

分裂期染色体分配における中心体の役割 ~中心小体の有無で何が変わるのか~

東京大学医科学研究所 癌細胞シグナル分野
大杉 美穂

1. 背景と目的

中心体は、多くの動物細胞において主要な微小管形成中心 (microtubule organizing center: MTOC) として機能するオルガネラである。細胞内微小管の重合、配向を制御することにより、細胞内輸送、細胞形態、極性、運動など、幅広い細胞事象の制御に関わる。特に分裂期には紡錘体の極に位置して紡錘体の形や向きを決定することにより、染色体分配を制御している。中心体は9つのトリプレット微小管を基本構造とする一対の中心小体 (centriole) と、中心小体を取りまく中心小体周辺物質 (pericentriolar material: PCM) から構成される。微小管の重合核である γ -tubulin環状複合体 (γ -tubulin ring complex: γ -TuRC) は、PCMに局在あるいはアンカーする。つまり、中心体のMTOCとしての実体はPCMにある。動物細胞における中心体の重要性は明らかで、多くの植物細胞や動物の卵には中心小体が存在せず、したがって典型的な中心体をもたない。このことは、中心体は紡錘体形成、染色体分配に必須ではないことを意味するが、中心体は存在する場合には紡錘体形成の要となるオルガネラであり、その役割の本質を知ることは染色体分配メカニズム解明における重要な研究課題となっている。しかし、中心体が存在する場合としない場合の紡錘体形成、染色体分配にどのような違いがあるのかについての知見はまだ少ない。

上述のように多くの動物の卵はその成熟過程で中心体を失うため、受精時には中心小体が存在しない。通常、精子から中心小体が持ち込まれて機能するため、受精卵は第一卵割期である最初の体細胞分裂期から中心体をもつ紡錘体を形成する。しかし、げっ歯類は例外的に精子の成熟過程で中心小体を失うため、受精卵は中心体を持たないまま卵割分裂を繰り返し、少なくとも初期桑実胚期までの割球では中心体をもたない紡錘体が形成される。一方、胚腔の発達した胚盤胞期の細胞には中心体が存在し、分裂期には中心体が極に位置する紡錘体が形成される。本研究は、マウス桑実胚における中心体出現前、出現後での分裂期の紡錘体微小管や染色体の動態を詳細に比較解析することにより、染色体分配における非必須の重要オルガネラ、中心体の役割を明らかにすることを目的としている。

2. 方法

マウスはBDF1系統またはBalb/cとC57BL6との交配から得られたF1を使用した。未受精卵は、過排卵処理をした8~12週齢の雌マウス卵管膨大部から得た。初期胚は過排卵処理をした野生型雌マウスを野生型雄マウスを交配させ、プラグが確認された雌の卵管膨大部から前核期胚を得て、M16培地 (Sigma) 中、37°C、5% CO₂濃度下でのin vitro培養を行い目的の時期まで発生させた。

また各種ヒト癌由来培養細胞は、10%FCSを含む適切な培地を用い、37°C、5% CO₂濃度下で培養した。

3. 研究成果

(1) マウス初期胚における γ -tubulinの発現解析

哺乳動物では、 γ -tubulinはTUBG1, TUBG2という2つの遺伝子にコードされている。それぞれの遺伝子産物 γ -tubulin1, γ -tubulin2はアミノ酸配列の95%以上が同一であり、両タンパク質の分子レベルでの機能的な違いは不明である。 γ -tubulin1はユビキタスに発現している一方で、 γ -tubulin2の発現は脳や胚盤胞期胚でのみ報告されていた。また、 γ -tubulin1, γ -tubulin2タンパク質は泳動度がほぼ同一であるが、マウスの γ -tubulin1は γ -tubulin2よりもわずかに泳動度が低く、泳動を工夫することでウエスタン解析により両者を区別することが

可能な条件を見出した。

マウス未受精卵から胚盤胞期胚を、1、2のどちらも認識する γ -tubulin抗体によるウエスタン解析を行ったところ、マウス未受精卵では γ -tubulin1はほとんど発現しておらず、 γ -tubulin2が主な γ -tubulinであることを見出した。更に、発生が進むに従って γ -tubulin1の発現が上昇すると共に γ -tubulin2の発現が減少し、胚盤胞期ではこれまでの報告の通り、 γ -tubulin1の発現が優勢となることを見出した。

また γ -tubulin2の発現変化については、マウス γ -tubulin2を特異的に認識する抗体（MBL社 Anti-TUBG2 (Mouse) mAb）を用いたウエスタン解析によっても確認できた。

（2）ヒト癌由来細胞株における γ -tubulin2の異所的発現解析

生殖細胞や受精直後の初期胚に限定的な発現を示し多くの正常細胞では発現していない遺伝子が、癌化した細胞では異所的に発現している例が報告されていることから、本研究では更にヒト γ -tubulin2についても同様の例がないか検討を行った。しかし、上述のマウス γ -tubulin2を特異的に認識する抗体はヒト γ -tubulin2は認識せず、さらにマウスと同じ条件ではヒト γ -tubulin1および2をSDS-PAGE上で分離することが出来なかった。そこで、まずそのSDS-PAGEのゲル組成を検討し、ゲルを構成するアクリルアミドとビスアクリルアミドの構成比を工夫することなどによりヒト γ -tubulin1および2を明確に分離可能な手法を確立した。この手法を用いて、25種類のヒト癌細胞株および正常細胞株について抗 γ -tubulin抗体を用いたウエスタン解析を行ったところ、このうち15の癌細胞株で γ -tubulin2と同じ移動度を示すバンドが検出された。さらに、このうち4種類の細胞株に対し、TUBG2に特異的なsiRNAを導入することで、 γ -tubulin2に相当するバンドが減弱あるいは消失することを確認した。現在、 γ -tubulin2発現抑制による微小管ネットワーク形成、紡錘体形成、細胞増殖に与える影響について検討を行っている。

4. 考察

本研究により、中心体の存在しない卵細胞ではPCMの主要構成分子の1つである γ -tubulinが γ -tubulin2であることを見出した。発生に従い γ -tubulin1および2の発現量の比には逆転が起こったがその時期は中心小体の新規合成が起こるとされる桑実胚～初期胚盤胞期と一致していた。哺乳動物において、 γ -tubulin2の発現が確認されているもう1つの細胞種である神経細胞では軸索や樹状突起において中心体以外のMTOCにおける微小管重合が盛んな細胞であることを合わせて考えると、 γ -tubulin2の発現は中心体、あるいは中心小体が存在しない状況でのMTOC活性との相関が想像され、興味深い。現在入手可能な γ -tubulin2特異的抗体は細胞免疫染色には使用できないため本研究では解析が不可能であったが、今後内在性 γ -tubulin1および2の細胞内局在を見分ける手法の確立と解析は、両者の機能の区別および中心体とそれ以外のMTOC活性の違いを明らかにする上で重要な課題となるだろう。

また、本研究では25種類の癌由来細胞株を解析し、15株においては本来体細胞では発現がみられない γ -tubulin2が異所的発現をしていることを見出した。現在解析中ではあるが、これらの γ -tubulin2発現細胞において γ -tubulin2を特異的にノックダウンしたところ、 γ -tubulin1の発現量には影響がないにも関わらず細胞増殖能の低下が見られる結果を得ている。このことはこれらの癌細胞株が γ -tubulin2に依存した細胞増殖、細胞分裂を行っていることを示唆している。また、正常細胞では γ -tubulin2が発現していないことから、 γ -tubulin2の発現は新たな癌マーカーや癌特異的な細胞増殖抑制のターゲットとなる可能性が示唆される。

5. 発表論文

本研究の成果を含む研究結果を現在投稿論文として準備中である。