したがって γ -tubulin2は細胞機能において必須ではないが、癌細胞株の増殖に寄与していると考えられる。 γ -tubulin2は体細胞ではほとんど発現していないことから、癌細胞株のみでなく実際の癌細胞においても発現が確認されれば、癌細胞特異的なマーカーや創薬のターゲットとしての応用が期待される。

γ -tubulinは微小管重合に寄与し中心体における主要なタンパク質として広く知られているが、実はその分子機能については明らかになっていないことも多い。特に哺乳類では2種類の γ -tubulinが存在するにも関わらず、 γ -tubulin2の発現は初期胚と脳に限られるため、その存在が多くの研究者に認知されてなく、 γ -tubulin2の研究はほとんど行われていなかった。しかし初期胚は癌細胞のように盛んに細胞分裂を行うのみならずc-mycなどの癌遺伝子が発現するなど類似点が多くあることに加えて、本研究で示した結果は γ -tubulin2が癌細胞株で発現していたことから、主に初期胚で発現する遺伝子が癌細胞の発生や増殖に寄与していることを示唆している。

本研究では γ -tubulin2Bを新規 γ -tubulin2スプライスバリエントとして同定した(図7)。これまでに γ -tubulin1にはスプライスバリエントが報告されていないことから、脊椎動物では3種類の γ -tubulinが存在することを明らかにした。つまり全ての脊椎動物で発現している γ -tubulin1、哺乳動物のみ発現している γ -tubulin2A、そして霊長類のみに転写される γ -tubulin2Bである。すなわち進化の過程でヒトに近づくにつれ γ -tubulinが多様になるが、進化との関連については不明である。

霊長類にのみTUBG2Bが存在するのは、霊長類のイントロン4が他の哺乳類に比

べて長いことと関連があると考えられる。霊長類のイントロン4の伸長はトランスポゾンによってもたらされた可能性がある。レトロトランスポゾンはSINE(short inserted element), LINE(long inserted element), LTR(long terminal repeat)に大別できる。SINEはその名のとおりに100~500 bpの短い反復配列であるが、霊長類特異的なSINEの一種に約290 bpのAlu配列がある。TUBG2のイントロン4にはAlu配列と相同性の高い配列が含まれていた。イントロン中に含まれるAlu配列はエキソン化しスプライシングに影響を与える例が知られており、このような機構によって霊長類への進化の過程でTUBG2Bが転写されるようになったと考えられる[58]。

γ -tubulinは立体構造上のどの部位が他のタンパク質と相互作用するかは、ほとんど明らかになっていないが β -tubulinと立体構造が非常によく似ていることから、 γ -tubulinとチューブリンドイマーとの相互作用を推察することが出来る[2]。 γ -tubulin2Bの挿入配列の位置を β -tubulinの構造と比較すると、微小管内腔に位置していた。従って γ -tubulin2Bの挿入配列は α -tubulinとの相互作用に直接的には影響を及ぼさないと考えられる。よって γ -tubulin2Bは挿入配列によって γ -TuRC構成因子との相互作用が減少した、あるいは立体構造が大きく崩壊したため γ -tubulinとしての機能を失ったと考えられる。

二次元電気泳動で γ -tubulin2を検出すると細胞に過剰発現させた γ -tubulin2Aおよび2Bや、内在性の γ -tubulin2は複数のスポットとして検出された。これら複数のスポットは主に翻訳後修飾によって等電点や泳動度が異なるためと考えられる。 γ -tubulin1では131番目のセリンのリン酸化や48番目と344番目のリジンがモノユビキチン化されることが報告されている[59, 56]。これらの残基は γ -tubulin2にも保存されているこ

とから、 γ -tubulin1と同様に翻訳後修飾されることが考えられる。ところが γ -tubulin2B-FLAGを細胞に発現させても γ -TuRC構成因子との結合や中心体への局在は認められなかった。 γ -tubulinはN末端側にタグを付加すると中心体に局在しないことが予備実験により得られたことからFLAGタグはC末端側に付加しているが、 γ -tubulin2BはC末端側へのタグの付加でも機能を失った可能性がある。しかし γ -tubulin1や γ -tubulin2Aは γ -TuRC構成因子と結合し中心体に局在したことから、 γ -tubulin2Bは γ -tubulinとしての機能を保持していないと考えられる。また γ -tubulin2の発現量は多くても γ -tubulin1の10分の1程度であり、加えて発現している γ -tubulin2は主に2Aがタンパク質として存在し、2Bは検出限界以下であったことから2Bは翻訳されていないか、もしくは発現量が著しく低く、細胞内でタンパク質としてほぼ機能していないと考えられる。しかしヒト脳や癌細胞株で転写産物は確認されたことから、mRNA型ノンコーディングRNAとして未知の機能を有している可能性は残される。

卵母細胞は γ -tubulin1よりも γ -tubulin2の発現量が高い細胞であることが分かった。卵母細胞の細胞分裂は癌細胞株の分裂様式とは大きく異なっている。まず癌細胞株は体細胞分裂であるのに対して卵母細胞は減数分裂である。また分裂期の時間も卵母細胞は数時間を必要とし、1時間程度で完了する癌細胞株の分裂に比べてかなり長い。また最も大きな特徴としてマウス卵母細胞は中心体を持たないで分裂を行う。このような違いから γ -tubulin2が卵母細胞の減数分裂に大きく寄与していることが期待されるが*Tubg2*欠損マウスでは γ -tubulin1が発現し、紡錘体形成やその後の発達に大きな違いは認められなかった。したがって γ -tubulin1は γ -tubulin2の機能を代替できることが明らかとなったが、卵母細胞における γ -tubulin2の機能の解明については今後の課題である。

本研究では γ -tubulin1を発現抑制すると分裂期の細胞で単極性紡錘体が形成された。単極性紡錘体形成の原因には微小管の安定化の他に以下の2つの可能性が考えられる。一つ目の原因として中心体に局在する γ -TuRCが減少したことにより、紡錘体形成に十分なMTOC活性が得られなかった可能性が上げられる。細胞内の総 γ -tubulinのうち、少なくとも80%は細胞質に存在し、残りが中心体に局在する[60]。つまりDay 0とDay 5では細胞内における総 γ -tubulin量に大きな差は無かったが、中心体に局在する γ -tubulin量は減少していたことが予想される。実際、 γ -tubulin1の発現抑制により生じた単極性紡錘体の免疫染色では中心体に局在する γ -tubulinのシグナルが双極性紡錘体の時よりも減少していた(図 15b)。 γ -tubulinが中心体に局在するためには γ -TuRC複合体形成が必須である。 γ -TuRCを構成するGCP2, 5や6の発現を抑制すると、細胞内の γ -tubulin量は変化しないが、 γ -tubulinが中心体に局在せず単極性紡錘体を形成する[61]。また*Tubg1*欠損マウスの胚盤胞期胚では γ -tubulin2が発現しているにも関わらず紡錘体極に γ -tubulinが局在しないことが報告されている[46]。細胞内に γ -tubulin2を発現させると γ -TuRCを形成し中心体に局在するが(図 9, 10b)、この時の γ -TuRCには γ -tubulin1が含まれていたことから、 γ -tubulin1の発現を抑制すると γ -tubulin1を含まない γ -tubulin2のみの γ -TuRCが形成することが予想される。中心体への γ -tubulin局在が減少する理由として、総量の減少に加えて γ -TuRCが中心体へ局在するためには γ -tubulin1が必要であり γ -tubulin2だけでは中心体へ局在できないため、結果として中心体に γ -TuRCが局在出来ないことが考えられる。

二つ目は中心小体が複製出来なかった可能性が考えられる。中心小体の複製に異常が生じる細胞は単極性紡錘体を形成する例が報告されている[62]。中心小体の複

製時には γ -tubulinが関わっていることから、 γ -tubulin1と2の違いにより中心小体複製障害を引き起こすことが考えられる[59, 63]。中心小体が正常に複製されなくても中心体分離は起これば、単極性紡錘体では2つの中心体が存在するように観察される。

本研究において γ -tubulinの違いが微小管ダイナミクスに与える影響について検討し、 γ -tubulin2は γ -tubulin1よりも微小管のダイナミクスを減少させ微小管の安定化にはたらくことが示唆された(図 19)。微小管の伸長継続時間やカイモグラフの結果から、ダイナミクスの違いはカタストロフの発生頻度が減少したことが原因であると考えられる。似たような表現型は γ -tubulinの変異体でも観察されている。 γ -tubulinは α 、 β -tubulinと同様にGTPと結合するが、酵母においてGTPと結合出来ない γ -tubulin変異体を発現させるとカタストロフの頻度が減少して微小管が過剰に安定化する[64]。何故、微小管のマイナス端の違いがプラス端の動態に影響を与えるのかについて詳細は不明だが、この γ -tubulinの変異体は中心体局在や γ -TuSCとの結合には影響がないが、GTPとの結合能が低いためGTP結合型 γ -tubulinと構造が異なり、マイナス端の γ -tubulinの構造の違いがプラス端に波及しカタストロフの発生を抑えていると考えられている。従って、 γ -tubulin2も1とは立体構造が異なることで微小管のダイナミクスに影響を及ぼすことが考えられる。これまでは+TIPsなどの微小管のプラス端に結合するタンパク質による微小管ダイナミクス制御が明らかとされてきたが、本研究の成果によりマイナス端結合タンパク質による微小管ダイナミクス制御の重要性も明らかにした。微小管ダイナミクスは分裂期のみならず細胞の運動時にも重要であり、癌細胞の浸潤などにも寄与するため、本研究は細胞分裂機構の解明だけでなく癌細胞の浸潤・転移など様々なステップに関わ微小管の役割を解明する上でも重要

な位置付けを示す。

微小管は過剰に安定化すると単極性紡錘体を形成することが知られている。例えば、RASSF1Aは微小管を安定化しアセチル化を促進する癌抑制遺伝子として知られているが、RASSF1Aの過剰発現は単極性紡錘体を引き起こすことが報告されている[65]。したがって、 γ -tubulin1発現抑制時の単極性紡錘体形成も γ -tubulin2の発現によって微小管が安定化したことが原因であると考えられる。 γ -tubulin2が微小管の安定化に働くことを考慮すると、 γ -tubulin2量が過剰に発現すると細胞機能に障害をもたらす可能性があるため、 γ -tubulin2の発現量はどの癌細胞株でも γ -tubulin1の1/10程度であったと考えられる。しかし、 γ -tubulin2を細胞に一過的に過剰発現させても目立った分裂期異常は観察されなかったことから、 γ -tubulin1存在下における γ -tubulin2発現の細胞に与える影響については、今後の課題である。微小管の安定化はがんの悪性化に寄与することが考えられ、 γ -tubulin2が高発現していたHCC1937細胞は、微小管重合阻害剤のコルヒチンを含む培地で処理し微小管の破壊を促しても、多くの微小管が残存している[66]。微小管の安定化は紡錘体形成時の動原体微小管の結合異常により、染色体不安定性(CIN)を引き起こすと考えられている[67]。CINはがんの悪性化を引き起こす原因となるため、今後 γ -tubulin2発現が認められた細胞株における動原体微小管の結合異常について検討し、 γ -tubulin2の発現とがんの悪性化やCINとの関連について解析を行いたい。

γ -tubulinによる微小管重合制御は真核生物で広く保存された機構だが、哺乳動物では2種類の γ -tubulinを使い分けている点は非常に興味深い。 γ -tubulinは中心体タンパク質として広く認知されているが、本質的な機能は微小管重合形成であり、中心体非依存的な微小管形成にも深く関わっていることが考えられる。 γ -tubulin2を発

現している初期胚や神経細胞では、中心体非依存的な微小管が多く存在する。胚盤胞期胚までのマウス初期胚は中心体を持たないまま分裂し、神経細胞における神経突起形成には中心体非依存的な微小管形成が重要である[68]。加えて γ -tubulin2の発現量が高かったHCC1937やMDAMB436細胞では、中心体由来と考えられる不溶性 γ -tubulinに比べて細胞質に由来すると考えられる可溶性 γ -tubulin量が増加していることも報告されている[66]。どの細胞内でも同じように見える微小管も、 α -tubulinや β -tubulinのアイソタイプや翻訳後修飾の組み合わせを考えると細胞や組織によってかなり多様であり、とくに脳の微小管は他の組織の細胞とアイソタイプや翻訳後修飾が大きく異なっている[15]。これらは γ -tubulin2が発現している脳や初期胚の細胞そして一部の癌細胞株では、他の正常組織と微小管の性質が異なっていると考えられる。つまり、細胞は細胞内環境に応じて微小管重合核形成に用いる γ -tubulin1と2を使い分けていることを示唆している。

本研究は微小管重合核形成の要である2種類の γ -tubulinについて、分子的な理解の足がかりを得ることが出来た。今後さらに γ -tubulinや微小管の解析を進めることにより、微小管形成や紡錘体形成に働く分子メカニズムを解明することが期待される。

引用文献

- [1] Downing, K. H. & Nogales, E. Tubulin and microtubule structure. *Current opinion in cell biology* 10, 16–22 (1998).
- [2] Rice, L. M., Montabana, E. A. & Agard, D. A. The lattice as allosteric effector: structural studies of alpha-beta- and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5378–83 (2008).
- [3] Anders, A. & Sawin, K. E. Microtubule stabilization in vivo by nucleation-incompetent γ -tubulin complex. *Journal of cell science* 124, 1207–13 (2011).
- [4] Kirschner, M. W. & Mitchison, T. Microtubule dynamics. *Nature* 324, 621 (1986).
- [5] Walker, R. A., O'Brien, E.T., Preyer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A. & Erickson, H.P. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of cell biology* 107, 1437–48 (1988).
- [6] Tanaka, K., Nukae, N., Dewar, H., Breugel, M., James, E.K., Prescott, A.R., Antony, C.A. & Tanaka, T.U. Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature* 434, 987–94 (2005).
- [7] Löwe, J., Li, H., Downing, K. H. & Nogales, E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of molecular biology* 313, 1045–57 (2001).
- [8] Mitchison, T. J. The engine of microtubule dynamics comes into focus. *Cell* 157, 1008–10 (2014).
- [9] Desai, A. & Mitchison, T. J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* 13, 83–117 (1997).
- [10] Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D. N. & Hyman, A. A. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science* 294, 1340–3 (2001).

- [11] Dehmelt, L. & Halpain, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome biology* 6, 204 (2005).
- [12] Kumar, P. & Wittmann, T. +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends in cell biology* 22, 418–28 (2012).
- [13] Brunner, D. & Nurse, P. CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102, 695–704 (2000).
- [14] Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. & Tsukita, S. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Current Biology* 10, 865–868 (2000).
- [15] Janke, C. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *The Journal of cell biology* 206, 461–472 (2014).
- [16] Shida, T., Cueva, J. G., Xu, Z., Goodman, M. B. & Nachury, M. V. The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21517–22 (2010).
- [17] Webster, D. R. & Borisy, G. G. Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *Journal of cell science* 92, 57–65 (1989).
- [18] Hammond, J. W., Cai, D. & Verhey, K. J. Tubulin modifications and their cellular functions. *Current opinion in cell biology* 20, 71–6 (2008).
- [19] Maruta, H, Greer, K & Rosenbaum, JL. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *The Journal of cell Biology* 103, 571-579 (1986).
- [20] Howes, S. C., Alushin, G. M., Shida, T., Nachury, M. V. & Nogales, E. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Molecular*

biology of the cell 25, 257–66 (2014).

[21] Zilberman, Y. et al. Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *Journal of cell science* 122, 3531–41 (2009).

[22] Hallak, M. E., Rodriguez, J. A., Barra, H. S. & Caputto, R. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS letters* 73, 147–50 (1977).

[23] Arce, C. A., Rodriguez, J. A., Barra, H. S. & Caputo, R. Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *European journal of biochemistry / FEBS* 59, 145–9 (1975).

[24] Piel, M, Meyer, P, Khodjakov, A & Rieder, CL. The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *The Journal of cell biology* 149, 317–329 (2000).

[25] Woodruff, J. B., Wueseke, O. & Hyman, A. A. Pericentriolar material structure and dynamics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369, (2014).

[26] Lawo, S., Hasegan, M., Gupta, G. D. & Pelletier, L. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nature cell biology* 14, 1148–58 (2012).

[27] Matsuura, K., Lefebvre, P. A., Kamiya, R. & Hirono, M. Bld10p, a novel protein essential for basal body assembly in *Chlamydomonas*: localization to the cartwheel, the first ninefold symmetrical structure appearing during assembly. *J. Cell Biol.* 165, 663–71 (2004).

[28] Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R. & Hirono, M. SAS-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr. Biol.* 17, 2169–74 (2007).

- [29] Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortgeld, M., Erat, M.C., Flükiger, I., Gönczy, P. & Steinmetz, M.O. Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell* 144, 364–75 (2011).
- [30] Hirono, M. Cartwheel assembly. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 369, (2014).
- [31] Nigg, E. A. Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends in cell biology* 17, 215–21 (2007).
- [32] Blagden, S. & Glover, D. Polar expeditions — provisioning the centrosome for mitosis. *Nature Cell Biology* (2003).
- [33] Lee, K. & Rhee, K. PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *The Journal of cell biology* 195, 1093–101 (2011).
- [34] Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. & Vande Woude, G. F. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271, 1744–7 (1996).
- [35] Kais, Z., Chiba, N., Ishioka, C. & Parvin, J. D. Functional differences among BRCA1 missense mutations in the control of centrosome duplication. *Oncogene* 31, 799–804 (2012).
- [36] Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623–7 (1997).
- [37] Ganem, N. J., Godinho, S. A. & Pellman, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278–82 (2009).
- [38] Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L. & Agard, D. A. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 709–21 (2011).
- [39] Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. & Mitchison, T. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578–83 (1995).

- [40] Lüders, J., Patel, U. K. & Stearns, T. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nature cell biology* 8, 137–47 (2006).
- [41] Raynaud-Messina, B. & Merdes, A. γ -tubulin complexes and microtubule organization. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 2430 (2007).
- [42] Gunawardane, R. N. et al. Characterization and reconstitution of Drosophila gamma-tubulin ring complex subunits. *The Journal of cell biology* 151, 1513–24 (2000).
- [43] Guillet, V. et al. Crystal structure of γ -tubulin complex protein GCP4 provides insight into microtubule nucleation. *Nature structural & molecular biology* 18, 915–9 (2011).
- [44] Haren, L. et al. NEDD1-dependent recruitment of the gamma-tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *The Journal of cell biology* 172, 505–15 (2006).
- [45] Stearns, T, Evans, L & Kirschner, M. γ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65, 825-836 (1991).
- [46] Yuba-Kubo, A., Kubo, A., Hata, M. & Tsukita, S. Gene knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice. *Developmental biology* 282, 361–73 (2005).
- [47] Vinopal, S., Černohorská, M., Sulimenko, V., Vosecká, V., Flemr, M., Dráberová, E., & Dráber, P. γ -Tubulin 2 nucleates microtubules and is downregulated in mouse early embryogenesis. *PloS one* 7, e29919 (2012).
- [48] Tseng, T. C., Chen, S. H., Hsu, Y. P. & Tang, T. K. Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA and cell biology* 17, 823–33 (1998).

[49] Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T. & Okano, Y. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *The Journal of biological chemistry* 274, 7334–40 (1999).

[50] Takabe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M. & Arai, N. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell Biol.* 8, 466-72 (1988)

[51] Maounis, N. F., Dráberová, E., Mahera, E., Chorti, M., Caracciolo, V., Sulimenko, T., Riga, D., Trakas, N., Emmanouilidou, A., Giordano, A., Dráber, P. & Kasteos, D. Overexpression of γ -tubulin in non-small cell lung cancer. *Histology and histopathology* 27, 1183–94 (2012).

[52] Zhu, F., Lawo, S., Bird, A., Pinchev, D., Ralph, A., Richter, C., Müller-Reichert, T., Kittler, R., Hyman, A.A. & Pelletier, L. The mammalian SPD-2 ortholog Cep192 regulates centrosome biogenesis. *Current biology* 18, 136–41 (2008).

[53] Blagosklonny, M., Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle* 6, 70-74 (2007)

[54] Ganem, N. J. & Compton, D. A. The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *The Journal of cell biology* 166, 473–8 (2004).

[55] Bouissou, A., Vérollet, C., de Forges, H., Haren, L., Bellaïche, Y., Perez, F., Merdes, A. & Raynaud-Messina, B. γ -Tubulin Ring Complexes and EB1 play antagonistic roles in microtubule dynamics and spindle positioning. *EBMO J.* 33, 114-128 (2014)

[56] Starita, L. M. et al. BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates

centrosome number. *Molecular and cellular biology* 24, 8457–66 (2004).

[57] Sankaran, S., Starita, L.M., Groen, A.C., Ko, M.J. & Parvin, J.D. Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination. *Mol. Cell Biol.* 25, 8656-8668 (2005)

[58] Lev-Maor, G., Sorek, R., Shomron, N. & Ast, G. The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science* 300, 1288–91 (2003).

[59] Alvarado-Kristensson, M., Rodríguez, M. J., Silió, V., Valpuesta, J. M. & Carrera, A. C. SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nature cell biology* 11, 1081–92 (2009).

[60] Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M. & Bornens, M. gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *Journal of cell science* 109 , 875–87 (1996).

[61] Bahtz, R. et al. GCP6 is a substrate of Plk4 and required for centriole duplication. *Journal of cell science* 125, 486–96 (2012).

[62] Habedanck, R., Stierhof, Y.-D. D., Wilkinson, C. J. & Nigg, E. A. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nature cell biology* 7, 1140–6 (2005).

[63] Kleylein-Sohn, J., Westerndorf, J., Clech, M.L., Habedanck, R., Stierhof, Y.D. & Nigg, E.A. Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Developmental cell* 13, 190–202 (2007)

[64] Gombos, L., Neuner, A., Berynskyy, M., Fava, L.L., Wade, R.C., Sachse, C. & Schiebel, E. GTP regulates the microtubule nucleation activity of γ -tubulin. *Nature cell biology* 15, 1317–27 (2013).

[65] Liu, L., Tommasi, S., Lee, D.-H. H., Dammann, R. & Pfeifer, G. P. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene* 22, 8125–36 (2003).

- [66] Cho, E. H., Whipple, R. A., Matrone, M. A., Balzer, E. M. & Martin, S. S. Delocalization of gamma-tubulin due to increased solubility in human breast cancer cell lines. *Cancer biology & therapy* 9, 66–76 (2010).
- [67] Bakhoun, S. F., Genovese, G. & Compton, D. A. Deviant kinetochore microtubule dynamics underlie chromosomal instability. *Current biology* : CB 19, 1937–42 (2009).
- [68] Courtois, A., Schuh, M., Ellenberg, J. & Hiiragi, T. The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *J. Cell Biol.* 198, 357–70 (2012).