

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657125

研究課題名(和文) マウス卵を用いた中心体非依存的微小管重合核の解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of acentrosomal microtubule organizing center in mouse oocytes

研究代表者

大杉 美穂 (OHSUGI, MIHO)

東京大学・総合文化研究科・准教授

研究者番号：00332586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の微小管の重合開始にはたらく チューブリンは、哺乳動物には2種類(TUBG1, TUBG2)存在するが、両者の機能の差異は不明であった。本研究では、マウス卵はTUBG2が主な チューブリンであることを見出し、TUBG2欠損マウス卵を用いた解析を行った。更に、通常、神経細胞および卵・初期胚でのみ発現しているTUBG2が複数のがん細胞株で異所的に発現しており、その発現が細胞の増殖に寄与していることを見いだした。また、卵ではTUBG2の発現がなくてもTUBG1があれば紡錘体が形成されるが、体細胞では紡錘体形成におけるTUBG1の役割はTUBG2では代替できないことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Gamma-tubulin localizes mainly to the centrosome and plays a central role in microtubule nucleation. Among the vertebrates, only mammals possess two gamma-tubulin genes, TUBG1, which is expressed ubiquitously and TUBG2, which is specific to early embryos and neurons. Here we addressed the question of whether there is a functional difference between these two gene products. We found that TUBG2 was ectopically expressed in several cancer cell lines. Our studies using these cell lines and TUBG2 deficient mouse oocytes suggest that TUBG1 and TUBG2 plays different roles in somatic cells, especially in mitotic spindle formation.

研究分野：発生細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：中心体 微小管 がん細胞 チューブリン

1. 研究開始当初の背景

主要な細胞骨格のひとつである微小管は、 α / β チューブリンダイマーが次々と重合することにより形成される。微小管重合の開始には重合核となる構造が必要であり、細胞内では γ チューブリンを含む複合体、 γ チューブリン環状複合体 (gamma-tubulin ring complex, γ TuRC) が主にその役割を担っている。植物や昆虫には2種類の γ チューブリン遺伝子が存在するが脊椎動物では多くが1種類のみ γ チューブリン遺伝子をもつ。しかし、哺乳動物には TUBG1, TUBG2 の2種類の γ チューブリン遺伝子が存在する。この2遺伝子にコードされるタンパク質はアミノ酸配列が 95% 以上同一で機能的な違いは不明である。TUBG1 がユビキタスな発現パターンを示すのに対し、TUBG2 は胚盤胞期および神経細胞に特異的な発現が報告されていた⁽¹⁾。しかし、mTUBG1 遺伝子欠損マウスは、胚盤胞期において mTUBG2 が発現しているにも関わらず分裂期紡錘体形成不全により致死となることから、両者に機能的な違いがあることが示唆されている⁽¹⁾。実際、TUBG1, TUBG2 間で異なるアミノ酸 (相違アミノ酸) はC端側に多く、中でも生物種間でよく保存されている相違アミノ酸はすでに解かれている立体構造に照らすと⁽²⁾ヘリックス9および10に2カ所ずつ存在し、いずれも側鎖が分子表面に露出している。従って、これら4アミノ酸の違いが γ チューブリンと他の分子との結合に大きな影響を与える可能性が考えられた。

(1) Yuba-Kubo et. al., Dev. Biol. 282, 361-373 (2005)

(2) Aldaz et. al., Nature 435, 523-527 (2005)

2. 研究の目的

(1) マウス卵、初期胚を用いた TUBG1, TUBG2 タンパク質の機能の違いについて

の検討

前述の各遺伝子欠損マウスの報告は mTUBG1, 2 に機能的に差がある可能性を示唆していたが、その詳細について知ること目的の1つとした。研究代表者らはマウス未受精卵～胚盤胞期に至るマウス初期胚での TUBG1, TUBG2 タンパク質の発現を解析した結果、未受精卵では TUBG2 の発現が主であり、胚盤胞期に至る過程で TUBG1 の発現量との逆転が起こることを見いだしていた (論文作成中)。マウスでは未受精卵～桑実胚期までは中心体が存在しないこと、神経細胞においては軸索や樹状突起などに多く存在する微小管については中心体以外の場所からの重合が示唆されていることを考え合わせ、TUBG1 と TUBG2 はそれぞれ、中心体と中心体以外の微小管重合活性に主に関わっているのではないかとの仮説を立て、マウス卵や初期胚における TUBG2 の発現抑制の結果、分裂期紡錘体形成にどのような影響が出るかを検討することとした。

(2) ヒト癌細胞株における TUBG2 タンパク質発現の検討

多くの癌細胞で、①中心体の過剰な存在がや γ チューブリンの発現上昇が認められている ②細胞あたりの染色体数の増加が高頻度で起こっており、染色体分配時により多くの微小管を必要とすると想像される、③分裂期キナーゼ Aurora C など通常生殖細胞や初期胚、神経細胞特異的に発現するタンパク質が癌細胞でも異所的な発現を示し、さらにその発現が癌細胞の増殖に必須である、例が報告されている。従って、癌 TUBG2 も神経以外の体細胞由来のがん細胞において発現し、その発現が当該細胞の増殖を支えている可能性があるのではないか、というアイデアに基づき、様々なヒト癌由来培養細胞において、TUBG2 タンパ

ク質の発現の有無を解析することを計画した。

3. 研究の方法

(1) マウス卵、初期胚を用いた TUBG1, TUBG2 タンパク質の機能の違いについての検討

論文発表 (Yuba-Kubo et. al., Dev. Biol. 282, 361-373 (2005)) されている mTUBG2 遺伝子ヘテロ欠損マウスの凍結胚を分与いただき、仮親への胚移植によってヘテロ欠損マウスを得た。このヘテロ欠損マウス同士との交配により、mTUBG2 ホモ欠損マウスを得た。8-16 週齢のメスの mTUBG2 ホモ欠損マウス、およびコントロールとしての野生型マウスから、PMSG, hCG 投与による過排卵処理を行い、hCG 投与後 15-18 時間後に未受精卵を採取した。未受精卵は M16 培地ドロップ内で 37°C、5% CO₂ の環境下で 30 分-1 時間培養したのちに免疫染色に用いた。また、第二極体の放出については、塩化ストロンチウムによる卵賦活化を行い検討した。

卵細胞の蛍光免疫染色は、既報 (Ohsugi et. al., Cell, 132, 771-782 (2008)) に従い、透明帯を除去したのちに 4% パラホルムアルデヒドにより固定し、各種抗体を用いて行った。

(2) ヒト癌細胞株における TUBG2 タンパク質発現の検討

各種ヒトがん由来細胞株はそれぞれ適切な培地 (表 1 に記載) を用い、37°C、5% CO₂ の環境下で培養を行った。また、hTUBG1, hTUBG2 の発現抑制実験には、それぞれに特異的な配列を対象とした siRNA を 4 種類以上合成して用いた。それぞれ 3 種類以上の siRNA によって mRNA、タンパク質の発現が特異的に抑制できることを RT-PCR およびウエスタンブロッテ

ィングによって確認した。

4. 研究成果

(1) マウス卵、初期胚を用いた TUBG1, TUBG2 タンパク質の機能の違いについての検討

mTUBG1, mTUBG2 タンパク質は SDS-PAGE による泳動度がわずかに異なり、ウエスタンブロッティングによって両者を区別することが可能である。野生型マウス卵では、mTUBG1 タンパク質の発現はわずかしら認められず、γ チューブリンの多くは mTUBG2 であるが、発生に伴い mTUBG1 タンパク質の発現量が上昇し、同時に mTUBG2 タンパク質の発現量が減少し、胚盤胞期の細胞では両者の発現量が逆転する。一方、mTUBG2 遺伝子ホモ欠損マウスから得られた未受精卵における γ チューブリンの発現をウエスタンブロッティングによって検討したところ、mTUBG2 の発現は見られず、代わりに mTUBG1 の発現が上昇しており、γ チューブリンの総量としては変化がなかった。

mTUBG2 タンパク質が主である野生型卵と mTUBG1 タンパク質のみが発現している mTUBG2 遺伝子欠損卵について、α チューブリン、β チューブリン、γ チューブリンおよび、ペリセントリンタンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行い、減数第二分裂中期の紡錘体形成および、細胞質に多数存在する微小重合中心 (Microtubule Organizing Center, MTOC) の顕微鏡観察を行ったところ、mTUBG2 欠損卵においても野生型と同等の形状、数の紡錘体および MTOC が観察され、第一極体および第二極体の放出にも異常は認められなかった。

(2) ヒト癌細胞株における TUBG2 タンパク質発現の検討

①hTUBG1, hTUBG2 タンパク質は通常の条件では泳動度がほぼ同一であり、マウスと同様の条件ではウエスタンブロッティングによる発現確認ができなかった。また、hTUBG1, hTUBG2 をそれぞれ特異的に認識する抗体は存在していなかった。このため、まず SDS-PAGE に用いるアクリルアミドゲルの組成を検討し、hTUBG1 タンパク質の泳動度が hTUBG2 タンパク質に比べて高くなる条件を見いだした (図)。

②この手法を用い、25種類のヒト細胞株についてγチューブリンタンパク質の発現解析を行い、癌由来の細胞株15種類について hTUBG2 が異所的発現をしていることを見いだした (表1, 図)。このうち、hTUBG2 の発現の高かった4種類の細胞株について hTUBG2 特異的 siRNA 処理による発現抑制実験を行い、ウエスタンブロッティングによって検出したバンドが hTUBG2 であることを確認すると共に、発

Cell Line	由来	Medium
Saos2	ヒト骨肉腫	RPMI 1640, 10%FBS
HCT 116	ヒト結腸腺癌	RPMI 1640, 10%FBS
A431	ヒト類表皮癌	DMEM, 10%FBS
PANC-1	ヒト膵臓腺癌	RPMI 1640, 10%FBS
CaR-1	ヒト直腸癌	DMEM, 10%FBS
SKBR3	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
KP-1N	ヒト膵臓癌	RPMI 1640, 10%FBS
MDAMB468	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
NUGC-3	ヒト胃癌	RPMI 1640, 10%FBS
MDAMB453	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
HCC1143	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
ZR-75-1	ヒト乳腺管癌	RPMI 1640, 10%FBS
HCC1937	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
K119	ヒト甲状腺癌	DMEM, 10%FBS
TCO2	ヒト甲状腺癌	DMEM, 10%FBS
U2OS	ヒト骨肉腫	RPMI 1640, 10%FBS
BT474	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
KOA2	ヒト甲状腺癌	DMEM, 10%FBS
WI38	ヒト胎児線維芽細胞	DMEM, 10%FBS
IMR90	ヒト胎児線維芽細胞	DMEM, 10%FBS
HepG2	ヒト肝癌	DMEM, 10%FBS
MCF7	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
MDAMB436	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS
T98	ヒト神経膠腫	DMEM, 10%FBS
HCC1395	ヒト乳癌	RPMI 1640, 10%FBS

現抑制による細胞増殖への影響を検討した。

siRNA 処理によりそれぞれの細胞の hTUBG2 の発現は約2-3割に抑制され、増殖がもとの約9割程度に抑制された。しかし、分裂期にいる細胞の割合 (分裂期インデックス) には変化がなく、紡錘体形成の異常も認められなかった。

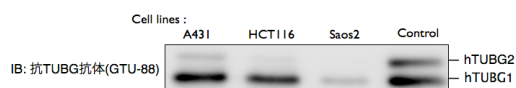


図 ヒト細胞株におけるγチューブリン発現解析 (ウエスタン解析)

③表1には含まれないがヒト子宮頸癌由来である HeLa 細胞においてもごくわずかに TUBG2 の発現が認められた。HeLa 細胞に対して hTUBG1 特異的 siRNA を処理し、発現抑制実験を行ったところ、hTUBG1 の発現量が約2割にまで減っても細胞の増殖や分裂期紡錘体形成に影響は認められなかった。しかし、更に hTUBG1 の発現量が下がると、相補的に hTUBG2 のタンパク質発現量が上がり、結果的にγチューブリンの総量は保たれることとなった。

しかし、hTUBG1 発現量が約2割以下に抑制された状況では細胞の増殖が著しく阻害され、また多くの細胞では単極の紡錘体が形成され、分裂停止が起こった。

以上の結果から、中心体をもたない卵細胞においては、TUBG2 の機能は TUBG1 によって代替可能であるが、中心体をもつ体細胞においては TUBG1 の存在が正常な紡錘体形成に重要であり、TUBG2 では補えない可能性が示唆された。

これらの内容を含む論文を現在作成中である。

④更に hTUBG2 にはこれまでに知られて

いないエクソンが存在し、この新規エクソンの有無による2種類のスプライスバリエントが存在することを見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

①Tsubasa Ohashi, Tadashi Yamamoto, Miho Ohsugi, “ Functional analysis of γ -tubulin2 in cancer cells”, 第65回日本細胞生物学会大会, 2013. 6. 19 - 2013. 6. 21, 愛知県名古屋市

②Tsubasa Ohashi, Tadashi Yamamoto, Miho Ohsugi, “ Functional analysis of γ -tubulin1 and γ -tubulin2 in cancer cell lines”, 第72回日本癌学会学術総会, 2013. 10. 3 - 2013. 10. 5, 神奈川県横浜市

③大橋 翼, 山本 雅, 大杉 美穂, “ γ -tubulin による染色体不安定性の制御”, 第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会, 2013. 11. 25 - 2013. 11. 27, 神奈川県箱根町

④Tsubasa Ohashi, Tadashi Yamamoto, Miho Ohsugi, “ Effect of expression of γ -tubulin1 and γ -tubulin2 on cell proliferation”, 第36回日本分子生物学会年会, 2013. 12. 3 - 2013. 12. 6, 兵庫県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ohsugilab2013/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大杉 美穂 (OHSUGI, Miho)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号: 00332586