

Targeted disruption of mouse gamma-tubulin gene

マウス γ チュブリンの機能解析

Akiko Yuba-Kubo

久保亜紀子

Cell Division Axis Group

細胞分裂軸グループ

Abstract

γ -tubulin is a universal component of microtubule organizing centers, and is believed to play an important role in the nucleation of microtubule polymerization. This protein is known to form several types of multi-molecular complexes within cells, of which the highly conserved γ -tubulin ring complex (gTuRC) has been well characterized. This complex consisting of several copies of γ -tubulin and at least five more species of proteins is thought to be a fundamental unit for microtubule nucleation. In human, two distinct γ -tubulin genes (TUBG1 and TUBG2) were shown to be expressed in various tissues. To clarify the physiological relevance for the existence of two distinct γ -tubulins, we first cloned their cDNAs as well as genomic DNAs from mice. The deduced amino acid sequences of these γ -tubulin isotypes showed 97% identity. FISH analyses showed that both γ -tubulin genes were located at mouse chromosome 11D. Next, we generated mutant mice with a targeted disruption of TUBG1. The heterozygous mice were normal and fertile. However, there was a total absence of homozygous γ -tubulin deficient pups produced by heterozygous intercross matings. *In vitro* culture of early embryos produced by heterozygous intercross matings, γ -tubulin-deficient embryos were found to be alive at the E3.5 stage. At the E4.5 stage γ -tubulin-deficient embryos did not form normal blastocysts *in vitro*. These findings indicated that g-tubulin is indispensable for early embryo development, and that any other molecules including TUBG2 did not functionally rescue its deficiency.

要旨

γ チュブリンは微小管のマイナス端に局在し、多種類の蛋白質からなる環状複合体として存在している。この研究では、 γ チュブリンの細胞分裂における働きを明らかにする目的で、マウスの胚性幹細胞の系を用いて γ チュブリンを

コードする遺伝子(TUBG1)を破壊した遺伝子欠損マウスを作成し、表現型の解析を行った。TUBG1欠損マウスは胚性致死で、受精後3.5日目の胚では単極性の紡錘糸が観察され、染色体の分配が行われない状態で分裂が停止していた。この結果より、 γ チューブリンは初期胚の発生において必要不可欠の分子であり、また、 γ チューブリンの機能を相補するような分子も存在しないことが示唆された。

はじめに

細胞分裂では、染色体凝縮、核膜の消失、細胞の両端に移動した中心体からの微小管の伸長、染色体の整列・分配という作業が規則正しく行われる。中心体は中心子(Centriole)と呼ばれる筒状の構造物が二つと、それを囲む中心体周辺物質(Pericentriolar material: PCM)からできていることが知られている¹⁾。細胞が分裂する時には元の中心体の中心子が二つに離れ、それぞれの母中心子と新しく作られた娘中心子が組になって新しい二つの中心体ができる。二つになった中心体の周りには微小管構造中心(Microtubular organizing center: MTOC)ができはじめ、そこから多数の微小管が伸びてくる²⁾。微小管は α ・チューブリンと β ・チューブリンと呼ばれる蛋白質がらせん状に重合して中空の管状になったもので、このような微小管は紡錘糸(Spindle)と呼ばれる。微小管構造中心には γ チューブリンを含む環状複合体(γ -tubulin containing ring complex: gTuRC)が存在し、gTuRCは微小管を中心体周辺につなぎ止める役割を果たしていると考えられる³⁾。そこで、 γ チューブリンの細胞分裂における働きを明らかにする目的で、マウスの胚性幹細胞の系を用いて γ チューブリンをコードする遺伝子(TUBG1)を破壊した遺伝子欠損マウスを作成し、表現型の解析を行った。

結果

マウス γ チューブリンのcDNA cloning

マウスには γ チューブリンをコードする独立な遺伝子が二種類発現していた。ショウジョウバエやヒトでも γ チューブリンに2つのサブタイプが有ることが報告されている⁴⁾。TUBG1はマウス肺のcDNAライブラリから、TUBG2はgenomic DNAの塩基配列情報を元に、マウスの胚性幹細胞(ES細胞: J1株)のcDNAライブラリからクローニングした。両遺伝子とも451アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、うち、439アミノ酸は相同であった。

マウス γ チューブリンのgenomic DNA cloning

実験に使用したES細胞(J1株)から作成したゲノムDNAライブラリ(λ FIXII)

からTUBG1とTUBG2の遺伝子をクローニングした。両遺伝子とも11個のエクソンからなる独立した遺伝子であった。構造的にも非常に似ており、エクソン、イントロンのつなぎ目は全く同じ場所であった。

Chromosome mapping

FISH法により、TUBG1とTUBG2の染色体上の位置を調べた結果、この二つの遺伝子は両方ともマウスの11番染色体の11D座に位置する事が明らかになった。ヒトでは両遺伝子とも17q21に存在し、約20kbしか離れていないことが発表されている5)。

Northern blot analyses

TUBG1とTUBG2について、互いに相同でない3側の非翻訳領域(約200 bp)をプローブとして、臓器別のmRNAプロットとノザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、TUBG1のmRNAは、臓器普遍的に発現し、TUBG2のmRNAは主に脳に発現していることが明らかになった。

Targeted disruption of TUBG1 gene

マウスの胚性幹細胞(J1株、129系マウス由来)に、TUBG1遺伝子の一部をネオマイシン耐性遺伝子に置換したベクターを導入し、薬剤で選抜して相同組換えを起こしているクローンを単離した。このES細胞をC57/BL系統マウスの胚盤胞に注入し、仮親の子宮に戻してキメラマウスを作成した。キメラマウスを正常のC57/BL系統のメスマウスと掛け合わせてF1世代を得た。F1世代は全てES細胞由来の野生色の毛皮であった。F1世代のヘテロノックアウトマウスどうしを掛け合わせて得られたF2世代には、野生型とヘテロノックアウトのマウスのみが得られ、TUBG1遺伝子ノックアウトマウスは胚性致死であることが示唆された。次に、着床前の8細胞期の初期胚を受精後2.5日目の卵管を灌流して回収し、M16培地を用いて培養して観察を行った。8細胞期、桑実胚の時期は実体顕微鏡レベルの観察では、野生型とノックアウト胚で差異は認められなかった。培養後1日(E3.5)で正常胚は胚盤胞を形成し、2日(E4.5)では胞胚腔が出来たが、 γ チューブリンノックアウト胚は途中で分裂が阻害され、異常な胚を形成した。

図1に正常胚とノックアウト胚の位相差顕微鏡写真と、核酸染色試薬による核酸の蛍光顕微鏡写真を示した。

TUBG1遺伝子ノックアウト胚の観察

TUBG1遺伝子ノックアウト胚の微小管や染色体がどのようになっているのか、各オルガネラの構成蛋白質に対する抗体や核酸染色試薬を用いて蛍光染色を行

い、観察をおこなった正常胚では核や、間期の微小管が観察されたが、TUBG1遺伝子ノックアウト胚では桑実胚期から異常な分裂像が見え始め、受精後3.5日目には胚盤胞は形成したが、形は正常では無かった。異常な細胞では染色体が形成され、中心体から動原体に向かって伸びている動原体微小管も観察されたが、中心体と思われる構造が一つしか見られず、染色体の整列、分配は行われていなかった。

図2に抗 β -チューブリン抗体による微小管の蛍光抗体染色と、核酸の染色をおこなった蛍光顕微鏡写真を示した。

おわりに

これらの結果から、TUBG1遺伝子のコードする γ チューブリンは初期胚の発生において必要不可欠の分子であり、また、 γ チューブリンの機能を相補するような分子も存在しないことが示唆された。マウス初期胚には母親由来の蛋白質やmRNAが若干含まれていることから、最初数回の分裂は母親由来のmRNAや γ チューブリン分子によって行われたと考えられる。

謝辞

TUBG1およびTUBG2遺伝子の染色体マッピングを共同研究してくださいました北海道大学理学部付属動物染色体研究施設・松田洋一教授、TUBG1ノックアウトマウス作成を共同研究してくださいました(株)カン研究所・秦正樹研究員に深謝いたします。

参考文献

1. R. R. Gould, and G. G. Borisy. (1977) The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J. Cell Biology* 73, 601-615.
2. B. R. Brinkley. (1985) Microtubule organizing centers. *Ann. Rev. Cell Biology* 1, 145-172.
3. Y. Zheng, M. K. Jung, and B. R. Oakley. (1991) Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65, 817-823.
4. P. G. Wilson, Y. Zheng, C. E. Oakley, B. R. Oakley, G. G. Borisy, and M. T. Fuller. (1997) Differential expression of two gamma-tubulin isoforms during gametogenesis and development in *Drosophila*. *Developmental Biology* 184, 207-221.

5. D. O. Wise, R. Krahe, B. R. Oakley. (2000) The gamma-tubulin gene family in humans. *Genomics* 67, 164-70.

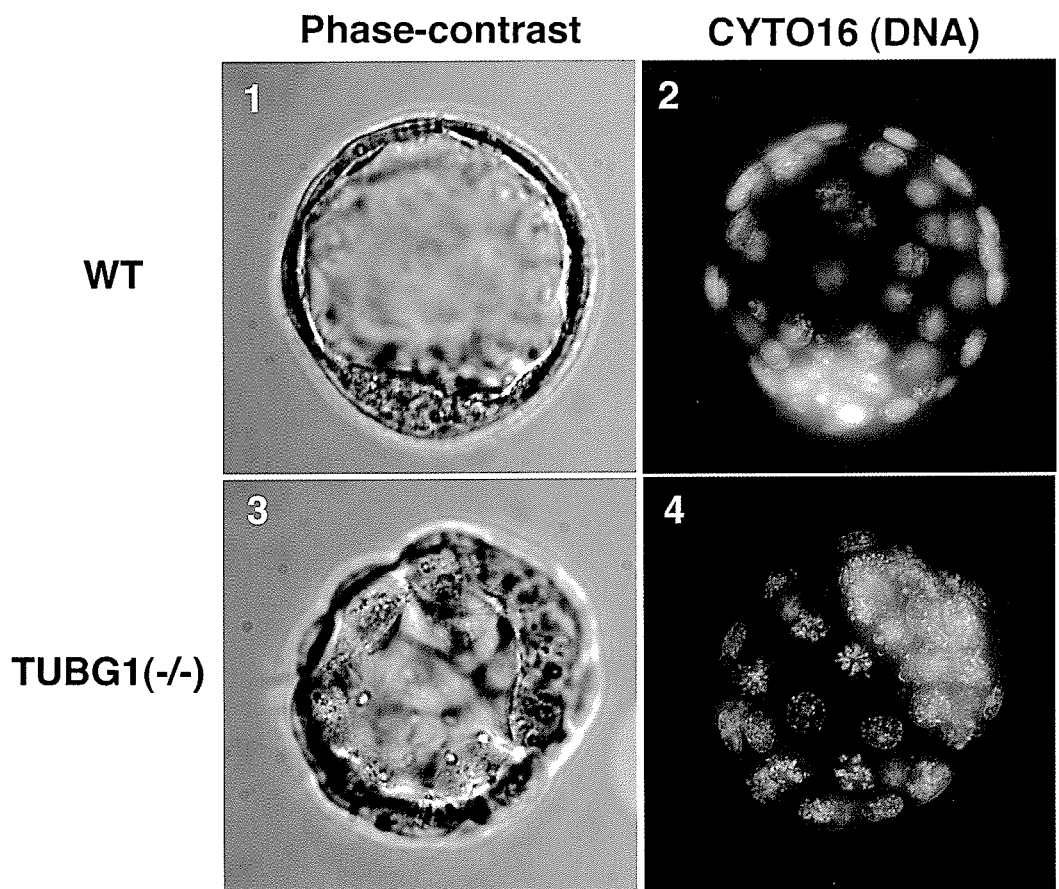


Fig. 1 wild type and TUBG1 disruptant E3.5 embryos

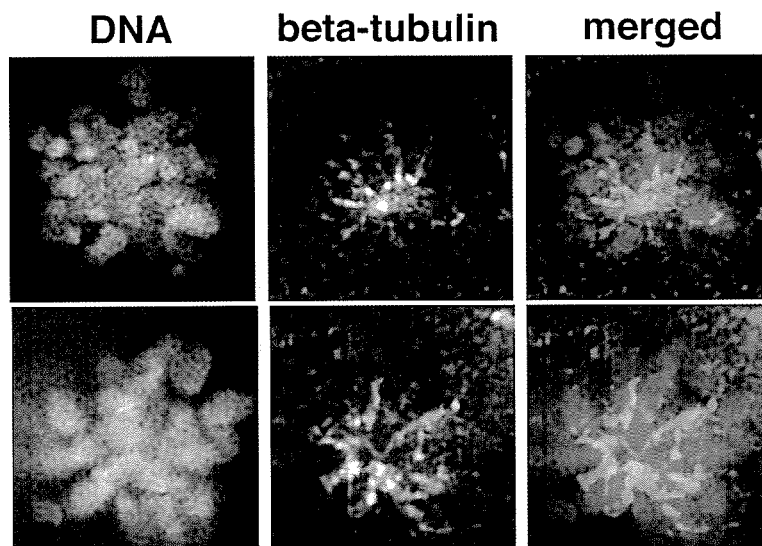


Fig. 2 beta-tubulin and DNA staining of TUBG1(-/-)embryo