

# 論文の内容の要旨

論文題目 中心体タンパク質  $\gamma$ -tubulin2 の機能解析

氏名 大橋 翼

微小管は  $\alpha$ -tubulin および  $\beta$ -tubulin からなるヘテロダイマーが重合して構成される細胞骨格である。細胞内において微小管は、微小管形成中心 (Microtubule-Organizing center; MTOC) を足場として重合する。中心体は動物細胞に特有の細胞内小器官であると同時に主要な MTOC である。 $\gamma$ -tubulin は中心体に多く局在するタンパク質で、GCP2, 3, 4, 5 および 6 と巨大な  $\gamma$ -tubulin 環状複合体 ( $\gamma$ -tubulin ring complex,  $\gamma$ -TuRC) を形成し、微小管の重合核形成を促進することで中心体における MTOC 活性の実態を担っている。 $\gamma$ -tubulin は酵母からヒトまで真核生物で広く保存されているタンパク質であるが、哺乳動物には 2 種類の  $\gamma$ -tubulin 遺伝子 (*TUBG1*, *TUBG2*) が存在する。 $\gamma$ -tubulin1 および 2 は非常によく似たタンパク質であり、ヒトにおける相同性は 98% である。哺乳動物間で保存された  $\gamma$ -tubulin1 と 2 の違いはわずか 6 アミノ酸しかなく、両タンパク質の機能の違いは不明であった。発現のパターンには違いがあり、 $\gamma$ -tubulin1 は体細胞で広く発現しているが、 $\gamma$ -tubulin2 の発現は初期胚と脳に限定されている。初期胚で特異的に発現するタンパク質はこれまでも多く知られているが、一部の初期胚特異的遺伝子は癌細胞で再び発現が増加し細胞増殖に寄与する例が知られている。 $\gamma$ -tubulin2 も主に初期胚で発現して脳以外の組織では発現していないことから、本研究では癌細胞における  $\gamma$ -tubulin2 の発現および、 $\gamma$ -tubulin1 と 2 の機能的な違いについて明らかにすることを目的とした。

まず癌細胞における  $\gamma$ -tubulin2 の発現を解析することとしたが、 $\gamma$ -tubulin1 と  $\gamma$ -tubulin2 は相同性が非常に高く、市販されている抗  $\gamma$ -tubulin 抗体は両方の  $\gamma$ -tubulin を認識するため、通常のウェスタンブロッティングでは  $\gamma$ -tubulin1 と  $\gamma$ -tubulin2 の発現を区別することは困難であった。そこで最初に、 $\gamma$ -tubulin2 の発現を検出できる系の構築を目指した。種々の条件を検討したところ、Low-bis ゲル (SDS-PAGE で使用するアクリルアミドにおける N, N'-メチレンビスアクリルアミドの割合が 1% のもの) を使用することで  $\gamma$ -tubulin1 と  $\gamma$ -tubulin2 の泳動度に差が生じ、ウェスタンブロッティングにより  $\gamma$ -tubulin1, 2 の発現を分離した別個のバンドとして確認することが出来た。この方法を用いて 25 種類の癌細胞株に対して  $\gamma$ -tubulin1, 2 の発現を検討した。 $\gamma$ -tubulin1 は全ての細胞株で強く発現していたが、このうち 15 細胞株で  $\gamma$ -tubulin2 の発現が認められた。これらの細胞株は初期胚や脳由来でないことから、 $\gamma$ -tubulin2 は一部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。

次に癌細胞株で発現していた  $\gamma$ -tubulin2 が細胞増殖に関与しているかを調べるため、 $\gamma$ -tubulin2 の発現を抑制した。 $\gamma$ -tubulin2 特異的な siRNA を構築し  $\gamma$ -tubulin2 が発現している細胞株にトランスフェクションすると、 $\gamma$ -tubulin2 の発現は減少したが  $\gamma$ -tubulin1 の発現量には大きな変動がなかった。この siRNA を用いて、 $\gamma$ -tubulin2 が高発現している 3 種類の癌細胞株に対して  $\gamma$ -tubulin2 の発現を特異的に抑制すると、コントロール細胞に比べて増殖速度が減少した。このことから、一部の癌細胞株では異所的に発現した  $\gamma$ -tubulin2 が細胞増殖に関与していることが示唆された。

癌細胞は遺伝子変異の蓄積により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  $\gamma$ -tubulin2 についての変異を検討するため、HeLa 細胞から  $\gamma$ -tubulin2 遺伝子 (*TUBG2*) の cDNA を合成し、シーケンス解析により配列を確認した。その結果、HeLa 細胞では 2 種類の *TUBG2* 転写産物を同定した。一方は既知の配列と同一であり *TUBG2A* と、もう一方は既知の配列よりも 27 塩基分長く *TUBG2B* と命名した。*TUBG2B* に特異的な 27 塩基対はゲノム上で *TUBG2A* のエクソン 4 と 5 の間のイントロン内に存在していたことから、この領域が新規エクソンとして機能し、*TUBG2B* は *TUBG2* の新規スプライスバリエーションであることが示唆された。ヒト癌細胞株において *TUBG2A* および *TUBG2B* の mRNA を RT-PCR により確認すると、 $\gamma$ -tubulin2 タンパク質が発現していた細胞でも、発現していなかった細胞でも両方の mRNA が検出された (U2OS 細胞を除く)。またヒト脳においても *TUBG2A* と *2B* の両方が転写されていることを明らかにした。しかし *TUBG2B* タンパク質を細胞に発現させても、GCP2 や GCP4 などの  $\gamma$ -TuRC 複合体構成因子と結合せず、また中心体にも局在しなかった。さらに癌細胞や脳で発現している  $\gamma$ -tubulin2 タンパク質を調べると  $\gamma$ -tubulin2A のみが検出され、 $\gamma$ -tubulin2B はタンパク質としてほとんど存在していないことが示唆された。

次に、 $\gamma$ -tubulin1 と  $\gamma$ -tubulin2 の機能の違いについて明らかにするため、*Tubg2* 遺伝子欠損マウスが発現しているマウス初期胚での  $\gamma$ -tubulin の発現について解析した。マウス卵母細胞を採取しウェスタンブロッティングにより  $\gamma$ -tubulin の発現量を調べると、野生型マウスでは  $\gamma$ -tubulin2 が高発現していたが、*Tubg2* 遺伝子欠損マウスでは反対に  $\gamma$ -tubulin1 が高発現していた。卵母細胞の分裂期染色体を免疫染色すると、どちらも樽型の紡錘体を形成しており形態に大きな違いは認められなかった。*Tubg2* 遺伝子欠損マウスは正常に発生することが報告されていることから、*Tubg2* 遺伝子欠損マウスでは、 $\gamma$ -tubulin1 が発現することで  $\gamma$ -tubulin2 の機能を相補していることが示唆された。

続いて HeLa 細胞において  $\gamma$ -tubulin1 を発現抑制すると増殖速度が著しく抑制された。この時の  $\gamma$ -tubulin 量をウェスタンブロッティングにより定量すると、 $\gamma$ -tubulin1 量は siRNA 導入時から継時的に低下していったが反対に  $\gamma$ -tubulin2 量が上昇していた。分裂期の様子を免疫蛍光染色により観察すると、双極性紡錘体が形成されず多くが単極性となり、一部の細胞ではさらに中心体の崩壊が観察された。ウェスタンブロッティングの結果とあわせて考えると、 $\gamma$ -tubulin1 の発現抑制により  $\gamma$ -tubulin2 のタンパク質量が増加しても、双極性紡錘体が形成されなかったことから、 $\gamma$ -tubulin2 が双極性紡錘体形成において、 $\gamma$ -tubulin1 の機能を相補できないことが示唆された。そこで次に、 $\gamma$ -tubulin1 発現抑制による単極性紡錘体形成を  $\gamma$ -tubulin2 の過剰発現により回復出来るか確かめた。コントロールとして  $\gamma$ -tubulin1 発現抑制細胞に siRNA 抵抗性  $\gamma$ -tubulin1 を発現させると、細胞は双極性紡錘体を示し、また単極性紡錘体のため分裂期で停止していた細胞の割合が減少した。一方、 $\gamma$ -tubulin2 を発現させると細胞は単極性紡錘体のままであり、分裂期の細胞の割合に変化はなかった。これらの結果より、 $\gamma$ -tubulin2 は双極性紡錘体形成において  $\gamma$ -tubulin1 の機能を相補できないことが明らかとなった。

微小管の両端は重合と脱重合を繰り返す動的不安定性 (微小管ダイナミクス) を示すが、このダイナミクスが破綻すると単極性紡錘体を形成することが報告されている。そこで、 $\gamma$ -tubulin1 または 2 を過剰発現させた細胞に EB1-GFP を共発現させて微小管のダイナミクスについて解析した。EB1 は微小管のプラス端に集積する因子 (Microtubule plus-end tracking proteins, +TIPs) の一種で、

特に伸長している微小管の先端にコメット状に集積する。タイムラプス観察により EB1 のコメットの進む速度および発光時間を、微小管の伸長速度および伸長継続時間として測定した。その結果、 $\gamma$ -tubulin1 を発現させた細胞ではコントロール細胞と微小管の伸長速度と時間に差は見られなかったが、 $\gamma$ -tubulin2 を発現させた細胞では速度が減少し、伸長継続時間が増大した。したがって、 $\gamma$ -tubulin2 発現細胞では微小管ダイナミクスの頻度が減少し、微小管が安定化していることが示唆された。

以上のことから  $\gamma$ -tubulin1 と  $\gamma$ -tubulin2 は双極性紡錘体形成において異なる機能を有しており、 $\gamma$ -tubulin2 は  $\gamma$ -tubulin1 を代替出来ないことが示唆された。また  $\gamma$ -tubulin2 は癌細胞で異所的に発現し微小管ダイナミクスの減少を介して、微小管の安定化を促進することが示された。