

γ -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin の抗腫瘍活性検討

恵比須 春菜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

微小管作用薬はがん細胞の細胞周期進行を分裂期で停止させ、細胞死を誘導することから抗がん剤として用いられている。しかしながら、paclitaxel や vinblastine などの既存の微小管作用薬は、間期の微小管に対しても作用して微小管ネットワークを破壊するため、時として末梢神経痛を始めとする副作用を引き起こす。このため副作用の少ない分裂期特異的阻害剤が求められている。

我々は中心体に局在し、微小管核形成時に足場としてはたらいしている γ -tubulin¹⁾ (Fig. 1) に対する特異的阻害剤 gatastatin (Fig. 2) を見出し、論文等で報告してきた。²⁾ 既存の微小管阻害剤とは異なり、gatastatin は間期細胞の微小管ネットワークを破壊せずに、細胞分裂期の二極紡錘体形成を阻害することから、副作用の少ない分裂期特異的作用薬である可能性が期待される。そこで、gatastatin の細胞増殖阻害活性とその阻害機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

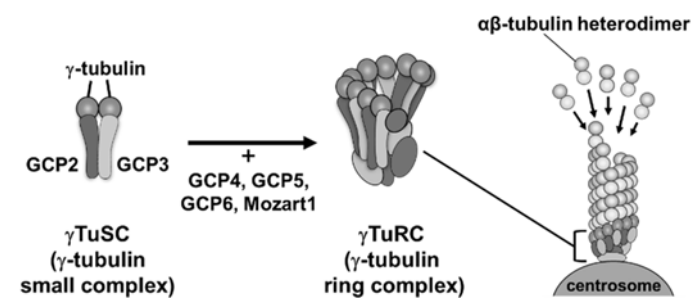
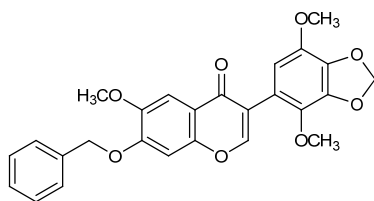
Fig. 1 γ -tubulin

Fig. 2 Gatastatin の構造

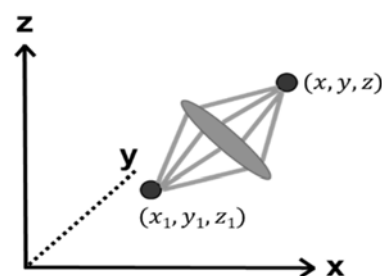
方法

1. 細胞周期解析 (FACS analysis)

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa (3.0×10^4 cells/ml) を 24 時間薬剤処理した後、70%エタノールで固定を行った。1 時間後、PI 染色液 (0.1% sodium citrate, 0.2% Nonidet P-40, 71.1 μ M propidium iodide) を加え、DNA を染色した。細胞周期分布を CyFlow® PA (PARTEC) を用いて測定した後、Multicycle AV (Phoenix Flow System) を用いて G1、S、G2/M 期細胞の割合を算出した。

2. 紡錘体形態観察・中心体間距離の計測

HeLa 細胞 (3.0×10^4 cells/ml) を 24 時間薬剤処理した後、70%エタノールで固定した。10 分後、 α -tubulin、中心体、及び DNA を、それぞれ抗 α -tubulin 抗体 (Santa Cruz, DM1A)、抗 pericentrin 抗体 (Abcam, ab4448)、DAPI で染色し、観察した。さらに、中心体の座標を計測しその距離を算出した (Fig. 3)。



$$\text{中心体間距離} = \sqrt{(x - x_1)^2 + (y - y_1)^2 + (z - z_1)^2}$$

Fig. 3 Pole-pole distance

3. Western Blotting

HeLa 細胞 (3.0×10^4 cells/ml) を 24 時間薬剤処理した後、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% Tween20, 1% glycerol, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail) に細胞を懸濁し、氷上で 15 分静置した。遠心 (15,000 rpm, 3 min) 後、上清に 1/3 量の 4 x SDS sample buffer を加え、煮ることでサンプルとした。

サンプルを電気泳動後、PVDF 膜に 1 時間転写し、5% スキムミルクで blocking を行った。各種アポトーシスマーカーの抗体を用いて western blot を行い、アポトーシスの検出を行った。

結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

参考文献

- 1) Tien-chen L. *et al.*, Targeting of γ -tubulin complexes to microtubule organizing center: conservation and divergence, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 5 (2015)
- 2) Chinen T. *et al.*, The γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle, *Nat. Commun.*, **6**, 8722 (2015)