

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	馬場 健太
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
<p>論文題目  <math>\Delta 3</math>-tubulin impairs mitotic spindle morphology and increases nuclear size in pancreatic cancer cells          （チューブリン翻訳後修飾 <math>\Delta 3</math> 化による膵癌細胞の細胞分裂時の紡錘体形態異常と核の増大）</p>			
論文審査担当者			
主 査	教授 松浦 伸也	印	
審査委員	教授 稲葉 俊哉		
審査委員	准教授 中津 祐介		
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>【背景】          細胞分裂は，多細胞真核生物の再生，成長，生殖にとって極めて重要である．適切な染色体分離は細胞分裂の重要なプロセスであり，染色体分離は微小管からなる紡錘糸と中心体からなる紡錘体極および周囲の星状体から構成される紡錘体が必要である．紡錘体の障害はがんやさまざまなヒトの病気の危険因子となることが知られており，紡錘体の適切な構造や機能にとって，微小管の動的不安定性は重要な要素である．微小管を構成するチューブリンは多数の翻訳後修飾を受ける．チューブリンの翻訳後修飾の中には，がんの増殖，転移，抗がん剤耐性に関連するものも報告されている．チューブリンカルボキシ末端（C 末端）領域に対する翻訳後修飾酵素の過剰発現や欠損は，微小管の動的不安定性を変化させる．これらの翻訳後修飾には，<math>\alpha</math>-チューブリンの C 末端アミノ酸残基が除去される脱チロシン化や，そこからさらにグルタミン酸残基が除去される <math>\Delta 2</math> 化が含まれる．申請者らは最近，<math>\Delta 2</math> 化チューブリンからさらに次のグルタミン酸残基が除去され，<math>\Delta 3</math> 化チューブリンが生成されることを発見した．<math>\Delta 3</math> 化チューブリンは，長寿命の安定な微小管で検出されているが，紡錘体の形態や細胞分裂に及ぼす影響についてはいまだ明らかになっていない．膵癌はヒト固形癌の中でも極めて予後不良な難治癌であり，チューブリンの翻訳後修飾の中には膵癌細胞と関連しているものも報告されている．<math>\Delta 3</math> 化チューブリンと膵癌との関連，また <math>\Delta 3</math> 化チューブリンの膵癌細胞への影響については，いまだ報告されていない．本研究では，膵癌細胞株 PANC-1 において，<math>\Delta 3</math> 化チューブリンが紡錘体の形態および細胞分裂に与える影響を検討した．</p> <p>【方法】          膵癌細胞株 PANC-1 に対する <math>\Delta 3</math> 化チューブリンの影響について，外因性タンパク質の過剰発現による毒性作用を避けるため，一過性の過剰発現だけでなく，<i>TUBA1B</i> 内因性プロモーターによる安定発現を用いて観察した．この安定発現のため，最近開発したゲノム編集手法（Ijaz &amp; Ikegami. <i>Cell Struct Funct</i> 46: 21-35, 2021）を用いて <i>TUBA1B</i> の 5'UTR に対して CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集を行い，蛍光タンパク質 EGFP と融合した <math>\Delta 3</math> 化チューブリンを発現する PANC-1 細胞を樹立した．紡錘体の形態は共焦点顕微鏡を用いて先行論文（Goshima G et al. <i>Science</i> 316: 417-421, 2007）に基づいた 7 つのフェノタイプに分類して評価した．さらに，<math>\Delta 3</math> 化チューブリンの発現が PANC-1 細胞の細胞増殖に与える影響を評価するため，EGFP-<math>\Delta 3</math> 化チューブリン発現細胞と EGFP-<math>\alpha</math> チューブリン発現細胞の細胞数を比較した．培養皿上に同数の細胞を播種してから 48 時間後と 96 時間後にそれぞれ実際の細胞数を測定した．最後に <math>\Delta 3</math> 化チューブリンの発現が紡錘体の形態に影響を及ぼしていることから，核の大きさに与える影響について共焦点顕微鏡を用いて核の最大断面積を測定し評価した．GFP 蛍光強度 120 以上の細胞を EGFP 陽</p>			

性群とした．カットオフ値である 120 は，トランスフェクションしていない細胞の細胞質におけるバックグラウンドシグナル強度を平均して決定した．

#### 【結果】

ペプチド配列タグ標識 HA を付加した  $\Delta 3$  化チューブリンを PGK プロモーターにより一過性に過剰発現させると，PANC-1 細胞において細胞分裂時の紡錘体形態異常の増加を認めた（68% vs. 45%,  $p = 0.0314$ ）．6 つの異常な紡錘体形態フェノタイプのうち，「紡錘体の屈曲」が最も有意に増加し（18% vs. 5%,  $p = 0.0439$ ），「紡錘糸の短縮」および「紡錘体の不整列」が有意差はないものの増加傾向を示した（紡錘糸の短縮 5% vs. 0%,  $p = 0.1526$ ；紡錘体の不整列 32% vs. 18%,  $p = 0.1396$ ）．続いて，*TUBA1B* 内因性プロモーターを用いて蛍光タンパク質 EGFP を融合させた  $\Delta 3$  化チューブリンを発現させたところ，EGFP- $\alpha$ チューブリンと比較して PANC-1 細胞において紡錘体の形態異常が認められた（54% vs. 35%,  $p = 0.0028$ ）．特に「紡錘体の屈曲」と「凝集不全」が有意に増加し（紡錘体の屈曲 6.7% vs. 0%,  $p = 0.0040$ ；凝集不全 3.3% vs. 0%,  $p = 0.0437$ ），「染色体の不整列」が増加傾向を示した（16.7% vs. 10%,  $p = 0.1287$ ）．また，細胞増殖に与える影響の評価として細胞播種後 48 時間と 96 時間後の細胞数を測定したところ，EGFP を融合させた  $\Delta 3$  化チューブリンの発現は細胞増殖を抑制する傾向を示した（48 時間後  $12.9 \times 10^3 \pm 0.9 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> vs.  $14.2 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>,  $p = 0.0676$ ；96 時間後  $47.8 \times 10^3 \pm 2.7 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> vs.  $50.8 \times 10^3 \pm 2.2 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>,  $p = 0.1249$ ）．さらに，EGFP を融合させた  $\Delta 3$  化チューブリンの発現は核サイズを有意に増大させ（ $250.7 \pm 84.2$   $\mu\text{m}^2$  vs.  $222.1 \pm 74.7$   $\mu\text{m}^2$ ,  $p = 0.0005$ ），EGFP の発現量と核サイズとの間に正の相関が観察された（ $r = 0.320$ ,  $p < 0.0001$ ）．

#### 【結論】

本研究において， $\Delta 3$  化チューブリンは膵癌細胞株 PANC-1 において紡錘体形態および細胞分裂に影響を及ぼすことが示唆された．

以上の結果から，本論文は  $\Delta 3$  化チューブリンが紡錘体形態および細胞分裂に影響を及ぼすことを示唆し、少なくとも染色体分布の異常という点では、 $\Delta 3$  化チューブリンの異常蓄積と疾患との関係の概念を提供しうるものとして高く評価される．  
よって審査委員会委員全員は，本論文が馬場健太に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた．