

The 24th International Summer Science School in Heidelberg 2019

研究報告書

- Characterization of gamma tubulin complex -



令和元年 9 月 10 日  
熊本大学理学部理学科生物コース 4 年  
松本 菜月

## 1. はじめに

熊本市と友好姉妹都市であるハイデルベルグに1か月派遣された内の12日間で私はZMBH(ハイデルベルグ大学分子生物研究所)のSchiebel研究室にて実験を行った。

## 2. ZMBH について

Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg の略である。ハイデルベルグ大学の施設であり、主に分子生物や生物医学に関する研究が行われている。ハイデルベルグ大学の学生だけでなく、様々な国からの研究者も在籍していた。私が実験を行った Schiebel 研究室には日本人の研究者も活躍されていた。

## 3. ガンマチューブリンについて

ガンマチューブリンは $\alpha$ チューブリン、 $\beta$ チューブリンと同様にチューブリンファミリーの一つである。tetrameric  $\gamma$ -tubulin small complex( $\gamma$ -TuSC)を形成するためにGCP2とGCP3と結合し、その割合はガンマチューブリン、GCP2、GCP3の順に2:1:1であることが知られている。また、哺乳類の染色体や酵母の中心体といった微小管の形成にもガンマチューブリンは関与する。

本実験ではこのガンマチューブリンに焦点を当てその構造解析や実際に微小管の形成を顕微鏡で観察したりした。

## 4. 実験内容

### ・サンプル

ガンマチューブリンを発現している昆虫の細胞  
RPE1(ヒト上皮細胞)

### ・手法

#### ①タンパク質の溶出

まず最初にタンパク質の精製から行った。ガンマチューブリンタンパク質が発現している昆虫の細胞を溶解し細胞膜を壊した後、ニッケルアフィニティ精製を行った。これはニッケルビーズを使ってタンパク質を分離する手法である。タンパク質にはヒスチジンが付いておりこれはニッケルと結合することが知られている。これを利用してタンパク質をニッケルビーズに結合させる。次に、ニッケルビーズに結合させたタンパク質をイミダゾールを使って、ビーズから溶出させた。

さらにタンパク質の純度を上げるためにMonoQと呼ばれるイオン交換クロマトグラフィーをした。機械にサンプルをセットして、幾つかのフラクションを得た後、電気泳動して(results: fig1)、どのフラクションに最も目的のタンパク質が多く含まれているか確認した。MonoQの次はゲルろ過クロマトグラフィーをしてさらにタンパク質の純度を上げた。これはタンパク質をその分子量で分ける方法で、これによりガンマチューブリンとその他のタンパク質を分離することができる。その後、得られたサンプルを電気泳動してその大きさを調べた。(results: fig2)

#### ②タンパク質(ガンマチューブリン)の構造解析

①で得られたサンプルを電子顕微鏡で観察した。まず観察するための準備をした。私たちが今回 Negative stain of single particle と呼ばれる手法を用いた。これは重金属をサンプルに付加することによって観察する方法である。400mesh grid に観察したいサンプルを乗せて、顕微鏡で観察した。(results; fig3)

#### ③大腸菌の形質転換

①で抽出したタンパク質を増やすために大腸菌の形質転換をした。まず、His-GFP-Mozart protein プラスミドを大腸菌に取り込ませた。その大腸菌を培地移し、一晚インキュベーションをしてコロニーを形成させた。コロニーを取りさらに大きなフラスコに移して、2時間インキュベーションをしたあと、十分に大腸菌が増えたか確かめるために吸光度を計った。さらに3時間インキュベーションした後、チューブに移し遠心して-80度で保存した。

④ガンマチューブリンを発現しているヒト細胞を使ったライブセルイメージング

RPE1(ヒト上皮細胞)を使って、ノコタゾールが微小管の成長にどれだけ影響を与えるか観察した。コントロールとしてRPE1をDMSOのみで処理したもの(sample1, results fig4)、ノコタゾールを100nMの濃度で加えたもの(sample2, results fig5)、5 $\mu$ Mの濃度で加えたもの(sample3, results fig6)をそれぞれ用意した。5分ごとに写真を一枚ずつ取りそれを12時間続けたものをビデオにして(live cell imaging)、微小管がそれぞれどのように伸長していくか調べた。

また、さらにHoechstを使ってDNAを染色して同様にlive cell imagingを行った。DMSO処理したものをsample4(results fig7)、100nM、5 $\mu$ Mでノコタゾール処理をしたものをそれぞれsample5(results fig8)、sample6(results fig9)とした。

なお、ノコタゾールは細胞分裂を阻害する作用がある。

## 結果と考察

### ①タンパク質の溶出

図1は MonoQ をした後、得られたサンプルを電気泳動した時の写真である。それぞれのタンパク質量を比較し、サンプル B3,B4 で濃いバンドが見られたのでその二つのサンプルを使うことにした。

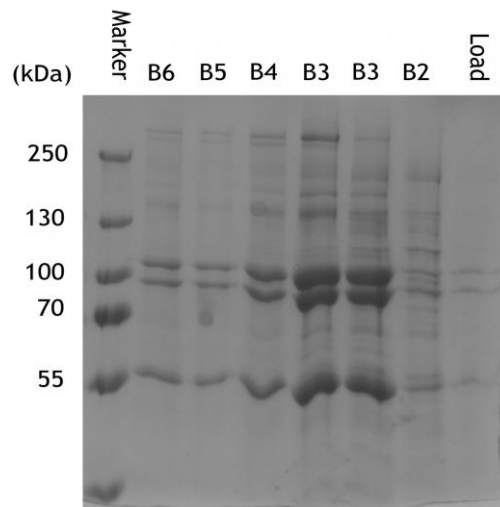


fig1; After MonoQ

また、図2はゲルろ過クロマトグラフィーをした後、MonoQ 後と同様に得られたサンプルを電気泳動した時の写真である。電気泳動を行うときはタンパク質は複合体のままではゲルの中を流れないので、必ず折りたたまれていない状態である。大きさから判断し、上から GCP2,GCP3,ガンマチューブリンであることがわかった。それぞれのバンドが濃いサンプル C5 と C6 を構造解析に使うことにした。

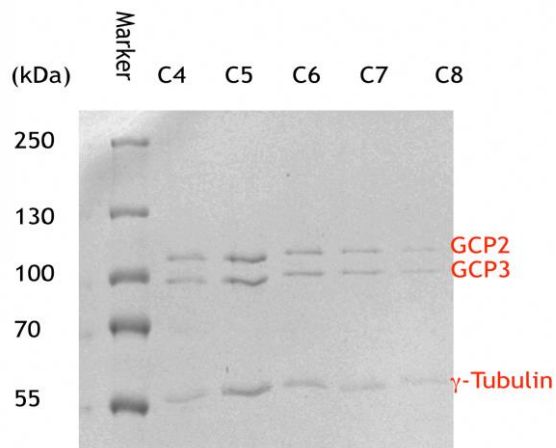


fig2 ; After Gel filtration

## ②タンパク質(ガンマチューブリン)の構造解析

ガンマチューブリン複合体は下図 a のように、二つのガンマチューブリンと GCP2,3,Spc110 から構成されている。①で抽出したタンパク質がこのような構造に見えるか、顕微鏡で観察した。実際に撮った写真が下図 fig3 である。サンプル C5 と C6 を観察したが、C5 の方がより良い画像が撮れたので、今回は C5 を載せている。赤丸で囲んでいるものを右側に拡大して載せた。V 字型のガンマチューブリンが観察できた。

サンプル C5 は構造がはっきり見えるものが多かったが、C6 はバックグラウンドがきれいではない上に  $\gamma$ -tubulin があまり観察されなかった。原因として元々タンパク質量が少なかったか、希釈のステップでミスがあったかの二つが考えられた。後日、ゲルに流した時にすでに最初のサンプルの方がバンドが濃くタンパク質が多く含まれていたことがわかったので、操作ミスではないと断定できた。

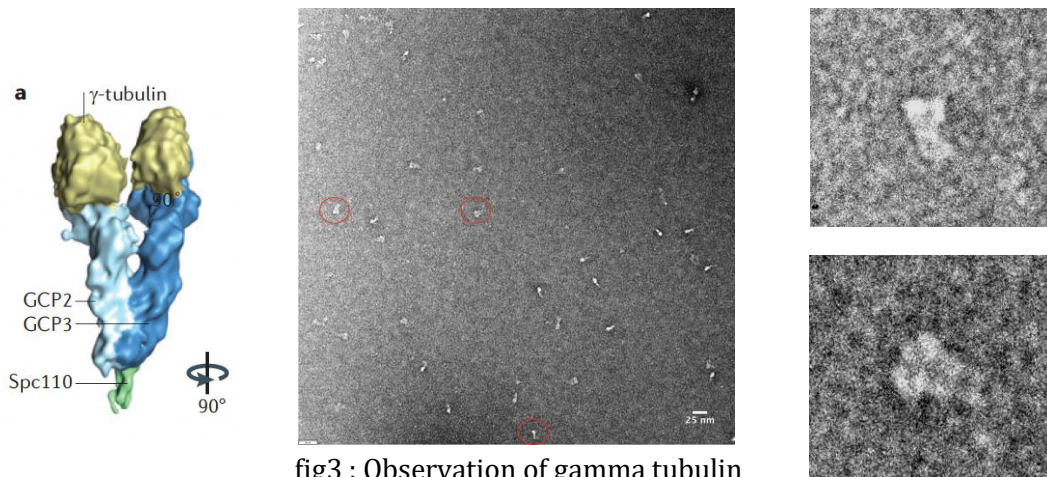


fig3 ; Observation of gamma tubulin

## ③大腸菌の形質転換

最初にインキュベーションを 2 時間した後、3 時間し、吸光度を計ると 0.711 であった。この数値は十分に大腸菌が増えていると判断できたため、-80 度で保存した。なお、この大腸菌は今後の実験では使用していない。

④ガンマチューブリンを発現しているヒト細胞を使ったライブセルイメージング

fig4 はコントロールとして DMSO 処理のみの PRE1 細胞である。微小管は mNeonGreen で染色されており、動画の中では緑色で観察できる。fig5、6 はノコタゾール処理をした時の微小管の様子を示しており fig5 はノコタゾール 100nM、fig6 は 5 $\mu$ M である。fig4 では正常な状態での微小管の成長が観察できた。fig5 と 6 では微小管の伸長が止まっている様子がそれぞれ観察できた。

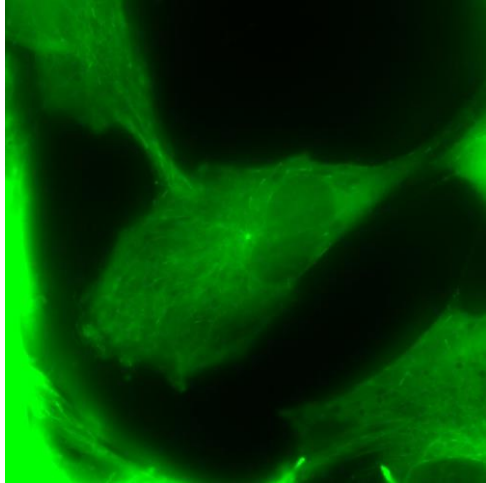


fig4 ; Control(Negative)

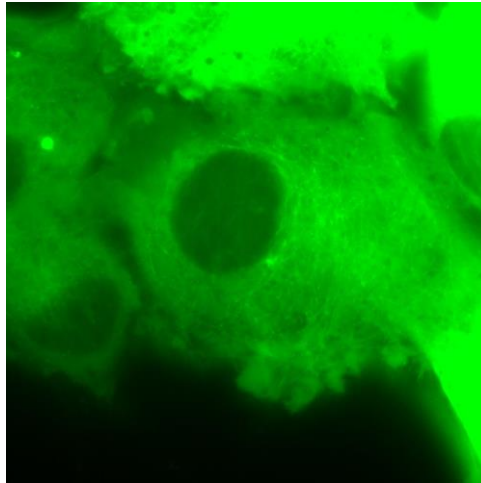


fig5 ; Nocotazole treatment 100nM

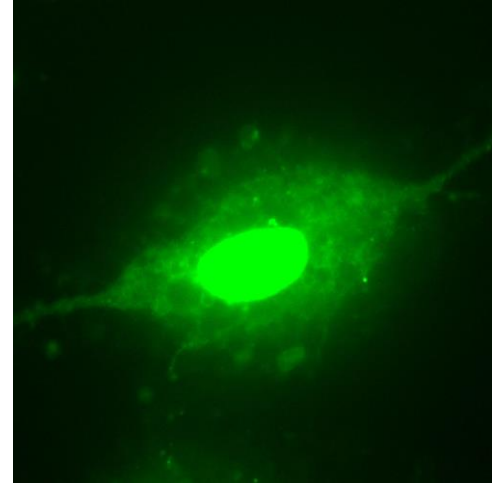


fig6; Nocotazole treatment 5 $\mu$ M

なお、DNA を Hoechst で染めたものは以下の通りである。fig5 は DMSO 処理のみしたコントロールである。ガンマチューブリンは赤、DNA は白に見える。右は微小管のみに着目したものである。

細胞分裂が前期から中期になると染色体が赤道面に集まり、それが後期になると染色体は中心体に引っ張られる様子が観察できた。

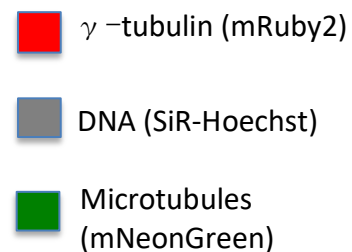
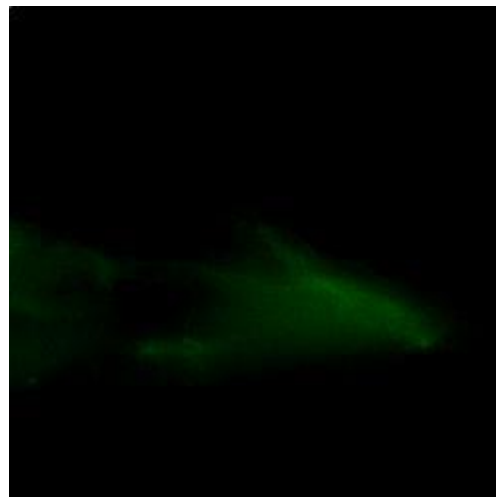
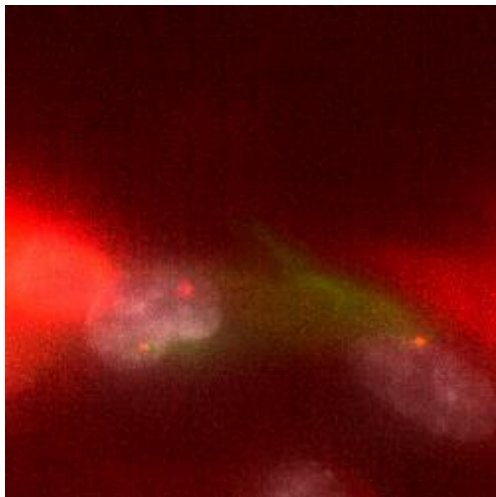


fig7 ; Control (Negative)

100nM の濃度でノコタゾール処理をしたものが fig8 である。fig7 と同様に右は微小管のみに焦点を当てた。  
コントロールと異なり、染色体は赤道面に集まることができずに、細胞分裂は進まない様子が観察できた。

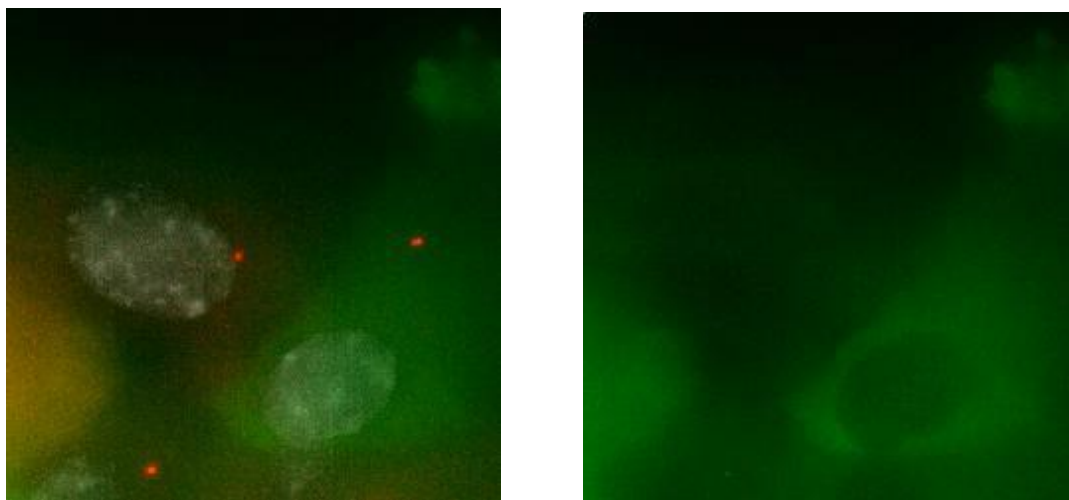


fig8 ; Nocodazole treatment 100nM

5 $\mu$ M の濃度でノコタゾール処理をしたものも同様に、染色体が赤道面に集まれずに細胞分裂が進まない様子が観察できた。

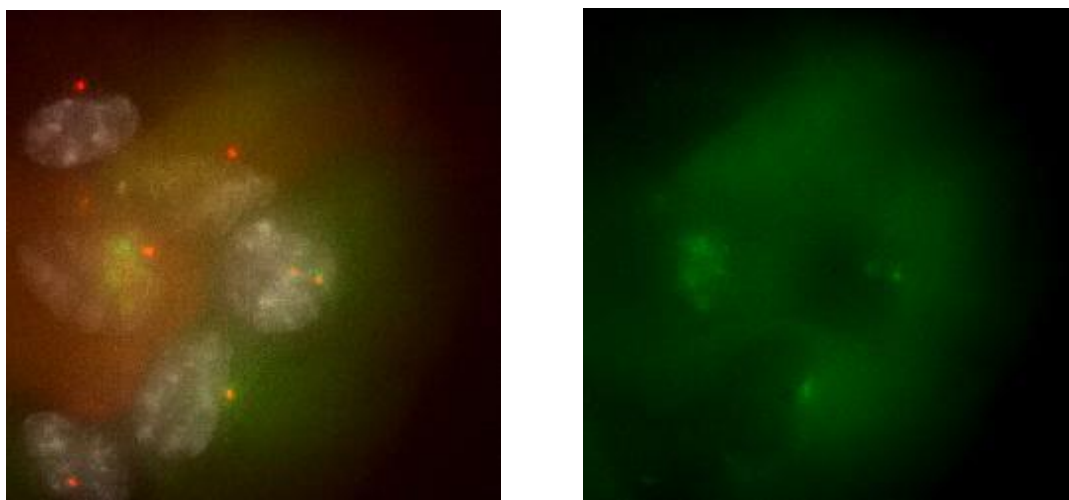


fig9 ; Nocodazole treatment 5 $\mu$ M

研究を終えて

今回 ISH で過ごした 4 週間のうち、2 週間ほどしか研究できなかったが、多くの実験をすることができた。日本で使ったことがない機械や手法を試したため、完全に実験内容を理解することは難しかったが、配属された研究室で研究員や技術員の方々ののおかげで、無事 2 週間過ごすことができた。

最後に本実験をサポートしてくださった Ursula、Dr. Elmar、そして共同実験者の Anya に感謝の意を述べたい。ありがとうございました。