

## 審査の結果の要旨

氏名 大橋 翼

本研究は初期胚および神経細胞に特異的な発現を示す中心体タンパク質の1つである  $\gamma$ -tubulin2 の機能を明らかにするため、癌細胞での  $\gamma$ -tubulin2 の発現および  $\gamma$ -tubulin1 との機能の違いについて解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト  $\gamma$ -tubulin1 と  $\gamma$ -tubulin2 を low-bis ゲルを用いたウェスタンブロッティングによりタンパク質レベルで分離して検出できる系を開発した。この方法を用いて 25 種類のヒト癌細胞株における  $\gamma$ -tubulin の発現パターンを解析したところ、15 種類の細胞株で  $\gamma$ -tubulin2 が異所的に発現していた。
2.  $\gamma$ -tubulin2 を特異的に認識する siRNA を用いて  $\gamma$ -tubulin 発現細胞株の発現抑制を行うと、 $\gamma$ -tubulin1 の発現量に影響を与えることなく、 $\gamma$ -tubulin2 の発現量が減少した。さらに、 $\gamma$ -tubulin2 発現抑制細胞の増殖速度を調べると、増殖速度が抑制された。
3. HeLa 細胞に発現する *TUBG2* mRNA の塩基配列を確認したところ、27 bp の挿入配列を含む新規転写産物が同定された。この挿入配列は *TUBG2* mRNA のイントロン 4 と 5 の間に位置し、新規のエキソンであると考えられた。この挿入配列を哺乳動物間で比較すると、霊長類のみに存在していた。
4.  $\gamma$ -tubulin2 の新規転写産物である *TUBG2B* mRNA は、 $\gamma$ -tubulin2 タンパク質の発現が確認された細胞株に加えて、確認されなかった細胞株でも転写産物の発現が確認された。さらに正常組織であるヒト脳でも同じ転写産物が認められた。
5.  $\gamma$ -tubulin1 および既知の  $\gamma$ -tubulin2A、新規転写産物の  $\gamma$ -tubulin2B について、 $\gamma$ -TuRC 複合体構成因子との結合を解析したところ、 $\gamma$ -tubulin1 および 2A は GCP2~5 や内在性の  $\gamma$ -tubulin1 と結合していたが、 $\gamma$ -tubulin2B はこれらのタンパク質との結合が認められなかった。さらに細胞内における局在を確認すると、 $\gamma$ -tubulin1 および 2A は中心体に局在していたが、 $\gamma$ -tubulin2B は中心体への局在が認められなかった。
6. 癌細胞株およびヒト脳における  $\gamma$ -tubulin2A および 2B のタンパク質レベルでの発現を二次元電気泳動および low-bis ゲルを用いて解析したところ、 $\gamma$ -tubulin2A のみが検出され、 $\gamma$ -tubulin2B の発現は認められなかった。
7. 野生型および *Tubg2* 欠損マウスの初期胚における  $\gamma$ -tubulin の発現を解析したところ、野生型マウスの初期胚では  $\gamma$ -tubulin1 よりも  $\gamma$ -tubulin2 の発現量が高かった。一方、*Tubg2* 欠損マウスの初期胚では  $\gamma$ -tubulin2 の発現は認められず、 $\gamma$ -tubulin1 の発

## [課程-2]

現量が野生型マウスの初期胚より増加していた。

8. HeLa 細胞に  $\gamma$ -tubulin1 特異的な siRNA を用いて発現抑制を行ったところ、トランスフェクション後 72 時間で  $\gamma$ -tubulin1 の発現量は 20%以下に減少したが、この時点では細胞増殖への影響は認められなかった。そこで、siRNA を追加導入したところ、増殖速度が著しく抑制された。さらに  $\gamma$ -tubulin1 を発現抑制した細胞では  $\gamma$ -tubulin1 の発現量が減少すると同時に  $\gamma$ -tubulin2 の発現量が増加していた。
9.  $\gamma$ -tubulin1 発現抑制細胞は分裂期において単極性紡錘体を形成していた。さらに一部の単極性紡錘体を形成した細胞では中心体の断片化が認められた。加えて間期の細胞では、分裂期に単極性紡錘体を形成した細胞が間期に進入した結果と考えられる、円状に配位した多核やドーナツ状の形態をした核が認められた。
10.  $\gamma$ -tubulin1 の発現抑制による単極性紡錘体形成および分裂期に停止する表現型は siRNA 抵抗性  $\gamma$ -tubulin1 の発現により回復したが、 $\gamma$ -tubulin2 の発現では回復しなかった。
11. MCF7 細胞に EB1 と  $\gamma$ -tubulin1 または  $\gamma$ -tubulin2A を共発現させて微小管ダイナミクスを解析したところ、 $\gamma$ -tubulin1 を過剰発現させてもダイナミクスに影響は無かったが  $\gamma$ -tubulin2A の発現により微小管の伸長速度が減少し、伸長時間が増大した。これらの結果から  $\gamma$ -tubulin2 は  $\gamma$ -tubulin1 に比べて安定な微小管を形成していると考えられた。

以上、本論文は中心体タンパク質  $\gamma$ -tubulin2 が癌細胞株に異所的に発現していること、及び双極性紡錘体形成において  $\gamma$ -tubulin1 とは異なる機能を有しており、安定な微小管を形成することを明らかにした。本研究はこれまでほとんど解析されていなかったヒト  $\gamma$ -tubulin2 の発現や機能を明らかにし、中心体タンパク質による微小管制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。