

ヒト中心体タンパク質 Cep169/CRBP1 の
同定と機能解析

Identification and Functional Analysis of
a Human Centrosomal Protein, Cep169/CRBP1

2016年2月

森 勇介

Yusuke MORI

ヒト中心体タンパク質 Cep169/CRBP1 の
同定と機能解析

Identification and Functional Analysis of
a Human Centrosomal Protein, Cep169/CRBP1

2016 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
化学・生命化学専攻 分子生物学研究

森 勇介

Yusuke MORI

略号一覧

(1) 細胞内小器官、タンパク質

AurA : aurora-A

CM1 : CNN motif 1

CM2 : CNN motif 2

CNN : centrosomin

EB1 : end-binding protein 1

GCPs : γ -tubulin complex proteins

GFP : green fluorescent protein

GST : glutathione S-transferase

Luc : luciferase

MAPs : microtubule associated proteins

mRFP : monomer red fluorescent protein

MT : microtubule

MTOC : microtubule-organizing center

NCKAP5L : Nck-associated protein 5-like

PCM : pericentriolar matrix

γ -TuRC : γ -tubulin ring complex

+TIPs : microtubule plus-end-tracking proteins

(2) 試薬

BSA : bovine serum albumin

CBB : Coomassie Brilliant Blue

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

Dox : doxycycline

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

FBS : fetal bovine serum

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PBS : phosphate buffered saline
PFA : paraformaldehyde
SAP: shrimp alkaline phosphatase
SDS : sodium dodecyl sulfate
TBS : Tris buffered saline
TBST : TBS-Tween20
Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane

(3) アミノ酸残基

Ala, A : alanine
Arg, R : arginine
Asn, N : asparagine
Ser, S : serine
Asp, D : aspartic acid
Cys, C : cysteine
Gln, Q : glutamine
Glu, E : glutamic acid
Gly, G : glycine
His, H : histidine
Ile, I : isoleucine
Leu, L : leucine
Lys, K : lysine
Met, M : methionine
Phe, F : phenylalanine
Pro, P : proline
Thr, T : threonine
Trp, W : tryptophan
Tyr, Y : tyrosine
Val, V : valine

(4) その他

aa: amino acids
DTB : double-thymidine block

IP : immunoprecipitation

IS : immunostaining

MS : mass spectrometry

ORF : open reading frame

siRNA : small interfering RNA

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

WB : western blot

WT : wild type

目次

第1章 序論	
第1節 動物細胞における中心体の機能	… 1
第2節 ショウジョウバエにおける CNN とヒトホモログ CDK5RAP2 の機能	… 2
第3節 紡錘体軸と細胞分化の関係	… 4
第4節 紡錘体軸の制御について	… 5
第2章 CDK5RAP2 に結合する、新規タンパク質 Cep169/CRBP1 の同定と 細胞生物学および生化学的な性質に関する基礎解析	
第1節 研究背景	… 8
第2節 CDK5RAP2 に結合するタンパク質の探索と同定	… 9
第3節 CRBP1 の分子量は 169 kDa	… 11
第4節 Cep169 の MTOC 機能の解析	… 13
第5節 微小管伸長端での Cep169 と CDK5RAP2 の関係	… 15
第6節 Cep169 の微小管伸長端の局在	… 19
第7節 小括	… 22
第3章 Cep169 の微小管動態制御機構	
第1節 研究背景	… 23
第2節 Cep169 が微小管の束化を誘導する	… 24
第3節 SxIP モチーフと微小管束化の関係	… 26
第4節 Cep169 の微小管に結合するドメインと自己会合するドメインの解析	… 28
第5節 Cep169 による微小管安定化の機構	… 32
第6節 内因性の Cep169 による微小管の安定化	… 34
第7節 小括	… 36
第4章 分裂期に活性化するキナーゼ Cdk1 と Cep169 の相互作用の解析	
第1節 研究背景	… 37
第2節 細胞周期における Cep169 の局在	… 38
第3節 キナーゼと Cep169 の関係	… 40
第4節 リン酸化部位の同定	… 43
第5節 小括	… 46

第 5 章 Cep169 による紡錘体軸の配向性制御機構	
第 1 節 研究背景	… 47
第 2 節 Cep169 の発現抑制は分裂期の異常を誘導する	… 48
第 3 節 Cep169 は星状体微小管の長さを制御している	… 51
第 4 節 Cep169 の発現抑制における紡錘体のセンタリング異常	… 53
第 5 節 Cep169 は紡錘体軸の角度を制御する	… 55
第 6 節 Cep169 の機能欠損によって起きる、紡錘体のセンタリングの異常は、 taxol 処理によって回復できる	… 57
第 7 節 CDK5RAP2 による紡錘体配向性制御	… 59
第 8 節 Dynein/dynactin 構成タンパク質 Arp1 と Cep169 の相互作用	… 61
第 9 節 Arp1 との結合ドメイン解析	… 62
第 10 節 MDCKII 細胞のシスト形成を Cep169 が制御している	… 65
第 11 節 小括	… 66
第 6 章 総括	
第 1 節 Cep169 による紡錘体軸の配向性制御モデルについて	… 68
第 2 節 CDK5RAP2 および Cep169 の分子機構に関して	… 70
第 3 節 Cep169 による組織形成の制御について	… 72
第 7 章 実験項	
第 1 節 各章での共通の実験項	… 74
第 2 節 第 2 章における実験項	… 78
第 3 節 第 3 章における実験項	… 81
第 4 節 第 4 章における実験項	… 83
第 5 節 第 5 章における実験項	… 88

参考文献

謝辞

研究業績

第 1 章 序論

第 1 節 動物細胞における中心体の機能

動物細胞における細胞内小器官である中心体は、中心小体とそれを取り囲む不定形の pericentriolar material (PCM) で構成されている。細胞周期の S 期から G2 期にかけて母中心小体から娘中心小体が形成され、細胞周期に一回のみ複製される。この過程は中心体複製と呼ばれる。また、G2 期から分裂期にかけて、 γ -tubulin ring complex (γ -TuRC) の集積に伴った PCM の増大が起きることが知られており、この過程は中心体成熟と呼ばれる。細胞周期の分裂期には二組の成熟した中心体が紡錘体の極として機能し、姉妹染色分体は娘細胞へ一つずつ分配される (Fig. 1-1) (Khodjakov and Rieder, 1999; Kuriyama and Borisy, 1981; Mahen and Venkitaraman, 2012; Zheng et al., 1995)。

中心体は細胞骨格である微小管の重合核として、微小管形成中心 (microtubule organizing center; MTOC) の機能をもつ (Bornens, 2012)。細胞周期を通して、微小管は細胞骨格として細胞内の物質輸送や形態維持を行い、分裂期には紡錘体を構築し、染色体を娘細胞に分配する装置として機能している。中心体には 200 種類以上のタンパク質が存在することが報告されており、Fig. 1-1 に示した中心体サイクルを制御しているが、中心体の複製や成熟機構には不明な点が多く、これらの機構を明らかにすることが細胞内の事象を解析していく上で重要である。

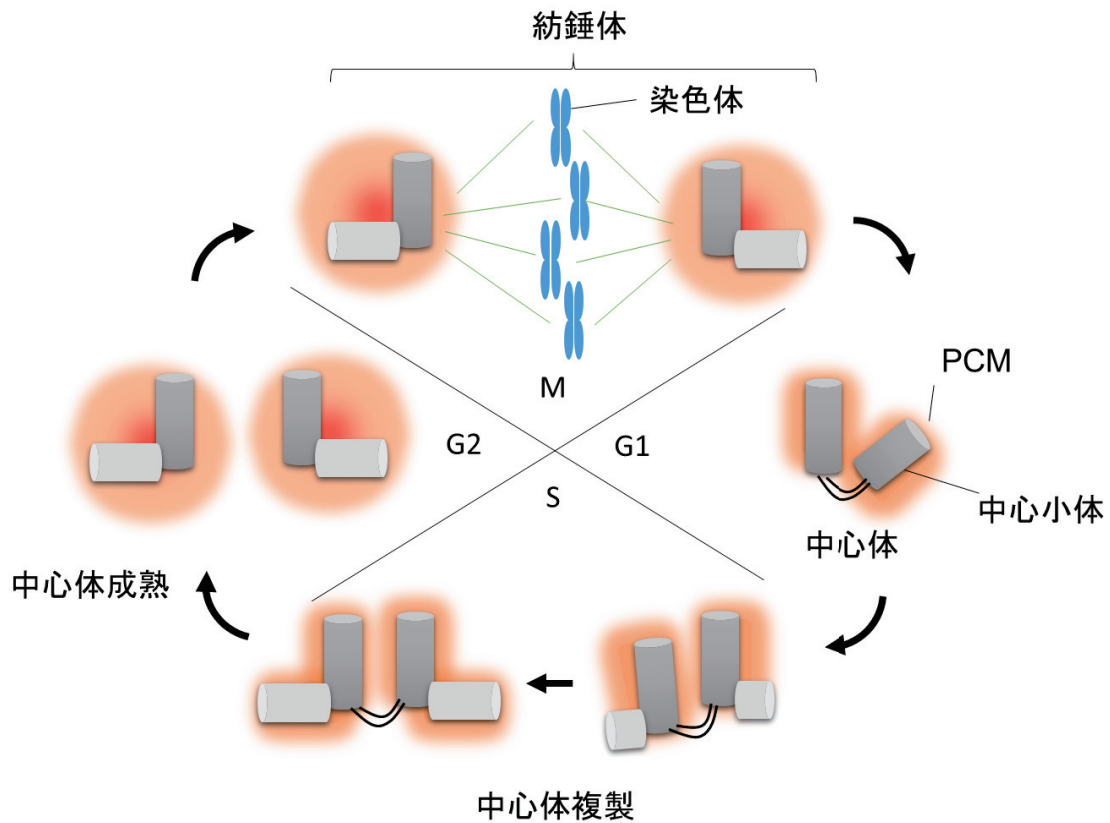


Figure 1-1. 中心体サイクル

細胞周期における中心体を示した。

第2節 ショウジョウバエにおける CNN とヒトホモログ CDK5RAP2 の機能

これまでの寺田研究室の先行研究から、ショウジョウバエにおける中心体タンパク質 centrosomin (CNN)が、中心体に γ -TuRC を集積する上で足場タンパク質として機能し、中心体成熟を制御している機構が提唱されていた (Terada et al., 2003)。CNN の N 末端の領域には、酵母におけるホモログ Mto1p および Pcp1p から、ヒトのホモログ CDK5RAP2 に至るまで構造的に高度に保存された CNN motif 1 (CM1)が存在し、この領域が γ -tubulin と結合することによって γ -TuRC を中心体へ集積させる (Fong et al., 2008; Sawin et al.,

2004; Terada et al., 2003)。 γ -TuRC は、6 つの GCPs (γ -tubulin complex proteins)から構成された環状の複合体であり、環に沿って α -tubulin と β -tubulin のヘテロ二量体が重合し、微小管が形成される(Fig. 1-2) (Zheng et al., 1995)。CNN は γ -TuRC の集積によって、中心体の微小管重合を制御していることが明らかになっている。

CNN における仕組みが、より高等な動物細胞でどれだけ機能的に保存されているかを明らかにする上で、CNN のヒトホモログである CDK5RAP2 の機能解析は重要である。CDK5RAP2 の機能は中心体成熟のみならず、紡錘体極間の距離の制御や、DNA 損傷応答にかかわることが報告されているが、どのような分子と相互作用することで機能しているのかという分子機構については不明な点が多く残されている (Barr et al., 2010; Fong et al., 2008)。さらに、2005 年にヒト小頭症の原因遺伝子としても CDK5RAP2 は報告され、神経細胞の発生分化における機能が注目されているが詳細な分子機構は明らかになっていない (Woods et al., 2005)。一方、Kaufman らによって、CNN 遺伝子を欠損したショウジョウバエは、神経分化に失敗し頭の小さい個体が生まれることが報告されているため、ヒト CDK5RAP2 もショウジョウバエの CNN と同様に、神経細胞の分化における制御があると考えられているが、どのようにして細胞の分化に関与しているか、詳細な解析は報告されていない (Heuer et al., 1995)。

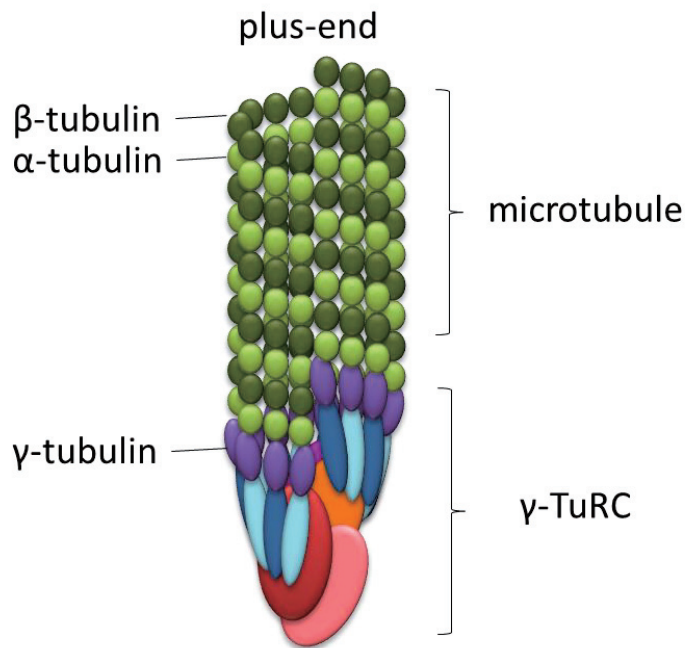


Figure 1-2. γ -tubulin と微小管重合

γ -TuRC を構成するタンパク質と伸長する微小管を示した。

第 3 節 紡錘体軸と細胞分化の関係

細胞分化を制御する一因として、紡錘体軸の配向性による制御モデルが提唱されている (Fig. 1-3)。紡錘体は中心体から伸長する微小管によって形成され、娘細胞に対して染色体を均等に分配する装置としての機能が知られていたが、近年、紡錘体軸決定が幹細胞分化時の、対称または非対称分裂を制御する上で重要な機能をもつことが報告されている。神経幹細胞や上皮幹細胞の分化時には、紡錘体軸の方向に依存して娘細胞の分裂方向が変わり、幹細胞の自己複製または、細胞分化へと細胞の運命が決定される。そのため、紡錘体軸の異常は小頭症のような発生不全や多発性嚢胞腎などの疾患を引き起こすことが示唆されている (Knoblich, 2010; Lu and Johnston, 2013; Siller and Doe, 2009; Woods et al., 2005)。しか

し、動物細胞における紡錘体軸の配向性を決定する因子についての報告は少なく、紡錘体を制御する分子の探索と、詳細な分子機構の解明が求められている (Matsumura and Toyoshima, 2012; Noatynska et al., 2012)。

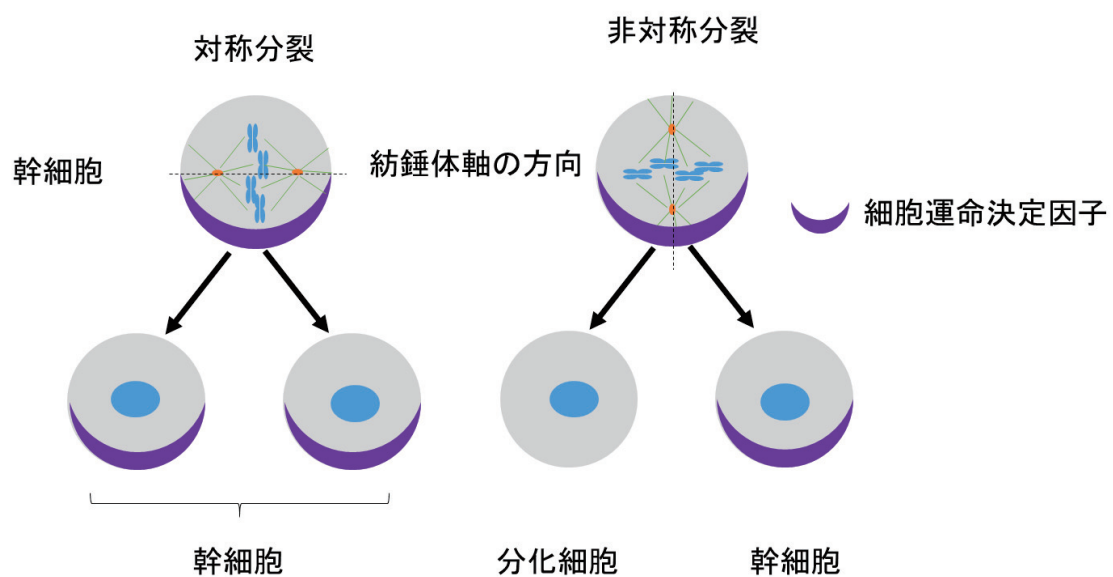


Figure 1-3. 紡錘体軸の配向性による細胞分化制御モデル

分化因子の極性方向に対して紡錘体軸が直行し、対称分裂によって細胞の自己複製が起きる(左)。分化因子の極性方向に対して紡錘体軸が平行に配向し、細胞の非対称分裂が起きる(右)。

第4節 紡錘体軸の制御について

紡錘体軸を制御する上で、星状体微小管と細胞皮層との相互作用が重要な機構であるこ

とが報告されている。この相互作用は微小管伸長端に集積する microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs)によって制御されていることが示唆されている。+TIPs には、end-binding 1(EB1)を含む、EB1 結合タンパク質である adenomatous polyposis coli (APC)、cytoplasmic linker protein (CLIP)、CLIP-associated protein (CLASP)が存在しており、微小管の動態の調節や、細胞内小器官と相互作用することで、細胞内の極性を制御していることが報告されている (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Carvalho et al., 2003; Galjart, 2005; Mimori-Kiyosue and Tsukita, 2003; Schuyler and Pellman, 2001a)。

EB1 タンパク質の発現抑制は、ショウジョウバエの S2 細胞やヒト培養細胞において、紡錘体軸の配向異常を引き起こすことが報告されている (Goshima and Vale, 2005; Gundersen and Bretscher, 2003; Rogers et al., 2002; Toyoshima and Nishida, 2007)。さらに、分裂酵母では、EB1 のホモログ Bim1 と APC ホモログ Kar6 の複合体が myosin に結合して、spindle pole body を娘細胞方向に配向させている (Gundersen and Bretscher, 2003; Ten Hoopen et al., 2012)。これらの報告から、+TIPs による紡錘体軸の配向性制御機構が種を越えて保存されていることが示唆されるが、+TIPs がどのように協調して機能を発揮しているかは不明な点が多い。また、前述の CDK5RAP2 も中心体のみならず微小管伸長端に局在する+TIPs のメンバーであり、EB1 との結合によって微小管の動態を変化させていることから、CDK5RAP2 が紡錘体軸の配向性の決定において関与している可能性が示唆されている (Bieling et al., 2007; Fong et al., 2009; Tirnauer et al., 2002b)。

脊椎動物では、細胞皮層に存在する dynein/dynactin 複合体が星状体微小管を捕捉することが報告されている (Berrueta et al., 1998; Choi et al., 2002; Tanenbaum et al., 2008; Tirnauer et al., 2002a)。dynein/dynactin 複合体は、様々なアダプタータンパク質と結合することが知られており、Gai-LGN-NuMA 複合体が dynein/dynactin の細胞皮層への局在を制御している (Du and Macara, 2004; Knoblich, 2010; Siller and Doe, 2009; St Johnston and Ahringer, 2010)。また、dynein は微小管のマイナス端に向かうモータータ

ンパク質であるため、星状体微小管を捕捉しけん引することで紡錘体を正しい位置に固定している (Espiritu et al., 2012; Gonczy et al., 2001; Grill et al., 2001)。しかしながら、dynein/dynactin 複合体による星状体微小管の捕捉機構はほとんど明らかになっておらず、+TIPs と dynein/dynactin 複合体との関連性を解明する必要がある。

本論文では、紡錘体軸の配向決定における分子機構解明を目的として、中心体および微小管の制御に関連するタンパク質の同定と機能解析を行った。CNN のヒトホモログである CDK5RAP2 に着目し、CDK5RAP2 に結合する分子を探索することで、中心体や紡錘体軸の制御における未知の機構を明らかにすることを考えた。CDK5RAP2 における種を越えて高度に保存されたモチーフ(CM1)に結合する分子の探索を行い、これまで機能について報告のない新規のタンパク質を同定し、遺伝子を単離した。このタンパク質を、Cep169 (centrosomal protein 169kDa)/CRBP1(CDK5RAP2-binding protein 1)と命名し、分子機構や機能の解析から紡錘体軸の配向性を制御する因子であることを明らかにした。

第2章 CDK5RAP2 に結合する、新規タンパク質 Cep169/CRBP1 の同定と細胞生物学および生化学的な性質に関する基礎解析

第1節 研究背景

ヒト細胞における CDK5RAP2 は、ショウジョウバエにおける CNN と同様、中心体の成熟機構に関与し、中心体から伸長する微小管を制御することが報告されている (Kumar et al., 2009)。また、CDK5RAP2 は中心体以外にも微小管の伸長端に局在することから、microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs)のメンバーであることが報告されている。多くの+TIPs は EB1 をコアとして複合体を形成し、微小管の伸長端へ局在することで、微小管の動態に関与することが報告されている。短い疎水性の(S/T)x(I/L)P 配列(SxIP モチーフ)が、EB1 との結合に必要とされ、CDK5RAP2 は、SxIP モチーフを介して EB1 と相互作用し、微小管の重合を正に制御することが報告されている (Fong et al., 2009)。また、CDK5RAP2 の機能欠損は、神経幹細胞の分化異常に伴った、小頭症(microcephary)を発症することが報告されている (Woods et al., 2005)。ヒト細胞において、CDK5RAP2 のもつ中心体や微小管の動態を制御する機能が、細胞の分化に大きく関与している可能性が示唆されているが、CDK5RAP2 に関する詳細な分子機構はいまだ明らかになっていない点が多い (Hannak et al., 2001; Kaindl et al., 2010; Kumar et al., 2009)。そこで本章では、CDK5RAP2 に結合する分子を探索することで、これまで未知であった CDK5RAP2 に関する分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

CDK5RAP2 の N 末端には種を越えて高度に保存された CM1 領域が存在する。本研究では、この CM1 に結合する分子の探索を行うことで、これまで機能について報告のないタンパク質を同定し、その遺伝子を単離した。このタンパク質を、Cep169 (Centrosomal protein 169kDa)/CRBP1 (CDK5RAP2-binding protein 1)と命名し、中心体での機能とともに、さ

らに、新規の+TIPs のメンバーであることを同定し、微小管伸長端における分子機構の解析を行った。

第 2 節 CDK5RAP2 に結合するタンパク質の探索と同定

CDK5RAP2 による微小管制御の分子機構を明らかにするため、CDK5RAP2 に結合する因子の探索を yeast two-hybrid 法を用いて行った。ベイトには、酵母からヒトに至るまで高度に保存された領域である CM1 を含む CDK5RAP2 の 58-196 aa の領域を用い、プレイにはマウス初期胚由来の cDNA ライブラリーを用いた。スクリーニングの結果、NCKAP5L (Nck-associated protein 5-like) 遺伝子を単離し、NCKAP5L の N 末端が CDK5RAP2 と結合することを示した(Fig. 2-1A, B)。同定した NCKAP5L を CRBP1 (CDK5RAP2 Binding Protein 1) と仮に命名し解析を行った。

さらに、ヒト細胞における CDK5RAP2 と CRBP1 の相互作用を確認するため、ヒト培養細胞 HEK293T に GFP-CRBP1 および FLAG-CDK5RAP2 を共発現させ、免疫沈降実験によって結合領域を解析したところ、酵母での実験と同様、CRBP1 の N 末端 1-135 aa が CDK5RAP2 との結合領域であることが明らかになった(Fig. 2-1A, C)。また、脊椎動物の間での CRBP1 のアミノ酸配列の相同性比較から、CRBP1 の N 末端が高度に保存されていることが明らかになり(Fig. 2-1D)、CDK5RAP2 と CRBP1 の結合が種を越えて保存されていることが示唆された。

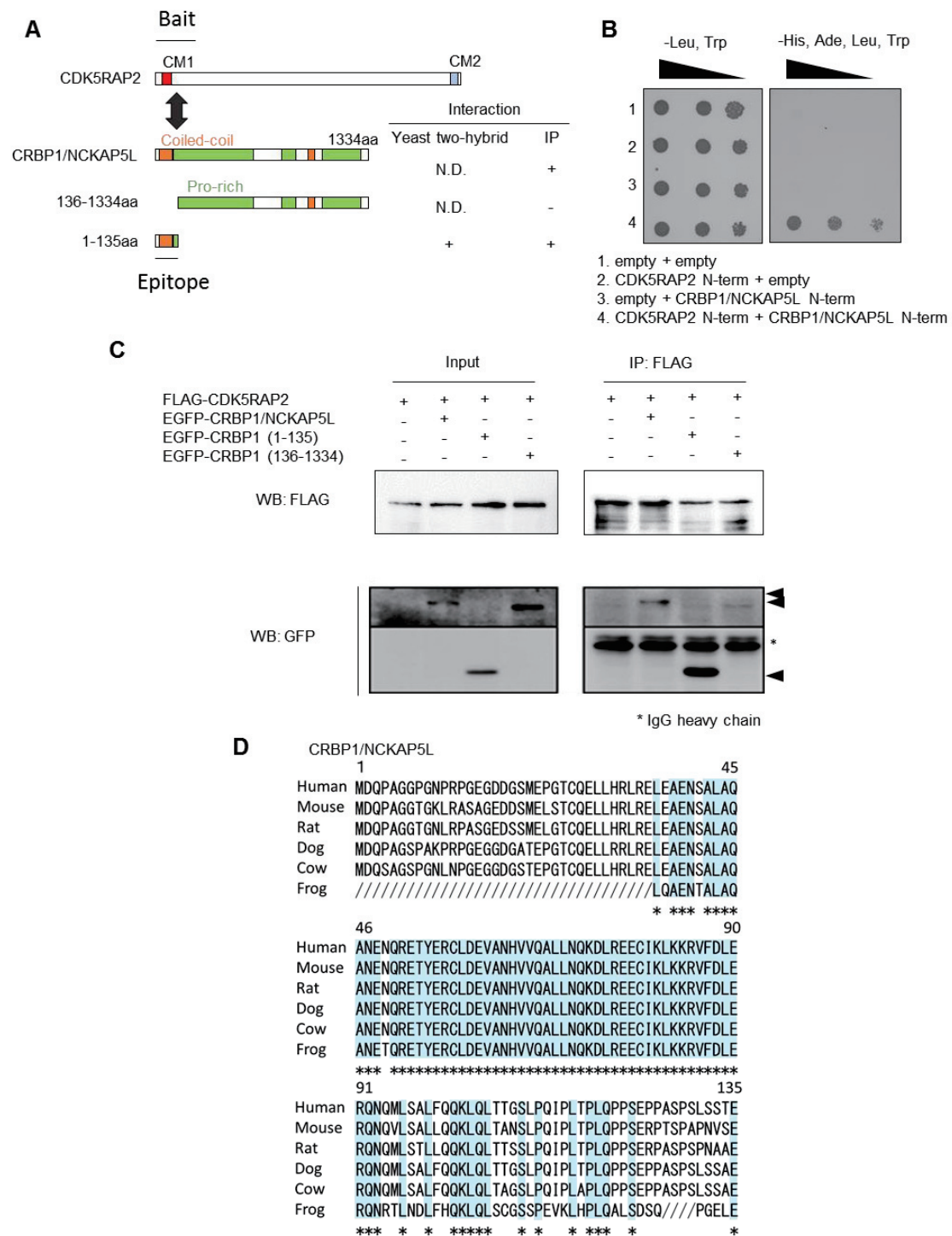


Figure 2-1. CDK5RAP2 に相互作用するタンパク質 CRBP1/NCKAP5L の同定

(A) CDK5RAP2 および CRBP1/NCKAP5L タンパク質のドメインを示した。CDK5RAP2 と CRBP1/NCKAP5L の全長および作製した欠損変異型(136-1334 aa、1-135 aa)を用いた、結合実験の結果を示した。

(B) Yeast two-hybrid 法による、CM1 と CRBP1/NCKAP5L 末端との相互作用の確認。栄養制限培地(-Leu, -Trp または、-His, -Ade, -Leu, -Trp)のプレート上に、各遺伝子を導入した酵母の培養液をスポットした。

(C) HEK293T 細胞に FLAG-CDK5RAP2 と GFP-CRBP1/NCKAP5L の全長または欠損変異型(136-1334 aa、1-135 aa)を共発現し、細胞の抽出液から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降実験を行い、抗 FLAG 抗体および抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットによるタンパク質の検出を行った。黒の矢印は FLAG-CRBP1 の全長および各種欠損変異型の位置を示している。

(D) 脊椎動物間における、CRBP1/NCKAP5L N 末端のアミノ酸配列の相同性を比較した。

第 3 節 CRBP1 の分子量は 169 kDa

前節での探索の結果、CDK5RAP2 の新規の結合タンパク質として CRBP1 を同定した。CRBP1 のタンパク質の発現量および局在解析のために、CRBP1 タンパク質の N 末端 1-100 aa をエピトープにしたウサギ由来のポリクローナル抗体を作製した(Fig. 2-1A)。ヒト培養細胞である HeLa、U2OS、HEK293T 細胞の抽出液を用い、ウエスタンブロットにより内因性の CRBP1 タンパク質が発現していることを確認した(Fig. 2-2A)。また、CRBP1 に対する siRNA を作製し、RNA 干渉による CRBP1 タンパク質の発現抑制効果があることを確認した(Fig. 2-2A)。

次に、CRBP1 タンパク質の分子量を測定するため、doxycycline による FLAG-CRBP1 発現誘導型の細胞株を樹立し、ウエスタンブロットにより FLAG-CRBP1 が 135 kDa から 180 kDa の範囲で、内因性の CRBP1 とほぼ同一の分子量で検出されることを確かめた (Fig. 2-2B)。さらに細胞の抽出液から抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行ったサンプルを SDS-PAGE により展開し、タンパク質の銀染色を行った。Doxycycline の添加の有無におけるタンパク質のバンドを比較したところ、doxycycline を添加したレーンにおいて黒矢印で示した位置

に FLAG-CRBP1 のバンドが検出された(Fig. 2-2C)。分子量マーカの移動度から検量線を作製し、CRBP1 の正確な分子量を測定した。ORF から想定される分子量は 139.459 kDa であったが、分子量測定の結果 CRBP1 のタンパク質の分子量は 169 kDa であり、また、CRBP1 は中心体に局在することから、Cep169 (Centrosomal Protein 169kDa)と新たに命名し解析を行った(Fig. 2-2C, 2-3A)。

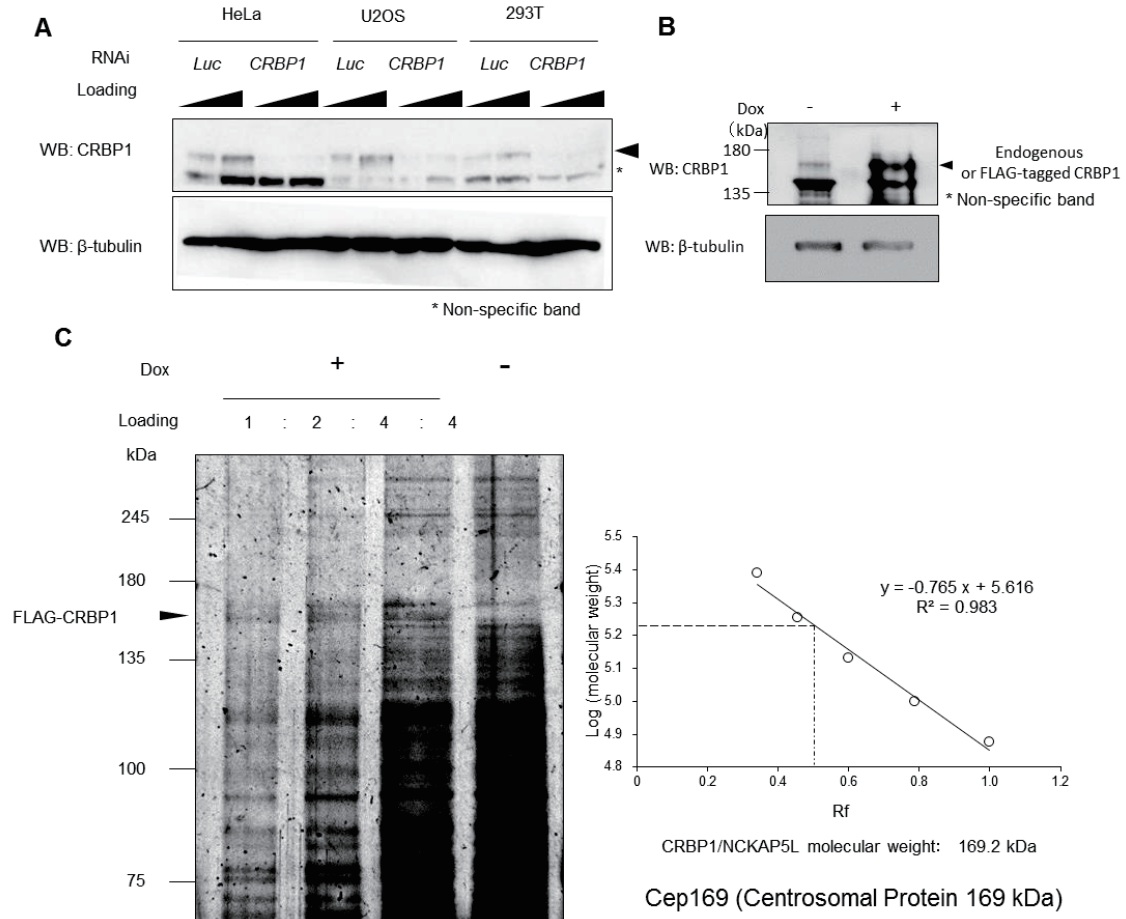


Figure 2-2. CRBP1/NCKAP5L のウエスタンブロットおよび銀染色による分子量測定 (A) HeLa、U2OS、HEK293T細胞に対して、コントロールとして *luciferase (Luc)* siRNA または、*CRBP1/NCKAP5L* siRNA を導入し、ウエスタンブロットによって細胞抽出液に含ま

れるCRBP1および、ローディングコントロールとして β -tubulinのタンパク質の量を検出した。黒の矢印は内因性のCRBP1の位置を示している。

(B) Doxycycline (Dox)によるFLAG-CRBP1発現誘導型の細胞株を作製し、内因性のCRBP1とFLAG-CRBP1のタンパク質の量およびバンドの位置を比較した。

(C) Doxycyclineの添加(Dox+)または未処理(Dox-)のFLAG-CRBP1発現誘導型の細胞株から抗FLAG抗体を用いた免疫沈降によりFLAG-CRBP1を精製し、SDS-PAGEで展開した。ゲルを銀染色し、Dox+とDox-におけるタンパク質バンドの比較から、FLAG-CRBP1の位置を黒矢印で示した。分子量マーカーの泳動距離から検量線グラフを作製し(右)、CRBP1タンパク質の分子量169 kDaを算出した。

第4節 Cep169のMTOC機能の解析

CDK5RAP2には、微小管の重合開始点となる γ -tubulinおよびその複合体 γ -TuRCを中心体へ集積する機能が報告されている。そこで、Cep169にもCDK5RAP2と同様の γ -tubulinを集積する機能があるかを解析した。Cep169の発現を抑制した細胞における γ -tubulinの免疫染色による蛍光強度を定量化したが、luciferaseを発現抑制した細胞(コントロール)と比べて γ -tubulinの蛍光強度はほとんど変化がないことが明らかになった(Fig. 2-3A)。次に、Cep169またはCDK5RAP2をU2OS細胞に過剰発現した時の γ -tubulinを観察した。Cep169およびCDK5RAP2の過剰発現は細胞内に凝集体を形成することがあり、CDK5RAP2の凝集体において γ -tubulinの集積が観察されたのに対して、Cep169の凝集体には γ -tubulinが集積しないことが明らかとなった(Fig. 2-3B)。これらの結果から、Cep169はCDK5RAP2とは異なり、 γ -tubulinの集積を介したmicrotubule organizing center (MTOC)の機能には関与しないことが示唆された。

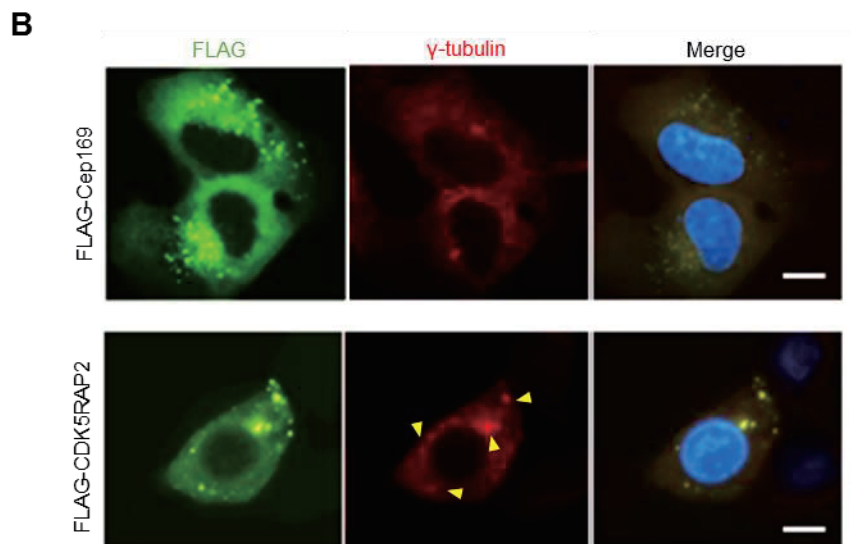
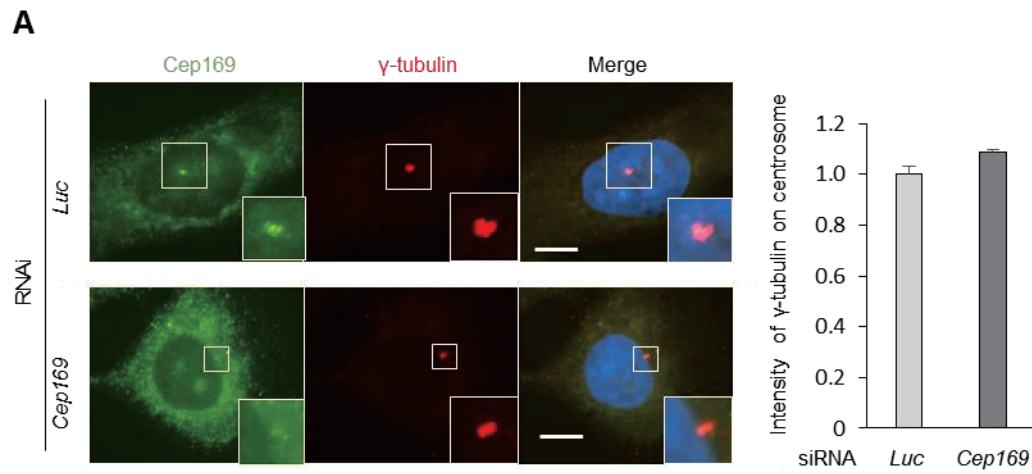


Figure 2-3. Cep169 と γ -tubulin との相互作用解析

(A) U2OS細胞に *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入し、抗Cep169抗体および抗 γ -tubulin抗体で免疫染色(左)を行った(スケールバーは10 μ m)。取得した画像は、NIS-Elements (Nikon)を用いて、中心体における γ -tubulinの蛍光強度を測定し、グラフで示した(右) ($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E.)。Cep169 (緑)、 γ -tubulin (赤)、DAPI (青)。中心体付近を白枠で囲み、その領域を拡大して示した。

(B) U2OS細胞にFLAG-Cep169(上)またはFLAG-CDK5RAP2(下)を導入し、細胞内の凝集体に γ -tubulinが集積されるかを、免疫染色法で観察した。FLAG (緑)、 γ -tubulin (赤)、DAPI (青)。凝集体に集積した γ -tubulinを黄色の矢印で示した(スケールバーは10 μ m)。

第 5 節 微小管伸長端での Cep169 と CDK5RAP2 の関係

Cep169 の MTOC 以外の機能を解析するため、Cep169 の局在について詳細な解析を行った。培養細胞に FLAG-Cep169 またはベクターのみを導入し免疫染色を行ったところ、FLAG-Cep169 が発現した細胞において中心体とコメット様の染色が観察された(Fig. 2-4A)。CDK5RAP2 は、中心体以外に微小管の伸長端に局在することが報告されているため(Fong et al., 2009)、FLAG-CDK5RAP2 および GFP-Cep169 を共発現させた細胞を観察したところ、中心体以外に微小管の伸長端において両者は共局在していることが明らかになった(Fig. 2-4B)。さらに、代表的な+TIPs である EB1 との局在を観察し、Cep169 が共局在することを明らかにした。また、EB1-GFP と mRFP-Cep169 を共発現した細胞のタイムラプス撮影から、細胞表層に向かってコメット様の運動を示す蛍光シグナルが観察された。これにより、Cep169 は微小管伸長端に局在し、Cep169 は+TIPs のメンバーであることが明らかになった(Fig. 2-4C, D) (Mori et al., 2015a)。

次に、Cep169 と CDK5RAP2 の微小管伸長端における局在が、互いに影響するかを解析した。Cep169 を発現抑制した細胞における CDK5RAP2 の局在を免疫染色により観察したが、中心体の蛍光強度は変化せず、また微小管伸長端の局在にも変化はなかったことから、Cep169 は CDK5RAP2 の局在に影響を与えないことが明らかとなった(Fig. 2-5A, B)。反対に、CDK5RAP2 を発現抑制した細胞における Cep169 の局在を観察したところ、同じく、中心体および微小管伸長端の局在には影響しなかった(Fig. 2-5C, D)。そのため、CDK5RAP2 と Cep169 の局在は相互依存的な関係にはなっておらず、独立して中心体および微小管伸長端に局在することが明らかとなった。

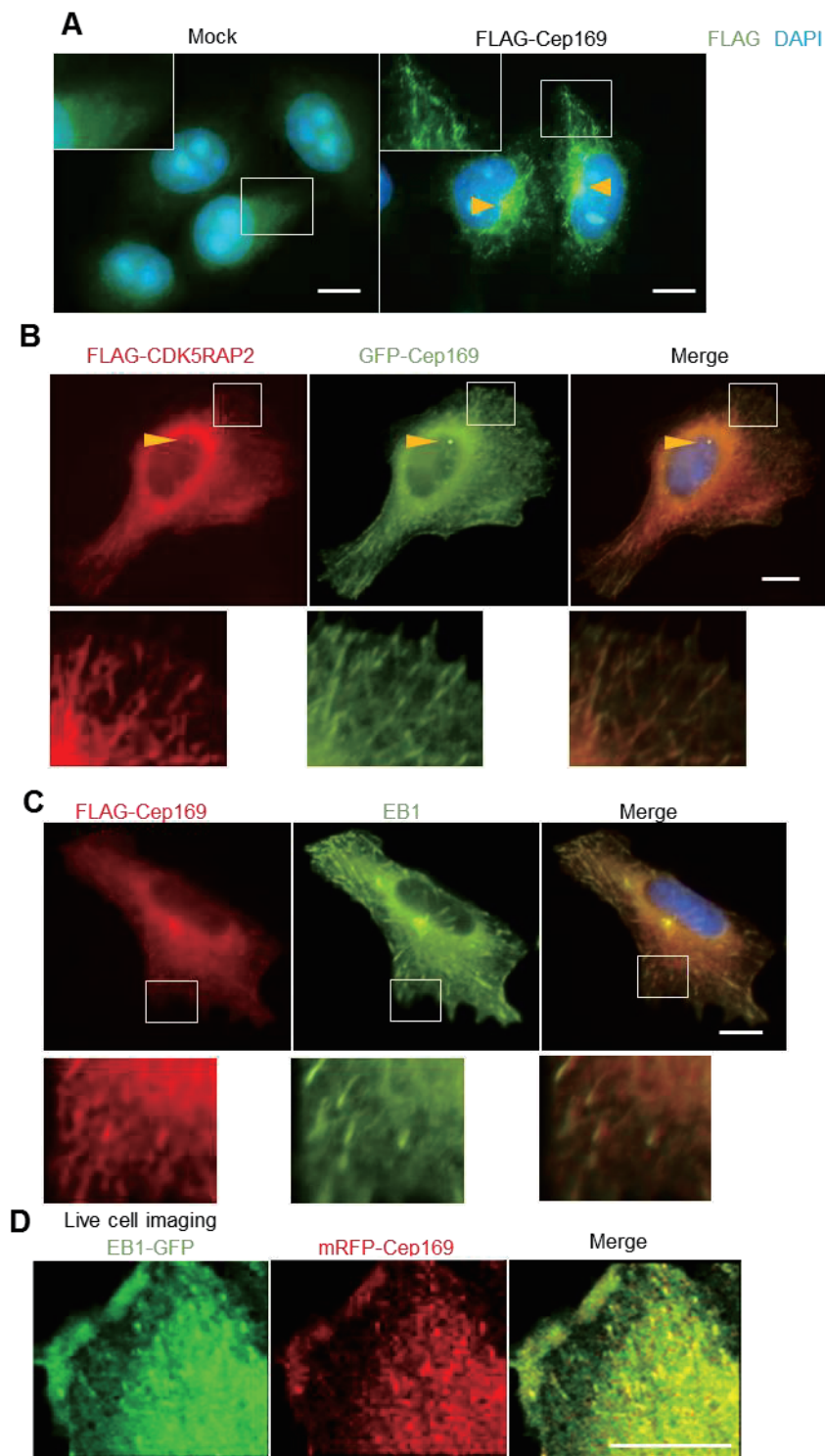


Figure 2-4. Cep169 の微小管伸長端における局在

(A) U2OS 細胞に pCMV TAG2 ベクター(Mock)または、FLAG-Cep169 を導入し、抗 FLAG 抗体(緑)を用いて免疫染色を行った(スケールバーは 10 μm)。黄色の矢印は中心体の位置を示している。白枠で囲んだ領域の拡大図を示した。

(B) FLAG-CDK5RAP2 および GFP-Cep169 を共発現した U2OS 細胞を抗 FLAG 抗体(赤)で免疫染色を行った(スケールバーは 10 μm)。黄色の矢印は中心体の位置を示している。白枠で囲んだ領域の拡大図を下に示した。

(C) U2OS 細胞に FLAG-Cep169 を発現させ、抗 FLAG 抗体(赤)および抗 EB1 抗体(緑)で免疫染色を行った(スケールバーは 10 μm)。白枠で囲んだ領域の拡大図を下に示した。

(D) EB1-GFP および mRFP-Cep169 を発現した U2OS 細胞を生細胞の状態にイメージングした。コメット様の運動を示す EB1 と Cep169 の共局在が観察された(スケールバーは 5 μm)。 (Movie 1:

<http://www.chem.waseda.ac.jp/terada/movie%20plus%20tips%20and%20spindle/Movie%201.mov>)

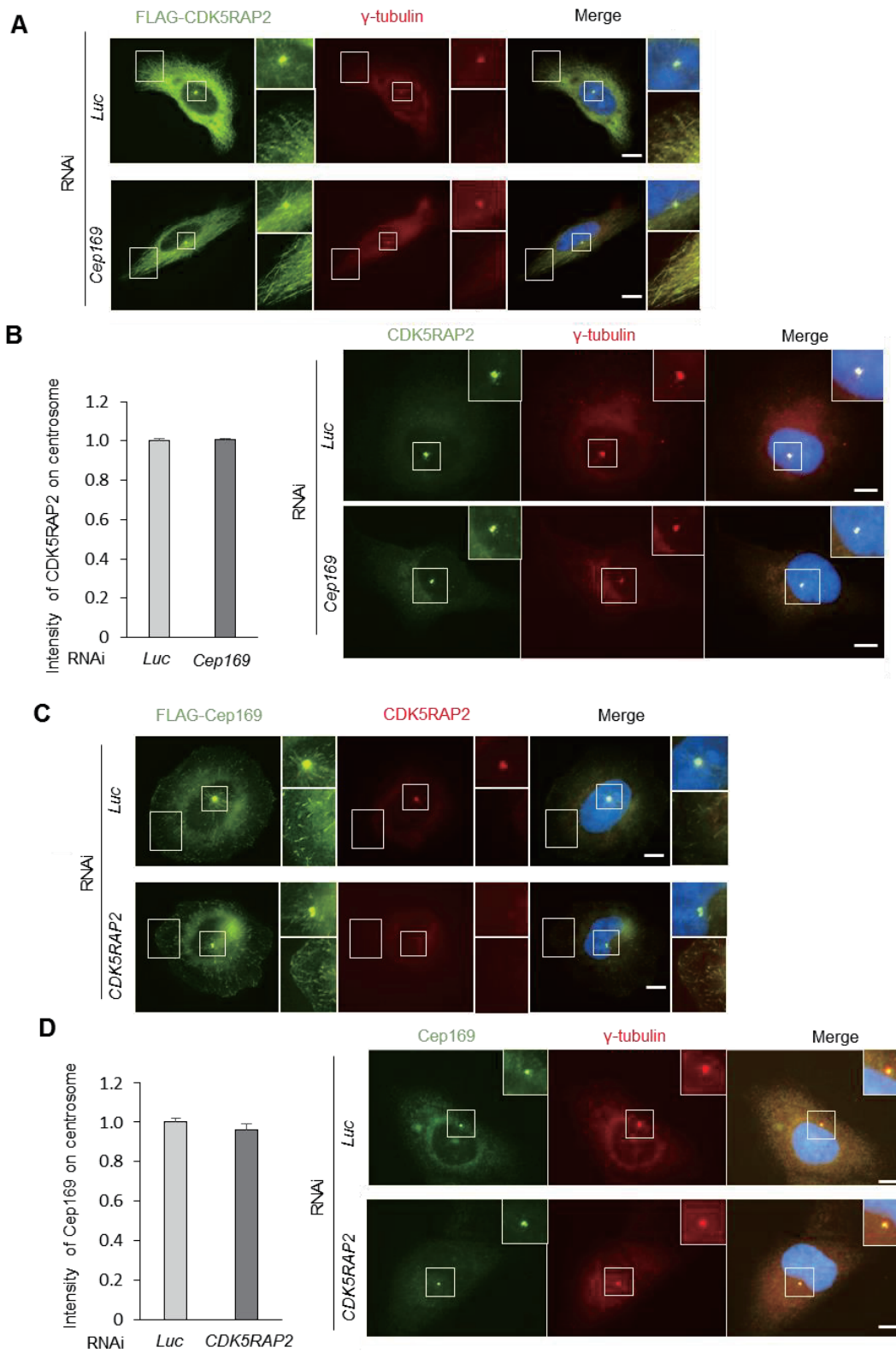


Figure 2-5. Cep169 と CDK5RAP2 の局在

(A, B) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した U2OS 細胞に FLAG-CDK5RAP2 を

発現させ、Cep169 が CDK5RAP2 の局在に与える影響を抗 γ -tubulin 抗体(赤)および抗 FLAG 抗体(緑)の免疫染色(A)または、*Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した U2OS 細胞の抗 CDK5RAP2 抗体(緑)の免疫染色により内因性の CDK5RAP2 を検出(B 右)した(スケールバーは 10 μ m)。取得した画像は、NIS-Elements (Nikon)を用いて、中心体における CDK5RAP2 の蛍光強度を測定し、定量化したグラフ(B 左)を示した($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E.)。

(C, D) 同様に、*Luc* siRNA または *CDK5RAP2* siRNA を導入した U2OS 細胞に FLAG-Cep169 を発現させ、CDK5RAP2 が Cep169 の局在に与える影響を抗 γ -tubulin 抗体(赤)および抗 FLAG 抗体(緑)の免疫染色(C)または、*Luc* siRNA または *CDK5RAP2* siRNA を導入した U2OS 細胞の抗 Cep169 抗体(緑)の免疫染色により内因性の Cep169 を検出(D 右)した(スケールバーは 10 μ m)。取得した画像は、NIS-Elements (Nikon)を用いて、中心体における Cep169 蛍光強度を測定し、定量化したグラフ(D 左)を示した($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E.)。

第 6 節 Cep169 の微小管伸長端の局在

多くの+TIPs は、EB1 との結合配列(S/T)_x(I/L)P (SxIP モチーフ)をもち、EB1 との結合を介して微小管伸長端に局在することが知られている。そこで、Cep169 の SxIP モチーフについて解析を行った。Cep169 のアミノ酸配列から、SxIP モチーフの有無を調べたところ、484-487 aa、825-828 aa、925-928 aa の 3 か所が存在することが明らかとなった(Fig. 2-6A)。3 か所のモチーフそれぞれがどの程度 Cep169 の微小管伸長端への局在に寄与するのかを明らかにするため、SxIP モチーフ後半の 2 アミノ酸をアラニンに置換した Cep169 の SxIP 変異型を作製し、細胞内での局在を観察した(Fig. 2-6B)。それぞれの変異型の微小管伸長端への局在を定量化するため、微小管伸長端と細胞質での蛍光強度比を測定したところ、野生型の Cep169 の強度比が 2.56 であったのに対して、SxIP モチーフすべてに変異を導入した SxAA123 の値が 1.12、925-928 aa に変異を導入した SxAA3 変異型の値が 1.25

に大きく減少していた。一方 484-487 aa および 825-828 aa のモチーフの変異型 SxAA1 および SxAA2 に関しては蛍光強度比がそれぞれ 2.56、2.38 であり、微小管伸長端への局在に与える影響は少なかったことから、微小管伸長端の局在は 925-928 aa の SxIP モチーフによる寄与が大きいことが明らかになった(Fig. 2-6B, C)。

次に、Cep169 の SxIP モチーフを介した EB1 との相互作用を確認するため、SxIP 変異型または野生型の FLAG-Cep169 と GST-EB1 との結合をプルダウン実験により比較した(Fig. 2-6D)。ウエスタンブロットにより、Cep169 の野生型と EB1 との共沈が検出されたが、変異型では検出されなかったため、相互作用が減少していることが明らかとなった。これらの結果から、Cep169 は SxIP モチーフを介した EB1 との相互作用によって微小管伸長端へ局在していることが示唆された。

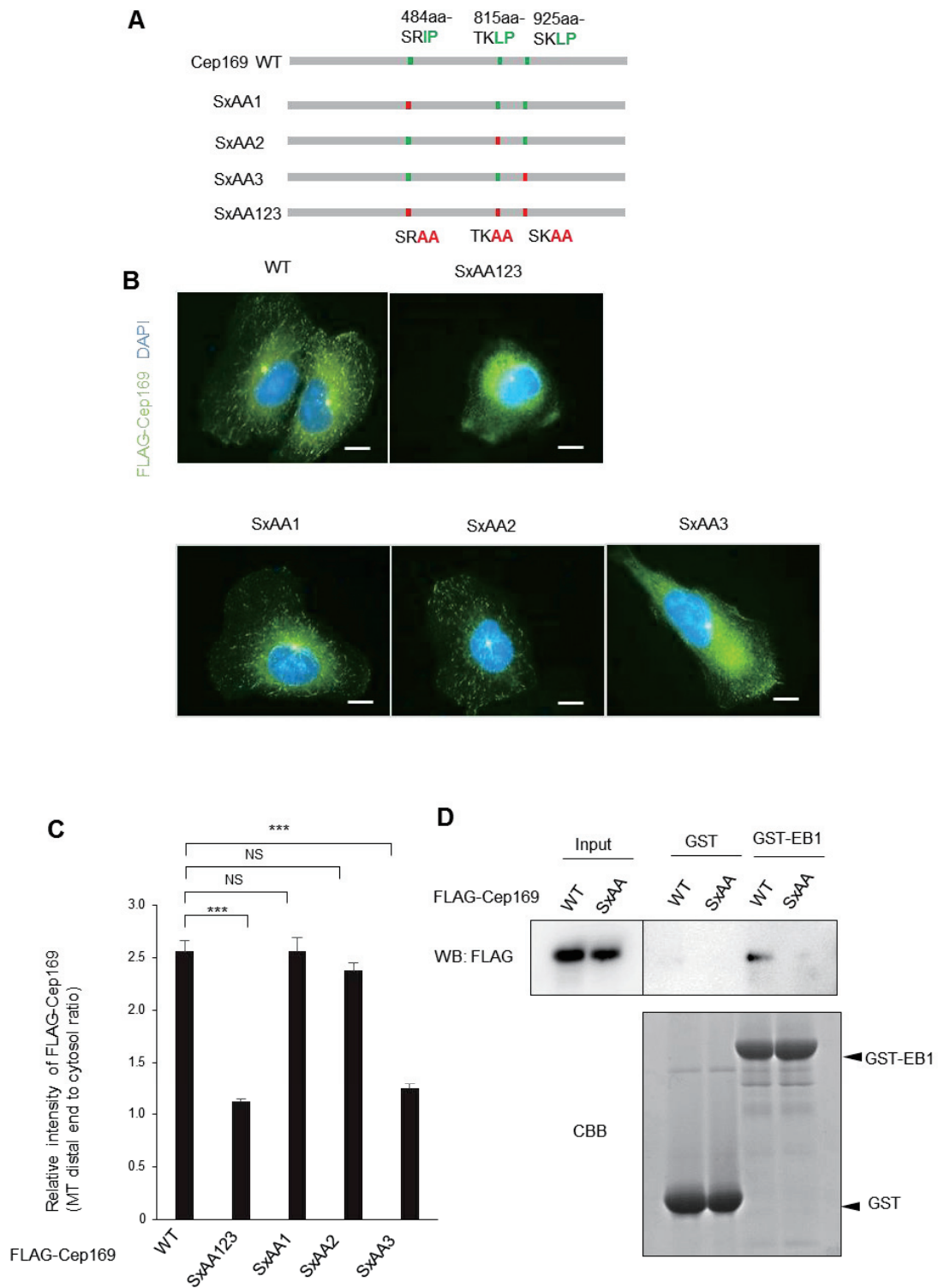


Figure 2-6. Cep169 の SxIP モチーフを介した微小管伸長端局在

(A) Cep169 の野生型(WT)における SxIP モチーフの位置を示した。SxIP 変異型(SxAA1、

SxAA2、SxAA3、SxAA123)をそれぞれ示した。

(B) Fig. 2-6A で示した、FLAG-Cep169 の野生型(WT)と SxIP 変異型(SxAA1、SxAA2、SxAA3、SxAA123)を U2OS 細胞に導入し、抗 FLAG 抗体(緑)で免疫染色を行った(スケールバーは 10 μ m)。

(C) Fig. 2-6B で染色した細胞における、微小管伸長端と細胞質での蛍光強度比を NIS-Elements (Nikon)を用いて測定し、グラフに示した($n = 60$ 細胞、mean \pm S.E.、NS: not significant, *** $P < 0.0001$ 、 t -test により算出)。

(D) プルダウン実験により、GST または GST-EB1 のリコンビナントタンパク質と、FLAG-Cep169 野生型(WT)または SxIP 変異型(SxAA)との結合を解析した。FLAG-Cep169 は、抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロット、GST および GST-EB1 を CBB 染色でそれぞれ検出した。黒の矢印は GST および GST-EB1 の位置を示している。

第 7 節 小括

本章における研究から、CDK5RAP2 に結合するタンパク質、Cep169 (Centrosomal protein 169 kDa)を新たに同定した。Cep169 は中心体のみならず、微小管伸長端に局在を示すことから、+TIPs のメンバーとしても同定され、CDK5RAP2 と中心体や微小管上で複合体を形成し機能をもつ可能性が示唆された。しかしながら、CDK5RAP2 と Cep169 の局在は互いの局在に影響を受けず、さらに、CDK5RAP2 は中心体において、 γ -tubulin を集積するタンパク質として報告されているが、Cep169 は γ -tubulin 集積に関して機能をもたないことから MTOC の機能を制御する因子ではないことが明らかとなった。次に、Cep169 の微小管伸長端における分子機構に注目し、EB1 との結合モチーフである SxIP の変異型を作製することで、SxIP モチーフを介した EB1 との結合が Cep169 の微小管伸長端への局在に重要であることを明らかにした。Cep169 には、SxIP モチーフが 484-487 aa、825-828 aa、925-928 aa の 3 か所存在し、特に 925-928 aa の SxIP モチーフ依存的に微小管伸長端に局在することが明らかとなった。

第3章 Cep169の微小管動態制御機構

第1節 研究背景

微小管は動的不安定性(dynamic instability)を有し、細胞内では重合と脱重合を繰り返していることが知られている。微小管は動的不安定性により、様々な細胞内小器官や細胞皮層に対して結合と解離を繰り返すことで(search and capture モデル)、物質の輸送や細胞内のシグナルを制御している(Kirschner and Mitchison, 1986)。一方で、一部の分化細胞では、束化によって安定化した微小管が観察されており、この微小管の束が、細胞の特異的な機能や形状に寄与していることが示唆されている。例として、(i)上皮細胞では、微小管の束が頂端-基底極性方向に対して配置され、上皮細胞の極性維持に寄与することや、(ii)神経細胞では、微小管の束によって神経突起が形成されることが報告されている (Caceres and Kosik, 1990; Dinsmore and Solomon, 1991)。これまで微小管の束化を制御する分子機構に関しては、微小管の側面に局在する microtubule-associated proteins (MAPs)や微小管伸長端に局在する microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs)によるものがそれぞれ報告されてきたが、分子機構に関する知見は少なく、これらの因子による微小管制御機構を詳細に解明する必要がある(Dayanandan et al., 2003; Lee et al., 2015; Pierre et al., 1994; Pringle et al., 2013)。また、CDK5RAP2 は微小管の束化を誘導することが報告されており、+TIPs 以外にも、微小管の動態を制御する MAPs としての機能が示唆されているが、詳細な分子機構は明らかになっていない (Fong et al., 2009)。前章での研究から、CDK5RAP2 の結合タンパク質として Cep169 を同定し、Cep169 が中心体および微小管伸長端において共局在することが明らかとなり、Cep169 も微小管伸長端だけでなく微小管側面に局在して微小管の動態に関与していることが考えられた (Mori et al., 2015a)。

本章での研究から、Cep169 の過剰発現によって、微小管の束化を誘導することが明らか

になり、Cep169 の MAPs としての微小管制御にかかわる機能を示す。また、Cep169 が、SxIP モチーフを介さず微小管に直接結合し、さらに、二量体もしくは多量体を形成することで、安定した微小管の束化を誘導する機構を解明した。

第 2 節 Cep169 が微小管の束化を誘導する

Cep169 が微小管の動態に与える影響を解析するため、Cep169 の過剰発現を行ったところ、細胞内に太い繊維状の構造体が観察された。微小管の構成タンパク質である β -tubulin の免疫染色を行い、共局在が確認されたことから、この繊維状の構造体は、微小管が束化したものであると考えられた(Fig. 3-1A)。さらに、細胞内で安定化した微小管はアセチル化が蓄積することが知られており、アセチル化 tubulin に対する抗体を用いて免疫染色したところ、束化した微小管が高度にアセチル化されていることが明らかとなった(Fig. 3-1B)。また、Cep169、EB1、CDK5RAP2 の三者の局在を観察したところ、微小管伸長端のみならず、束化した微小管上でも共局在していることが明らかになり、これらのタンパク質は協調して微小管の安定化に関与している可能性が示唆された(Fig. 3-1C)。

また、微小管が高度にアセチル化されていることから、束化した微小管の先端において動的不安定性が低下していることが示唆された。そこで、4 秒間隔でタイムラプス撮影を行い微小管プラス端の動きを観察したところ、微小管伸長端に局在する EB1-GFP および mRFP-Cep169 は細胞表層に向かって伸長し、また、脱重合によって消失している様子が観察された。一方、束化した微小管の先端では、24 秒間の観察で微小管の先端の位置がほとんど変化せず、動的不安定性が低下した様子が観察された(Fig.3-1D)。これらの結果から、Cep169 は微小管側面に結合し、微小管の安定化に関与することが示唆された。

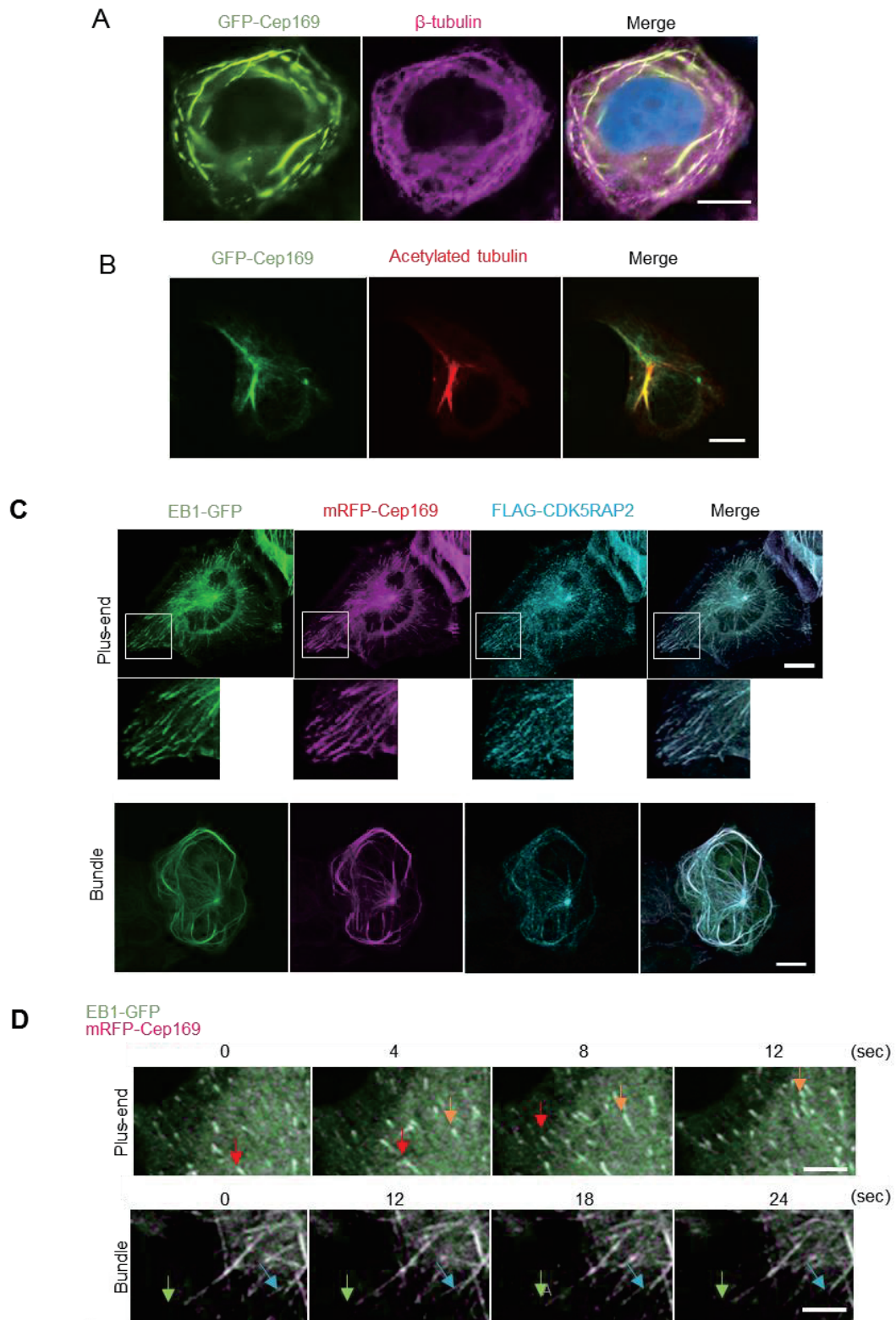


Figure 3-1. Cep169 による微小管の束化誘導

(A, B) U2OS 細胞に GFP-Cep169 を発現させ、抗 β -tubulin 抗体(赤)による免疫染色(A)ま

たは、抗 acetylated tubulin 抗体(赤)による免疫染色(B)を行った(スケールバーは 10 μm)。 (C) U2OS 細胞に EB1-GFP、FLAG-CDK5RAP2、mRFP-Cep169 を発現させた。微小管伸長端(上)、および、束化した微小管 (下)の発現パターンを、それぞれ、抗 FLAG 抗体(青)を用いた免疫染色により観察した(スケールバーは 10 μm)。白枠で囲んだ領域を拡大して示した。

(D) EB1-GFP および mRFP-Cep169 を共発現させた U2OS 細胞をタイムラプス撮影し、矢印で示した微小管先端を追跡した。微小管伸長端(上)および束化した微小管 (下)の各発現パターンにおいて観察した(スケールバーは 5 μm)。

第 3 節 SxIP モチーフと微小管束化の関係

次に、Cep169 の微小管安定化の機能が、Cep169 の+TIPs としての機能に依存しているかを明らかにするため、SxIP 変異型を導入した細胞での微小管束化を解析した(Fig. 3-2A)。野生型と同様、SxIP 変異型の発現により、束化した微小管の形成が誘導されることから、微小管の束化には Cep169 の EB1 との結合は関与しないことが示唆された。さらに、豚の脳から精製した微小管と Cep169 の野生型または SxIP 変異型を発現した HEK293T 細胞の抽出液との *in vitro* でのプルダウン実験から、Cep169 は野生型および SxIP 変異型にかかわらず tubulin と共沈し、結合することが明らかになった(Fig. 3-2B)。これらの結果から、Cep169 の微小管束化の機能は、+TIPs としての機能とは独立したものであり、また、SxIP 以外での微小管側面に結合するドメインが存在していることが示唆された。

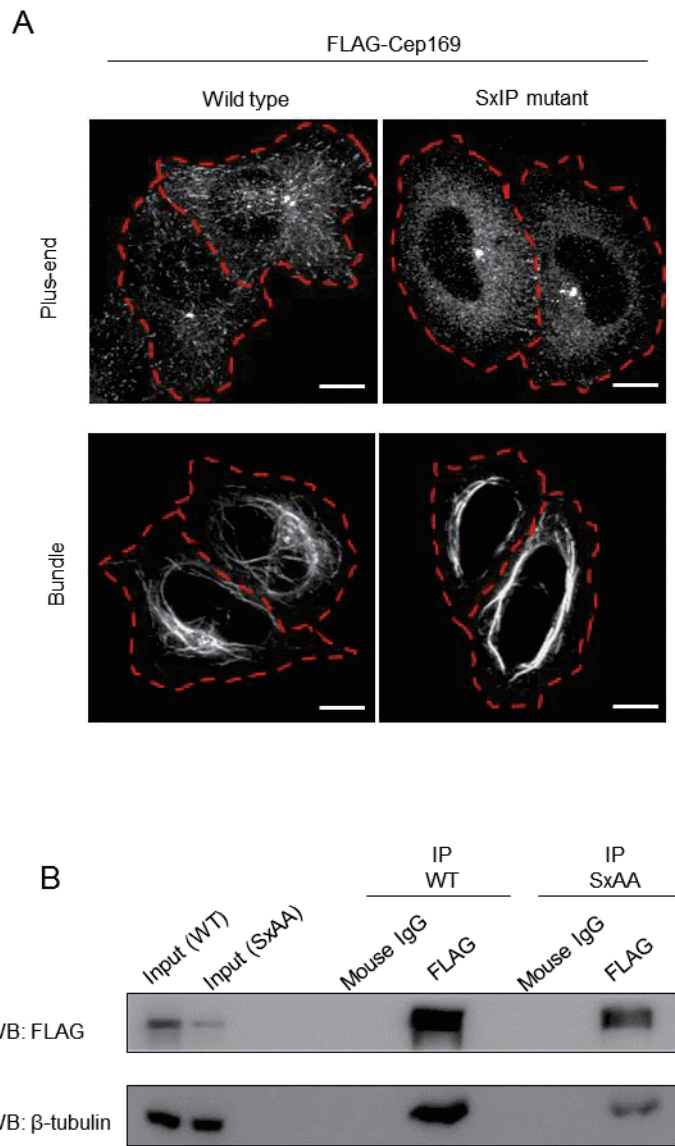


Figure 3-2. Cep169 SxIP 変異型による微小管束化の誘導

(A) FLAG-Cep169 の野生型(WT)および SxIP 変異型(SxAA)を U2OS 細胞に導入し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色を行った。微小管伸長端(上)および微小管の束(下)の各発現パターンを示した。細胞の輪郭を赤の破線で示した。

(B) 精製微小管と HEK293T 細胞で発現させた FLAG-Cep169 の野生型(WT)または SxIP 変異型(SxAA)のプルダウン実験を行った。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行うことで、FLAG-Cep169 と tubulin の共沈を確認した。タンパク質の検出には、抗 FLAG 抗体および抗 β-tubulin 抗体によるウエスタンブロットを用いた。

第4節 Cep169の微小管に結合するドメインと自己会合するドメインの解析

Cep169による微小管束化が、Cep169のどのドメインによって誘導されるかを明らかにするため、Cep169の tubulin 結合ドメインを解析した。HEK293T細胞で発現させたCep169の野生型または欠損変異型を含む細胞抽出液と豚の脳から精製した微小管との *in vitro*でのプルダウン実験から、Cep169は746-1152 aaで tubulin と共沈することが明らかとなった(Fig. 3-3A, B)。さらに、精製タンパク質同士の結合実験によって、Cep169と tubulinの間の結合が直接的なものであるかどうかを確認した。大腸菌でGST-Cep169(746-1152 aa)を発現させ、精製したリコンビナントタンパク質と精製微小管との結合実験を行った。glutathione ビーズによるGST-Cep169のアフィニティー精製において tubulin の共沈がウエスタンブロットにより確かめられ、両者の間に直接的な結合があることが明らかとなった(Fig. 3-3C, 3-4C)。

次に、微小管の束化には微小管を架橋する機構が必要であると考え、Cep169同士の結合を解析した。HEK293T細胞にタグの異なるFLAG-Cep169およびGFP-Cep169を共発現させ、FLAG抗体による免疫沈降実験を行ったところ、両者が共沈することがわかり、Cep169は二量体もしくは多量体を形成していることが示唆された(Fig. 3-4A)。さらに、FLAG-Cep169およびGFP-Cep169の野生型または欠損変異型を用いて同様の実験を行ったところ、Cep169のcoiled-coilドメインを含むN末端1-135 aaがCep169同士の結合に必要なドメインであることが明らかとなった(Fig. 3-4B, C)。

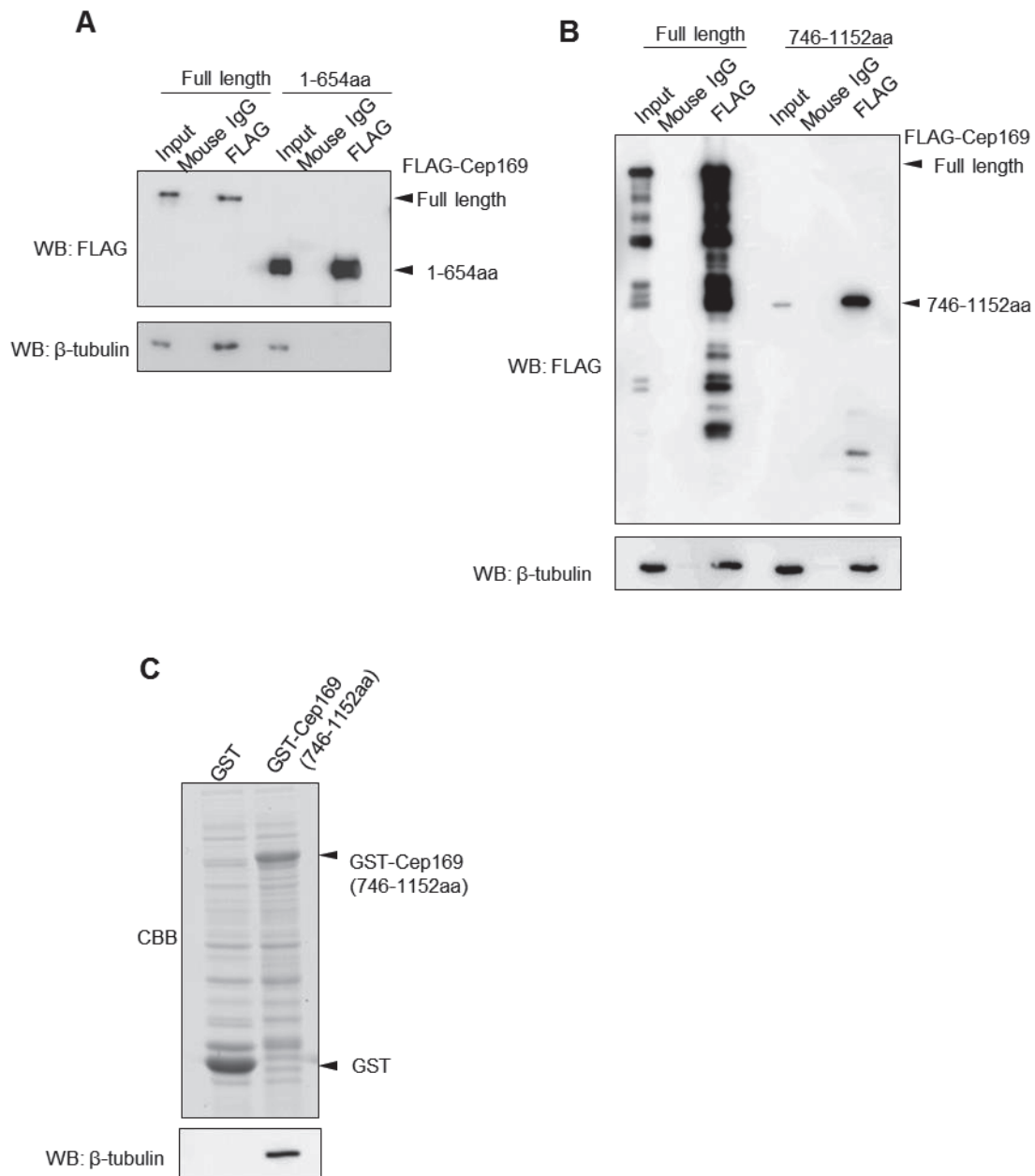


Figure 3-3. Cep169 の tubulin 結合ドメインの解析

(A, B) Fig. 3-2B と同様にプルダウン実験を行い、Cep169 の tubulin 結合ドメインを同定した。FLAG-Cep169 の全長または欠損変異型 1-654 aa (A)、745-1152 aa (B) を発現させた HEK293T 細胞の抽出液と精製微小管において抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、ウェスタンブロットによりタンパク質を検出した。黒の矢印は FLAG-Cep169 の全長および欠損変異型の位置を示している。

(C) 大腸菌で発現させた GST および GST-Cep169 のリコンビナントタンパク質を精製した溶液と、豚の脳由来の精製微小管を用いた、*in vitro* での結合実験を行った。glutathione ビーズで GST および GST-Cep169 タンパク質をアフィニティー精製し、共沈した tubulin をウエスタンブロットにより検出した。GST および GST-Cep169 は CBB 染色で検出した。矢印は GST および GST-Cep169 の位置を示している。

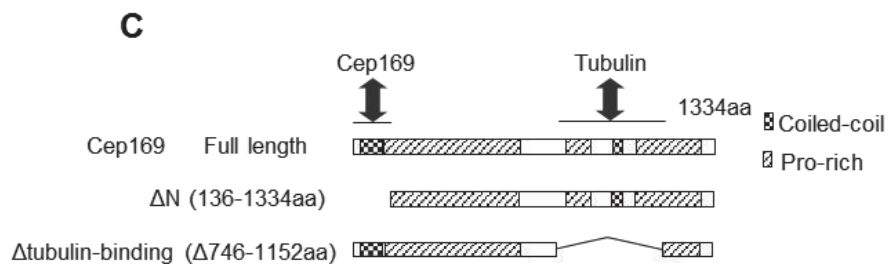
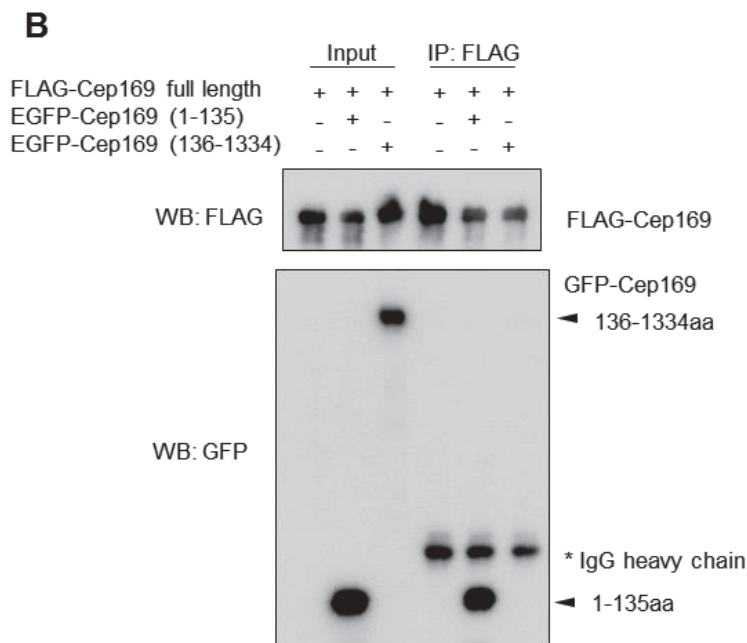
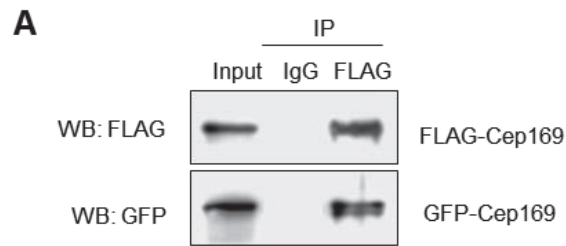


Figure 3-4. Cep169 の自己会合ドメインの解析

(A) FLAG-Cep169 および GFP-Cep169 を HEK293T 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。抗 FLAG 抗体および抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットにより共沈タンパク質の検出を行った。

(B) Fig. 3-4A と同様の方法で、FLAG-Cep169 および GFP-Cep169 の欠損変異型 1-135 aa および 136-1334 aa を HEK293T 細胞に共発現させ、Cep169 同士の相互作用に必要なド

メインの解析を行った。黒の矢印は GFP-Cep169 の欠損変異型の位置を示している。

(C) Fig. 3-3A-C、Fig. 3-4A-B のドメイン解析結果を示した。さらに、Cep169 同士の相互作用に必要なドメインを欠損させた変異型(Δ N: 136-1334 aa)および、tubulin との結合ドメインを欠損させた変異型(Δ tubulin-binding: Δ 746-1152 aa)を作製した。

第 5 節 Cep169 による微小管安定化の機構

これまでの結果から、Cep169 の 1-135 aa および 746-1152 aa の領域が微小管の束化に重要であることが示唆されたため、N 末端を欠いた変異型 Δ N (136-1334 aa) および tubulin との結合ドメインを欠いた変異型 Δ tubulin-binding (Δ 746-1152 aa) をそれぞれ細胞内に過剰発現した際に、微小管の束化が誘導されるかどうかを確かめた(Fig. 3-4C, 3-5A)。その結果、 Δ N および Δ tubulin-binding どちらの過剰発現でも微小管の束化が起こらず、束化には Cep169 同士の N 末端ドメインを介した相互作用と、Cep169 と微小管の直接的な結合が必要であることが明らかとなり、Fig. 3-5B に示す Cep169 による微小管束化のモデルが考えられた。

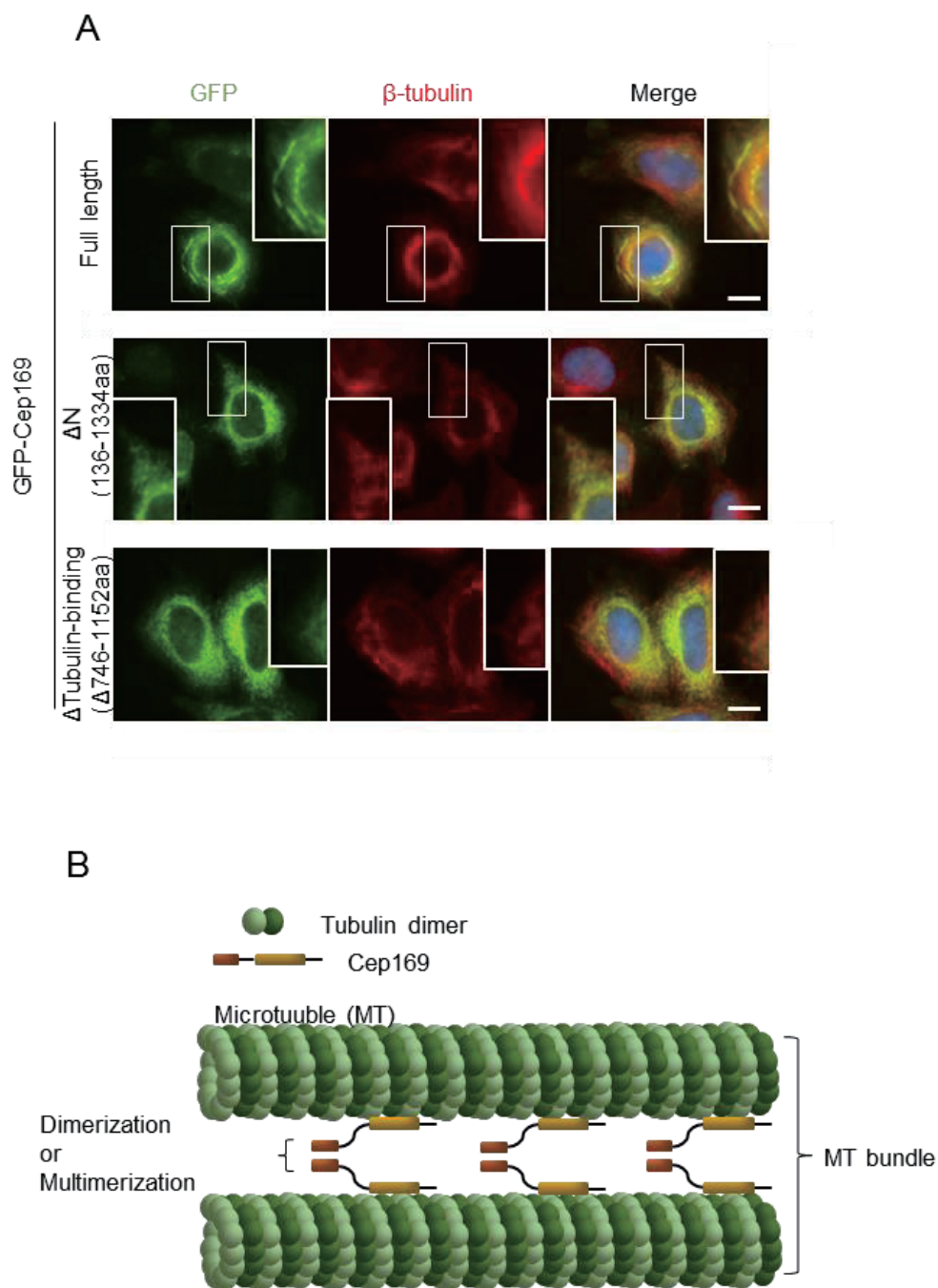


Figure 3-5. Cep169 のドメインと微小管束化の関係

(A) U2OS 細胞に、GFP-Cep169 全長(上)、 ΔN (136-1334 aa) (中央)、 Δ tubulin-domain ($\Delta 746$ -1152 aa) (下)を発現させ、DAPI (青)、抗 β -tubulin 抗体(赤)を用いて免疫染色を行った(スケールバーは 10 μm)。

(B) Cep169 による微小管の束化モデル。

第 6 節 内因性の Cep169 による微小管の安定化

Cep169 の微小管束化の現象は Cep169 の過剰発現によって観察されてきたが、内因性の Cep169 も微小管の安定性に寄与する可能性が示唆される。そこで、間期の細胞を 4 °C でインキュベートし微小管の不安定化を誘導した条件において微小管を観察したところ、luciferase を発現抑制した細胞(コントロール)では微小管が残存していたのに対して、Cep169 を発現抑制した細胞では、微小管のほぼすべてが脱重合していることが明らかとなった(Fig. 3-6A)。さらに、分裂期の細胞において、nocodazole 処理により脱重合した微小管をメディウム交換によって薬剤を除去し、再重合させる実験を行ったところ、Cep169 を発現抑制した細胞ではコントロールと比べて中心体から伸長する微小管の長さが短くなっている様子が観察された(Fig. 3-6B)。これらの結果により、Cep169 は細胞周期を通して、微小管の安定化に寄与していることが示唆された。

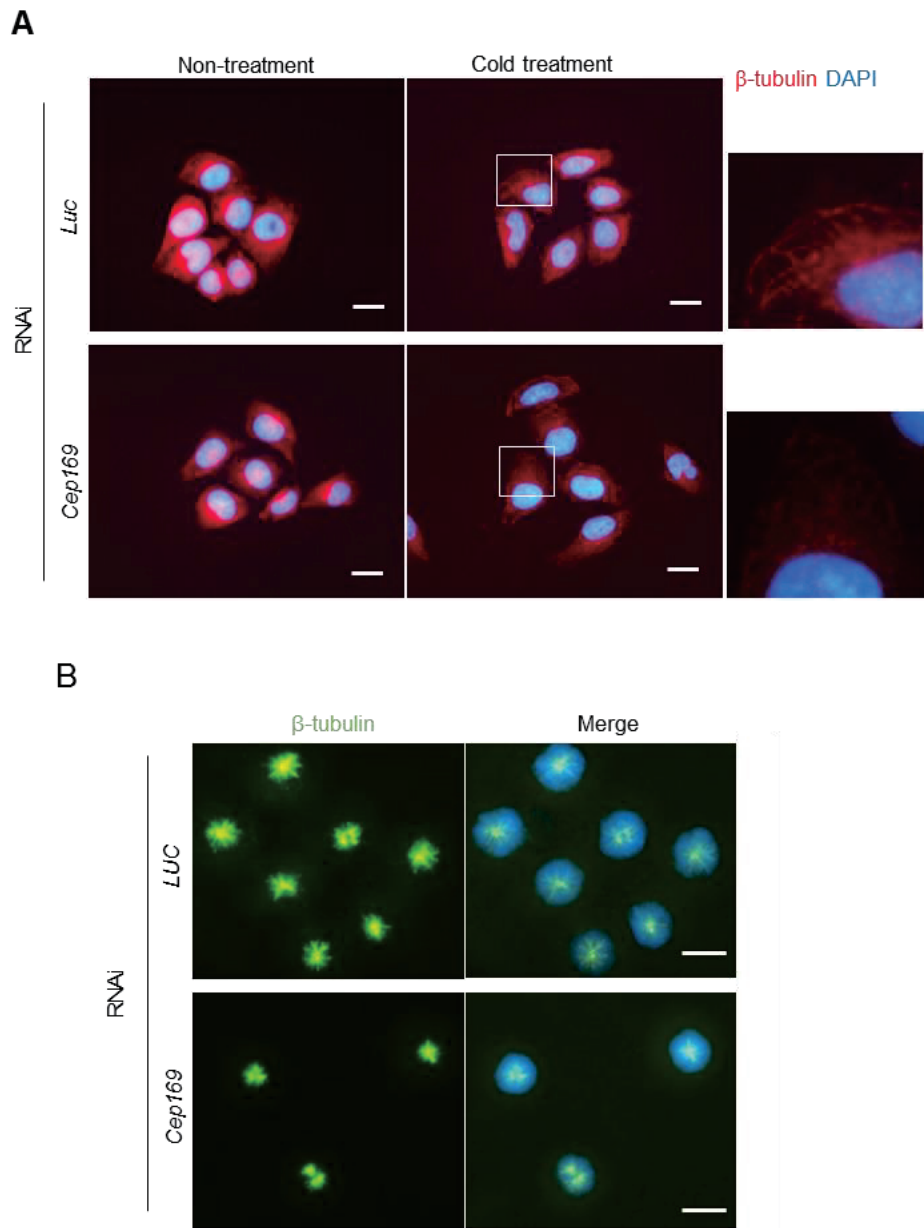


Figure 3-6. Cep169 による微小管の安定化機能

(A) *Luc* siRNA および *Cep169* siRNA を導入した U2OS 細胞を 4 °C、15 分で処理した際に、脱重合せず残存した微小管を抗 β -tubulin 抗体(赤)で観察した(スケールバーは 20 μ m)。

(B) 12 時間の nocodazole 処理によって微小管を脱重合し、分裂期に同調した細胞を DMEM のメディアウム交換によりリリースし、3 分後の微小管を抗 β -tubulin 抗体(緑)の免疫染色により観察した(スケールバーは 10 μ m)。

第7節 小括

これまでの結果から、Cep169 が微小管を安定化する機能をもつことが明らかとなった。また、第5節までの実験から、SxIPモチーフを介した微小管伸長端の局在は微小管安定化能には必要ではなく、微小管に直接結合する746-1152 aa領域が重要であることが明らかになった。また、1-135 aaの領域がCep169の二量体または多量体の形成に必要であることから、Fig. 3-5Bのモデルによって微小管を束化していることが示唆された。Cep169の微小管安定化の機能は、培養細胞におけるCep169の発現抑制からも確認され、細胞周期を通じて微小管の安定性に関与することが明らかとなった。

また、神経軸索の中には、微小管が束化した状態で存在しており、束化と脱束化が神経軸索の伸展を制御していることが知られている。現時点では、Cep169の微小管束化の生理機能は不明であるが、Cep169が神経軸索の微小管に存在することや、神経軸索の伸展の制御にも関係していることから、神経軸索の微小管束化にかかわる因子である可能性が示唆された。

第4章 分裂期に活性化するキナーゼ Cdk1 と Cep169 の相互作用の解析

第1節 研究背景

細胞周期の分裂期は、細胞が自己複製のため娘細胞へゲノムを均等に分配する重要な過程である。分裂を制御する様々な分子が時間空間的にダイナミックに変化しながらも、分裂期の各段階は厳密に制御されている。分裂期では、aurora-A、Cdk、Plk等のキナーゼおよびPP2A(protein phosphatase 2A)等のホスファターゼが特異的に活性化し、基質のリン酸化修飾の有無によって、紡錘体形成、染色体分裂、細胞質分裂等の過程を制御している(Barr et al., 2011; De Wulf et al., 2009; Hannak et al., 2001; Liu and Ruderman, 2006; Mochida and Hunt, 2012; Nigg, 1998; Wurzenberger and Gerlich, 2011)。

紡錘体は、中心体と、中心体を核として伸長した微小管によって構成されている。分裂期の微小管は間期に比べ動的不安定性が増加し、二極性の紡錘体の形成、染色体の捕捉、紡錘体を細胞皮層へ固定する役割を担っている。微小管の動態変化についても、上記のキナーゼが密接に関与しており、分裂期キナーゼと基質との関係を明らかにすることが、分裂期でのCep169の機構を理解する上で重要となる。

前章の研究から、中心体および、微小管伸長端集積因子であるCep169が分裂期の微小管の安定性を制御していることから、分裂期の進行においてキナーゼと関連した機構があると考えられるが、分子機構については明らかになっていなかった(Mori et al., 2015c)。

そこで本章では、分裂期におけるCep169の細胞内局在を解析しCep169が分裂期特異的に中心体から細胞質に解離することを明らかにし、さらにこの過程が代表的な分裂期キナーゼCdk1により引き起こされていることを明らかにした。

第 2 節 細胞周期における Cep169 の局在

細胞周期を通しての Cep169 の細胞内局在について解析を行った。チミジンブロックによって細胞を同調し 2 時間ごとに回収することで、細胞周期の各段階における Cep169 を免疫染色およびウエスタンブロットで検出した(Fig. 4-1A-C)。免疫染色の結果から、Cep169 は間期では中心体に局在し、G2 期から分裂期に移行する際、細胞質へ拡散することが明らかになった。さらに、分裂期で細胞質中に拡散した Cep169 は次の G1 期から徐々に中心体に集積することが明らかとなった(Fig. 4-1B)。

また、細胞周期での Cep169 タンパク質のバンドをウエスタンブロットにより検出したところ、間期では 170 kDa 付近に見えていたバンドが、G2 期から分裂期へ移行する時期において高分子量側へシフトしていることが明らかとなり、分裂期特異的に何らかの化学修飾を受けていると考えられ、細胞質への解離との関係が示唆された(Fig. 4-1C)。

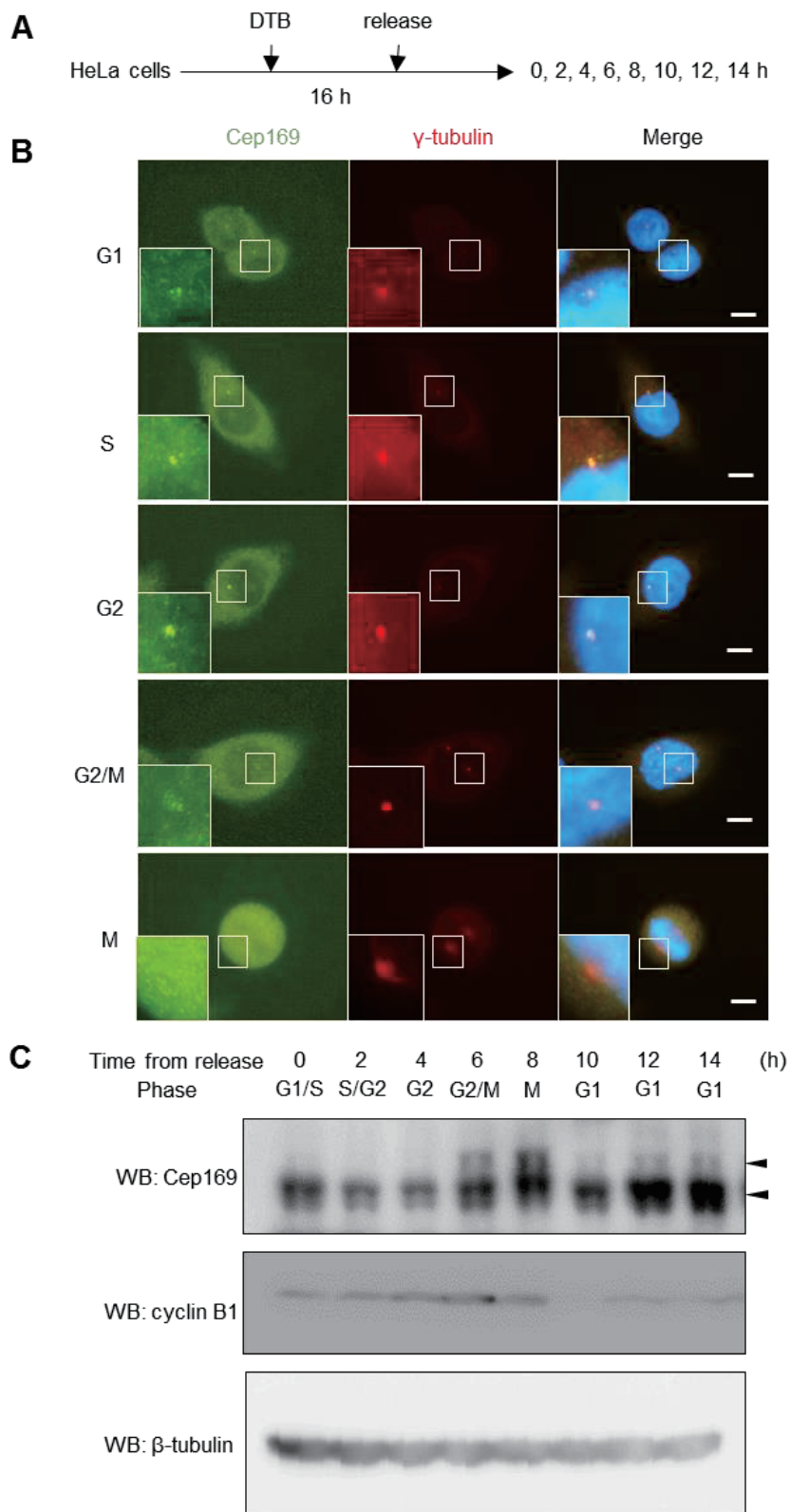


Figure 4-1. 細胞周期における Cep169 の挙動

(A) HeLa 細胞の同調スケジュールを示した。ダブルチミジンブロックによって 16 時間同

調した HeLa 細胞をメEDIUM交換によりリリースし、2 時間ごとに細胞の回収を行った。(B) 免疫染色による、細胞周期の各段階での Cep169 の局在を示した。Cep169 (緑)、中心体マーカーとして γ -tubulin (赤)の検出を行った。白枠で囲んだ中心体周辺の領域を拡大して示した(スケールバー10 μ m)。(C) ウェスタンブロットにより、同調した HeLa 細胞の Cep169 タンパク質を検出した。分裂期で高分子量側へバンドシフトが起きており、間期および分裂期での Cep169 のバンド位置を黒の矢印で示した。

第3節 キナーゼと Cep169 の関係

分裂期には、多くのキナーゼが活性化され、基質となるタンパク質のリン酸化と脱リン酸化のバランス関係が、核膜崩壊、紡錘体形成、染色体分配や細胞質分裂などのダイナミックな変化をもたらすことが知られている。そこで、分裂期における Cep169 の中心体からの解離が、リン酸化によって調節されているか否かを検討した。

最初に、Cep169 の分裂期における特異的な修飾が、キナーゼによる Cep169 のリン酸化によるか否かを解析した。ホスファターゼを用いた *in vitro* の解析によって、分裂期における Cep169 のバンドの位置が間期と同じ位置に戻ったことから、Cep169 のバンドシフトはリン酸化によるものであることを確認した(Fig. 4-2A)。さらに、Cep169 をリン酸化する分裂期キナーゼを特定するため、中心体に局在するキナーゼである aurora-A、Cdk1、Plk1 に注目し、各キナーゼの阻害剤を分裂期に同調した細胞に添加し、30 分間培養を行った(Fig. 4-2B, C)。各キナーゼの阻害剤を用いた解析の結果、Cdk1 阻害剤 purvalanol A が分裂期の Cep169 のバンドシフトを顕著に抑制した。さらに、同様の条件で各種キナーゼ阻害剤を添加した細胞の免疫染色を行ったところ、Cdk1 の阻害剤添加によって、分裂期の細胞質中に拡散した Cep169 が中心体に戻ってくることが明らかとなった(Fig. 4-2C, D)。さらに、中心体を粗生成したフラクションに含まれる Cep169 の量を、(i) 非同調、(ii) taxol により同

調した分裂期、(iii) taxol により同調した分裂期に Cdk1 阻害剤を添加したサンプルで比較を行った。非同調での Cep169 のタンパク質の量を 1.0 としてバンドの定量化を行ったところ、taxol により同調した分裂期の細胞での Cep169 の量は 0.48 と半分以下に減少していたが、Cdk1 阻害剤処理によって Cep169 のタンパク質の量が 0.93 に増加することが明らかとなった(Fig. 4-2E)。これらの結果から、Cdk1 の活性依存的に Cep169 の中心体局在が制御されていることが示唆された。

次に、Cdk1 が Cep169 を直接的にリン酸化するか否かを明らかにするため、Sf9 細胞に Cep169 および Cdk1/cyclinB1 複合体をそれぞれ発現させタンパク質の精製を行い、in vitro でのキナーゼ解析を行ったところ、リン酸基供与体である ATP を添加したときにのみバンドシフトが起きたため、Cdk1 が直接 Cep169 をリン酸化することが明らかとなった(Fig. 4-2F)。これらの結果から、Cdk1 は分裂期特異的に Cep169 をリン酸化し、Cep169 の中心体からの解離を誘導していることが示唆された。

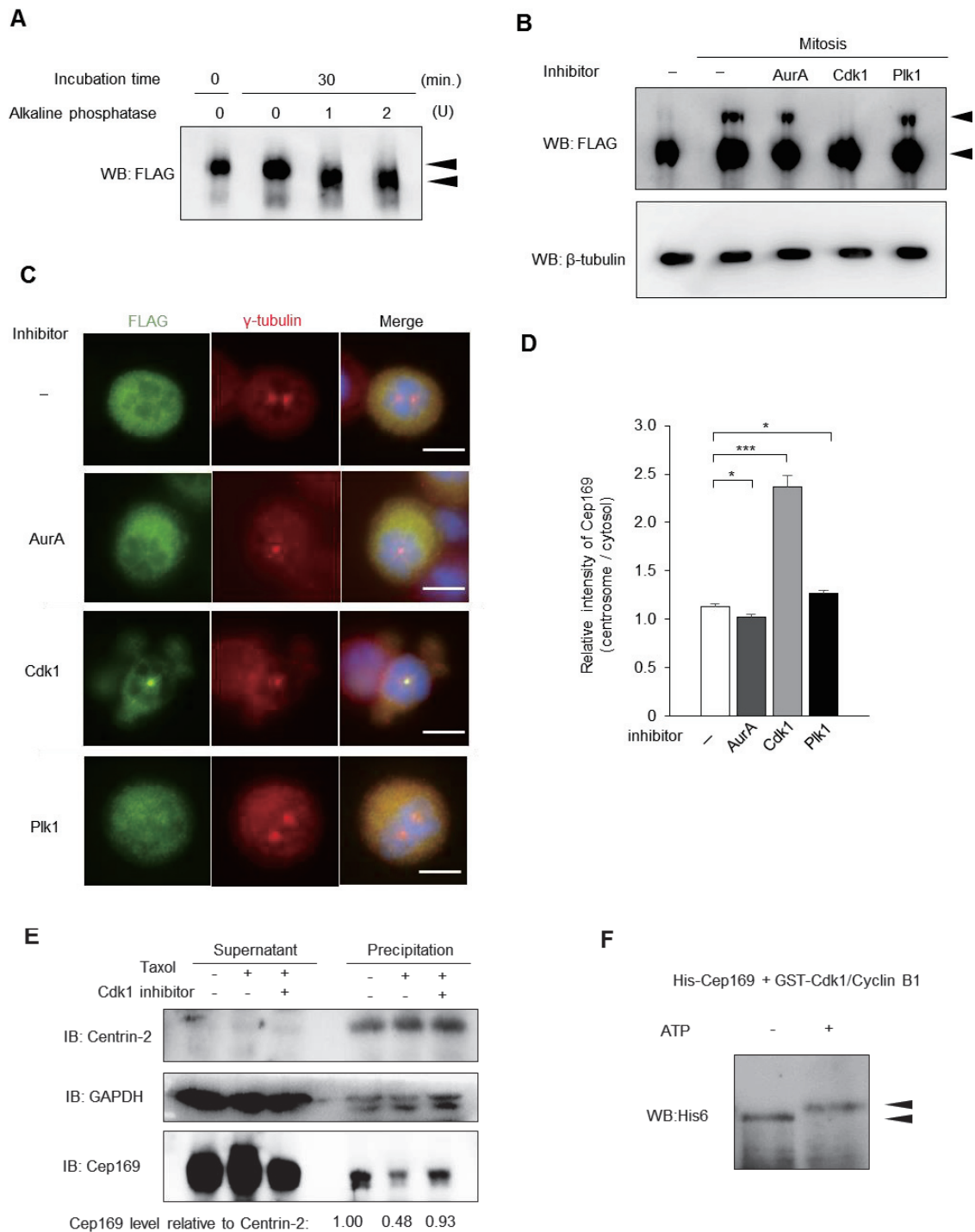


Figure 4-2. キナーゼ阻害剤を用いた解析

(A) FLAG-Cep169 を HeLa 細胞で発現させ、抗 FLAG 抗体ビーズを用いてタンパク質を精製した。タンパク質溶液に対して、SAP を 0~2 unit 添加しホスファターゼ実験を行った。抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットにより、FLAG-Cep169 のバンドシフトを検出

した。

(B, C) 分裂期に同調した HeLa 細胞に、各種阻害剤(aurora-A 阻害剤: MK-5108、Cdk1 阻害剤: purvalanol A、Plk1: BI2536)を添加し、Cep169 のバンドシフトをウエスタンブロットで検出した(B)。黒の矢印は FLAG-Cep169 の位置を示している。同様の条件において、doxycycline による FLAG-Cep169 発現誘導型の細胞株を用い、抗 FLAG 抗体(緑)、中心体マーカーとして抗 γ -tubulin 抗体(赤)を用いて免疫染色により局在を観察した(C) (スケールバーは 10 μ m)。

(D) Fig. 4-2C で示した免疫染色における、Cep169 の蛍光強度比(中心体/細胞質)を定量化し、グラフに示した($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E.、* $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0001$ 、 t -test により算出)。蛍光強度の測定には NIS-Elements (Nikon)を用いた。

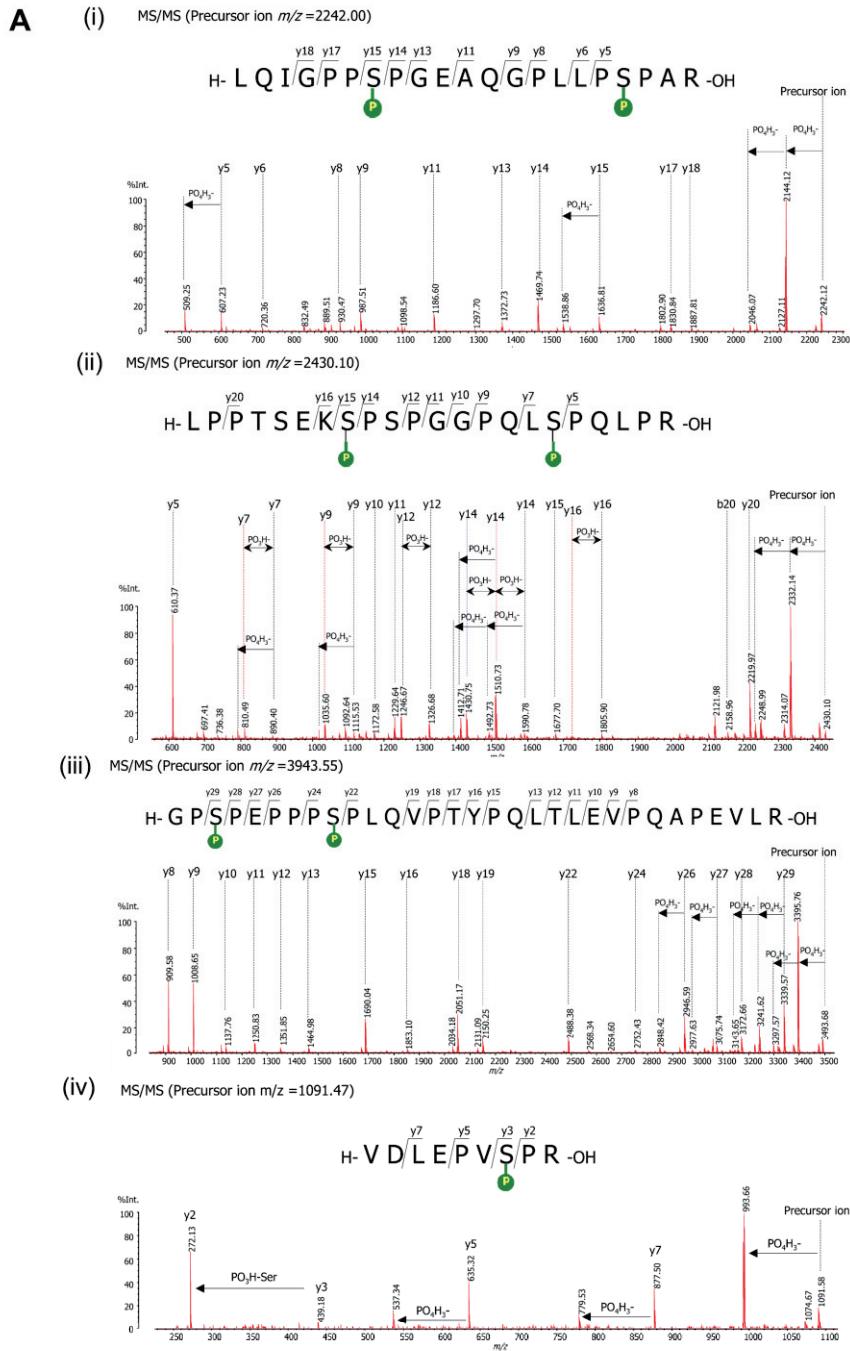
(E) (i) 非同調の細胞、(ii) taxol により分裂期に同調した細胞、(iii) taxol により分裂期に同調し Cdk1 阻害剤 purvalanol A を添加した細胞の抽出液をそれぞれ遠心によって、可溶化フラクションと不溶化フラクションに分離し、不溶化フラクションに含まれる中心体タンパク質を検出した。Cep169、および中心体マーカーとして centrin-2、細胞質マーカーとして GAPDH に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。中心体を含む不溶化フラクションにおける Cep169 のバンドを ImageJ により測定し定量化した。

(F) Sf9 細胞に発現させた、His₆-Cep169 および Cdk1/GST-cyclin B1 を精製し、in vitro で混合しキナーゼ実験を行った。リン酸基供与体としての ATP 添加の有無における Cep169 のバンドシフトの変化を、抗 His₆ 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。矢印は His₆-Cep169 の位置を示している。

第 4 節 リン酸化部位の同定

次に、Cep169 のリン酸化部位同定のため、mass spectrometry (MS)による解析を行った。Doxycycline による FLAG-Cep169 発現誘導型の細胞株を nocodazole により分裂期に同調し、抗 FLAG 抗体で精製を行った FLAG-Cep169 のサンプルを SDS-PAGE により展開した。ゲルを銀染色し FLAG-Cep169 のゲル片を切り出し、trypsin を用いてゲル内消化の後リン酸化ペプチドを濃縮し、MS 解析に供した。Mascot 検索の結果、Cep169 に含まれ

る 4 つのリン酸化ペプチド領域を検出し、計 7 か所のリン酸化部位(Ser-440、Ser-451、Ser-470、Ser-477、Ser-571、Ser-577、Ser-767)を同定した(Fig. 4-3A, B)。



B

401-500 GPLPFLSMFM GAGDAPLGSR PGHPHSSSQV **KSKLQIGPPS PGEAQQGLLP SPARGLKLK LPPTSEKSPS PGGPQLSPQL PRNSRIPC RN** SGSDGSPSL
 501-600 LARRQLGGGE LSPGAGQLP TSPSPCYTTP DSTQLRPPQS ALSTLLSPG VVSPCYENIL **DLRSRSTFRGP SPEPPPSLPQ VPTYPLQLTLE VPQAPEVLR**S
 601-700 PGVPPSPCLP ESYPYGSPQE KSLDKAGES PHPGRRTPGN SSKKPSQSGS RRPDGPSTP LRDLAALGK LKTGPEGALG SEKNQVPARP GTEKTRGPGK
 701-800 SGESAGDMVP SIHRPLEQLE AKGGIRGAVA LGTNSLKQGE PGLMGDPGAR VYSSHSMGAR **VDLEPVSPRS CLTKVELAKS RLAGALCPQV PRTPAKVPTS**

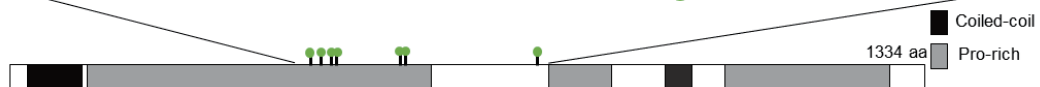


Figure 4-3. MS によるリン酸化部位の同定

(A) MS/MS で得られたリン酸化ペプチドのスペクトルチャート。

(B) Fig. 4-3A の MS/MS の結果を元に、Cep169 タンパク質のドメインおよびアミノ酸配列上に、リン酸基の位置を示した。

第 5 節 小括

これまでの結果から、分裂期特異的な Cep169 のリン酸化部位を特定した。Cep169 を分裂期特異的にリン酸化するキナーゼが Cdk1 であり、Cdk1 によるリン酸化が Cep169 の中心体局在を制御していることが明らかとなった。また、MS による解析の結果、Cep169 の計 7 か所のリン酸化部位(Ser-440、Ser-451、Ser-470、Ser-477、Ser-571、Ser-577、Ser-767)を同定した。さらに、これらのリン酸化は Cep169 タンパク質の中央から近傍の領域に存在し、Cdk1 によるリン酸化のコンセンサス配列(S/T-P)を満たすことから、Cdk1 は Cep169 を複数か所リン酸化していることが示唆された。

第5章 Cep169による紡錘体軸の配向性制御機構

第1節 研究背景

分裂期において、中心体を核として伸長した微小管は紡錘体を形成し、染色体を娘細胞に分配する装置として働く。そのため、紡錘体の形成異常は染色体不安定性を誘導し、染色体異常やがん化の原因となることが知られている (Pihan et al., 2003; Shi and King, 2005)。幹細胞は、発生の初期には対称分裂によって、自らと同じ性質をもつ二つの娘細胞を産出し幹細胞を増大させるが、その後、非対称分裂に切り替えることによって、一つは分化した細胞と、もう一つは幹細胞を産出し、幹細胞の数を維持しながら、分化した細胞を増大させるという特徴をもつ。最近になって、幹細胞ニッチ(stem cell niche) 環境における紡錘体軸の配置が、対称または非対称分裂による細胞の運命決定を制御する上で重要な機構であることが報告されている (Yadlapalli and Yamashita, 2012)。神経幹細胞や上皮幹細胞の分化時には、紡錘体軸の方向に依存して、娘細胞の分裂方向が変わり、幹細胞の自己複製、または、分化細胞へと細胞の運命が決定される。そのため、CDK5RAP2などの中心体タンパク質の機能が欠損すると、神経幹細胞の正常な分裂が妨げられ、幹細胞の枯渇が起きて大脳皮質の神経細胞の数が減少し、小頭症を引き起こすことが示唆されている (Knoblich, 2010; Lu and Johnston, 2013; Siller and Doe, 2009; Woods et al., 2005)。しかし、このような紡錘体軸の配置を決定する因子についての動物細胞での報告は少なく、紡錘体軸の配向性を制御する分子の探索と、詳細な分子機構の解明が求められている。

微小管は、プラス端において重合と脱重合を繰り返す動的不安定性をもつ。微小管の動的不安定性を制御する因子のなかで、伸長する微小管のプラス端に局在する分子群は、2001年に Pellman らによって、microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs)と総称された (Schuyler and Pellman, 2001b)。多くの+TIPsはEB1と直接結合することで、微小管伸長

端に集積することが知られている。**+TIPs**は、微小管動態の制御にとどまらず、微小管先端で細胞内小器官と相互作用することで、微小管ネットワークの非対称性を生み出し細胞内極性を生む。分裂期では、紡錘体軸の決定や染色体分配にも関与し、紡錘体軸の決定では、星状体微小管と細胞皮層との相互作用において重要であると考えられている。さらに、**EB1**は、紡錘体の配向に重要な星状体微小管の安定化の機能にも重要であることが知られており、**EB1**のノックダウンにより星状体微小管自体が欠失することが知られている (Toyoshima and Nishida, 2007)。

細胞皮層においては、モータータンパク質である **dynein** と **dynactin** の複合体が、星状体微小管をけん引することによって、紡錘体を適切な位置に配置させる。**dynein/dynactin** 複合体が星状体微小管を捕捉する機構において、星状体微小管の安定的な維持と細胞皮層との結合を仲介する**+TIPs**分子の探索が求められているが、現在のところ、動物細胞の紡錘体配向性を制御する詳細な分子機構については不明な点が多い。本章では、紡錘体軸の配向性決定における分子機構解明を目的として、中心体および微小管の制御に関連するタンパク質 **Cep169** の機能解析を行った。

Cep169は微小管の安定化に寄与し、分裂期では中心体から解離することから、分裂期では **Cep169**は紡錘体微小管や星状体微小管の安定化に寄与していることが強く示唆された (Mori et al., 2015b)。そのため、分裂期の紡錘体形成における、**Cep169**の機能解析を行った。本章では、**Cep169**の分裂期における紡錘体配向性制御因子としての機能解析の結果から、**Cep169**が **dynein/dynactin** 複合体の構成タンパク質である **Arp1** との結合を通して、紡錘体の配向性を制御していることを明らかにした。

第2節 **Cep169**の発現抑制は分裂期の異常を誘導する

前章では、**Cdk1**による **Cep169**タンパク質の分裂期特異的な局在変化を明らかにした。

そこで、本章では Cep169 が分裂期でどのような機能をもつかを解析した。Cep169 の発現を抑制した細胞では luciferase を発現抑制した細胞(コントロール)に対して分裂期の細胞の割合(mitotic index)が増加し(コントロール: 8.5%、Cep169 発現抑制: 20.6%)、これが外因性の Cep169 の発現によりレスキューされる(野生型: 5.4%、SxIP 変異型: 11.7%)ことから、Cep169 の機能欠損によって分裂期停止が誘導されることが明らかになった(Fig. 5-1A)。また、Cep169 の発現を抑制した細胞では、染色体の整列異常を起こした細胞の割合が増加していた(Fig. 5-1B)。これらの結果から、Cep169 の発現抑制は、分裂期の進行に何らかの異常を引き起こすことが考えられた。そこでタイムラプス撮影により分裂期の細胞をイメージしたところ、Cep169 を発現抑制した細胞では、紡錘体の軸が固定されず回転している様子が観察された。さらに、核膜崩壊から分裂期中期までの時間を測定したところ、コントロールおよび Cep169 を発現抑制した細胞ではおよそ 24 分でほとんど時間に変化はなかったが、分裂期後期の移行までの時間は Cep169 を発現抑制することで 75 分以上経過しても分裂期後期に移行しない細胞の割合が増加した(Fig. 5-1D, E)。

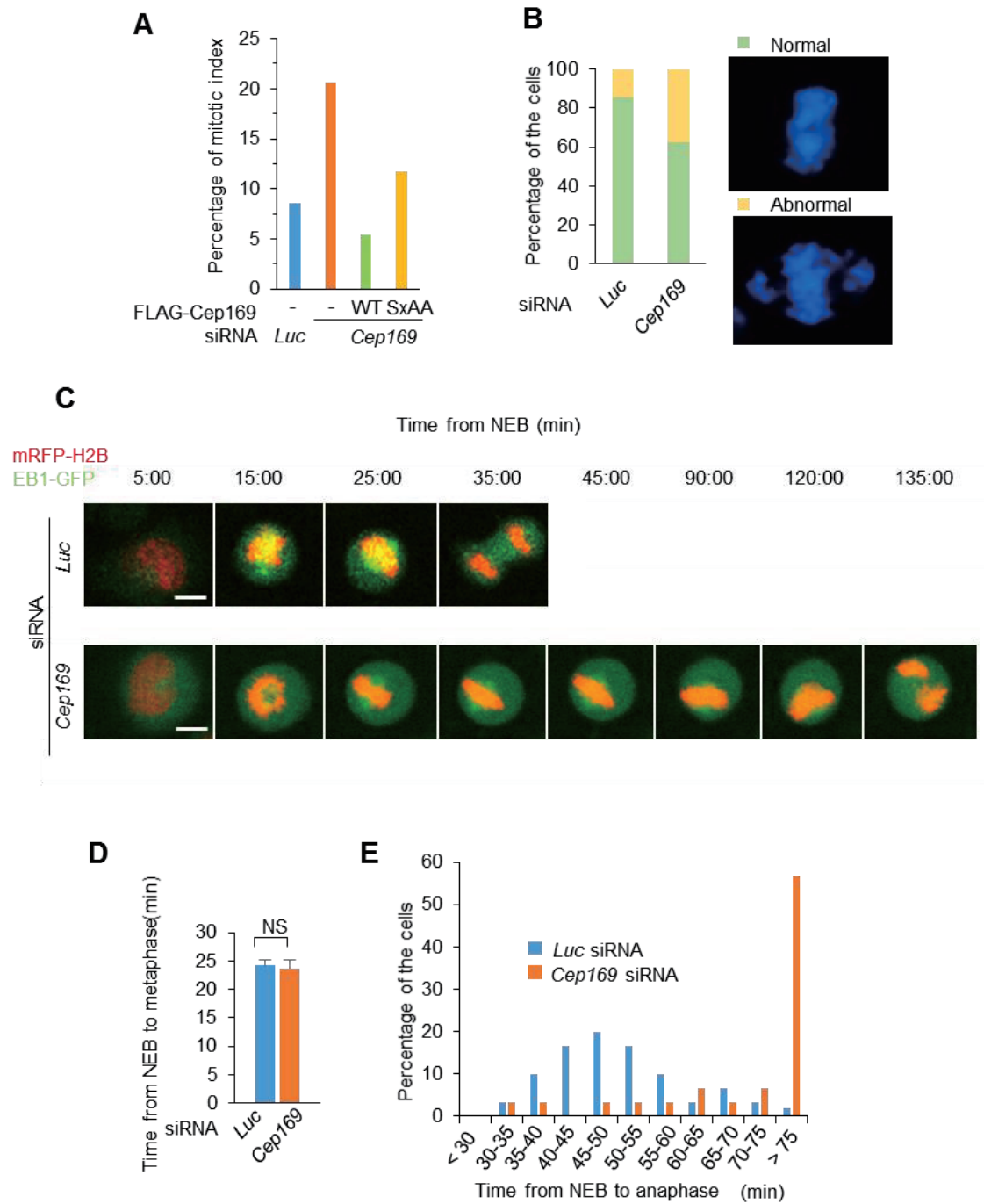


Figure 5-1. Cep169 の発現抑制による分裂期進行異常の解析

(A) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞に対して、FLAG-Cep169 の野生型(WT)または SxIP 変異型(SxAA)の遺伝子を導入し、レスキュー実験を行い、mitotic index を測定した($n = 350$ 細胞)。

(B) 二極性の紡錘体を形成した *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞に

において、染色体の整列異常を示した細胞の割合を測定した($n = 100$ 細胞)。

(C) HeLa 細胞の EB1-GFP および mRFP-histon H2B の安定発現株に *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入し、タイムラプス撮影により分裂細胞のイメージングを行った(スケールバーは 10 μm)。

(D, E) Fig. 5-1C のイメージング解析によって測定した、核膜崩壊から分裂期中期進行までにかかる時間(D)および、核膜崩壊から分裂期後期までの時間(E)を示した($n = 30$ 細胞、 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 、NS: not significant、*t*-test により算出)。

第 3 節 Cep169 は星状体微小管の長さを制御している

分裂期後期進行の異常をより詳細に解析するため、EB1-GFP による紡錘体の詳細なイメージングを行った。イメージングの結果、Cep169 の発現抑制は紡錘体の星状体微小管の短縮を引き起こしていることが明らかとなった(Fig. 5-2A)。固定細胞の観察から、紡錘体全体のサイズが減少していることが明らかになったが、特に星状体微小管の長さがコントロールの細胞では平均 2.78 μm であったのに対し、Cep169 の発現抑制では 1.56 μm と減少率が顕著であった(Fig. 5-2B-E)。

さらに、星状体微小管の短縮が Cep169 の+TIPs としての機能もしくは、微小管安定化の機能によるものかを明らかにするため、前章で作製した SxIP 変異型および $\Delta\text{tubulin-binding}$ 変異型によるレスキュー実験を行った(Fig. 5-2D, E)。その結果、SxIP 変異型では野生型と同様に星状体微小管の長さが回復したのに対して、 $\Delta\text{tubulin-binding}$ 変異型の導入によっては回復しなかったため(野生型: 2.47 μm 、SxIP 変異型: 2.39 μm 、 $\Delta\text{tubulin-binding}$ 変異型: 1.61 μm)、Cep169 の星状体微小管長の制御は、微小管結合ドメインに依存することが明らかとなった。

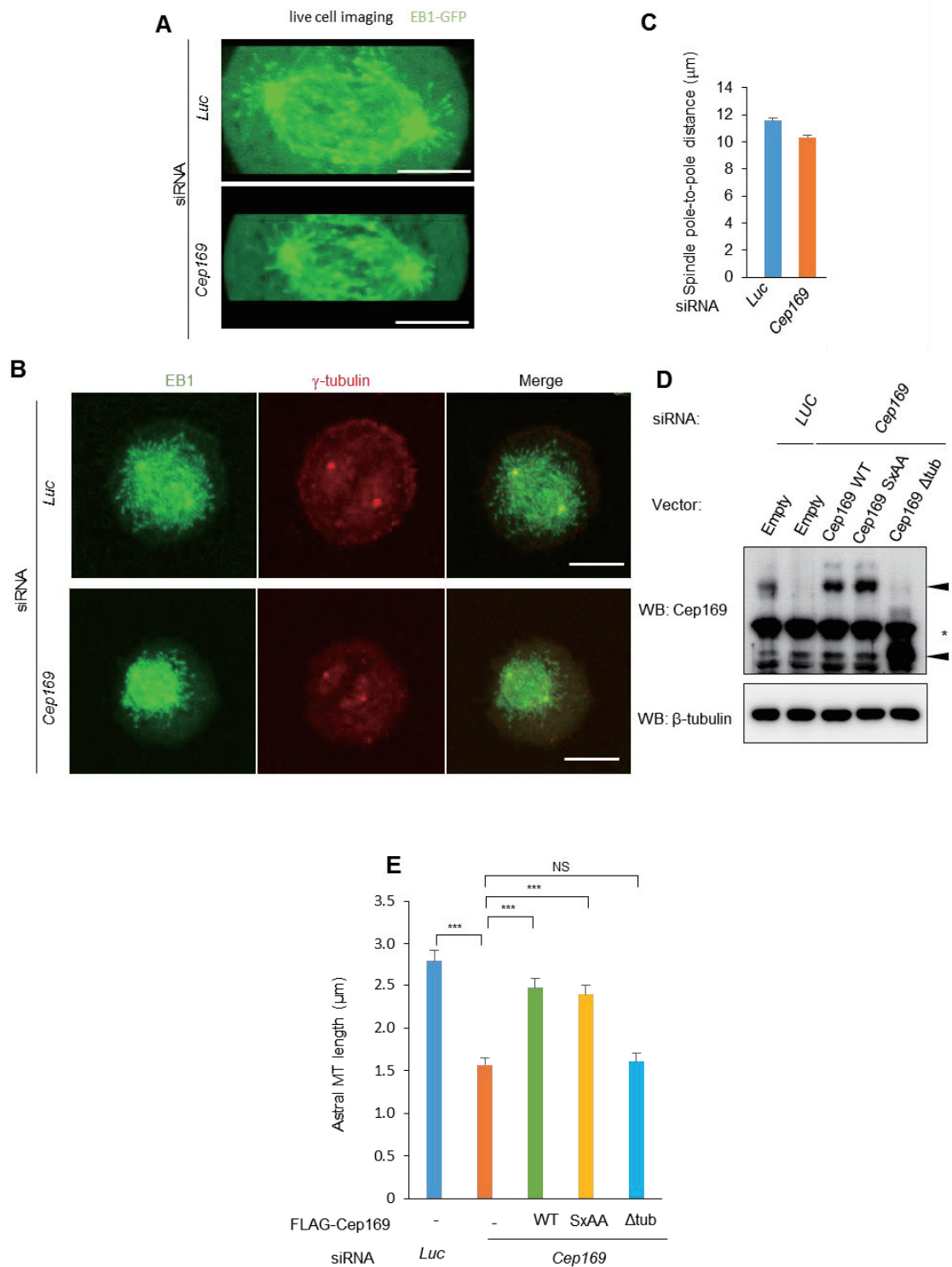


Figure 5-2. Cep169 による星状体微小管の長さ制御における解析

(A) EB1-GFP を発現した HeLa 細胞に *Luc* siRNA (Movie 2) または *Cep169* siRNA (Movie 3) を導入し、10 μM MG-132 で分裂期中期に同調し、紡錘体のイメージングを行った(スケールバーは 5 μm)。 (Movie 2:

<http://www.chem.waseda.ac.jp/terada/movie%20plus%20tips%20and%20spindle/Movie%202.mov>、Movie 3:

<http://www.chem.waseda.ac.jp/terada/movie%20plus%20tips%20and%20spindle/Movie%203.mov>)

(B) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞を 10 μ M MG-132 で分裂期中期に同調し、免疫染色によって紡錘体の観察を行った(スケールバー10 μ m)。EB1(緑)、 γ -tubulin(赤)。

(C) Fig. 5-2B における γ -tubulin の染色を指標にして紡錘体の極間距離を測定し、グラフに示した($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E.)。極間距離の測定には NIS-Elements (Nikon)を用いた。

(D, E) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞に FLAG-Cep169 の野生型(WT)、SxIP 変異型(SxAA)、 Δ tubulin-binding 変異型(Δ tub)をそれぞれ導入し、10 μ M MG-132 で分裂期中期に同調した。Cep169 タンパク質の量をウエスタンブロットで検出し(D)、星状体微小管の長さをグラフ(E)に示した($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E.、NS: Not significant, *** $P < 0.0001$ 、 t -test により算出)。黒の矢印は内因性の Cep169 および FLAG-Cep169 の位置を示している。測定には NIS-Elements (Nikon)を用いた。

第 4 節 Cep169 の発現抑制における紡錘体のセンタリング異常

紡錘体は、星状体微小管を介して細胞皮層に固定され、配向性が制御されていることが報告されている。そこで Cep169 による紡錘体の配向性制御機構に注目し、解析を行った。接着系培養細胞である HeLa 細胞は、紡錘体が細胞外基質に対して平行に位置し、均等に分裂することが知られている。紡錘体が細胞内において中央に位置(紡錘体のセンタリング)しているか、紡錘体の配向性を定量化する一つの指標として、細胞の輪郭における重心と紡錘極間の midpoint との距離(spindle position)を測定した(Fig. 5-3A, B)。その結果、Cep169 の発現抑制によって、紡錘体が細胞皮層近くの偏った位置に形成され(コントロール: 1.20 μ m、Cep169 発現抑制: 2.76 μ m)、センタリングの異常が起きていることが明らかとなった。紡

錘体の位置に関して、Cep169 の野生型および SxIP 変異型を用いてレスキュー実験を行ったところ、どちらの遺伝子の導入によっても回復されるという結果(野生型: 1.58 μm 、SxIP 変異型: 1.78 μm)を得た。しかしながら、星状体微小管の長さを回復できない $\Delta\text{tubulin-binding}$ 変異型の導入では重心と紡錘極間の midpoint との距離が 2.43 μm であり、紡錘体の位置の回復がほとんど起きていなかった。これらの結果から、Cep169 は微小管伸長端ではなく、微小管側面への結合を介して星状体微小管を安定化し、紡錘体の位置を決定していることが示唆された。

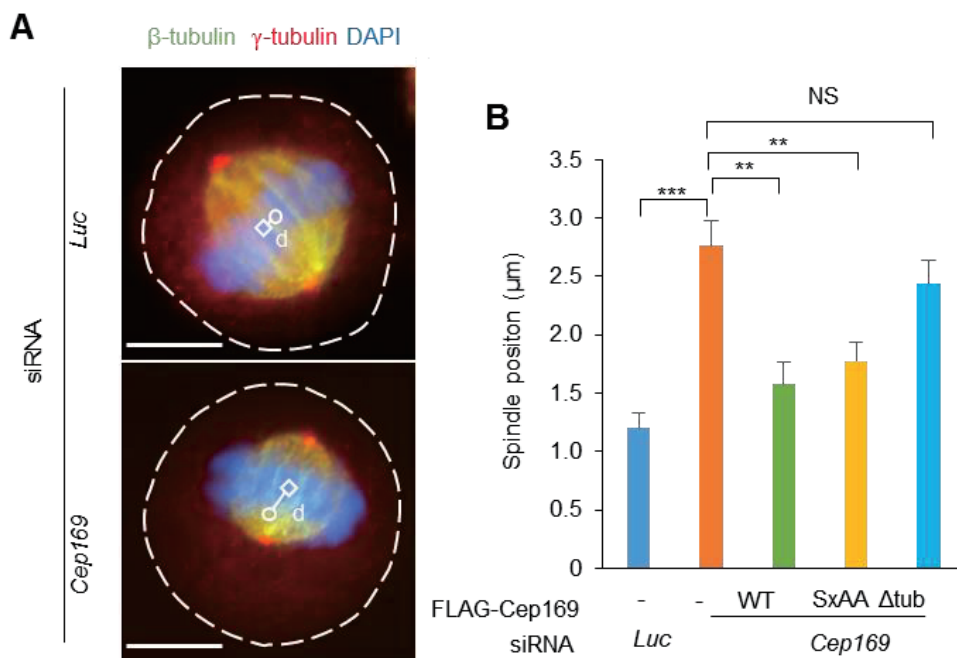


Figure 5-3. Cep169 の発現抑制における紡錘体のセンタリング異常

(A) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞を 10 μM MG-132 で分裂期中期に同調し、 β -tubulin(緑)、 γ -tubulin(赤)によって免疫染色を行った。破線は、細胞の輪郭を示し、細胞の重心と紡錘体極の midpoint との距離 d を測定した(スケールバーは 10 μm)。

(B) Fig. 5-3A で示した距離 d (細胞の重心と紡錘体 midpoint の距離)を ImageJ を用いて測定し、

グラフに示した($n=30$ 細胞、 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 、NS: Not significant, $**P < 0.001$, $***P < 0.0001$ 、 t -test により算出)。

第 5 節 Cep169 は紡錘体軸の角度を制御する

次に、紡錘体の配向性を定量化する別の指標として、紡錘体軸の角度(spindle angle)について定量化を行った。共焦点顕微鏡を用いて、3 次的に紡錘体を観察し、細胞外基質に対する角度 α を測定した(Fig. 5-4A-C)。その結果、Cep169 の発現抑制によって、紡錘体はコントロールに対して、2 倍程度角度が拡大することが明らかとなった(Fig. 5-4C)。角度の測定の実験に関しても、Cep169 の野生型および SxIP 変異型を用いてレスキュー実験を行ったところ、紡錘体のセンタリングのときとは異なり、コントロールとの角度比において野生型では角度の異常が回復していたが SxIP 変異型では回復されないことから(野生型: 1.24 倍、SxIP 変異型: 1.87 倍)、SxIP モチーフを介した紡錘体角度決定の機構が存在することが示唆された。

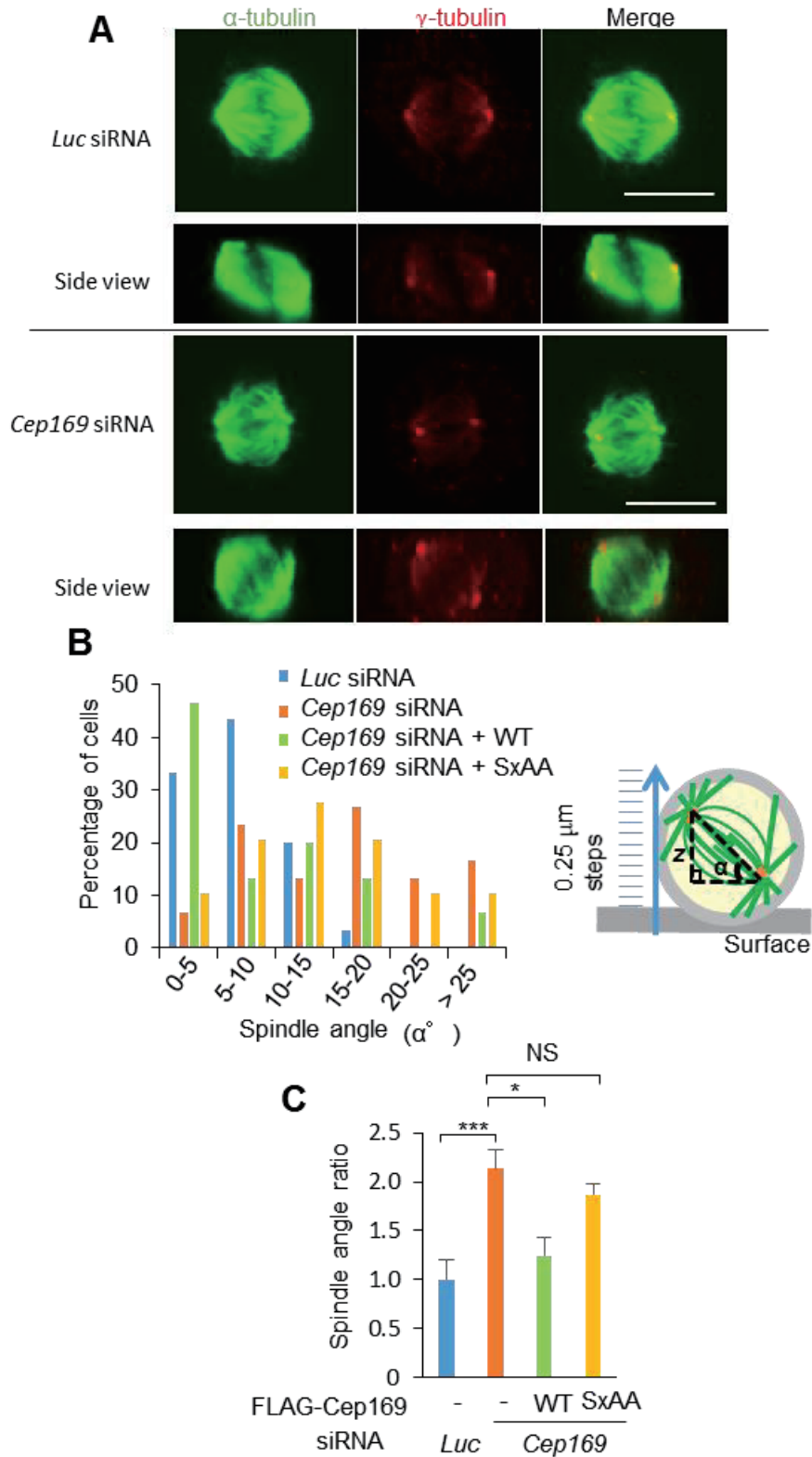


Figure 5-4. 紡錘体角度の定量化

(A) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞を、10 μ M MG-132 で分裂期

中期に同調した。 γ -tubulin(赤)および β -tubulin(緑)を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察し、0.48 μm ごとの Z-スタックイメージから側面図を構築した(スケールバーは 10 μm)。 (B, C) 右図で示したように、Z-スタックイメージから基底面に対して紡錘体の角度 α を測定した。*Luc* siRNA または *Cep169* siRNA で処理をした HeLa 細胞に、Cep169 の野生型 (WT) または SxIP 変異型(SxAA)を導入し角度を測定した。測定結果のヒストグラム(B)および、コントロールの細胞における角度の平均値との比をグラフに示した(C) ($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E., NS: Not significant, * $P < 0.005$, *** $P < 0.0001$, *t*-test により算出)。

第 6 節 Cep169 の機能欠損によって起きる、紡錘体のセンタリングの異常は、taxol 処理によって回復できる

これまでの結果から、Cep169 は紡錘体の星状体微小管の長さを制御し、紡錘体の配向性を制御していることが示唆された。そこで、taxol 処理によって強制的に微小管を安定化させたときに、Cep169 の発現抑制による紡錘体配向性の異常が回復されるかを解析した(Fig. 5-5A)。解析の結果、微小管を安定化し伸長させることで、Cep169 の発現抑制による紡錘体位置(センタリング)の異常に関しては回復したが(taxol-: 2.47 μm 、taxol+: 0.99 μm)、角度の異常に関しては回復しないことが明らかとなった(Fig. 5-5B, C)。これらの結果から、紡錘体の位置は微小管の安定化によって細胞中央に修正されることが明らかとなり、さらに、Cep169 は星状体微小管の安定化を介した紡錘体の位置決定だけでなく、紡錘体の角度決定に重要な因子であることが示唆された。

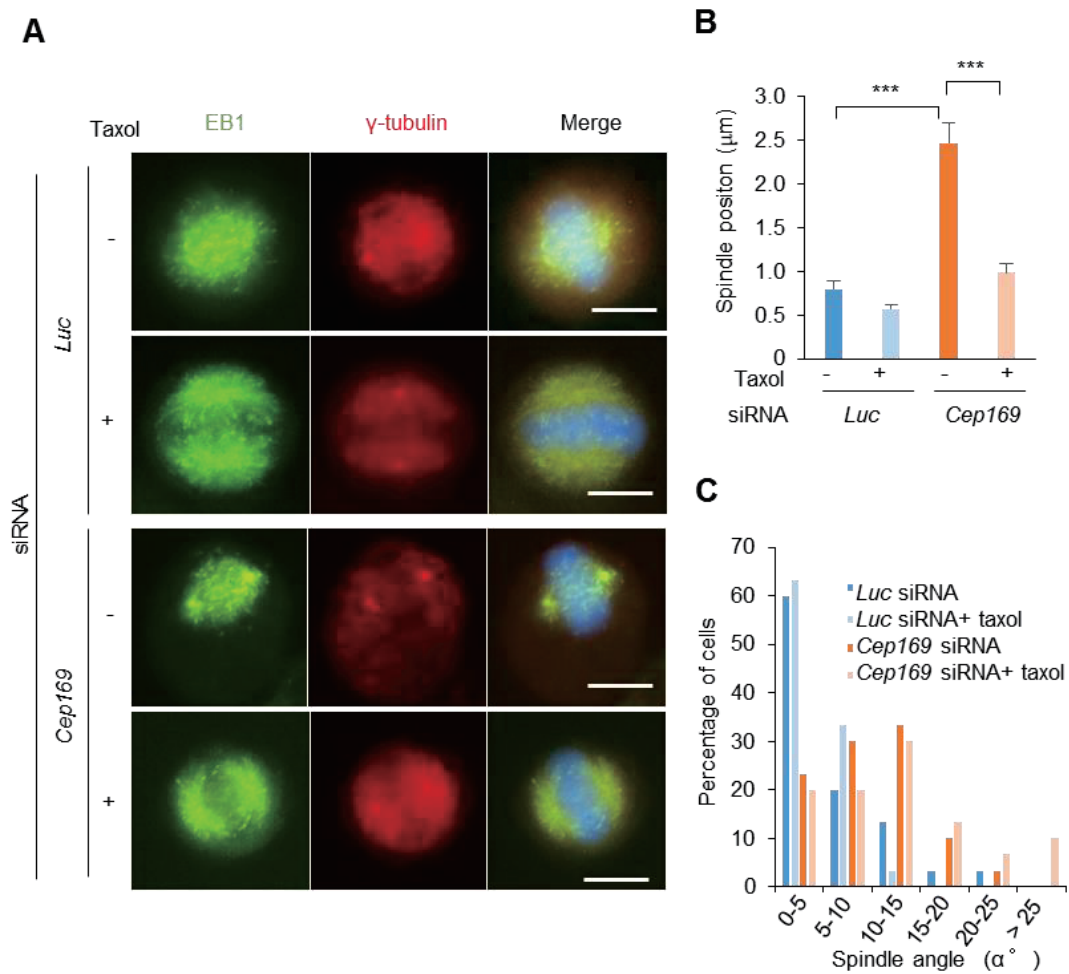


Figure 5-5. Taxol 処理における紡錘体の配向性

(A) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞を 10 μ M MG-132 で分裂期中期に同調後、1 μ M taxol で 20 分間処理を行い、免疫染色によって紡錘体を観察した(スケールバーは 10 μ m)。 γ -tubulin (赤)、EB1 (緑)、DAPI (青)。

(B, C) Fig. 5-5A の細胞において、Fig. 5-3B, 5-4B と同様、紡錘体の中点と細胞の重心位置までの距離(B)および、基底面に対しての紡錘体角度を測定したヒストグラム(C)を示した($n = 30$ 細胞、mean \pm S.E.、*** $P < 0.0001$ 、 t -test により算出)。

第 7 節 CDK5RAP2 による紡錘体配向性制御

CDK5RAP2 の配向性に関して実験を行った。前節までと同様に、*CDK5RAP2* siRNA の導入によって CDK5RAP2 の発現を抑制した HeLa 細胞では、星状体微小管の顕著な短縮 (コントロール: 3.15 μm 、CDK5RAP2 発現抑制: 1.83 μm) が起きていた (Fig. 5-6A-C)。さらに、紡錘体の位置や角度に関する測定を行い、Cep169 と同様の紡錘体配向性に関する異常が見られることが明らかとなった (Fig. 5-6D-F)。これらの結果から、CDK5RAP2 と Cep169 は、分裂期において紡錘体の星状体微小管制御に関して同様の機能を持ち、協調して機能している可能性が示唆された。

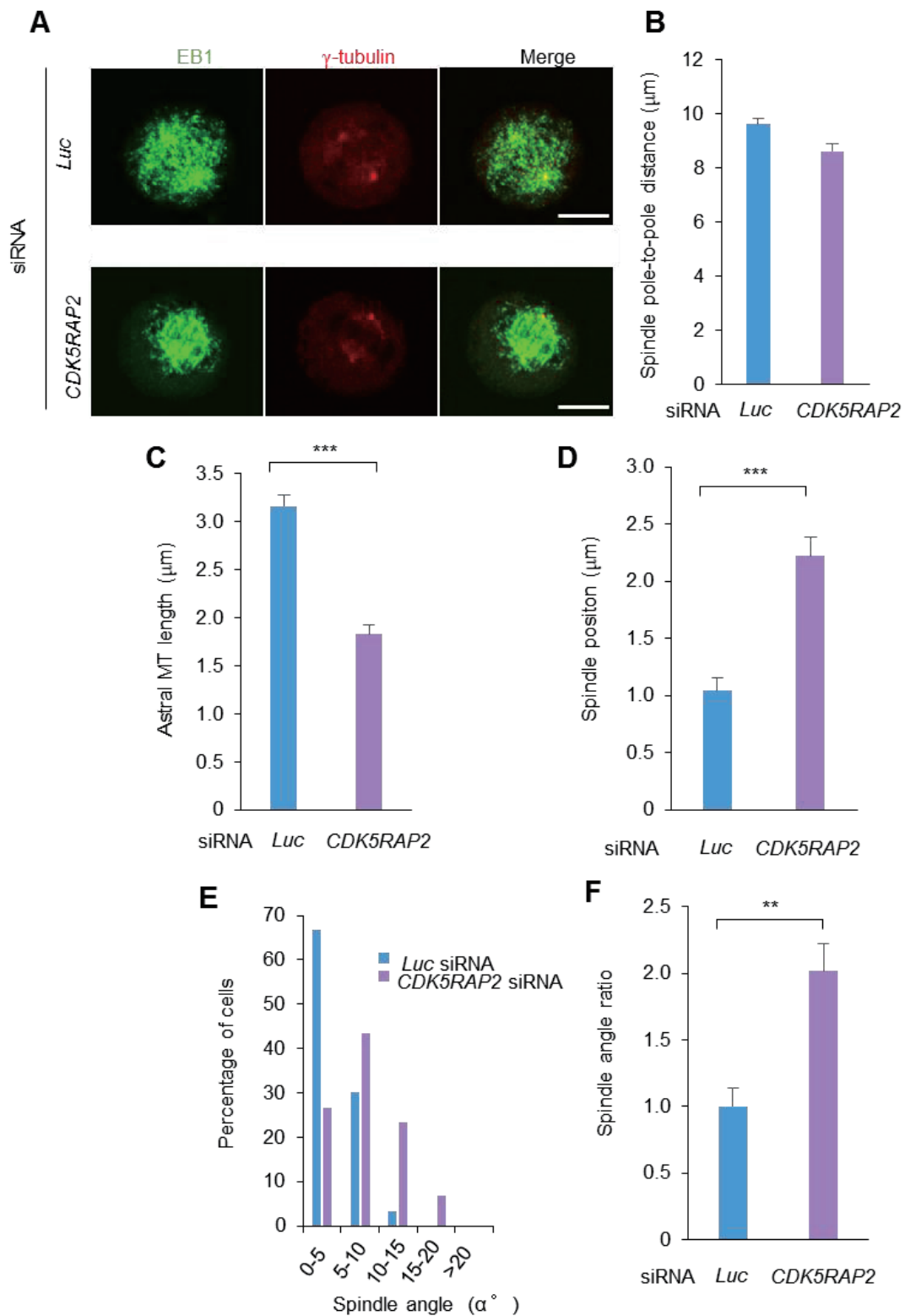


Figure 5-6. CDK5RAP2 発現抑制細胞における紡錘体配向性

(A) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を導入した HeLa 細胞を 10 μM MG-132 で分裂期中

期に同調し、免疫染色によって紡錘体の観察を行った(スケールバーは 10 μm)。EB1 (緑)、 γ -tubulin (赤)。

(B) Fig. 5-6A における、紡錘体極間距離(B)、星状体微小管の長さ(C)、紡錘体の中点と細胞の重心位置までの距離(D)、基底面に対しての紡錘体角度を測定したヒストグラム(E)およびコントロールの細胞における角度の平均値との比をグラフ(F)に示した($n = 30$ 細胞、 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 、 $**P < 0.001$, $***P < 0.0001$ 、 t -test により算出)。

第 8 節 Dynein/dynactin 構成タンパク質 Arp1 と Cep169 の相互作用

これまでの結果から、Cep169 が紡錘体軸角度の決定に関与することが示唆されたため、より詳細な角度決定に関するタンパク質との分子機構解析を行った。紡錘体の角度は、星状体微小管が細胞皮層上にある dynein/dynactin 複合体に捕捉されることにより、決定される機構が報告されている(Fig. 5-7A) (Raaijmakers et al., 2013)。そこで、dynactin を構成するタンパク質 Arp1 と Cep169 が相互作用するか否かを結合実験により検証を行った。GST-Arp1 の精製タンパク質と FLAG-Cep169 を発現した HEK293T 細胞の抽出液を混合し glutathione ビーズを用いたプルダウン実験を行ったところ、GST-Arp1 特異的に FLAG-Cep169 の共沈が検出されたため、両者が相互作用することが明らかとなった(Fig. 5-7B)。

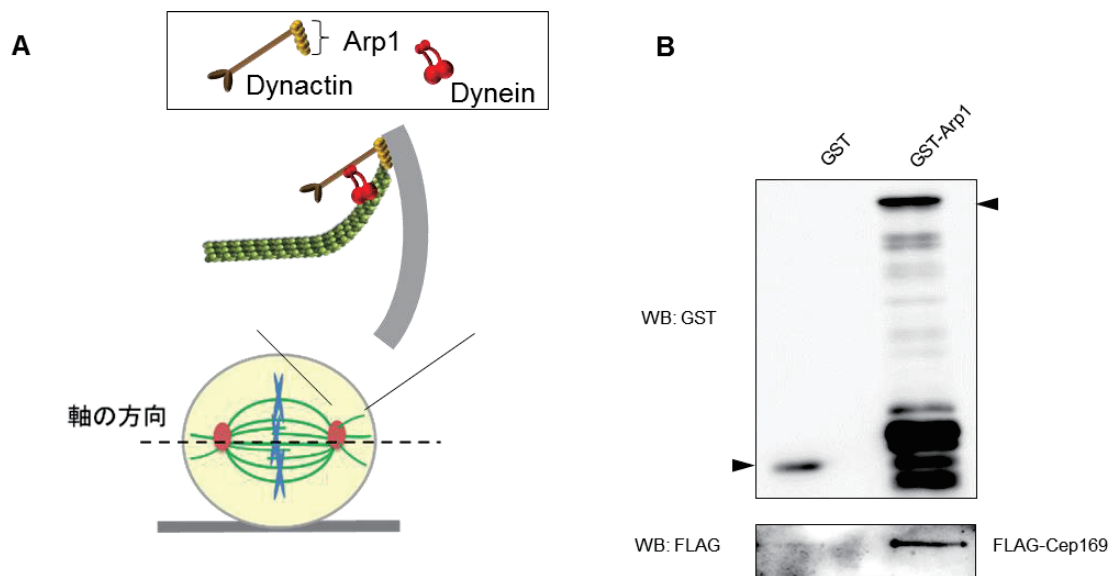


Figure 5-7. Arp1 と Cep169 の相互作用

(A) dynein/dynactin による星状体微小管捕捉のモデル図。

(B) 大腸菌で発現させた GST-Arp1 の精製タンパク質を用いて、HEK293T 細胞で発現させた FLAG-Cep169 タンパク質とのプルダウン実験を行った。glutathione ビーズを加え、GST または GST-Arp1 をアフィニティー精製し、共沈した FLAG-Cep169 を抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。GST または GST-Arp1 は抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロットで検出し、矢印で位置を示した。

第 9 節 Arp1 との結合ドメイン解析

次に、Arp1 との結合ドメインを解析するため、HEK293T 細胞に GFP-Arp1 と FLAG-Cep169 の全長または各種欠損変異型を共発現し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験を行った(Fig. 5-8A)。Arp1 とのドメイン解析の結果、Cep169 の N 末端 1-135 aa では Arp1 との相互作用が見られなかったが、1-400 aa において Arp1 との共沈が確認され、1-400 aa が Arp1 との結合に必要なドメインであることを特定した(Fig. 5-8A, B)。

さらに、Cep169 が Arp1 との結合によって紡錘体角度の調節に関与していることを明らかにするため、Cep169 の Arp1 との結合領域 1-400 aa を細胞に過剰発現し、ドミナントネ

ゲティブ効果における、紡錘体の配向性を解析した(Fig. 5-8C, D)。その結果、GFP-Cep169 (1-400 aa)の過剰発現は、GFP 単独の発現に比べて紡錘体軸の角度拡大を引き起こすことが明らかとなり、Cep169 と Arp1 との結合は紡錘体軸の角度決定に重要な役割をもつことが示唆された。また、Arp1 を RNA 干渉により発現抑制した細胞においても、紡錘体軸の角度拡大が顕著に表れることから、dynein/dynactin による微小管の捕捉には Cep169 と Arp1 の相互作用が重要であることが示唆された(Fig. 5-8E, F)。

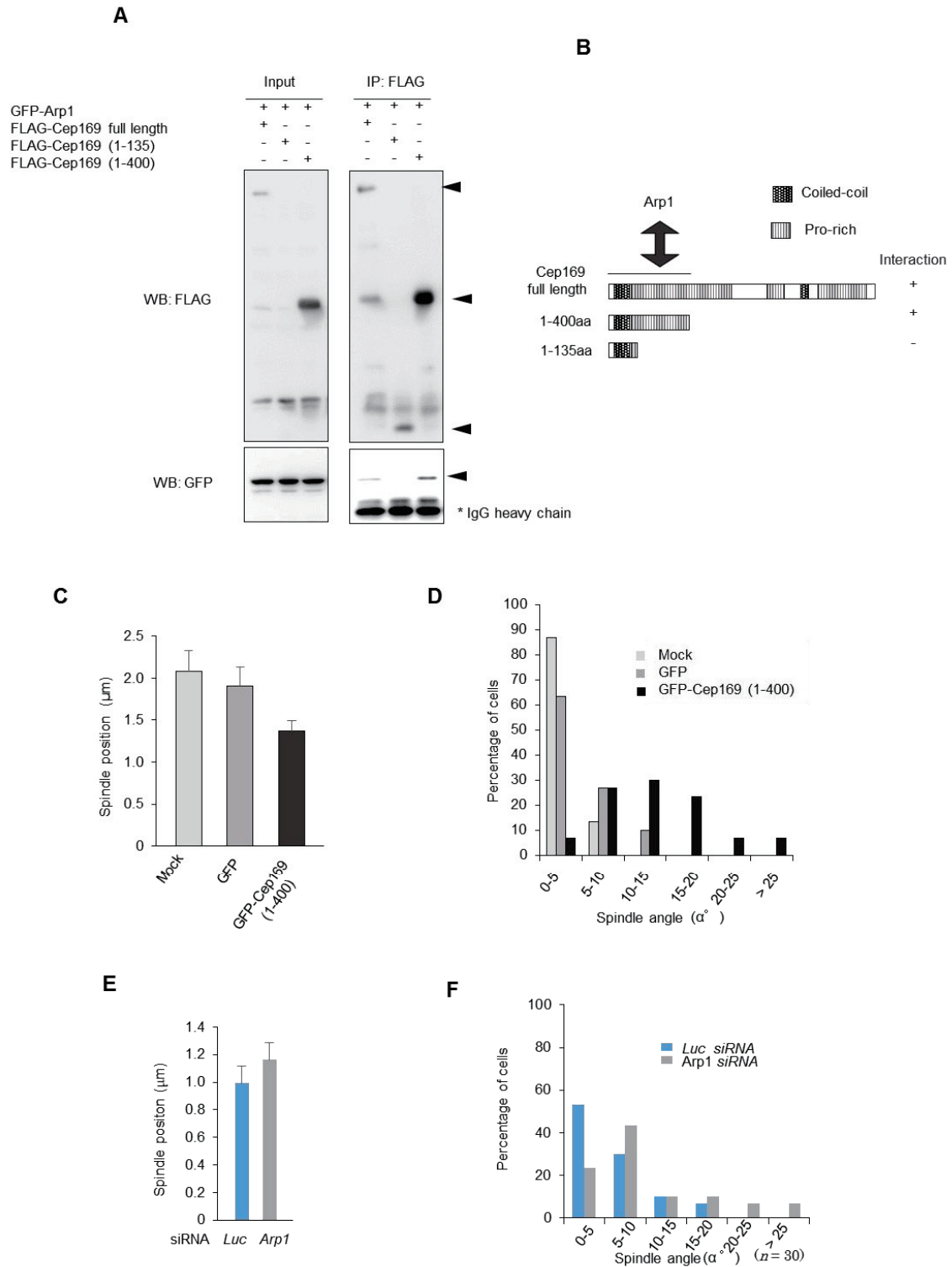


Figure 5-8. Arp1 と Cep169 の紡錘体配向における関係

(A) Cep169 の Arp1 に結合するドメインを免疫沈降実験により解析した。FLAG-Cep169 の全長または各種欠損変異型(1-135 aa、1-400 aa)と GFP-Arp1 を HEK293T 細胞に共発現させ抗 FLAG 抗体で免疫沈降したサンプルを、抗 FLAG 抗体および抗 GFP 抗体を用いた

ウエスタンブロットにより検出した。黒の矢印は、FLAG-Cep169の全長および各種欠損変異型の位置を示している。

(B) Fig. 5-8Aでのドメイン解析の結果を示した。

(C, D) Arp1結合ドメインであるGFP-Cep169(1-400 aa)をHeLa細胞に過剰発現し、Fig. 5-3B, 5-4Bと同様、紡錘体の中点と細胞の重心位置までの距離(C)および、基底面に対しての紡錘体角度を測定したヒストグラム(D)を示した($n = 30$ 細胞、 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$)。

(E, F) Fig. 5-3B, 5-4Bと同様、*Luc* siRNAまたは*Arp1* siRNAを導入したHeLa細胞の、紡錘体の中点と細胞の重心位置までの距離(E)、基底面に対しての紡錘体角度を測定したヒストグラム(F)を示した($n = 30$ 細胞、 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$)。

第10節 MDCKII細胞のシスト形成をCep169が制御している

Cep169による紡錘体の配向性制御が、組織形成において重要であるかを解析するため、MDCKII細胞の3D培養による上皮組織形成モデルを用いた。MDCKII細胞によるシスト形成は、内腔に対して平行に紡錘体が配向することによって、中央に一つの内腔を形成することが知られている(Fig. 5-9A)。しかし、Cep169の発現を抑制したMDCKII細胞はコントロールに比べて多腔のシストの割合が増加している(コントロール: 37%、Cep169発現抑制: 64%)ことが明らかとなった(Fig. 5-9B, C)。この結果から、Cep169は紡錘体軸の配向性を制御することによって、組織形成において重要な役割をもつことが示唆された。

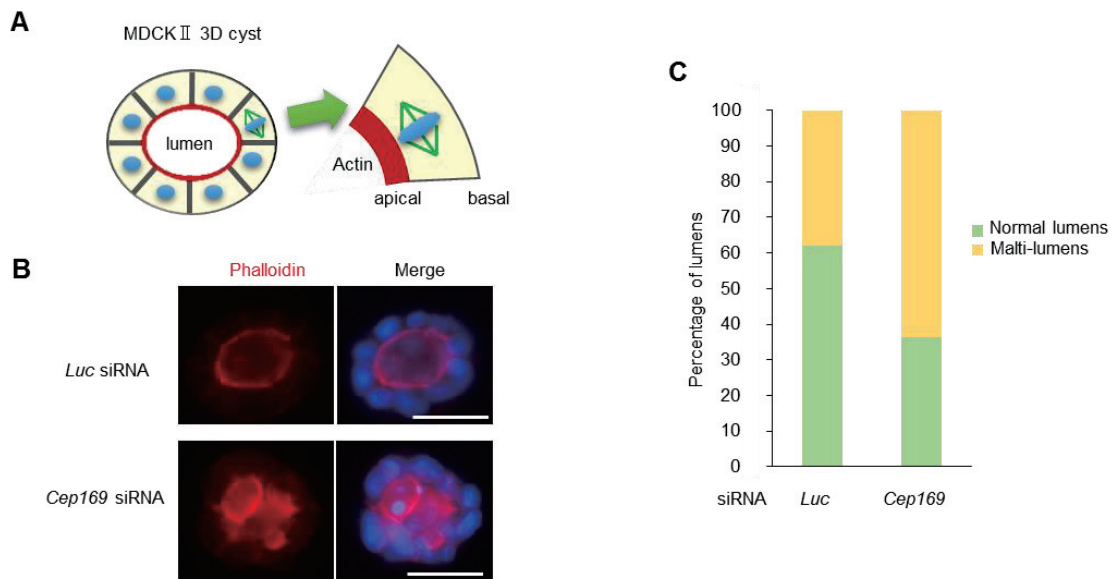


Figure 5-9. Cep169 による上皮細胞のシスト形成制御.

(A) MDCKII 細胞のシスト形成の模式図。シストの内部には、細胞頂端面による内腔が形成され、内腔の周囲に F-actin が集積する。

(B) *Luc* siRNA または *Cep169* siRNA を MDCKII 細胞に導入し、24 時間後にコラーゲンのマトリゲル上に播種し 3D 培養を行った。phalloidin-rhodamin (赤) によって F-actin および DAPI (青) で DNA を観察した(スケールバーは 50 μ m)。

(C) Fig. 5-9B の phalloidin-rhodamin 染色において、単一の内腔をもったシストおよび複数の内腔をもつシストの割合をグラフに示した($n = 160$ シスト)。

第 11 節 小括

本章における結果から、Cep169 は分裂期において紡錘体の配向性を制御していることが示唆された。Cep169 は、(i)星状体微小管の安定化による紡錘体の位置制御と(ii)星状体微小管と細胞皮層との結合を仲介する紡錘体軸の角度制御の機構があることが示唆された。(i)星状体微小管の安定化は、3章で示した tubulin との直接的な結合ドメインが重要であることが明らかとなった。また、(ii)星状体微小管と細胞皮層との結合を仲介する紡錘体軸の角

度制御の機構には、dynactin の構成タンパク質である Arp1 と Cep169 との相互作用が重要であり、さらに、EB1 との結合モチーフ(SxIP モチーフ)も角度決定に必要であることから、Cep169 が微小管伸長端における EB1 と細胞皮層に存在する Arp1 との結合を仲介し、星状体微小管が細胞皮層に捕捉される過程を制御していることが示唆された。また、MDCKII 細胞を用いた解析から、Cep169 は紡錘体軸の配向を制御することによって、組織形成において重要な機能をもつことが示唆された。

第6章 総括

第1節 Cep169による紡錘体軸の配向性制御モデルについて

本研究では、CDK5RAP2の結合タンパク質として、紡錘体の配向性を制御する因子であるCep169を同定し、機能解析を行った。Cep169は微小管の側面および伸長端に局在し、微小管の安定化に関わっている。Cep169は間期では中心体に局在しており、分裂期の開始とともにCdk1によってリン酸化され中心体から解離する。以上の結果から、Cep169は分裂期において紡錘体を構成する微小管を安定化している可能性が示唆された。

Cep169の微小管安定化には、微小管結合領域746-1152 aaが重要であり、Cep169はこの領域を介してmicrotubule-associated proteins (MAPs)として機能し、紡錘体微小管や星状体微小管の安定化に寄与する。分裂期中期に、二極性の紡錘体が形成され、両極から細胞皮層へ星状体微小管が伸長することで紡錘体は中央に配置される(Fig. 6-1A)。しかし、Cep169の機能欠損では、二極性の紡錘体は形成されるものの、星状体微小管が細胞皮層へ到達しないために、細胞中央の位置から紡錘体が大きく偏ることが明らかとなった。これは、dynein/dynactinによる微小管の捕捉とは独立した機構であり、伸長する星状体微小管が細胞皮層からの物理的な作用によって”押す力”が生じることで紡錘体が中央に修正される機構が存在すると考えられる(Fig. 6-1B)。Cep169による紡錘体のセンタリングの修正は、両極から細胞皮層へ伸長する星状体微小管から生み出される”押す力”によって行われていることが強く示唆された。実際に、Cep169を欠損した細胞では、星状体微小管の顕著な消失が見られるが、taxol処理で、微小管の脱重合を阻害し安定化すると、紡錘体のセンタリングの修正が起きることが観察された。しかしながら、紡錘体の角度の修正は、taxol処理では見られなかったことから、Cep169には、星状体微小管の安定化を介した、紡錘体のセンタリングの制御以外に、角度調節の制御があることが示唆された。

紡錘体の配向性決定機構は、主に出芽酵母を用いた研究において dynein/dynactin に依存した星状体微小管の捕捉による紡錘体の角度調節について解析されてきたが、動物細胞ではほとんど明らかになっていない。これまで、染色体の分配において紡錘体微小管が動原体を捕捉する分子機構に関しては詳細に研究されているものの、星状体微小管が dynein/dynactin に捕捉される分子機構は、ほとんど明らかになっていなかった。今回の研究によって、微小管伸長端に局在する Cep169 は Arp1 との相互作用を介して、微小管の先端が細胞皮層の dynein/dynactin に捕捉される過程をサポートしていることが示唆された。Cep169 の機能欠損や、この相互作用が阻害されると、紡錘体軸の角度調節がされなくなることが明らかになった。さらに、Cep169 の+TIPs としての機能が紡錘体軸の角度決定に極めて重要な機能をもつことが明らかになった。

Cep169 による紡錘体軸の角度決定機構の解析から、(i) Cep169 の SxIP モチーフを介した EB1 との結合、(ii) Cep169 の 1-400 aa の領域での Arp1 との複合体形成によって、微小管先端と dynein/dynactin 複合体との結合を仲介し、星状体微小管の捕捉をサポートすることによって紡錘体軸の角度を決定するモデルを提唱する(Fig. 6-1B)。

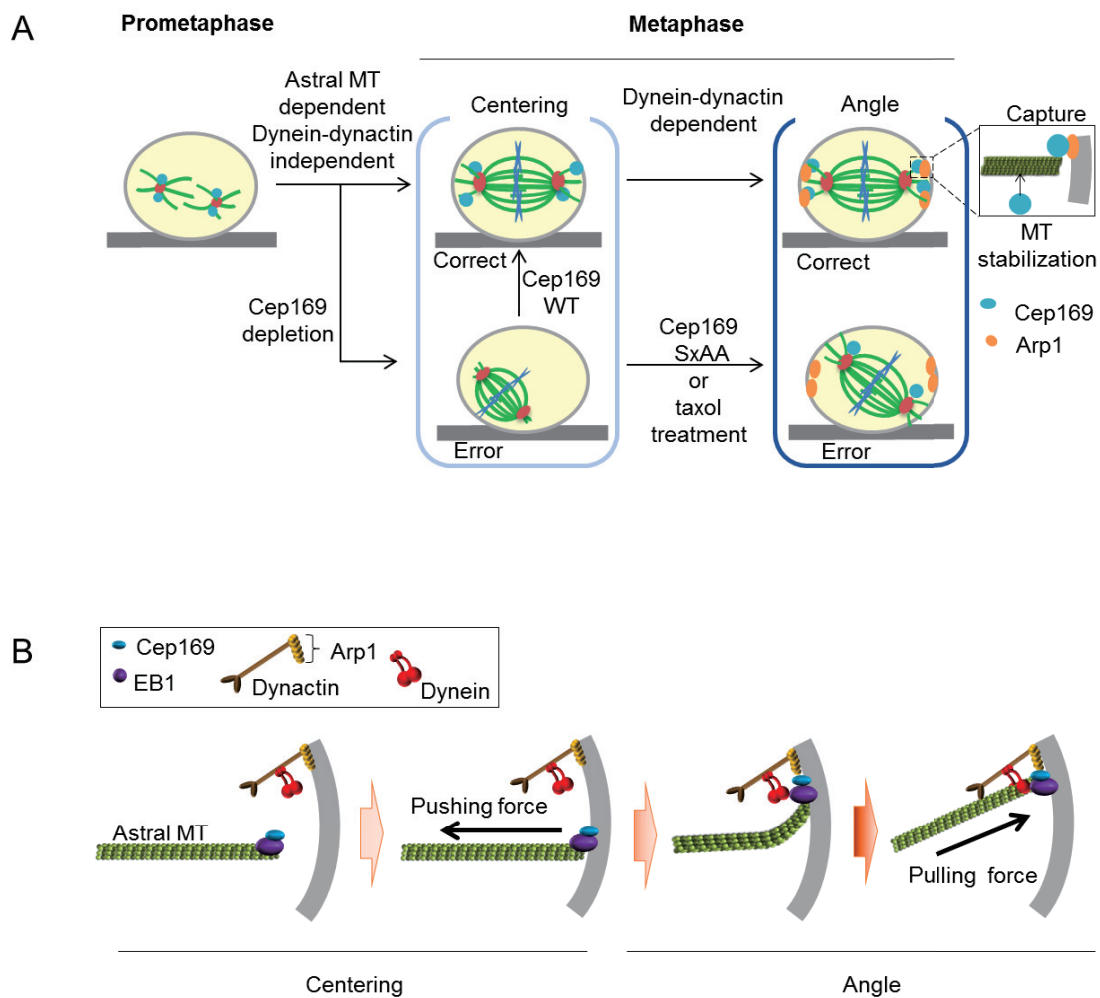


Figure 6-1. 分裂期における Cep169 の紡錘体配向性制御モデル

(A) Cep169 による分裂期前中期から中期にかけての紡錘体形成と配向性決定におけるモデル。

(B) 星状体微小管が細胞皮層に到達し、dynein/dynactin に捕捉されるモデル。

第 2 節 CDK5RAP2 および Cep169 の分子機構に関して

本研究から CDK5RAP2 の CM1 領域に結合するタンパク質 Cep169 を同定した。CM1 は、 γ -tubulin の中心体への集積に重要な領域であるため、Cep169 が γ -tubulin の中心体への集積に関与することが考えられたが、Fig. 2-3 から Cep169 は、この機能には関与しな

いことが明らかとなった。Cep169は、CDK5RAP2と異なり、中心体において微小管形成中心(microtubule organizing center; MTOC)としての機能はもたないが、微小管との直接的な相互作用を介して、微小管の安定化に寄与することが明らかとなった。興味深いことに、星状体微小管の安定化の機能はCDK5RAP2でも確認され、Cep169とCDK5RAP2が協調して微小管の安定化を介して、紡錘体配向性の制御に関与していることが示唆された(Fig. 6-2)。

微小管安定化の機能をもつタンパク質として、MAPsが知られ、神経細胞の制御にかかわることが報告されている。tauタンパク質やMAP2Aの過剰発現は繊維芽細胞において微小管の束化を誘導し、発現抑制は神経細胞の神経突起伸長を阻害することが報告されている。小頭症は、大脳皮質の神経細胞の減少に伴う遺伝病であるが、CDK5RAP2やCep169のMAPsとしての機能は神経細胞の突起形成を制御している可能性も示唆される(Caceres and Kosik, 1990; Dinsmore and Solomon, 1991)。

CDK5RAP2とCep169の相互作用に必要な領域は互いに種を越えて高度に保存されていることが明らかになった。CNNファミリーは酵母からヒトに至るまで保存されているが、Cep169は脊椎動物でのみ存在していることから、Cep169は脊椎動物においてCDK5RAP2の機能を調整する因子として進化上、新たに付加されたタンパク質であると推測される。

さらに、分裂期におけるCep169タンパク質の局在の解析から、Cdk1によるリン酸化がCep169の局在を制御していることが示唆された。Cdk1はG2期から分裂期にかけて活性化し、Cdc25、Eg5、BRCA2等多くの中心体タンパク質をリン酸化し分裂期の進行を制御していることが報告されている(Errico et al., 2010; Jackman et al., 2003)。Cep169も微小管の安定化による紡錘体形成機能が、Cdk1にリン酸化されることで制御されている可能性が示唆された。間期から分裂期への移行の段階では、紡錘体を形成するため微小管の動態が大きく変わるが、分裂期に活性化したCdk1はCep169のリン酸化を介して微小管の動態制御を行うことで紡錘体形成に関与していることが考えられる。分裂期におけるCep169

のリン酸化部位 7 か所 (Ser-440、Ser-451、Ser-470、Ser-477、Ser-571、Ser-577、Ser-767) が特定され、いずれも Cdk1 によるリン酸化のコンセンサス配列 (S/T-P) を有していたことが明らかになった。これらのリン酸化によって Cep169 は中心体から解離し、微小管に局在することで星状体微小管や紡錘体微小管の安定化を介して、紡錘体の配向性を制御していることが示唆された。

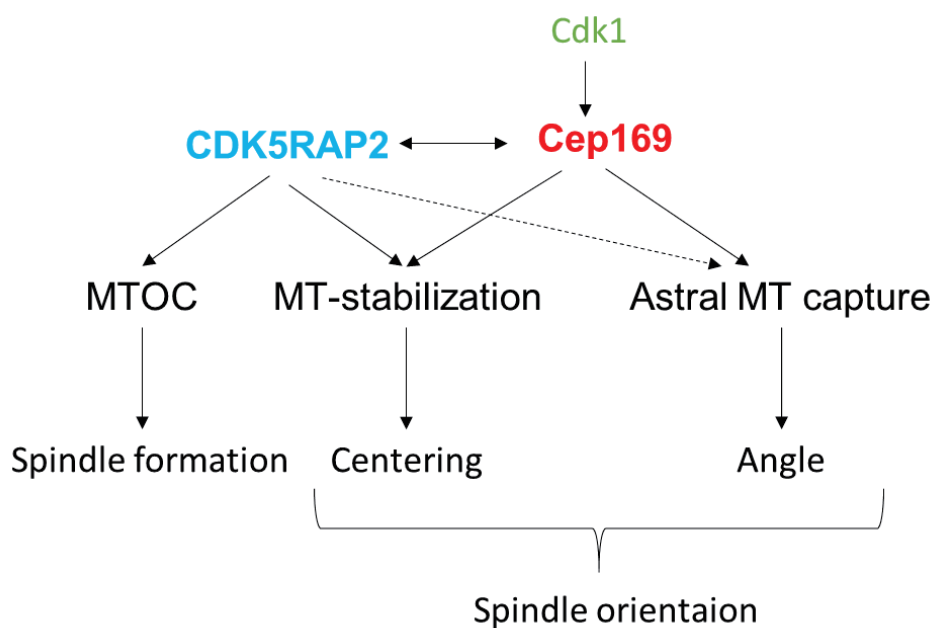


Figure 6-2. CDK5RAP2 と Cep169 の分子機構

第 3 節 Cep169 による組織形成の制御について

紡錘体軸の決定は、細胞の分化や組織の形成制御に重要な役割があると考えられている。Fig. 5-9 での MDCKII 細胞を用いたシスト形成による解析から、Cep169 は紡錘体軸の配向性を制御することによって、上皮細胞の層構造の維持に関与していることが示唆された。さらに、個体レベルでも上皮細胞による細胞層形成は、皮膚や腎臓など多くの組織で見られ

ることから、Cep169 が組織の正常な形成および個体の発生に寄与することが考えられる。

また、CDK5RAP2 は小頭症の原因遺伝子であり、神経幹細胞における分化制御に関与していると考えられているが、本研究による解析の結果から、CDK5RAP2 および結合タンパク質である Cep169 が星状体微小管を安定化し、紡錘体軸の配向性を制御することで、Fig. 1-3 に示した細胞分化の事象に寄与していることが示唆された。しかしながら、両者がどのように協調して紡錘体軸の配向性を制御しているのか、さらに、Cep169 の機能欠損が個体で、小頭症のような遺伝病の症状を示すのかは明らかではなく、今後の研究から、これらの重要な問題が解決されることを期待する。

第7章 実験項

第1節 各章での共通の実験項

1.1 DNAおよびRNA設計とトランスフェクション

HeLa細胞由来のcDNAを用いて、Cep169/CRBP1遺伝子をPCRにより単離した。クローニングしたPCR産物は、pEGFP-C、pCMV TAG2、およびpcDNA5/FRT/TOベクター (Invitrogen)に導入しプラスミドを作製した。ヒトCDK5RAP2遺伝子 (Kazusa DNA Res. Inst.)も同様に、pEGFP-CおよびpCMV TAG2ベクターに組み込んだ。

さらに、各種変異型の作製には、PrimeSTAR Mutagenesis Kit (TaKaRa)を用い、各プライマーによって変異を導入した。

siRNA抵抗性変異に用いたプライマーの配列を以下に示す。

sense#1: 5' -CCAAGCTAATGAGAACCAGCGGGAGACTTAT-3'

antisense#1: 5' -TTCTCATTAGCTTGGGCAAGTGCCGAGTTC-3'

sense#2: 5' -ATCGCAAGTCAAGAGCAAGCTCCAAATTGGC-3'

antisense#2: 5' -GCTCTTGACTTGCGATGAGGAATGGGGGTGG-3' .

FLAG-Cep169 SxIP変異型作製の際に、SxIPモチーフ484-487 aa、825-828 aa、925-928 aaの後半2アミノ酸をアラニンに置換するために使用したプライマーを以下に示した。

SxIPモチーフ484-487 aa変異

sense: 5' -TCGCGAGCCGCTGTCGGAACAGTGGCT-3'

antisense: 5' -GACAGGCGGCTCGCGAGTTCGGGGGAG-3' ;

SxIPモチーフ825-828 aa変異

sense: 5' -ACCAAGGCCGCTTCCAAGTCACCAACCA-3'

antisense: 5' -TGGAAGCGGCCTTGGTGGGGCTGCTGTG-3'

SxIPモチーフ484-487 aa変異

sense: 5' -AGCAAGGCGGCAGCGCTGAACCGCCGCA-3'

antisense: 5' -GCGCTGCCGCCTTGCTCTTCTTAAGGCC-3'

作製したプラスミドDNAは、BioT (Bioland Scientific)によってHeLa、U2OS、HEK293T細胞へ導入した。

また、各遺伝子のRNAiによる発現抑制には、以下のsiRNAのターゲット配列(Japan Bioservice)を用いた。

Luc siRNA: 5' -CGUACGCGGAAUACUUCGA-3'

Cep169 siRNA-1: 5' -CUUGCCCAGGCCAACGAAAA-3'

Cep169 siRNA-2: 5' -CCUCAUCUCAGGUGAAAAG-3'

CDK5RAP2 siRNA-1: 5' -UGGAAGAUCUCCUAACUAA-3'

CDK5RAP2 siRNA-2: 5' -CUAUGAGACUGCUCUAUCA-3'

Arp1 siRNA: 5' -CGCAUUUGGCAAUAUGUCU-3'

HeLa、U2OS、MDCKII細胞へのsiRNA導入にはLipofectamine RNAi MAX (Invitrogen)を使用した。

1.2 細胞培養

ヒト子宮頸がん由来 HeLa、ヒト骨肉腫由来 U2OS、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293T、イヌ腎臓尿管上皮由来 MDCKII 細胞(ATCC)は、10% fetal bovine serum (Collect)、1% penicillin-streptomycin 溶液(WAKO)を添加した DMEM (Life Technologies)中で、37 °C、5% CO₂ の条件下で培養を行った。

Doxycycline による FLAG-Cep169 発現誘導型の細胞株の作製には、pcDNA5/FRT/TO-FLAG-Cep169 を Flip-InTMT-RExTM-HeLa 細胞 (Invitrogen)に導入後、100 µg/ml

hygromycin によってセレクションを行い細胞株の樹立を行った。発現誘導には、2 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline を培養液に添加し、24 時間培養を行った。

1.3 使用した抗体

ウエスタンブロットで用いた一次抗体:

抗Cep169抗体、抗FLAG抗体(1:1000 希釈; WAKO)、抗GFP抗体(1:1000 希釈; WAKO)、抗 β -tubulin抗体(1:1000 希釈; Sigma-Aldrich)、抗GST抗体(1:1000 希釈; Santa Cruz)、抗His₆抗体(1:1000 希釈; Santa Cruz)、抗cyclin B1抗体(1:1000 希釈; Santa Cruz)、抗GAPDH抗体(1:10000 希釈; Santa Cruz)、抗centrin-2抗体(1:500 希釈; Santa Cruz)

ウエスタンブロットで用いた二次抗体:

goat抗rabbit IgG抗体-HRP (1:2000 希釈; Santa Cruz)、goat抗mouse IgG抗体-HRP (1:2000 希釈; Santa Cruz)

免疫染色で使用した一次抗体:

抗Cep169抗体、抗CDK5RAP2抗体(1:100 希釈; Sigma-Aldrich)、抗EB1抗体(1:2000 希釈; BD Biosciences)、抗FLAG抗体(1:1000 希釈; WAKO)、抗 β -tubulin抗体(1:1000 希釈; Sigma-Aldrich)、抗 γ -tubulin抗体(1:100 希釈; Santa Cruz)、抗 α -tubulin抗体 (1:250 希釈; Santa Cruz)

免疫染色で使用した二次抗体:

Alexa Fluor 568 goat抗mouse IgG (H+L)抗体(1:400希釈; Invitrogen)、Alexa Fluor 568 goat抗rabbit IgG (H+L)抗体(1:400希釈; Invitrogen)、Alexa Fluor 488 goat抗mouse IgG (H+L)抗体(1:400希釈; Invitrogen)、Alexa Fluor goat抗rabbit 488 (H+L)抗体(1:400希釈; Invitrogen)

1.4 ウェスタンブロット

タンパク質溶液または細胞の抽出液にsample buffer (0.125 M Tris-HCl、10% β -mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.004% bromophenol blue)を加え、100 °C、10分間ボイルした。このサンプルを6~12% ポリアクリルアミドゲルを用いて、SDS-PAGEにより展開した後、Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore)にトランスファーした。このメンブレンをblocking buffer {5% Membrane Blocking Agent (GE Healthcare)/TBST (25 mM Tris-HCl、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.05% Tween20)}で1時間ブロッキングし、blocking bufferで希釈した一次抗体溶液で4°C、一晩振盪した。次にTBSTで10分間3回の洗浄を行い、blocking bufferで希釈した二次抗体溶液で室温30分間振盪した。その後TBSTで10分間3回の洗浄を行った。検出にはECL Plus (GE Healthcare)を反応させ、イメージングアナライザーLAS3000 (Fujifilm)を使用して撮影した。

1.5 免疫染色と細胞のイメージング

カバーガラス上に播種した細胞を4% PFA/PBSまたは、-30 °Cのメタノールにより固定し、0.3% Triton-X/PBSによる10 分間の透過処理を行った。次に、blocking buffer (1% BSA、0.3% Triton-X/PBS)によって37 °Cで1時間インキュベートし、その後、一次抗体を希釈したblocking buffer中で37 °C 1時間もしくは、室温3時間でインキュベートした。PBS-0.05% Teen20によって10分間3回の洗浄後、同様に二次抗体を希釈した溶液で37 °C 1時間インキュベートを行った。PBS-0.05% Teen20によって10分間3回の洗浄を行ったカバーガラスをスライドガラス上にマウントし、封入を行った。

固定細胞の観察もしくは生細胞のイメージングには、Nikon TE2000-E顕微鏡もしくは、共焦点顕微鏡Olympus FV1000顕微鏡を用いた。取得した画像の蛍光強度や距離の測定には、NIS-Elements (Nikon)を用いた。

1.6 統計処理

統計的な解析の際には、Microsoft ExcelによるStudent's *t*-testを用いた。

第2節 第2章における実験項

2.1 Yeast-two hybrid法

探索には、9.5~10.5日のマウスの胚由来のcDNAをpGADT7に組み込んだyeast two-hybrid library (S. Hollenbergから供与)を用いた。ベイトには、ヒトCDK5RAP2のCM1を含む58-196 aaの領域をpGBKT7ベクター(CLONTECH)に組み込んだものを用いた。

酵母は AH109 株を用い、ベイトが組み込まれたベクターを導入した菌体を SD (6.7 mg/ml difconitrogen base、0.6 mg/ml DO supplement (Clontech)、2% dextrose)プレート (-Trp)に播種した。2 日後、菌体を採取し、50 ml の SD (-Trp)培地で培養後集菌し、two-hybrid library を導入し、SD (-Trp、-Leu、-Ade、-His)プレートに播種した。2 日後形成したコロニーを SD (-Trp、-Leu、-Ade、-His)培地で培養し、酵母からプラスミドを回収した。

2.2 Cep169タンパク質の分子量測定

DoxycyclineによるFLAG-Cep169発現誘導型の細胞株の培養液に2 µg/ml doxycyclineを添加し、24時間培養した。extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.2% Nonidet P-40、10% glycerol、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、20 mM β-glycerophosphate、10 mM β-mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Nacalaitesque)、0.2 mM PMSF)を用いて細胞を懸濁し、3回の凍結融解によって細胞を破碎した。細胞の抽出液に3 µg/mlの抗FLAG抗体を添加し3時間、4 °Cでインキュベートし、protein G beads (Amersham)を添加し1時間、4 °Cローテートした後に、4000 rpmで遠心すること

とでビーズを沈降させた。沈降させたビーズは、extraction bufferにより3回洗浄し、sample buffer (0.125 M Tris-HCl、10% β -mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.004% bromophenol blue)を加え、100 °C、10分間ボイルすることによってサンプルを調製した。サンプルおよび分子量マーカーを10%ゲルを用いてSDS-PAGEにより展開し、銀染色によってタンパク質のバンドを検出した。分子量マーカーの泳動距離から検量線グラフを作製後、FLAG-Cep169の分子量を算出した。

2.3 大腸菌からのタンパク質精製

Glutathione S-transferase (GST)と融合した目的タンパク質がコードされたベクターを導入した大腸菌 BL21 株を、50 μ g/ml ampicillin を添加した LB (10 mg/ml Bacto Tryptone、5 mg/ml bacto yeast extract、10 mg/ml NaCl)で培養し、0.5 mM IPTG を添加し、3 時間培養を行った。菌体を遠心によって回収し、extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton-X、1 mM PMSF)で懸濁し、超音波によって菌体を破碎した。15000 rpm、15 分間、4 °C の遠心によって可溶化タンパク質の溶液を分離し、glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare)を添加し、4 °C で3 時間ローテートした。ビーズを遠心で沈殿させ、extraction buffer で洗浄を3 回行った後、ビーズに elution buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM 還元型 glutathione、150 mM NaCl)を加え溶出し、目的タンパク質を精製した。

2.4 抗体作製と精製

GST-Cep169 (1-100 aa)を大腸菌によって産生および精製した。精製したGST-Cep169タンパク質をウサギに免疫し、ポリクローナル抗Cep169抗体が含まれた血清を作製した。抗体の精製には、Affigel-10 (Bio-Rad Laboratories)を用いて作製した、GSTタンパク質のカ

ラムを通すことで抗GST抗体を除き、次に、GST-Cep169 (1-100 aa)タンパク質のカラムによって抗Cep169抗体を精製した。

2.5 免疫沈降実験

HEK293T細胞にGFP-Cep169およびFLAG-CDK5RAP2を共発現させ、extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM β-mercaptoethanol, Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai tesque), 0.2 mM PMSF)を用いて細胞を懸濁し、3回の凍結融解によって細胞を破砕した。細胞の抽出液を二等分し、それぞれ3 μg/mlの抗FLAG抗体またはmouse IgGを添加し3時間、4 °Cでインキュベートし、protein G beads (Amersham)を添加し1時間、4 °Cローテートした後に、4000 rpmで遠心することとでビーズを沈降させた。沈降させたビーズは、extraction bufferにより3回洗浄し、sample buffer (0.125 M Tris-HCl, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS, 10% sucrose, 0.004% bromophenol blue)を加え、100 °C、10分間ボイルすることによってサンプルを調製した。共沈したタンパク質の検出はウエスタンブロットにより行った。

2.6 プルダウン実験

GST-EB1を大腸菌において産生し、glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare)を用いてアフィニティー精製した。GST-EB1と結合したglutathione sepharoseのビーズに対し、extraction bufferで懸濁したFLAG-Cep169野生型またはSxIP変異型を発現したHEK293T細胞の抽出液を添加し、12時間、4 °Cでローテートした。4000 rpmでビーズを沈降させ、extraction bufferにより3回洗浄した後に、extraction bufferに20 mM 還元型glutathioneを加えた溶液でビーズからGST融合タンパク質の溶出を行い、サンプルをウエスタンブロットおよびCBB染色によってタンパク質の検出を行った。

2.7 CBB染色

SDS-PAGEによりサンプルを展開したゲルを、CBB染色液(2.5 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250、25% メタノール、7.5 % 酢酸)で30分間振盪後、脱色液(25% メタノール、7.5 % 酢酸)で3時間の脱色を行い、タンパク質のバンドを可視化した。

第3節 第3章における実験項

3.1 精製したtubulinを用いた結合実験

HEK293T細胞にFLAG-Cep169の全長または、欠損変異型FLAG-Cep169 (1-654 aaまたは745-1152 aa)を発現させ、extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.2% Nonidet P-40、10% glycerol、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、20 mM β -glycerophosphate、10 mM β -mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Nacalaitesque)、0.2 mM PMSF)を用いて細胞を懸濁し、3回の凍結融解によって細胞を破碎した。細胞の抽出液に対して、豚の脳から精製したtubulin溶液を添加し、3時間、4 °Cでローテートした。anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich)を加えさらに、1.5時間、4 °Cでローテートし、遠心によってビーズを沈降させた。ビーズは、extraction bufferにより洗浄を3回行った。その後ビーズをelution buffer (150 μ g/mL FLAG peptide / extraction buffer)で懸濁し、結合タンパク質を溶出した。溶出した溶液にsample buffer (0.125 M Tris-HCl、10% β -mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.004% bromophenol blue)を加え、100 °C、10分間ボイルしたサンプルをSDS-PAGEにより展開して、抗 β -tubulin抗体および抗FLAG抗体によるウエスタンブロットで検出した。

上述の実験と同様に、大腸菌から精製したリコンビナントタンパク質GSTまたは、GST-Cep169 (746-1152 aa)と tubulin 溶液を extraction buffer で懸濁し結合実験を行った。glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare)によって、GST融合タンパク質を沈降させ、ビーズをextraction bufferにより3回洗浄を行った。その後ビーズにelution buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM 還元型glutathion、150 mM NaCl)を加え、タンパク質を溶出した。溶出した溶液にsample buffer (0.125 M Tris-HCl、10% β -mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.004% bromophenol blue)を加え、100 °C、10分間ボイルしたサンプルを、SDS-PAGEにより展開して、抗 β -tubulin抗体を用いたウエスタンブロットおよびCBB染色で検出した。

3.2 Cep169の二量体もしくは多量体形成ドメインの解析

HEK293T細胞にFLAG-Cep169およびGFP-Cep169の全長もしくは欠損変異型(1-135 aa または136-1334 aa)を共発現させ、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行った。2.5 免疫沈降実験を参照。

3.3 低温処理による微小管解析

カバーガラス入りのディッシュに播種したHeLa細胞に*Luc* siRNAまたは*Cep169* siRNAを導入し36時間培養後、4 °Cで15分間インキュベートし、微小管の不安定化を誘導した。30 °Cのメタノールにより細胞を固定し、抗 β -tubulin抗体を用いた免疫染色によって微小管を染色し、蛍光顕微鏡Nikon TE2000-Eでの観察を行った。

3.4 微小管の再重合解析

カバーガラス入りのディッシュに播種した HeLa 細胞に *Luc* siRNA または、*Cep169* siRNA を導入し 24 時間培養後、33 ng/ml nocodazole (Calbiochem)を添加し 12 時間培養

することによって分裂期への同調を行った。分裂期の細胞を 50 分間 4 °C で静置し微小管を脱重合した。PBS で 3 回洗浄後、37 °C の DMEM に培地交換し、3 分後-30 °C のメタノールにより細胞を固定し、抗 β -tubulin 抗体を用いた免疫染色によって微小管を染色し、蛍光顕微鏡 Nikon TE2000-E での観察を行った。

第 4 節 第 4 章における実験項

4.1 ダブルチミジンブロックによる同調

HeLa 細胞の培養液中に、2.5 mM thymidine/PBS を添加し、16 時間の培養により G1/S 期に細胞を同調後、PBS で 3 回の洗浄によって thymidine を除去し、DMEM にメディアウム交換した。さらに 8 時間培養し、S 期を脱出させた後、再び 2.5 mM thymidine/PBS を添加し、16 時間培養した。同様に PBS 洗浄による G1/S 期からのリリースを行い、2 時間おきに細胞を回収し、ウエスタンブロットおよび免疫染色により各細胞周期の Cep169 を解析した。

4.2 ホスファターゼを用いた in vitro 脱リン酸化実験

Doxycycline による FLAG-Cep169 発現誘導型の細胞株の培養液に 2 μ g/ml doxycycline を添加し、12 時間後 100 ng/ml nocodazole (Calbiochem) を添加し、さらに 12 時間培養した。免疫沈降実験と同様、extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.2% Nonidet P-40、10% glycerol、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、20 mM β -glycerophosphate、10 mM β -mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Nacaltesque)、0.2 mM PMSF) を用いて細胞を懸濁し、3 回の凍結融解によって細胞を破碎した。細胞の抽出液に anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を加え 1.5 時間、4 °C でロー

テートし、遠心によってビーズを沈降させた。ビーズは、extraction buffer により洗浄を 3 回行った。その後ビーズを elution buffer (150 µg/mL FLAG peptide / extraction buffer) で懸濁し、結合タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質溶液に対して、1 unit または 2 unit の shrimp alkaline phosphatase (SAP) を添加し、30 分 37 °C でインキュベートしタンパク質の脱リン酸化を行った。FLAG-Cep169 のタンパク質は、ウエスタンブロットにより検出した。

4.3 キナーゼ阻害剤処理における実験

SAP 実験と同様の条件で、doxycycline による FLAG-Cep169 発現誘導型の細胞株の培養液に 2 µg/ml doxycycline を添加し、12 時間後 100 ng/ml nocodazole を添加し、12 時間培養することで細胞を分裂期に同調した。分裂期の細胞に、4 µM MK-5108 (aurora-A 阻害剤)、20 µM purvalanol A (Cdk1 阻害剤)、200 nM BI2536 (Plk1 阻害剤) をそれぞれ添加し、30 分処理をした細胞を回収し、免疫染色およびウエスタンブロットによる検出を行った。

4.4 中心体フラクションの粗精製

非同調の HeLa 細胞または、12 時間の 10 nM taxol (Calbiochem) 処理で分裂期に同調しさらに 30 分間 20 µM purvalanol A で処理もしくは未処理の HeLa 細胞を extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM β-mercaptoethanol, Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai tesque), 0.2 mM PMSF) で懸濁し、3 回の凍結融解によって細胞を破碎した。20000 x g で遠心を 15 分間行い、可溶化タンパク質および中心体を含む不溶化フラクションに分離した。不溶化フラクションを可溶化フラクションと等量の extraction buffer で懸濁し、それぞれに sample buffer (0.125 M Tris-HCl, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS, 10% sucrose, 0.004% bromophenol blue) を加え、100 °C、

10 分間ボイルしたサンプルを調製した。サンプルを SDS-PAGE により展開して、中心体マーカーである抗 centrin-2 抗体、細胞質マーカーである抗 GAPDH 抗体、抗 Cep169 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。Cep169 タンパク質のバンドの定量化には ImageJ を用いた。

4.5 Sf9 細胞によるタンパク質発現と精製

目的の遺伝子 His₆-Cep169 および Cdk1/GST-cyclin B1 を Bac-to-Bac 用ベクターにクローニングし、プラスミドを氷上で大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) に導入した。LB 培地 (10 mg/ml Bacto Tryptone、5 mg/ml bacto yeast extract、10 mg/ml NaCl) で 37 °C、4 時間培養後、50 µg/ml kanamycin、7 µg/ml gentamicin、10 µg/ml tetracycline、100 µg/ml X-gal、40 µg/ml IPTG を添加した LB プレートに播種し 24 時間 37 °C でインキュベートした。大腸菌コロニーを 50 µg/ml kanamycin、7 µg/ml gentamicin、10 µg/ml tetracycline/LB で 12 時間、37 °C で振盪培養し、増殖した大腸菌から組換えバキュロウイルス DNA を精製した。

Sf9 細胞 2.5×10^5 /ml を播種し、精製したバキュロウイルス DNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて導入した。27 °C、5 時間インキュベート後、メEDIUM を交換し 7 日間培養した。3000 rpm、室温、10 分の遠心分離により培養上清を回収し、バキュロウイルスを作製した。Sf9 細胞 1.8×10^6 /ml をフラスコに播種し、作製したバキュロウイルスを含む溶液を添加し、3 日間、27 °C、110 rpm で旋回培養を行った。

回収した細胞を extraction buffer (20 mM β-glycerophosphate、10 mM hepes pH 7.7、5 mM EGTA、150 mM NaCl、Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai tesque)、1% Nonidet P-40) で懸濁し、氷上で 30 分間静置し細胞を破碎した後、10000 x g、4 °C で 15 分間遠心し、可溶化タンパク質の溶液を分離した。タンパク質溶液に Ni-NTA (QIAGEN) または、glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare) を添加し、His₆ 融合タンパク質または、GST 融合タンパク質沈降させ、ビーズを extraction buffer により 3 回洗浄を行い、アフィニティ

一精製した。His₆融合タンパク質の溶出には elution buffer (20 mM β-glycerophosphate、10 mM hepes pH 7.7、150 mM NaCl、250 mM imidazole)を用い、GST融合タンパク質の溶出には elution buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM 還元型 glutathion、150 mM NaCl)を用いた。

4.6 キナーゼ実験

Sf9 細胞において His₆-Cep169 および Cdk1/GST-cyclin B1 発現させ、それぞれを精製し、kinase buffer (20 mM hepes pH 7.5、1 mM MgCl₂、1 mM DTT、20 mM β-glycelo phosphate、50 mM Na₃VO₄)に懸濁し、200 μM ATP を添加し 60 分、30 °C でインキュベートし反応させた。10 mM EDTA を加え反応を停止させ、溶液に sample buffer (0.125 M Tris-HCl、10% β-mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.004% bromophenol blue)を加え、100 °C、10 分間ボイルしたサンプルを、SDS-PAGE により展開して、抗 His₆抗体によるウエスタンブロットで Cep169 のタンパク質バンドを検出した。

4.7 Mass spectrometry による解析

Doxycycline による FLAG-Cep169 発現誘導型の細胞株の培養液に 2 μg/ml doxycycline を添加し 12 時間後、さらに 100 ng/ml nocodazole を添加し 12 時間培養することで分裂期前中期に同調を行った。4.2 ホスファターゼ実験と同様に、extraction buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.4、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.2% Nonidet P-40、10% glycerol、1 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、20 mM β-glycerophosphate、10 mM β-mercaptoethanol、Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai tesque)、0.2 mM PMSF)を用いて細胞を懸濁し、3 回の凍結融解によって細胞を破碎した。細胞の抽出液に、anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を加え 1.5 時間、4 °C でローテートし、遠心によってビーズを沈降させた。ビーズは、extraction buffer による洗浄を 3 回行った。その後ビーズを elution buffer (150 μg/mL

FLAG peptide/extraction buffer)で懸濁し、結合タンパク質を溶出した。溶出した Cep169 を含むタンパク質溶液に、sample buffer (0.125 M Tris-HCl、10% β -mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.004% bromophenol blue)を加え、100 °C、10 分間ボイルしたサンプルを、10%ゲルを用いた SDS-PAGE により展開した。ゲルを銀染色し、169 kDa にある Cep169 タンパク質のバンドをメスで切り出し、チューブに移した。ゲル片に 100% CH₃CN を加え脱水し、CH₃CN を揮発させた後、10 mM DTT、25 mM NH₄HCO₃ 溶液を加えて、56 °C、45 分間インキュベート後、25 mM NH₄HCO₃ でゲル片を洗浄した。55 mM 2-iodoacetamide、25 mM NH₄HCO₃ 溶液を加え、室温で 30 分間振盪することでタンパク質の還元型アルキル化を行った。ゲル片に 100% CH₃CN を加え再び脱水し、CH₃CN を揮発させた後に、trypsin 溶液を加え 37 °C で 12 時間反応させゲル内消化を行い、ペプチドをゲル内から溶出した。ゲルから抽出した消化物から Titansphere Phos-TiO kit (GL Sciences Inc.)および GL-Tip SDB (GL Sciences Inc.)を用いて、リン酸化ペプチドをアフィニティー精製し、リン酸化ペプチド溶液を ZipTip 0.2 μ l C18 (Merck)を用いて脱塩処理した。マトリックスには終濃度 5 mg/ml DHB (2, 5-dihydroxybenzoic acid)/0.05% TFA、50% CH₃CN を用いた。サンプルは MALDI-QIT reflectron TOF mass spectrometer (AXIMA Resonance, Shimadzu/KRATOS)に供し、MS/MS による解析を行った。得られたマススペクトルについて、Mascot 検索(Matrix Science)を行い Cep169 のペプチド配列および $\Delta m/z$ 80 ($-\text{HPO}_3$) もしくは $\Delta m/z$ 98 ($-\text{H}_2\text{PO}_4$)の差をもったシグナルとデータベースとの照合を行い、ペプチド配列の同定およびリン酸化部位の特定を行った。

第5節 第5章における実験項

5.1 紡錘体配向性の解析

HeLa細胞を33 nM nocodazole (Calbiochem)で12時間処理し、PBSによる洗浄で薬剤除去を行い分裂期前中期からリリースした。26S proteasome阻害剤である10 μ M MG132 (Sigma-Aldrich)を培養液に添加し、2時間培養することで細胞を分裂期中期に同調した。細胞を固定し、抗 γ -tubulin抗体および抗EB1抗体または抗tubulin抗体を用いた免疫染色を行った。紡錘体軸の角度は共焦点顕微鏡を用いたZ-スタックイメージから算出し、紡錘体の中点と細胞の重心間の距離は、ImageJを用いて解析した。

5.2 プルダウン実験

2.6 プルダウン実験を参照。大腸菌によって産生し、精製したGST-Arp1タンパク質およびFLAG-Cep169の全長または欠損変異型(1-135 aaまたは1-400 aa)を発現させたHEK293T細胞の抽出液を用いた。

5.3 免疫沈降実験

2.5 免疫沈降実験を参照。GFP-Arp1およびFLAG-Cep169をHEK293T細胞に共発現させ、抗FLAG抗体によって免疫沈降を行った。

5.4 MDCKII細胞によるシスト形成の解析

10% FBS-DMEMで二次元培養していたMDCKII細胞に*Luc* siRNAまたは*Cep169* siRNAをLipofectamine RNAi MAX (Invitrogen)を用いて導入した。24時間後、2% Matrigel (BD Bioscience)で懸濁した 5×10^4 /mlの細胞をMatrigel上に播種し3D培養を行った。10日

後に細胞を固定し、rhodamine-phalloidin (Invitrogen)を用いた染色によってMDCKII細胞のシストを観察した。

参考文献

- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:309-322.
- Barr, A.R., J.V. Kilmartin, and F. Gergely. 2010. CDK5RAP2 functions in centrosome to spindle pole attachment and DNA damage response. *The Journal of Cell Biology*. 189:23-39.
- Barr, F.A., P.R. Elliott, and U. Gruneberg. 2011. Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *Journal of Cell Science*. 124:2323-2334.
- Berrueta, L., S.K. Kraeft, J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, L.B. Chen, D.E. Hill, D. Pellman, and B.E. Bierer. 1998. The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 95:10596-10601.
- Bieling, P., L. Laan, H. Schek, E.L. Munteanu, L. Sandblad, M. Dogterom, D. Brunner, and T. Surrey. 2007. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature*. 450:1100-1105.
- Bornens, M. 2012. The centrosome in cells and organisms. *Science*. 335:422-426.
- Caceres, A., and K.S. Kosik. 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature*. 343:461-463.
- Carvalho, P., J.S. Tirnauer, and D. Pellman. 2003. Surfing on microtubule ends. *Trends in Cell Biology*. 13:229-237.
- Choi, J.H., P.G. Bertram, R. Drenan, J. Carvalho, H.H. Zhou, and X.F. Zheng. 2002. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Reports*. 3:988-994.

- Dayanandan, R., R. Butler, P.R. Gordon-Weeks, A. Matus, S. Kaech, S. Lovestone, B.H. Anderton, and J.M. Gallo. 2003. Dynamic properties of APC-decorated microtubules in living cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 54:237-247.
- De Wulf, P., F. Montani, and R. Visintin. 2009. Protein phosphatases take the mitotic stage. *Current Opinion in Cell Biology*. 21:806-815.
- Dinsmore, J.H., and F. Solomon. 1991. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell*. 64:817-826.
- Du, Q., and I.G. Macara. 2004. Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell*. 119:503-516.
- Errico, A., K. Deshmukh, Y. Tanaka, A. Pozniakovsky, and T. Hunt. 2010. Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Advances in Enzyme Regulation*. 50:375-399.
- Espiritu, E.B., L.E. Krueger, A. Ye, and L.S. Rose. 2012. CLASPs function redundantly to regulate astral microtubules in the *C. elegans* embryo. *Developmental Biology*. 368:242-254.
- Fong, K.W., Y.K. Choi, J.B. Rattner, and R.Z. Qi. 2008. CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex. *Molecular Biology of the Cell*. 19:115-125.
- Fong, K.W., S.Y. Hau, Y.S. Kho, Y. Jia, L. He, and R.Z. Qi. 2009. Interaction of CDK5RAP2 with EB1 to track growing microtubule tips and to regulate microtubule dynamics. *Molecular Biology of the Cell*. 20:3660-3670.
- Galjart, N. 2005. CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6:487-498.

- Gonczy, P., J.M. Bellanger, M. Kirkham, A. Pozniakowski, K. Baumer, J.B. Phillips, and A.A. Hyman. 2001. *zyg-8*, a gene required for spindle positioning in *C. elegans*, encodes a doublecortin-related kinase that promotes microtubule assembly. *Developmental Cell*. 1:363-375.
- Goshima, G., and R.D. Vale. 2005. Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in *Drosophila* S2 cells. *Molecular Biology of the Cell*. 16:3896-3907.
- Grill, S.W., P. Gonczy, E.H. Stelzer, and A.A. Hyman. 2001. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*. 409:630-633.
- Gundersen, G.G., and A. Bretscher. 2003. Cell biology. Microtubule asymmetry. *Science*. 300:2040-2041.
- Hannak, E., M. Kirkham, A.A. Hyman, and K. Oegema. 2001. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology*. 155:1109-1116.
- Heuer, J.G., K. Li, and T.C. Kaufman. 1995. The *Drosophila* homeotic target gene centrosomin (*cnn*) encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis. *Development*. 121:3861-3876.
- Jackman, M., C. Lindon, E.A. Nigg, and J. Pines. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biology*. 5:143-148.
- Kaindl, A.M., S. Passemard, P. Kumar, N. Kraemer, L. Issa, A. Zwirner, B. Gerard, A. Verloes, S. Mani, and P. Gressens. 2010. Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly. *Progress in Neurobiology*. 90:363-383.

- Khodjakov, A., and C.L. Rieder. 1999. The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *The Journal of Cell Biology*. 146:585-596.
- Kirschner, M., and T. Mitchison. 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*. 45:329-342.
- Knoblich, J.A. 2010. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11:849-860.
- Kumar, A., S.C. Girimaji, M.R. Duvvari, and S.H. Blanton. 2009. Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *The American Journal of Human Genetics*. 84:286-290.
- Kuriyama, R., and G.G. Borisy. 1981. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 91:814-821.
- Lee, K.Y., B. Esmaeili, B. Zealley, and M. Mishima. 2015. Direct interaction between centralspindlin and PRC1 reinforces mechanical resilience of the central spindle. *Nature Communications*. 6:7290.
- Liu, Q., and J.V. Ruderman. 2006. Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 103:5811-5816.
- Lu, M.S., and C.A. Johnston. 2013. Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development*. 140:1843-1856.
- Mahen, R., and A.R. Venkitaraman. 2012. Pattern formation in centrosome assembly. *Current Opinion in Cell Biology*. 24:14-23.

- Matsumura, S., and F. Toyoshima. 2012. ABL1 joins the cadre of spindle orientation machinery. *Cell Structure and Function*. 37:81-87.
- Mimori-Kiyosue, Y., and S. Tsukita. 2003. "Search-and-capture" of microtubules through plus-end-binding proteins (+TIPs). *Journal of Biochemistry*. 134:321-326.
- Mochida, S., and T. Hunt. 2012. Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO Reports*. 13:197-203.
- Mori, Y., Y. Inoue, S. Tanaka, S. Doda, S. Yamanaka, H. Fukuchi, and Y. Terada. 2015a. Cep169, a Novel Microtubule Plus-End-Tracking Centrosomal Protein, Binds to CDK5RAP2 and Regulates Microtubule Stability. *PLoS One*. 10:e0140968.
- Mori, Y., Y. Inoue, Y. Taniyama, S. Tanaka, and Y. Terada. 2015b. Phosphorylation of the centrosomal protein, Cep169, by Cdk1 promotes its dissociation from centrosomes in mitosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 468:642-646.
- Mori, Y., Y. Taniyama, S. Tanaka, H. Fukuchi, and Y. Terada. 2015c. Microtubule-bundling activity of the centrosomal protein, Cep169, and its binding to microtubules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 467:754-759.
- Nigg, E.A. 1998. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Current Opinion in Cell Biology*. 10:776-783.
- Noatynska, A., M. Gotta, and P. Meraldi. 2012. Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: cause or consequence? *The Journal of Cell Biology*. 199:1025-1035.
- Pierre, P., R. Pepperkok, and T.E. Kreis. 1994. Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo. *Journal of Cell Science*. 107 (Pt 7):1909-1920.

- Pihan, G.A., J. Wallace, Y. Zhou, and S.J. Doxsey. 2003. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Research*. 63:1398-1404.
- Pringle, J., A. Muthukumar, A. Tan, L. Crankshaw, L. Conway, and J.L. Ross. 2013. Microtubule organization by kinesin motors and microtubule crosslinking protein MAP65. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 25:374103.
- Raaijmakers, J.A., M.E. Tanenbaum, and R.H. Medema. 2013. Systematic dissection of dynein regulators in mitosis. *The Journal of Cell Biology*. 201:201-215.
- Rogers, S.L., G.C. Rogers, D.J. Sharp, and R.D. Vale. 2002. Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*. 158:873-884.
- Sawin, K.E., P.C. Lourenco, and H.A. Snaith. 2004. Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p. *Current Biology : CB*. 14:763-775.
- Schuyler, S.C., and D. Pellman. 2001a. Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell*. 105:421-424.
- Schuyler, S.C., and D. Pellman. 2001b. Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *Journal of Cell Science*. 114:247-255.
- Shi, Q., and R.W. King. 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*. 437:1038-1042.
- Siller, K.H., and C.Q. Doe. 2009. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology*. 11:365-374.

- St Johnston, D., and J. Ahringer. 2010. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell*. 141:757-774.
- Tanenbaum, M.E., L. Macurek, N. Galjart, and R.H. Medema. 2008. Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *The EMBO Journal*. 27:3235-3245.
- Ten Hoopen, R., C. Cepeda-Garcia, R. Fernandez-Arruti, M.A. Juanes, N. Delgehr, and M. Segal. 2012. Mechanism for astral microtubule capture by cortical Bud6p priming spindle polarity in *S. cerevisiae*. *Current Biology : CB*. 22:1075-1083.
- Terada, Y., Y. Uetake, and R. Kuriyama. 2003. Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in *Drosophila* and mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*. 162:757-763.
- Tirnauer, J.S., J.C. Canman, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2002a. EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Molecular Biology of the Cell*. 13:4308-4316.
- Tirnauer, J.S., S. Grego, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2002b. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Molecular Biology of the Cell*. 13:3614-3626.
- Toyoshima, F., and E. Nishida. 2007. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *The EMBO Journal*. 26:1487-1498.
- Woods, C.G., J. Bond, and W. Enard. 2005. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *The American Journal of Human Genetics*. 76:717-728.

Wurzenberger, C., and D.W. Gerlich. 2011. Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 12:469-482.

Yadlapalli, S., and Y.M. Yamashita. 2012. Spindle positioning in the stem cell niche. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 1:215-230.

Zheng, Y., M.L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378:578-583.

謝辞

本学位論文は、早稲田大学 先進理工学部 化学・生命化学科 寺田 泰比古 教授の御指導のもとで行われました。寺田教授には、研究室配属以来、分子生物の基礎から、研究者としてのあり方まで、様々なことを御指導御鞭撻賜り、心より深く感謝いたします。

本学位論文の作成にあたり、多くの御助言と御指導いただいた同学科 小出 隆規 教授、中尾 洋一 教授、同学部 生命医科学科 井上 貴文 教授に感謝いたします。

本研究において、専門的見地から御指導と有益な御助言を賜りました、山梨大学 竹田 扇 教授、成田 啓之 准教授に厚く御礼申し上げます。

MS のスペクトルデータの取得の際に、御協力賜りました、株式会社 島津製作所 中家 修一 修士に深く感謝致します。

寺田研究室で所属した研究グループの先輩であった福地 大樹 修士には多くの御助言をいただき、研究を進める上で大変お世話になりました。本論文の作成にあたりグループの後輩の方々には多大なる御協力を賜りました。また、他のグループのメンバーにも多くの御助言や御協力を賜ったことを深く感謝致します。

最後に、著者の意思を尊重し、多大なる支援を賜りました、父 久訓と母 ひとみに、この場を借りて、心より感謝申し上げます。

2016 年 2 月

研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ “Phosphorylation of the centrosomal protein, Cep169, by Cdk1 promotes its dissociation from centrosomes in mitosis” <u>Mori, Y.</u>; Inoue, Y.; Taniyama, Y.; Tanaka, S.; Terada, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015, doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.004.</p> <p>○ “Microtubule-bundling activity of the centrosomal protein, Cep169, and its binding to microtubules” <u>Mori, Y.</u>; Taniyama, Y.; Tanaka, S.; Fukuchi, H.; Terada, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015, 467, 754-759.</p> <p>○ “Cep169, a novel microtubule plus-end-tracking centrosomal protein, binds to CDK5RAP2 and regulates microtubule stability” <u>Mori, Y.</u>; Inoue, Y.; Tanaka, S.; Doda, S.; Yamanaka, S.; Fukuchi, H.; Terada, Y. PLoS One, 2015, 10, e0140968.</p> <p>“Asymmetric and highly stereoselective synthesis of the DEF-ring moiety of (-)-FR182877 and its derivative inducing mitotic arrest” Kobayakawa, Y.; <u>Mori, Y.</u>; Okajima, H.; Terada, Y.; Nakada, M. Org. Lett., 2012, 14, 2086-2089.</p>

研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>(1) “新規中心体タンパク質 CRBP1/Cep169 による一次繊毛形成の制御機構の解析” 寺田 泰比古、森 勇介、谷山 ゆき、井上 陽子、中村 秀樹、井上 貴文、 成田 啓之、竹田 扇 東京、細胞生物学会：シンポジウム、2015年7月</p> <p>(2) “CRBP1, a novel centrosomal protein, suppresses primary cilia formation with Cep97 and CP110” Taniyama, Y.; <u>Mori, Y.</u>; Kishida, N.; Yamanaka, S.; Nakamura, H; Inoue, T.; Narita, K.; Takeda, S.; Terada, Y. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kanagawa, November 2014.</p> <p>(3) “一次繊毛形成を抑制する新規中心体タンパク質・CRBP1 の同定と機能解析” <u>森 勇介</u>、谷山 ゆき、岸田 尚樹、山中 翔太、中村 秀樹、井上 貴文、 成田 啓之、竹田 扇、寺田 泰比古 静岡、繊毛研究会、2014年5月</p> <p>(4) “CRBP1, a novel microtubule plus-end-tracking protein, regulates cell polarization including directional migration and neurite extension” <u>Mori, Y.</u>; Doda, S.; Kishida, N.; Yamanaka, S.; Taniyama, Y.; Aoki, S.; Nakamura, H.; Inoue, T.; Takeda, N.; Terada, Y. International Symposium on Integration of Chemistry and Bioscience, Tokyo, January 2014.</p> <p>(5) “Isolation and analysis of CRBP1, a novel microtubule plus-end-tracking protein” <u>Mori, Y.</u>; Doda, S.; Kishida, N.; Yamanaka, S.; Taniyama, Y.; Terada, Y. The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Hyogo, December 2013.</p>

研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>(6) “Identification and characterization of a novel microtubule plus-end-tracking protein interacting with CDK5RAP2” <u>Mori, Y.</u>; Tanaka, S.; Doda, S.; Fukuchi, H.; Terada, Y. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, December 2012.</p> <p>(7) “(-)-FR182877 のファーマコフォアの不斉全合成” 小早川 優、岡島 秀樹、<u>森 勇介</u>、寺田 泰比古、中田 雅久 日本化学会第 92 春季年会、神奈川、2012 年 3 月</p> <p>(8) “Enantioselective Synthesis and Biological Evaluation of the Pharmacophore of Antitumor Antibiotic (-)-FR182877” Kobayakawa, Y.; <u>Mori, Y.</u>; Okajima, H.; Terada, Y.; Nakada, M. The 6th GCOE International Symposium on “Practical Chemical Wisdom”, Tokyo, December 2011.</p>