

博士論文

誘導型細胞内タンパク質分解システムを活用した
微小管生成および紡錘体形成機構の研究

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

土屋 賢汰

目次

1. 要旨.....	4
2. 序論.....	6
2.1. 微小管の構造と機能.....	6
2.2. 微小管動態の制御.....	6
2.3. 微小管生成機構.....	7
2.4. 分裂期スピンドル形成.....	9
2.5. HCT116細胞.....	10
2.6. AID法による目的タンパク質のノックアウトレベルの分解.....	11

第一章

ヒト培養細胞における γ -チューブリン非依存的な微小管生成機構

3. 結果.....	12
3.1. TubG デグロン株の作製および活性の確認.....	12
3.2. 間期および分裂期における γ -チューブリン非依存的な微小管の存在.....	13
3.3. 間期および分裂期におけるAID法による γ -チューブリンデグロンの効率.....	13
3.4. TubG1デグロン細胞における間期微小管の再重合系の確立.....	13
3.5. 全反射顕微鏡を用いた γ -チューブリン非依存的な微小管生成観察.....	14
3.6. γ -チューブリン非依存的な微小管生成を担う候補因子のスクリーニング.....	14
3.7. TubG1ダブルデグロン株の作製.....	14
3.8. ダブルデグロンおよびノックアウト株によるRNAiスクリーニング結果の検証..	15
3.9. CAMSAPファミリーは協調的に微小管生成に関与する.....	15
3.10. 37 °Cにおける微小管生成因子の間期微小管生成に対する機能.....	16
3.11. 紡錘体形成に対する低温環境の影響.....	16
3.12. 微小管生成時における微小管生成因子の局在解析.....	16
3.13. 分裂期前中期における微小管再重合実験.....	17
3.14. 微小管生成因子の単独デグロンによる微小管再重合への影響.....	18
3.15. γ -チューブリンと微小管生成因子のデグロンによる微小管再重合への影響.....	18
3.16. γ -チューブリン非依存的な微小管生成における分裂期キナーゼの機能.....	19

3.17. SiR-tubulinによる微小管動態への影響.....	19
------------------------------------	----

第二章

Ran 依存的な紡錘体形成因子の局在制御

4. 結果.....	21
4.1. 分裂期RCC1デグロンは表現型が確認されるものの, 細胞分裂は成功する.....	21
4.2. RCC1, RanGAP1, importin- β に対するデグロンは, NuMAの局在に影響しない.....	21
4.3. 紡錘体形成因子のRan依存的な局在制御.....	22
4.4. HURPとimportin- β の共依存的な局在制御.....	23
4.5. RanGAP1依存的なHURPとimportin- β のキネトコア微小管への局在制御.....	24
4.6. 試験管内再構成によるHURP, importin- β , Ranの共局在の検証.....	24
5. 考察.....	26
5.1. 間期における γ -チューブリン非依存的な微小管生成.....	26
5.2. 分裂期における γ -チューブリン非依存的な微小管生成.....	26
5.3. CLASP1とTPX2による γ -チューブリン非依存的な微小管生成機構.....	27
5.4. γ -チューブリンと独立した微小管生成が有する生物学的意義.....	28
5.5. Ran-importin 経路によるSAFsの局在制御.....	29
5.6. Ran-importin 経路による SAFs 局在制御の細胞分裂への寄与.....	30
6. 手法.....	32
6.1. プラスミド作製方法, 細胞培養方法, 細胞株樹立方法および用いた抗体.....	32
6.2. ショ糖密度勾配法.....	33
6.3. タンパク質精製およびIn vitro微小管結合能の解析法.....	33
6.4. 顕微鏡を用いた生細胞の観察方法.....	34
6.5. 微小管再重合法.....	35
6.6. 統計解析方法.....	35
7. 動画の説明文.....	38

8. 図.....	39
9. 表.....	79
10. 参考文献.....	85
11. 謝辞.....	97

1. 要旨

細胞骨格の一種である微小管は幅広く生命現象に関わっており、その機能不全は様々な疾患の原因となる。微小管の構造は、 α -チューブリンと β -チューブリンが結合した α/β -チューブリンヘテロダイマーによって形成される中空状であり、伸長と短縮を繰り返す動態を示す。プラス端を介した微小管動態の制御機構に関する解析は進んでおり、ch-TOG, CLASP, CLIP170 等の微小管付随タンパク質が制御因子として協調して機能することで伸長や短縮といった動態が生み出されることが分かっている。一方で、微小管生成機構については未解明な点も多い。In vivo, In vitro の解析から、 α -、 β -チューブリンのサブクラスである γ -チューブリンと GCPs によって構成される γ -TuRC 複合体が微小管生成の主要因子であり、 γ -TuRC が α/β -チューブリンヘテロダイマーの鋳型となることで微小管生成が促進されることが報告されている。ところが興味深いことに、RNAi や阻害剤を用いた γ -チューブリンの機能阻害実験でも微小管生成が確認されており、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路も存在することが予想されていた。しかし、これらの手法による γ -チューブリンの機能阻害は不完全であるため、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路が細胞内に存在することは明瞭に証明されておらず、関連因子も特定されていなかった。 γ -チューブリンの機能を完全に阻害しようにも、 γ -チューブリンは必須遺伝子であるため、遺伝子破壊株等の作製は不可能であり、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路を解析するためには、この問題を克服する必要がある。

そこで本研究の第一章では、AID 法を活用して γ -チューブリン非存在環境を人為的に作り出し、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成経路を特定および解析することを目的とした。まず、ヒト HCT116 細胞において CRISPR/Cas9 法を用いて γ -チューブリンに mAID-mClover 標識を施し、AID 法による γ -チューブリンの時期特異的分解を試みた。その結果、細胞内の γ -チューブリンは検出限界以下の量にまで分解可能であることが確認できた。次に γ -チューブリン非存在下での微小管生成を解析するため、 γ -チューブリンの分解過程を可視化して確認した上で、微小管を一度完全に脱重合させてから再重合を促したところ、微小管が生成された。この結果は、線虫等を用いた解析から予想されていた、 γ -チューブリンと独立した微小管生成経路の存在を明瞭に証明した。次に 11 種の微小管付随タンパク質の RNAi スクリーニングと複数タンパク質の同時分解実験の結果から、微小管安定化因子として知られる CLASP1 が間期と分裂期において、TPX2 が分裂期において、微小管生成に関わることが明らかになった。さらに、微小管伸長促進因子 ch-TOG は、間期では微小管生成に寄与するものの、分裂期においては微小管生成ではなく、微小管伸長に関わることが示された。加えて γ -チューブリン非存在下で分裂期キナーゼを阻害したところ、微小管生成が認められなかったことから、Aurora-A, Aurora-B キナーゼが分裂期微小管生成に関わることが明らかになった。

以上の結果から、細胞内において γ -チューブリン非存在条件を人為的に誘導可能であること、細胞内において γ -チューブリン非依存的に微小管が生成されること、微小管付随タンパク質および分裂期キナーゼが γ -チューブリンと独立して微小管生成を担うことが示された。 γ -チューブリン非依存的な微小管生成は、ヒメツリガネゴケ細胞やシヨウジョウバエ脂肪細胞においても確認されているため、本研究で明らかになった微小管生成経路は生体内でも機能していると予想される。特に中心体遠位の神経細胞軸索先端や中心体が存在しない卵母細胞の減数分裂などの微小環境における微小管動態制御への理解に繋がると期待される。

RanGTPは細胞周期を通して細胞内タンパク質の局在制御に必須の役割を果たすタンパク質であり、分裂期には細胞内で濃度勾配を形成し紡錘体形成因子の局在を制御することで、紡錘体形成に寄与することが報告されている。分裂期ではRanGEFであるRCC1は染色体に局在し、RanGAP1は細胞質に拡散しているため、分裂期では染色体近遠軸でRanGTPの濃度勾配が形成される。紡錘体形成因子はimportin- α およびimportin- β と結合すると機能が不活性化され、RanGTPの結合によりimportinのタンパク質結合状態が変化し、紡錘体形成因子はimportinと解離するとともに不活性化制御も外れる。つまりRanGTP濃度勾配が高いところでは紡錘体形成因子が活性化し、低いところでは紡錘体形成因子が不活性化する。ところが、RanGTPは間期にもタンパク質の局在を制御する必須因子として機能しており、これまでの手法では分裂期のみでRanの機能を阻害することが困難であったため、分裂期における紡錘体形成因子の局在制御については不明瞭な点が多かった。

そこで本研究の第二章では、Ranの制御因子であるRCC1、RanGAP1およびimportin- β や紡錘体形成因子に対してAID法による分裂期特異的な分解を行うことで、紡錘体形成因子の局在制御機構を厳密に検証することを目的とした。まず、Ran経路の制御因子を分裂期特異的に分解して紡錘体形成因子の動態を観察したところ、RanGTP濃度勾配の非存在下でもNuMA、TPX2の局在は変わらないことが明らかになった。次に、RanGTP過剰存在下ではHURP、importin- β はどちらも微小管結合強度が向上し、キネトコア微小管上をダイナミックに結合と解離を繰り返すことでキネトコア微小管を安定化することが示唆された。

以上の結果から、今まで不明瞭であったRan依存的な紡錘体形成因子の分裂期特異的な局在制御機構について、本研究の厳密な解析により、現行モデルを修正した局在制御モデルを提唱するに至った。これは紡錘体の形成・維持・位置決定などの機構についてのさらなる理解に繋がると期待される。

2. 序論

2.1. 微小管の構造と機能

細胞骨格の一種である微小管は、 α -チューブリンと β -チューブリンが結合した α/β -チューブリンヘテロダイマーが連なったプロトフィラメントによって形成される中空状の重合体である¹(図1A)。微小管長軸方向には極性が形成されており、伸長速度が速いプラス端と、その位置の反対をマイナス端と定義される^{2,3}。プラス端では β -チューブリン、マイナス端では α -チューブリンが露出している。微小管は、チューブリンの重合による伸長と脱重合による短縮を繰り返しており、伸長から短縮への転換をカタストロフ、その逆をレスキュー、また伸長も短縮もしていないように見える状態をポーズと呼ぶ。この微小管の動態を変化させる性質は動的不安定性と称される⁴。この微小管動態には β -チューブリンのヌクレオチド結合状態が大きく関与している。GTP-チューブリンが微小管に取り込まれた際、その微小管プラス端はGTPキャップと呼ばれ、微小管は安定的に伸長する。しかし時間経過とともにGTPの加水分解が促進されると、GTPキャップが喪失し、微小管の短縮が急速に促進される。また微小管側面にGTP-チューブリンが存在する際、微小管は短縮から伸長への移行が促されると共に、新たなGTPキャップとして機能する⁵。加えて微小管付随タンパク質 (MAPs) によって微小管動態が制御されるが、この微小管動態制御は細胞内輸送に関わる間期微小管ネットワークの構築、絨毛や鞭毛の軸糸の運動制御や分裂期紡錘体の構築といった細胞内機能に必須である⁶ (図1)。

2.2. 微小管動態の制御

前述の通り、微小管は様々なMAPsによってその動態が制御されており、特に微小管プラス端の動態に関与する因子は数多く同定されている。代表的な微小管プラス端結合タンパク質であるEB1 (End-binding 1) は、微小管伸長活性を有していると共に、微小管側面への結合の際にプロトフィラメント間の結合をより緊縮させることで微小管の構造を安定化させる⁷⁻⁹。さらにXMAP215/ch-TOG, CLIP170, p150Glued, SLAIN2/SentinといったMAPsと結合し、足場タンパク質としても機能する^{5,10}。ch-TOGは微小管プラス端結合タンパク質として同定され、4つのチューブリン結合ドメインであるTOGドメインによって微小管伸長を促進する¹¹。微小管プラス端および側面に結合するCLASP1は、微小管のカタストロフ頻度を低減し、レスキューとポーズの頻度を増加させることがIn vitro解析から明らかになっている¹²⁻¹⁴。CAMSAPは微小管マイナス端に結合し、安定化させると共に、微小管配向を制御することも報告されている^{13,15}。TPX2は微小管マイナス端に結合するとともに、In vitro実験では微小管生成を促進させる¹⁶⁻¹⁸。非運動性のキ

ネシンとして同定されたキネシン-13は、微小管に結合した後にチューブリンの構造を変化させることで、微小管脱重合を誘導することが報告されている^{19,20}。

2.3. 微小管生成機構

γ-チューブリン依存的な微小管生成

In vitro実験では、30 μMという高濃度のチューブリン存在下では微小管生成が観察されるが、細胞内ではチューブリン濃度が低いため、微小管付随タンパク質による補助がなければ細胞質で微小管生成はほとんど起こらない。ここで主要な微小管生成因子として同定されたのが、チューブリンサブクラスのγ-チューブリンである^{21,22}。γ-チューブリンはGCP2やGCP3 (Gamma-tubulin Complex Protein) と結合し、γ-TuSC (γ-Tubulin Small Complex) と呼ばれる複合体を形成する²³。GDP4-6とγ-TuSCが環状に連なった複合体はγ-TuRC (Ring-shaped Complex) と呼ばれる^{24,25}(図1B)。γ-TuRCを鋳型として、α/β-チューブリンヘテロダイマーが結合することで微小管生成や微小管伸長が促進される²⁶。この微小管生成機構は真核生物に広く保存されている。ただしγ-TuRCそれ自体だけでは微小管生成活性は十分ではなく、CDK5RAP2, ch-TOG, TPX2, augminとの相互作用が必要とされている²⁷⁻³²。(図1B)

中心体由来の微小管生成

中心体は微小管形成中心 (MTOC: MicroTubule Organizing Center) と呼ばれ、細胞内で微小管生成の中心的な役割を果たす³³。このMTOC形成に主要な機能を持つのが中心体マトリクス (PCM: PeriCentriolar Material) であり、多層の足場タンパク質およびγ-TuRC活性化因子によって構成される。活性化因子としては、pericentrinとCDK5RAP2が挙げられる²⁸。細胞分裂期にはPCMが巨大化することによって、微小管生成活性が向上する。

微小管由来の微小管生成

微小管は中心体からだけではなく、微小管側面を基部としてそこから枝分かれするようにも生成されることが観察されている³⁴。この現象は微小管分枝 (Branching) と定義されており、8つのサブユニットからなるaugminが微小管側面に結合し、γ-TuRCの基部となることで側面からの微小管生成を促進させる^{35,36}。分枝した微小管は、元の微小管から0-40°程度の角度を形成することが観察されており、この微小管分枝は分裂期紡糸体の形態維持に重要な機能を有する³⁷⁻³⁹。

染色体由来の微小管生成

染色体由来の微小管生成は、体細胞分裂や減数分裂においてよく観察されており、微小管再重合実験やアフリカツメガエル卵抽出液を用いたIn vitro実験によって解析されてきた^{40,41}。この微小管生成には γ -TuRC, XRHAMM, TPX2, RanGTPが関わっており⁴², Aurora BやINCENPなどによって構成されるCPC (chromosome passenger complex) は染色体近位の微小管会合に重要な機能を持つことが報告されている^{43,44}。ただし核膜崩壊期や分裂期中期などでは、染色体由来の微小管生成とBranchingとの区別が困難であり、その機能の重要性については疑問点が残る。しかし、分裂期後期では染色体間の領域での微小管生成は確認されているため、染色体由来の微小管生成は生体内で機能することは明らかになっている^{38,45}。

細胞小器官由来の微小管生成

-ゴルジ体

哺乳類細胞においてゴルジ体周辺は、主要な微小管生成の場となっており、ヒトRPE-1細胞を用いた解析が数多く報告されている⁴⁶。ゴルジ体膜タンパク質のGM130にAKAP450が結合し、そこにさらにCDK5RAP2が結合することで γ -TuRCをリクルートし、微小管生成を促進させる⁴⁷⁻⁴⁹。

-核

核周辺の微小管生成については、筋肉細胞を用いた解析が報告されている。核膜に結合しているNesprin-1 α を足場としてAKAP450が結合し、 γ -TuRCがリクルートされることで微小管生成が促進される⁵⁰。

-ミトコンドリア

ショウジョウバエ精子には非常に巨大なミトコンドリアが存在しているため、この細胞を対象にミトコンドリア由来の微小管生成について解析が行われている⁵¹。ショウジョウバエ精子細胞と精巣特有のCnn/CDK5RAP2のスプライシングバリエントCnnTがミトコンドリア表面に結合しており、 γ -TuRCがリクルートされることで微小管生成が促進される⁵²。

細胞質での微小管生成

ほとんどの微小管は上記の方法で生成されるが、細胞質中に自然発生的に微小管が生成される場合がある。例えば酵母において間期微小管を再重合させた際に、CDK5RAP2/mtoによって細胞質微小管が生成されることが確認された⁵³。またヒトRPE1

細胞においてゴルジ由来や中心体由来の間期微小管生成を阻害することによって、細胞質微小管生成が確認された⁴⁷。加えてショウジョウバエS2細胞において、分裂期にCDK1の機能を阻害することで細胞質微小管生成が確認された⁵⁴。これら細胞質微小管生成は細胞周期問わず確認され、主に γ -TuRCがその機能を担っている。ヒメツリガネゴケでは多くの微小管が細胞質中で生成されることが報告されている⁵⁵。ヒメツリガネゴケではCDK5RAP2, pericentrin, AKAP450が存在しないため⁵⁶、自然発生的に γ -TuRC由来の細胞質微小管生成がなされたと考えられている。

γ -チューブリン非依存的な微小管生成

γ -チューブリンは必須遺伝子であるため、遺伝子破壊株を作製することは不可能である。そのためこれまで細胞内での γ -チューブリンノックアウト条件下での微小管生成機構を解析することはできなかった。RNAi法を用いることで様々な生物種で γ -チューブリン非依存的な微小管生成に関する知見が得られてきた^{55,57-61}。約90%の効率で γ -チューブリンがノックダウンできる線虫初期胚では、ノックダウン条件でも微小管が生成されることが確認されている⁵⁸。また陸上植物ヒメツリガネゴケでは、細胞質で生成された微小管のうち90%に γ -チューブリンのシグナルが確認されたのに対して、10%の微小管では確認されなかった⁵⁵。したがって、生細胞内において γ -チューブリン非依存的な微小管生成機構および生成因子の存在は予想されていた。TPX2, ch-TOG, CAMSAP, EB, CLIP-170などのMAPsが微小管生成活性を有することがIn vitro解析によって示されたため^{18,62-64}、これらが γ -チューブリン非依存的な微小管生成因子の候補として挙げられている。

2.4. 分裂期スピンドル形成

細胞分裂の際に、染色体を均等に娘細胞に分配するために紡錘体が形成される⁶⁵。紡錘体は主構成要素である微小管を含む数百分子によって構成される巨大な複合体であり、微小管動態制御や微小管間の架橋や滑動を行うタンパク質がその形成や維持に関わっている⁶⁶。紡錘体形成には染色体近傍の紡錘体形成因子 (SAF: Spinde Assembly Factor) の局在制御が必要とされ、RanGTPによってその局在や機能が制御される^{67,68} (図2)。分裂期では染色体に局在するRanGEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) であるRCC1と、細胞質中に拡散しているRanGAP1 (GTPase-activating Protein) によって、RanはRanGTPとRanGDPの状態をサイクルしており、染色体近位ではRanGTP濃度が高く、染色体遠位ではRanGDP濃度が高い濃度勾配が形成される^{69,70}。一方間期では核内にRCC1が局在し、RanGAP1は細胞質中に拡散しているため、核内外でRanGTP濃度勾配が生じる。この濃度勾配がimportinのタンパク質結合状態を変化させるため、細

胞質-核間のタンパク質輸送が可能となる⁷¹. SAF は importin- α および importin- β と結合すると機能が不活性化される. さらに細胞質-核間の輸送も importin によって制御されており, RanGTP 濃度が高い領域では importin は SAFs ではなく RanGTP に結合するため, SAF は importin と解離し, 不活性化制御も外れる⁷². 活性化 SAF は紡錘体における微小管の生成, 動態制御, 輸送, 架橋などに関わっている. 例えば NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus Protein) は微小管マイナス端を認識し, 細胞質ダイニンと協調しながら微小管を架橋することで紡錘体の極収束に貢献する^{73,74}. TPX2 は微小管生成を促進することで紡錘体形成に貢献する^{63,75,76}. HSET は微小管間の並行性および逆行性架橋のどちらにも関与しており, 特に並行性の微小管架橋に重要な役割を果たす^{77,78}. HURP (Hepatoma Upregulated Protein) は染色体近傍のキネトコア微小管の束化を行う⁷⁹. ほとんどの SAF は importin- α の特異的認識配列である NLS (Nuclear Localization Sequences/Signals) を有しているが⁸⁰⁻⁸², 例に挙げた SAF のうち HURP のみが NLS を持たず, importin- β が直接認識, 結合している⁷⁹. RanGTP の濃度勾配の生理的意義については, アフリカツメガエル卵抽出液を用いた研究を中心に解明されてきたが⁸³⁻⁸⁶, 他の動物細胞の体細胞分裂, 減数分裂においても同様の結果が確認されている^{87,88}. 特に RanGTP は雌性減数分裂における中心体非依存的な紡錘体形成には必須だが^{89,90}, 体細胞分裂における必須性については未だに議論が残っている⁹¹⁻⁹³. 上述の通り RanGTP は間期においても細胞内輸送等に関与しているため, 恒常的な機能阻害や機能破壊を行ったとしても, 間期の表現型が分裂期表現型に影響を与える可能性が高く, 分裂期特異的な RanGTP の SAF の局在制御に関して不明瞭な点が多く残っている(図 2).

2.5. HCT116細胞

本研究では安定的な 2 倍体である, ヒト結腸がんから単離した HCT116 細胞を対象とした⁹⁴. この細胞腫では CRISPR/Cas9 法によって比較的容易にゲノム編集が可能であり, AID 法の実証報告もされているため, 本研究の必須遺伝子である RCC1 や γ -チューブリンの時期特異的なノックダウンを行うのに適している^{74,95}. また RNAi 法も行うことが可能であるため, 複数遺伝子のスクリーニングも容易であり, 加えて所属研究室では当細胞腫の細胞観察方法に精通していることから, 本研究ではモデル細胞として扱った.

2.6. AID法による目的タンパク質のノックアウトレベルの分解

研究対象である遺伝子が必須遺伝子である場合、その機能をノックアウトによって解析することは不可能である。そこで植物ホルモンの一種であるオーキシンをトリガーとして、発現した目的タンパク質のユビキチン-プロテアソームによる分解を促すことによって、目的タンパク質を急速にかつ、ノックアウトレベルにノックダウンが可能となるAID法 (**A**uxin-**i**nducible **D**egron) が鐘巻 将人 博士らによって開発された⁹⁶。シロイヌナズナオーキシニン応答タンパク質であるIAA17から同定されたオーキシニン認識配列をCRISPR/Cas9法を用いて目的遺伝子の末端に挿入し、イネ由来のオーキシニン感応型Fboxタンパク質であるTIR1を発現させる。するとユビキチンリガーゼであるSCF (Skp1-Cullin-F-box) が形成され、オーキシニン暴露下で目的タンパク質がユビキチンプロテアソームによって分解される。この分解によるタンパク質の半減期は10分から20分であり、ほとんどの因子は30分の反応時間でノックアウトレベルまで分解される(図3)。本研究では、TIR1がドキシサイクリン (Dox) 依存的に発現するようにゲノム編集したHCT116細胞株を親株に対して、目的遺伝子末端にmAID-mClover (mAC), mCherry-mAID (mACh) を挿入した。また本研究ではAID法による分解をデグロンと表記する。

第一章では、時期特異的に γ -チューブリンを分解することで、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成およびその関連因子を明らかにした。第二章では、間期でも細胞内機能があることから、未だに不明瞭であった分裂期におけるRanGTPによるSAFの局在制御に対する機能について、RCC1, RanGAP1 およびSAFを分裂期特異的に分解することで明らかにした。

第一章

ヒト培養細胞における γ -チューブリン非依存的な微小管生成の解析

3. 結果

3.1. TubG デグロン株の作製および活性の確認

ヒトにはTubG1とTubG2の2つの γ -チューブリンパラログが存在しており、TubG1が主要な機能を担っている⁹⁷. γ -チューブリン非存在下での微小管生成機構を解析するために、TubG2をノックアウトした細胞に対してTubG1にmAIDタグを付加した. 具体的にはCRISPR/Cas9法を用いて、TubG2のORF全域をブラストサイジン耐性遺伝子に置換することでTubG2 KO細胞を作製した(図4A). その後TubG2 のそれぞれのエキソン内でプライマーを作製し、ゲノムPCRによってTubG2 ORF全域のノックアウトを確認した. その後TubG1に対してCRISPR/Cas9法によって、カルボキシル末端 (C末端) にmAID, mClover, ネオマイシン耐性遺伝子を挿入した(図4B). ゲノムPCRによってTubG1のC末端領域断片を増幅し、配列の挿入を確認した後、TubG抗体を用いたウェスタンブロッティングによって蛍光タグと融合したTubG1の発現を確認した(図4C). 1種類の β -チューブリンTub2しか持たない酵母において、Tub2への蛍光タグの大きさに比例してチューブリンが微小管に取り込まれにくくなり、致死の表現型を示す報告がなされている⁹⁸. そこでショ糖密度勾配遠心によって、蛍光タグによる γ -チューブリンの複合体形成への影響を調べた. コントロールとして蛍光タグを施していない親株を用いたところ、12レーンに強いピークが確認された. このピークは γ -TuRCが形成されていることを示している(図4D). 一方TubG1-mAC細胞株では、13レーンに強いピークが確認された(図4E). これは蛍光タグによって複合体の分子量が増加したことを示している. しかし10レーンにも弱いピークが確認されたため、蛍光タグによって複合体に取り込まれなかったTubG1-mACが存在することを示唆している. さらに蛍光タグの影響を調べるために、TubG1-mACの細胞内局在と核膜崩壊から分裂期後期までの時間を測定した. 分裂期におけるTubG1-mACの局在は先行研究の免疫染色の結果と同様であった⁹⁹ (図4F). また細胞分裂時間は 31 ± 8 分であり、第二章で用いたコントロール細胞の 34 ± 8 分と同等であった. 加えて細胞増殖の速さは親株と同等であったため(データは示さない), 蛍光タグによって複合体形成に影響はあるものの、表現型として表れるほどの機能阻害には至っていないことが示された.

3.2. 間期および分裂期におけるAID法による γ -チューブリンデグロンの効率

AID法によって内在性 γ -チューブリンがノックアウトレベルにデグロンされたかを確認するために親細胞株と TubG1-mAC, および TubG1-mAC デグロン細胞における mClover の輝度を測定した. 間期, 分裂期共に TubG1-mAC デグロン細胞では親株と同程度の輝度を示す細胞から Dox, IAA 非投与細胞と同程度の輝度を示す細胞が混在する結果が示された(図 5A, B). 今後の解析において, マゼンタで示したデータ群である親株と同程度の輝度を示す細胞を, TubG1 がほぼ完全にデグロンされた細胞として扱った(図 5C, D). ただしこの細胞群の中では細胞全体の輝度としては親株と同程度だが, ごく弱いシグナルが中心小体に見られる細胞も確認された(データには示さない). これらの細胞は解析からは除外した.

3.3. 間期および分裂期における γ -チューブリン非依存的な微小管の存在

TubG1-mAC 細胞に対して Dox, IAA を投与することで分解を行い, 表現型を確認するとともに, γ -チューブリン非依存的な微小管生成の有無を確認した. 先行研究では幅広い生物種において, RNAi による γ -チューブリンのノックダウンによって分裂期が停止する表現型が確認されている^{58,60}. コントロールでは細胞分裂時間が 31 ± 8 分であるのに対して, TubG1-mAC に対して分解を行った結果, 分裂期への進行は確認されたものの, ごく短い紡錘体が形成され, 120 分以上の時間を経ても分裂期後期に進行することはなかった(図 6A, B). 24 時間 Dox/IAA を投与した間期 TubG1-mAC 細胞を観察したところ, 微小管の存在が確認された(図 6C).

3.4. TubG1デグロン細胞における間期微小管の再重合系の確立

γ -チューブリン非依存的な微小管生成を解析するために微小管脱重合/再重合実験を TubG1デグロン細胞に対して行った. まず 40 ng/ml ノコダゾールを投与し, 氷上で4時間インキュベートすることで微小管を完全に脱重合させた. その後, 25 °C の室温にて培地を交換することで微小管再重合を促した(図7A). その結果コントロール細胞では, 45個中43個の細胞が10分で細胞質微小管の再重合が観察されたのに対して, TubG1-mACを分解した細胞では42個中33個の細胞は10分間で再重合が観察されず, 20分経過するまでほとんどの細胞で細胞質微小管の再重合が観察されなかった(図7B). 以上の結果から, ヒト培養細胞において γ -チューブリン非依存的な微小管生成の観察に成功し, かつその微小管生成活性は γ -チューブリン依存的微小管生成よりも低いことが示された.

3.5. 全反射顕微鏡を用いた γ -チューブリン非依存的な微小管生成観察

γ -チューブリン非依存的な微小管生成をより詳細に観察するために、全反射顕微鏡を用いて微小管再重合実験を行った。コントロール細胞の細胞表面では、 γ -TuRCと思われるTubG1の顆粒状のシグナルが観察された(図8A)。コントロール細胞では微小管のほとんどは中心体から生成、伸長したため、細胞表面上のTubG1の顆粒状シグナルからは微小管の生成は観察されなかった。一方TubG1のデグロン下では、中心体からの微小管生成活性が低下しているため、細胞質中での微小管生成が観察された(図8B)。観察開始から初めて微小管が観察された時間を計測したところ、コントロールでは 1.4 ± 1.5 分であるのに対して、TubG1 デグロン下では 8.3 ± 4.8 分と遅延するという結果が得られ、共焦点顕微鏡での微小管再重合実験と同様の結果が得られた(図8C)。またTubG1 デグロン下において生成された微小管は、直線状ではなくカーブした環状の形態をとることが観察された(図8D)。その半径は $0.85 \pm 0.26 \mu\text{m}$ ($n = 29$) であり、*In vitro*解析でのMT-gliding assayと類似した構造を示すことが明らかになった¹⁰⁰。以上の結果から、 γ -チューブリン非存在下では微小管生成活性は著しく低下し、生成された微小管の形態にも影響を及ぼすことが示された。

3.6. γ -チューブリン非依存的な微小管生成を担う候補因子のスクリーニング

γ -チューブリン非依存的な微小管生成がヒト培養細胞で確認されたため、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成を担う微小管生成因子のスクリーニングを行った。TubG1のデグロン下において11の遺伝群に対してRNAiを行い、30分後に微小管が生成しているかを判断した(図9A)。その結果、TubG1デグロン下におけるch-TOG, CLASP1, CAMSAP1/2/3のRNAiノックダウンによって、全体の半数ほどの細胞において微小管再重合が30分間確認されなかった(図9B-E)。一方、他の細胞腫において細胞質微小管の生成を促すとされるCSK5RAP2やPCNTのRNAiノックダウンは再重合に影響しなかった^{28,47,49}

3.7. TubG1ダブルデグロン株の作製

RNAi スクリーニングの結果をより厳密に確認するために、TubG1-mAC 細胞株に対してch-TOG, CLASP1, TPX2 に mAID-mCherr タグを施し(図 10A-C)、また AKAP450 と CAMSAP3 ノックアウト株を作製した(図 10D, E)。株取得の確認はゲノム PCR とウェスタンブロッティングによって確認した。

3.8. ダブルデグロンおよびノックアウト株によるRNAi スクリーニング結果の検証

RNAi スクリーニングの結果を検証するためにTubG1-mAC細胞に対して、それぞれch-TOGと CLASP1にmChを挿入することによってダブルデグロン条件下で微小管再重合を観察し、またTubG1-mAC細胞に対してそれぞれCAMSAP3とAKAP450をノックアウトした細胞株で微小管再重合を観察した(図11A-D). CAMSAP3ノックアウト株に対してはさらにCAMSAP1/2 RNAiを行った.

その結果, ch-TOGダブルデグロンでは70 %以上, CLASP1ダブルデグロンでは90 %以上, CAMSAP3ノックアウトかつCAMSAP1/2 RNAiでは50 %の細胞が30分間で微小管再重合が観察されなかった(図11E). 一方AKAP450ノックアウトではRNAiスクリーニングと同様に微小管生成には影響は無かった. 微小管再重合の30分後の細胞全体の微小管輝度を測定したところ, TubG1単独デグロン (304.4 ± 199.7) と比較するとch-TOG (156.1 ± 75.76), CLASP1 (200.1 ± 123.8), CAMSAPs (121.1 ± 72.38) のダブルデグロン下では優位に輝度が減少していた(図11F). 以上の結果から, 微小管伸長因子として同定されたch-TOG¹¹, 微小管安定因子でありゴルジ体や γ -チューブリン依存的な微小管生成に関与するCLASP1^{12,14,101}, 微小管のマイナス端安定因子であるCAMSAPファミリーの3因子が γ -チューブリン非依存的な間期微小管生成に大きく関与することが明らかになった. しかし, ゴルジ体微小管ネットワークにAKAP450は必要であるが⁴⁷⁻⁴⁹, 本研究で注目した γ -チューブリン非依存的な微小管生成には必要ないことが明らかになった.

3.9. CAMSAPファミリーは協調的に微小管生成に関与する

ヒト CAMSAP ファミリーには CAMSAP1, CAMSAP2, CAMSAP3 の 3 つのパラログが存在するため, その冗長性を TubG1-mAC + CAMSAP3 KO 細胞に対して CAMSAP1, CAMSAP2 をそれぞれ RNAi することで確認した(図 12A-C). コントロールとしてルシフェラーゼ siRNA を用いたところ, すべての細胞において 30 分後の微小管生成が確認された. CAMSAP1 RNAi ノックダウンでは 25 %, CAMSAP2 RNAi ノックダウンでは 50 %の細胞において 3 分後の微小管生成が確認されなかった(図 12D). 以上の結果から, ヒト CAMSAP ファミリーは間期微小管生成に対して冗長的に寄与することが示された.

3.10. 37 °Cにおける微小管生成因子の間期微小管生成に対する機能

通常の細胞培養では37 °Cの恒温インキュベーターが用いられる。微小管脱重合を促したノコダゾールを含んだ培地を交換する際に37 °Cの培地を用いた場合、撮影箇所の調整中の2分程の時間で既に微小管再重合が確認されたため、本研究の微小管再重合実験は25 °Cで行った。ただし微小管動態は温度によって大きく変化するため¹⁰²、通常よりも低い温度条件での微小管再重合への影響を考慮し、37 °Cにおける微小管再重合実験を行い、微小管生成因子の機能を解析した(図13)。コントロール細胞では2分以内に全体の50%の細胞で微小管再重合が観察された。TubG1 デグロン下では25 °Cの微小管再重合実験と同様に微小管再重合が確認される時間が遅延した。またTubG1, CLASP1のダブルデグロン下ではTubG1単独デグロンと比較して微小管再重合がより遅延した。以上の結果から、間期における微小管生成の初期段階にCLASP1が関与することが示された。

3.11. 紡錘体形成に対する低温環境の影響

これまで微小管再重合実験は25 °Cで行ってきたが、この温度はヒト培養細胞には低温環境となっている。ヒトCFPAC1培養細胞において、19 °CではG2/M期へ進行することはないが、分裂期に侵入した細胞を急速に19 °Cに冷却すると、分裂時間が延長するものの正常に紡錘体形成と細胞分裂が進行することが報告されている¹⁰³。そこで、低温環境における微小管再重合実験に妥当性があるかを検証するために、微小管再重合実験と類似した、微小管の配向および再重合が観察される分裂期紡錘体形成過程を25 °Cの低温環境で観察した。37 °Cで前培養を行い、Cdk阻害剤 (RO) によってG2/M期で同調した。その後培地を交換し、25 °Cで紡錘体形成過程を観察した。その結果細胞分裂にかかる時間は延長したものの、25 °Cの低温環境であっても紡錘体が形成された(図14A, B)。以上の結果から、これまで行ってきた25 °Cにおける微小管再重合実験の妥当性が証明された。

3.12 微小管生成時における微小管生成因子の局在解析

γ -チューブリン非依存的な間期微小管の再重合において、RNAiスクリーニングにより微小管生成因子を同定し、ダブルデグロンやノックアウトによってその機能の検証を行った。次に微小管再重合における微小管生成因子の局在について全反射顕微鏡を用いて解析することで、微小管生成のどの段階で機能するのかを調べた。TubG1-mAC細胞に対して、ch-TOGとCLASP1に対してそれぞれmAID配列を含まないmCherry配列を挿入

することによって、 γ -チューブリンのデグロン下におけるそれぞれの局在を解析した。その結果、ch-TOGとCLASP1はともに微小管生成時には微小管マイナス端に局在しておらず、微小管伸長後にプラス端に局在する様子が観察された(図15, 16)。ここでは微小管の染色をSiR-tubulinを用いているが、この色素体は微小管が生成されてから10秒ほど遅れて表面に結合することが報告されている¹⁰⁴。そのため微小管生成時にch-TOGとCLASP1は、微小管マイナス端に十分量の局在をしないことが明らかになった。それゆえ、 γ -チューブリン非存在下での微小管生成において、この解析で検出可能な量のch-TOGとCLASP1の微小管マイナス端への局在は無いと結論づけた。

3.13 分裂期前中期における微小管再重合実験

間期微小管における γ -チューブリン非依存的な微小管生成因子の同定を行ったため、次は分裂期前中期における γ -チューブリン非存在下での微小管生成を観察した。分裂期微小管再重合実験では37 °Cで24時間ノコダゾール投与することによって核膜崩壊期に細胞を同調し、その後4時間氷上に静置することで微小管を脱重合させた後、25 °Cにおいて微小管再重合を促した(図17A)。微小管脱重合後に免疫染色によって固定した細胞を観察したところ、TubG1-mACと抗TubA抗体 (DM1A) の強い輝点が確認され、中心体を標識する抗centrin-2抗体の輝点が同じ箇所を確認された(図17B)。さらに検証のためにplk4阻害剤 (centrinone) を12日間投与し、継代することで中心体欠落細胞を作製した¹⁰⁵。同様にTubG1, TubA, centrin-2の局在を免疫染色によって観察したところ、centrinone未処理細胞で見られた中心体と思われる輝点が消失した(図17C)。以上の結果から、上述の分裂期微小管の脱重合によって中心体微小管を残して全ての微小管の脱重合が確認された。

この微小管脱重合操作後に25 °Cにおいて微小管再重合を観察したところ、全ての細胞において10分以内に微小管再重合が確認され、80 %の細胞において中心体からなる微小管形成中心 (MTOC) からの微小管再重合が観察された(図17D)。同様の操作をTubG1デグロン下で行ったところ、10分から20分ほど遅延したものの微小管再重合が観察された(図17E)。これは先行研究で明らかにされた、Hela細胞における γ -TuRC構成因子のRNAiノックダウン下においても分裂期微小管が再重合するという結果と一致する⁹⁹。またコントロールでは 青矢印で示されたMTOCに加えて緑矢印で示された細胞質中の非中心体由来の微小管形成中心ncMTOC (noncentrosomal MTOC) からも微小管再重合が頻繁に観察された。以上の結果から、間期と同様に分裂期前中期においても γ -チューブリン非存在下でも微小管が生成されることが示された。

3.14. 微小管生成因子の単独デグロンによる微小管再重合への影響

間期における微小管生成因子が分裂期においても微小管生成に関与するか否かを解析するために、まずそれぞれの因子に対して単独でデグロンを行い、微小管再重合に与える影響を解析した(図 18A-C). その結果 ch-TOG と CLASP1 のそれぞれの単独デグロン下では、コントロール細胞と同様に 1 分前後で MTOC からの微小管生成が確認されたものの、50%ほどの細胞において ncMTOC からの微小管生成も確認された(図 18A, B, D, E). これは MTOC における微小管生成や微小管伸長活性が低下することによって、ncMTOC からの微小管生成が許容された影響だと考えられる. ここで、間期では核内に局在しており間期微小管動態には関与しないものの、分裂期において ncMTOC の形成に機能しており¹⁷、微小管再重合実験においても ncMTOC の形成に機能すると報告のある TPX2 に対しても同様の実験を行った¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. その結果 ch-TOG や CLASP1 と同様に、TPX2 単独デグロン下では 10 分前後で MTOC からの微小管生成が確認され、50%の細胞で ncMTOC からの微小管生成が確認された(図 18C-E). この結果により、LLC-PK1 細胞や Hela 細胞では TPX2 は ncMTOC からの微小管生成に必要とされていたが、本研究で扱う HCT116 細胞では必要ではないという示唆が得られた.

3.15. γ -チューブリンと微小管生成因子のデグロンによる微小管再重合への影響

間期と同様に、 γ -チューブリン非存在下での分裂期微小管生成に関わる微小管生成因子の機能を解析するために、TubG1 とそれぞれの微小管生成因子を同時に分解し、ncMTOC への影響を解析した(図 19A-C). TubG1 と ch-TOG のダブルデグロン下では、TubG1 単独デグロンと比較して微小管伸長が極度に抑制された(図 19A). しかし ncMTOC は形成されており、出現までに要する時間は TubG1 単独デグロンした場合と大きく変わらなかった(図 19D). 線虫において γ -チューブリンと ch-TOG のオルソログである ZYG-9 の RNAi ノックダウンでは、 γ -チューブリン単独 RNAi と比較して分裂期微小管には大きく変化しないとされていたが⁵⁸、ヒト培養細胞では γ -チューブリン非存在下において微小管伸長に強く関与することが明らかになった. 同様に TubG1 デグロンと KO と RNAi による CAMSAP のノックダウンでは ncMTOC の形成に要する時間は大きく変化しなかった. 一方 TubG1 と CLASP1 のダブルデグロン下では、ncMTOC の形成までに要する時間が大幅に遅延することが観察された(図 19B). また TubG1 と TPX2 のダブルデグロン、TubG1 単独デグロンと TPX2 RNAi ノックダウン、TubG1 と CLASP1 ダブルデグロンと TPX2 RNAi ノックダウンを行って ncMTOC の形成を観察したところ、いずれの条件でも ncMTOC の形成に要する時間が大幅に遅延する結果が得られた(図 19C, D). 以上の結果から、ヒト培養細胞分裂期において、CLASP1 と TPX2 が微小管生成に関与する一方で、ch-TOG は微小管伸長に関与することが明らかになっ

た. この解析ではいずれの条件でも, 少なくとも 50 %の細胞で ncMTOC が形成されていたため, CLASP1 や TPX2 以外の因子が γ -チューブリン非存在下での微小管生成に関わっている可能性が高い.

3.16. γ -チューブリン非依存的な微小管生成における分裂期キナーゼの機能

分裂期において3種類の分裂期キナーゼが微小管形成に関与していることが報告されている. Plk1/polo¹⁰⁶と Aurora A^{107,109}が中心体, Aurora Bが染色体近位領域¹¹⁰において微小管形成に寄与するという報告があり, また線虫では γ -チューブリンと Aurora AのRNAiノックダウンによって微小管形成が抑制されることが報告されている¹¹¹. そこで γ -チューブリン非存在下での微小管再重合において, 阻害剤を用いることで分裂期キナーゼの機能を解析した(図20A-E). γ -チューブリンデグロン下におけるDMSOの投与, また BI2536によるPlk1の機能阻害条件下ではncMTOCの形成に要する時間は大きく変化しなかった(図20B, C, F). 一方 γ -チューブリンデグロン下において, ZM447439による Aurora Bの機能阻害と Alisertibによる Aurora Aの機能阻害条件下ではncMTOCの形成に要する時間が遅延した(図20D-F). この結果は, γ -チューブリンデグロン下での Aurora B RNAiノックダウンによっても再現された. 以上の結果から, Aurora Aと Aurora Bは γ -チューブリン非存在下でのncMTOC形成に関与することが示された.

3.17. SiR-tubulinによる微小管動態への影響

本研究では微小管を可視化するために, シリコンローダミン (SiR) とドセタキセルを結合させた蛍光試薬SiR-tubulinを用いた. ドセタキセルはタキサンの一種であり, 微小管安定化活性を有しているため¹¹², これまでの解析においてSiR-tubulinによる微小管安定化の懸念が生じた. そこで間期と分裂期それぞれにおいて, γ -チューブリン非存在下での微小管生成にSiR-tubulinが与える影響を検証した. 間期ではch-TOGにmCherryタグを施し, 全反射顕微鏡を用いて γ -チューブリン非依存的な微小管再重合の際の微小管動態を解析した(図21A). その結果, 微小管の伸長速度に関しては, コントロールでは 59.16 ± 30.25 nm/secであるのに対して, SiR-tubulin投与下では 72.05 ± 59.56 nm/secと優位な差はなかった(図21B). 微小管生成が初めて確認された時間に関しても同様に, コントロールでは 11.0 ± 6.1 分であるのに対して, SiR-tubulin投与下では 14.4 ± 4.2 分と優位な差はなかった(図21C). また分裂期ではTPX2にmCherryタグを施し, γ -チューブリン非依存的な微小管再重合を観察した(図22A). その結果, ncMTOCが初めて形成された時間に関しては, コントロールでは 17.9 ± 6.3 分であるのに対して, SiR-tubulin 投与

下では 16.4 ± 5.2 分と優位な差はなかった(図30B). MTOCの数に関しても同様に, コントロールとSiR-tubulin投与の間に大きな変化はなかった(図30C). 以上の結果から, 本研究における γ -チューブリン非存在下での微小管再重合に対してSiR-tubulinはほとんど影響しないことが明らかになった.

第二章

Ran 依存的な紡錘体形成因子の局在制御

4. 結果

4.1. 分裂期RCC1デグロンは表現型が確認されるものの、細胞分裂は成功する

これまでRCC1は間期におけるNLSタンパク質などの核内輸送の機能を担うとともに⁶⁷, 複数生物種の減数分裂における紡錘体形成や染色体分配でも必須の役割を果たすことが報告されていた^{87,89,113}. しかし, 間期における必須機能のため, 分裂期におけるRCC1の厳密な機能については議論の余地が残されていた^{92,93}. そこでCRISPR/Cas9法とAID法を組み合わせ, 分裂期特異的にRCC1をデグロンすることによって, 分裂期特異的なRCC1の機能を解析した. まずRanGEFであるRCC1に対してCRISPR/Cas9法を用いてmAIDタグとmCloverタグを施し, その後図に示した進行手順表でRCC1をデグロンし, 表現型を確認した(図23A-C). その結果, RCC1デグロン下では核膜崩壊から分裂期後期までにかかる時間(細胞分裂時間)の延長が観察されたものの(コントロール: 34.1 ± 7.6分, RCC1デグロン: 47.2 ± 10.5分), 細胞質分裂まで進行した(図23D). また細胞長に対する紡錘体長の比率(紡錘体長比)が減少した(コントロール: 0.54 ± 0.04, RCC1デグロン: 0.47 ± 0.04)(図23E). この表現型はニワトリDT40細胞におけるRCC1-mAIDを付加発現させた後に内在性RCC1をノックアウトし, AID法によってRCC1-mAIDをノックダウンした結果と同様である⁹¹. 細胞分裂後に核内に局在する, NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein)の動態を観察したところ, RCC1デグロンによって核内局在が細胞質へと変化した. また細胞全体のSiR-tubulinの輝度を計測したところ, 輝度の低減が確認された(コントロール: 1694 ± 663.2, RCC1デグロン: 1056 ± 457.5)(図23F).

4.2. RCC1, RanGAP1, importin-βに対するデグロンは, NuMAの局在に影響しない

細胞分裂期において, 細胞質ダイニンとの協調的な微小管架橋によって紡錘体極の維持に機能するNuMAは^{73,74,114,115}, importin-βによって機能が抑制され, RanGTPの存在によってその機能が回復することが報告されている⁸⁰. そこで分裂期におけるNuMAのRan依存的局在制御を解析するために, RCC1-mAC, RanGAP1-mAC, importin-β-mAC 細胞のデグロン下におけるNuMAの局在を観察した(図24A-C). RCC1-mACデグロン下では紡錘体極のNuMAの輝度が優位に減少した(コントロール: 318 ± 90.86, RCC1デグロン: 279.6 ± 92.39)(図24D). しかし, SiR-tubulinの輝度も減少していたため, NuMAの輝

度の減少は微小管総量の減少による影響である可能性が考えられた。実際にNuMAの輝度とSiR-tubulinの輝度の比率を算出したところ、コントロール (0.22 ± 0.14) と比較してRCC1デグロン (0.33 ± 0.22) では優位に高くなっていた(図24E)。すなわちRCC1のデグロンによって紡錘体に局在するNuMAの総量には大きな影響を与えないことが明らかになった。

同様の解析をRanGAP1に対して行ったところ、RanGAP1のデグロン下では紡錘体極のNuMAの輝度には優位な差は見られず(コントロール: 349.6 ± 108.3 , RanGAP1 デグロン: 318.6 ± 107.7)、SiR-tubulinの輝度は優位な差が見られた(コントロール: 3707 ± 1314 , RanGAP1デグロン: 3130 ± 1044) (図24F, G)。また紡錘体長比 (コントロール: 0.54 ± 0.04 , RanGAP1デグロン: 0.52 ± 0.07)と細胞分裂時間 (コントロール: 35.5 ± 9.0 分, RanGAP1デグロン: 39.1 ± 10.1 分)には優位な差はなかった(図24H, I)。

importin- β のデグロン下では、紡錘体極のNuMAの輝度には優位な差は見られず(コントロール: 511.2 ± 223 , importin- β デグロン: 414.8 ± 199.5)、SiR-tubulinの輝度は優位な差が見られなかった(コントロール: 1431 ± 897.6 , importin- β デグロン: 1385 ± 843.6) (図24J, K)。一方で、RCC1デグロンと同様に紡錘体長比が優位に短縮し(コントロール: 0.49 ± 0.05 , importin- β デグロン: 0.44 ± 0.07)、細胞分裂時間が優位に延長した(コントロール: 41.9 ± 16.3 分, importin- β デグロン: 66.7 ± 26.7 分) (図24L, M)。

以上の結果から、Ran経路の因子を分解してもNuMAの局在は大きく変化しなかったため、ヒト培養細胞において分裂期におけるNuMAの局在および機能制御にRan経路は必要ないことが示された。

4.3. 紡錘体形成因子のRan依存的な局在制御

NuMAと同様に他の紡錘体形成因子のRan依存的な局在制御を解析するために、3つの主要な紡錘体形成因子TPX2, HSET, HURPおよびimportin- β の局在をRCC1デグロン下において解析した(図25A-D)。その結果、RCC1デグロン下においてTPX2の局在には影響せず、紡錘体におけるTPX2の輝度に優位な差はなかった (コントロール: 212.7 ± 127.3 , RCC1デグロン: 203.2 ± 119.1) (図25E)。

一方同様にHSETの局在を観察したところ、コントロールでは紡錘体全体に局在するのに対して、RCC1デグロン下では紡錘体の染色体近位の局在が減少している様子が観察された(図25F)。紡錘体の染色体近位と遠位でのHSETの輝度とSiR-tubulinの輝度の比率を計測したところ、染色体近位においてコントロールでは 5.68 ± 1.03 であるのに対して、RCC1デグロン下では 4.16 ± 1.34 であり優位な差が見られた。染色体遠位においてはコントロールでは 2.48 ± 0.61 であるのに対して、RCC1デグロン下では 2.55 ± 0.95 であり優位な差は見られなかった。

同様にHURPの局在を観察したところ、コントロールではキネトコア微小管に強く局在するのに対して、RCC1デグロン下では紡錘体全体に弱く局在する様子が観察された(図25G).

またimportin- β の局在を観察したところ、コントロールではキネトコア微小管と細胞質中にimportin- β は局在するのに対して、RCC1デグロン下ではキネトコア微小管への局在が消失した(図25H).

以上の結果から、RCC1によるRanGTP濃度勾配によってHSET, HURPの染色体近位の紡錘体局在が制御されるのに対して、NuMA, TPX2の局在には影響されないことが明らかになった(図25I).

4.4. HURPとimportin- β の共依存的な局在制御

HURPはimportin- β の直接結合によって不活性化されていることが報告されているが⁷⁹, 共にキネトコア微小管に局在しており、RCC1デグロン下ではどちらもキネトコア微小管の局在が減弱もしくは消失した. 局在様式がHURPとimportin- β で類似していたため、HURPとimportin- β をそれぞれデグロンした際の局在を解析し、局在の共依存性を確認した(図26A, B). その結果コントロールではimportin- β のキネトコア微小管への局在が確認されたのに対して、HURPデグロン下ではimportin- β のキネトコア微小管への局在が消失した(図26C). また紡錘体長比に関しては、コントロールでは 0.64 ± 0.05 であるのに対して、HURPデグロン下では 0.52 ± 0.06 であり優位な差が見られた(図26D). ただしSiR-tubulinの輝度に関しては、コントロールでは 2947 ± 1188 であるのに対して、HURPデグロン下では 2707 ± 1303 であり優位な差は見られなかった(図26E). 一方コントロールではHURPはキネトコア微小管に強く局在するのに対して、importin- β デグロン下ではキネトコア微小管の局在が減少し、紡錘体極への局在が増加した. 紡錘体極のHURPの輝度とSiR-tubulin輝度の比率を算出したところ、コントロールでは 0.52 ± 0.52 であるのに対して、importin- β デグロン下では 2.80 ± 2.57 であり、優位に増加した(図26F). 以上の結果から、HURPはimportin- β の不活性化制御を経ることでキネトコア微小管へ局在することが示された. それに伴い、importin- β もHURPと局在を共にし、キネトコア微小管に局在することが明らかになった.

4.5. RanGAP1依存的なHURPとimportin- β のキネトコア微小管への局在制御

上述の実験から, HURP, importin- β は, RCC1による染色体近位から遠位にかけての RanGTPの濃度勾配によってその局在が制御されることが明らかになった. そこで RanGAP1をAID法でノックダウンすることによって, 細胞内のRanGTP濃度の上昇をひきおこし, HURP, importin- β の局在がどう影響されるかを解析した(図27A, B). まず内在性RanGAP1の局在を観察したところ, 先行研究と同様に細胞質全体に分散しつつ, 一部がキネトコアに局在する様子が確認できた¹¹⁶. RanGAP1デグロン下におけるHURP, importin- β の局在を観察したところ, どちらも紡錘体全体に強く局在する様子が確認できた. 紡錘体極におけるHURP, importin- β のそれぞれの輝度を測定したところ, HURPの輝度 (コントロール: 0.047 ± 0.027 , RanGAP1デグロン: 0.136 ± 0.059), importin- β の輝度 (コントロール: 0.027 ± 0.0023 , RCC1デグロン: 0.059 ± 0.036) はどちらも優位に増加した(図27C, D). 以上の結果からRanGTP存在下では, HURPとimportin- β はその結合強度が増加することが示された.

第二章で用いた細胞株のゲノムPCRおよび免疫染色法による株確認を図28に示す.

4.6. 試験管内再構成によるHURP, importin- β , Ranの共局在の検証

HURPとimportin- β が染色体近位のキネトコア微小管に共局在する観察結果が得られたため, *In vitro*にてRanGTP依存的にHURPとimportin- β が微小管上に共局在するかを検証した. 先行研究では, 精製微小管にHURPを加えると微小管束化が確認され, importin- β およびGTPとの結合が極めて弱いRanの点変異体であるRanT24Nをそこに加えると微小管束化が解消し, さらにGTPとの結合を維持し続けるRanQ69Lを加えると微小管束化が再び確認されるという結果が報告されている⁷⁹. しかしこれまで*In vitro*ではHURP, importin- β の微小管上の局在が観察されていないため, それぞれ蛍光タグを施し, Ran依存的な局在変化を解析した. まず大腸菌で発現させたGFP-HURP, importin- β -SNAP, FLAG-RanT24N, FLAG-RanQ69Lを精製した(図29A-D). その後importin-SNAPに蛍光色素561-SNAPを加え, フィルターを用いて残存色素をろ過した. 647-チューブリンを重合させた微小管をスライドガラス上に結合させ, その後図の通りに混合した溶液と重合させた微小管を流すことで, HURP, importin- β , 微小管の輝度を測定した(図29E-G). HURP単独を加えた溶液と比較して, importin- β を加えると微小管の輝度を基に算出したHURPの輝度の比率が優位に減少した (HURP: 0.194 ± 0.0473 , HURP+importin- β : 0.0143 ± 0.00402). さらにRanQ69Lを加えるとHURPの輝度の比率がimportin- β を加えた場合よりも優位に増加した (HURP+importin- β +RanQ69L: 0.0675 ± 0.0178). これらの結果は先行研究と一致する結果となっている. ただし, HURPデグロン下において内在性importin- β は細胞質に拡散しており, 紡錘体微小管に結合していなかったものの, *In*

*vitro*においてimportin- β は微小管に非特異的に結合していた。このような細胞内の挙動とは異なる局在様式が観察された要因として、細胞内組成と異なることや他因子が存在しないことが挙げられる。そのため本実験では言及出来る点は限られており、少なくともimportin- β によってHURPの微小管への局在は低減するものの、RanGTP型Ran変異体であるRanQ69Lを加えるとその低減が緩和されることは示された。

5. 考察

5.1. 間期における γ -チューブリン非依存的な微小管生成

幅広い生物種および様々な細胞組織において、 γ -チューブリンからなる γ -TuRCが主要な微小管生成因子として同定され、その機能が解析されてきた。RNAi法などによって γ -チューブリンの発現や機能を低下させることで微小管生成への寄与を確認されてきたが、必須遺伝子であるため細胞内におけるノックアウトレベルの解析はこれまで不可能であった。そのため、主要な微小管生成活性を有する γ -チューブリンの存在によって顕在化しづらい、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成機構を解析することは非常に困難であった。そこで本研究ではCRISPR/Cas9法とAID法を組み合わせることによって、 γ -チューブリンをノックアウトレベルのノックダウンを可能とし、1細胞レベルでの γ -チューブリン非依存的な微小管生成機構の解析を実現した。

25°C微小管再重合実験では、間期においてch-TOG, CLASP1, CAMSAPsが γ -チューブリン非依存的な微小管生成に重要であることが明らかになった。より微小管生成に良好な条件である37°Cで微小管再重合実験を行ったところ、CLASP1非存在下では微小管生成が観測されるまでの時間が延長した。この結果から、分裂期と同様にCLASP1は微小管生成の最初期の段階で必要であることが示された一方、ch-TOGは微小管伸長に重要な機能を果たすことが明らかになった。CLASP1は間期において、ゴルジ体依存的な微小管生成を促進していることが知られており¹¹⁷, AKAP450, γ -チューブリンと共に γ -チューブリン依存的な微小管生成を促進することが報告されている^{47-49,117}。本研究で明らかになったCLASP1の γ -チューブリン非依存的な微小管生成は、CLASP1が単独でチューブリンもしくは微小管に作用する可能性を示唆している。CAMSAPsは γ -チューブリン非依存的な微小管伸長に関与することは本研究で明らかになったが、詳細な機能は不明な点が多く残っている。ただし先行研究では、CAMSAPsは微小管マイナス端の安定化¹³, 微小管生成に関わっているとされており⁶², 線虫ホモログでは γ -チューブリンを介して非中心体由来の微小管の配向を制御することも報告されている⁶¹。

5.2. 分裂期における γ -チューブリン非依存的な微小管生成

本研究では分裂期における γ -チューブリン非依存的な微小管生成の解析によって、CLASP1とTPX2がncMTOCの形成に必要であることが示された。TPX2はアフリカツメガエル卵抽出液やIn vitro再構成実験などにおいて、オーグミンや γ -チューブリン依存的な微小管分枝を促進させ²⁷, またGMP-CPP MT鋳型からの微小管生成に寄与していることが報告されている¹¹⁸。本研究により、TPX2は細胞内において、 γ -チューブリン依存的

な微小管生成だけでなく、 γ -チューブリン非依存的な微小管生成にも関与していることが明らかになった。これはリコンビナントTPX2を用いたIn vitro実験にて示された、TPX2は微小管生成を促進させるという報告と一致する¹⁶⁻¹⁸。CLASP1に関しては、In vitro解析から微小管のプラス端および側面を安定化することで、微小管のカタストロフ頻度を低減し、レスキューとポーズの頻度を増加させることが報告されている^{12,14,101}。分裂期においてはキネトコアでの機能について言及されていたが、これまで微小管生成に関する報告は無く^{119,120}、本研究によって初めて明らかになった。ただし、MTOC形成には微小管生成だけでなく、微小管伸長、安定化、集合などのプロセスも含むため、TPX2とCLASP1が微小管生成以外の機能を有する可能性は否定できない。

分裂期において ch-TOG と CAMSAPs は、 γ -チューブリン非依存的な ncMTOC 形成に必要ではないことが明らかになった。しかし CAMSAPs の非存在下では ncMTOC からの微小管伸長が高頻度で観察されたのに対して、ch-TOG の非存在下ではその伸長がほとんど観察されなかった。そのため微小管伸長因子として同定されている ch-TOG は、ncMTOC 形成時の微小管生成には必要ないものの、微小管伸長に決定的に機能することが明らかになった。本研究では ch-TOG の非存在下では、ncMTOC からの微小管伸長だけでなく中心体からの微小管伸長も低減されていたため、ch-TOG は中心体での γ -チューブリン非依存的な微小管生成に寄与している可能性が生じた。先行研究では線虫において、ch-TOG のホモログ ZYG-9 は中心体にてチューブリンを回収、集積し、チューブリン濃度を局所的に増加させることで微小管生成を促すということが報告されている¹²¹。しかし本研究で行った微小管再重合実験では、中心小体内腔の微小管によって構成されるカートホイール構造を完全に脱重合出来ていないため、微小管側面からの微小管依存的微小管生成の可能性が否定できない。そのため、本研究の結果のみでは ch-TOG の中心体における γ -チューブリン非依存的微小管生成の有無については断定できない。この仮説は、今後中心体における微小管生成について解析する上では重要な情報となる可能性が十分にある。

5.3. CLASP1とTPX2による γ -チューブリン非依存的な微小管生成機構

本研究ではCLASP1とTPX2が γ -チューブリン非依存的な微小管生成に機能することが明らかになったが、詳細な分子機構については不明な点が残されている。全反射顕微鏡を用いた解析では、CLASP1は微小管生成の瞬間に検出限界を超えるほどの集積は見られなかった。 γ -チューブリン依存的微小管生成は、 γ -チューブリンが含まれる13のサブユニットによって構成される γ -TuRCが鋳型となるため、CLASP1を介した微小管生成の機構はこれと異なることが予想される。TPX2とCLASP1はチューブリンの縦軸方向の側面

に結合することが報告されており¹²², TPX2に関しては相転移による凝集によってチューブリン濃度を上昇させることで微小管生成を促すことが報告されている⁶³.

微小管に取り込まれていない α/β -チューブリンヘテロダイマーは, T5ループによる長軸方向から10°程度の傾斜をもち, *curved tubulin*と呼称されており, 微小管に取り込まれた後にはGTP依存的なT5ループの構造変化によって傾斜が解消され, *straight tubulin*となることが報告されている^{123,124}. 近年電子顕微鏡を用いた解析によって明らかになった, 微小管生成の初期段階において*straight tubulin*がオリゴマーを形成することでその後の微小管生成や微小管伸長が促進されるという興味深い報告がされた¹²⁵.

この報告が真であるとするならば, 微小管生成活性を有するTPX2やCLASPがチューブリン結合によって*curved tubulin*を*straight tubulin*に矯正することで微小管生成を促進させるという仮説が考えられる. 今後*In vitro*における解析によって証明されるべき仮説であると考えている.

XMAP215 や CLASP は TOG ドメインを有しており, このドメインはチューブリン結合活性を有している. どちらの TOG ドメインにもチューブリン結合部位が2箇所存在しているが, α/β -チューブリンヘテロダイマーの反り具合に応じてそれぞれの TOG ドメインの結合接点数が異なることが報告されている¹²³. この報告では, *ch*-TOG の TOG ドメインは *straight tubulin* には1点で, *curved tubulin* には2点での結合が予想されているが, CLASP の TOG ドメインは *curved tubulin* ですら1点でのみ結合すると予想されている. この構造の違いが, 同じ TOG ドメインを有する MAPs 間での微小管伸長と微小管生成への寄与の違いを生み出している可能性が考えられる.

5.4. γ -チューブリンと独立した微小管生成が有する生物学的意義

生体内では γ -チューブリン依存的な微小管生成が主要と考えられるが, 本研究で用いたHCT116細胞に対して全反射顕微鏡を用いて微小管生成を観察したところ, 想定通り中心体付近からの γ -チューブリン依存的な微小管生成が主要であり, γ -チューブリン非依存的な微小管生成を観察することは困難であった. 本研究で明らかになった γ -チューブリン非依存的な微小管生成機構が生体内で実際に機能しているのだろうか. ヒト培養細胞以外では γ -チューブリン存在下での γ -チューブリン非依存的な微小管生成を解析した事例がいくつか報告されている. ヒメツリガネゴケの原糸状細胞において, 全反射顕微鏡を用いた解析において, 生成された微小管のうち10%の微小管のマイナス端に γ -チューブリンのシグナルが確認されなかった⁵⁵. また中心体が存在しないショウジョウバエの脂肪体細胞では, 核近傍のMTOC形成に γ -チューブリンは必要ではなく, *ch*-TOGによってリクルートされるCAMSAPとNineinがMTOC形成に必要であることが報告されている¹²⁶. 少なくともこれら植物細胞および動物細胞においては γ -チューブリン非依

存的な微小管生成の存在およびその役割は報告されているため、本研究で明らかになった微小管生成機構についても十分に生物学的意義を有していると考えられる。

線虫神経細胞ではCAMSAPのホモログであるPTRN-1が微小管配向に重要であることが報告されており¹²⁷, またショウジョウバエの減数分裂においてTPX2ホモログであるSsp1/mei-38は染色体分配に必須であることが報告されている¹²⁸. 本研究では結腸がん細胞由来のHCT116細胞を用いたが, 上述の中心体遠位で微小管生成する必要がある神経細胞の軸索先端や中心体を有さない減数分裂においては, γ -チューブリン非依存的な微小管生成がより重要であることが予想される。

5.5. Ran-importin 経路によるSAFsの局在制御

先行研究から, SAFsはRan-importin経路によってその局在が制御されていると考えられていたが, 間期における細胞内機能への影響があるため, これまで分裂期におけるRan-importinによるSAFs局在制御に関する解析は未解明な点が多く残されていた(図30A). 本研究ではCRISPR/Cas9法とAID法を組み合わせることによって, 細胞分裂期特異的に内在性目的タンパク質を分解することが可能となり, 未解明であった分裂期におけるRan-importin経路によるSAFsの局在制御に関する知見を得ることに成功した. SAFsのうちNuMAおよびTPX2の局在は, Ran-importin経路によっては制御されないことが明らかとなり, 先行研究の報告と一致する結果が得られた(図30B). 先行研究では, RanGTPの濃度の増減によってNuMAの局在は大きく影響しないことが報告されていた⁷⁸. またTPX2に関してはRan-importin経路だけではなく, ゴルジ体に局在するGM130依存的な経路や¹²⁹, パルミトイル化反応によってimportin- α による制御が外れ, 機能が活性化されることが報告されている¹³⁰. 加えてNEK9によるNLSのリン酸化が, TPX2の機能および局在に影響することが報告されている¹³¹. 特にNuMAのNLSに対するRan経路以外の制御に関しては不明な点が多く残っているため, NLSを介したその他経路によるNuMAの機能および局在の制御機構の解明が正常な紡錘体形成や染色体分配の理解に繋がる。

一方NuMAとは異なり, 先行研究から予想されたとおりHURPはRan依存的に局在が制御されることが明らかになった⁷⁹. 驚くべきことにRanGTP存在下においてもHURPとimportin- β が染色体近傍に共局在することが明らかとなった. さらにRanGTPが飽和状態になると考えられるRanGAP1デグロン下において, HURPとimportin- β はそれぞれ紡錘体全体に局在する様子が観察された. これらの結果からは2つの仮説が考えられ, HURPとimportin- β は染色体近傍にてRanGTPを介してダイナミックに結合と乖離を繰り返すという仮説, またはHURP, importin- β , RanGTPが染色体近傍にて共依存的に局在するという仮説が予想された. 前者は清光 智美博士によって行われた, 光褪色後蛍光回復法(FRAP)を用いたimportin- β の存在/非存在下におけるHURPのターンオーバーを解析することで検証された. この解析では, 光褪色後にコントロール細胞ではHURPのターン

オーバーが観察されたのに対して, importin- β デグロン下ではそのターンオーバーが観察されなかったという結果が得られた. この結果から, HURPのキネトコア微小管への局在様式の確立およびその維持に対して, importin- β による微小管結合活性の抑制が重要な役割を果たすことが明らかになった. 後者の仮説も考慮し, 試験管内再構成実験にて HURP, importin- β , RanGTPの局在を観察したが, importin- β の微小管への非特異的な結合が確認されたため, 三者の共局在を示すことは出来なかった.

HSETはHURPと同様に, 先行研究と一致してRan依存的な局在制御がされていることが明らかになった. 先行研究では, HSETのNLSにimportinと結合出来ないように変異を挿入した場合, 染色体近傍でのNLS変異HSETのターンオーバーが遅延したことが報告されている¹³². HURPの局在制御と同様に, HSETも染色体近傍において紡錘体微小管にダイナミックに結合と乖離を繰り返すと予想している.

5.6. Ran-importin経路によるSAFs局在制御の細胞分裂への寄与

先行研究からRan-importin経路による細胞分裂期にSAFsの局在制御についてある程度の仮説が立てられていたが, 本研究ではその予想を厳密に明らかにしつつ, さらに予想とは異なり, NuMAおよびTPX2は分裂期における紡錘体への局在はRan依存的不是ではないことが示され, またHURP, importin- β 間の結合強度がRanGTP依存的に増加していることが示された. この結果をもとに正常な紡錘体形成や染色体分配への寄与について議論する. 細胞分裂においてキネトコア微小管は染色体分配に非常に重要な構造となっているが, この微小管構造は低温条件下においても安定的な構造であることが報告されている⁷⁹. HURPとimportin- β のそれぞれのデグロン下において低温条件でのキネトコア微小管の安定性について清光 智美博士が観察したところ, importin- β デグロン下ではキネトコア微小管の存在が確認されたものの, HURPデグロン下ではその存在が失われていた(データは示さない). そのためRan-importin経路によるHURPの染色体近傍への局在がキネトコア微小管の安定性向上に貢献することが示唆された.

またRanGAP1デグロン下において特徴的な表現型は確認されなかったものの, HURPとimportin- β は紡錘体全体に局在する様子が観察された. 本研究で用いたHCT116細胞ではこのように特徴的な表現型は確認されなかったものの, 先行研究ではHela細胞において, RanGAP1と結合し, 複合体を形成するRanBP2のRNAiノックダウンによって紡錘体の多極化などの表現型が確認されている¹¹⁶. またマウス減数分裂において, RanT24NおよびRanQ69Lを外部から細胞に注入したところ, RanT24Nを注入した場合には紡錘体形成にかかる時間が延長し, RanQ69Lを注入した場合には異常に伸長した紡錘体を確認された⁸⁷. そのためRanGAP1によるSAFsの局在制御は, 細胞腫ごとにまた細胞分裂の様式に応じて必要性が異なることが考えられる.

本研究で用いた HCT116 細胞では HURP のデグロンによって細胞分裂や紡錘体形成において致命的な表現型は観察されなかったものの、マウス減数分裂や U2OS 細胞において HURP の機能阻害は紡錘体の多極化や染色体分配異常が生じることが報告されているため^{133,134}、こちらも細胞腫ごとにまた細胞分裂の様式に応じて必要性が異なることが考えられる。

6. 手法

6.1. プラスミド作製方法, 細胞培養方法, 細胞株樹立方法および用いた抗体

CRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集およびAID法は先行研究に従い, 標準的な手法を用いた^{74,96}. 用いた組換え用ドナープラスミドおよびCas9-sgRNAプラスミドは表1, 2に示した. 組換え用の相同配列を取得するために, ゲノムPCRによって組換え領域の前後500 bp程度の配列を増幅し, 両配列の間にBamHI 制限酵素配列を挿入した後, pBluescriptのMCS領域にIn-fusion (Takara) によって挿入した. もしくはEurofins Genomics K.K.またはGenewizに依頼し, 目的遺伝子の組換え箇所の200 bp程度の相同配列を有したプラスミドを遺伝子合成によって取得した. その後BamHI制限酵素配列を両端に持つmAID配列, 蛍光タンパク質配列, 薬剤耐性遺伝子配列を有したカセットをライゲーションによって挿入することで組み替え用ドナープラスミドを作製した. Cas9-sgRNAプラスミドは, pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (addgene,¹³⁵) に対してsgRNA配列を含んだDNA配列をBbsI 制限酵素処理とライゲーションによって挿入することで作製した.

ノックインおよびノックアウト株の樹立のため, Effectene (Qiagen)を用いて組換え用ドナープラスミドとCas9-sgRNA プラスミドをトランスフェクションした. 薬剤セレクションには1 μ g/mL puromycin (Wako Pure Chemical Industries), 800 μ g/mL G418 (Roche), 200 μ g/mL hygromycin B (Wako Pure Chemical Industries), 8 μ g/mL blasticidin S hydrochloride (Funakoshi Biotech) を用いた. トランスフェクションの4日後に薬剤セレクションを始め, その4-5日後に薬剤入りの新しい培地に交換し, 10-14日後に形成されたコロニーを採取した. 10 cm培養容器中のコロニーをPBSで1回洗浄した後に顕微鏡 (EVOS XL, Thermo Fisher Scientific) 下でピペットマンを用いて回収した. その後数分間50 μ L trypsin-EDTAを用いて細胞を乖離させ, 24ウェル培養容器中の500 μ L培地にそれぞれのコロニー溶液を加え, ゲノムDNA回収用にそのうち200 μ Lを96ウェル培養容器に移した. ゲノムDNA回収のために, 96ウェル培養容器中の増殖した細胞をPBSで洗浄した後に90 μ Lの50 mM NaOHを加えて細胞を溶出し, 10分間煮沸した. その後10 μ Lの100 mM Tris-HCl (pH9.0)を加えて平衡化した. ゲノムPCRによる株の確認は, Tks Gflex DNA polymerase (Takara Bio) と表3に示したプライマーを用いて行った. ウェスタンブロットによる株の確認の際には表4に示した抗体を用いた. SDS-PAGE用溶液の作製は標準のプロトコルに従ったが, ch-TOGのサンプル調整のみ4 M尿素を含んだサンプルバッファーを用いて室温で10分間変性させた. 第一章で用いた主要なプラスミドおよび細胞株は林 久登修士および仁科 桃子氏によって樹立された. 細胞培養は主に5 % CO₂下で37 °Cの恒温を維持しつつ, 培地は10 %ウシ血清, 1 %ペニシリン-ストレプトマイシンを含んだMcCoy's 5A(Gibco)を用いた. AIDの活性化には2 μ g/mL ドキシサイクリンを20-24

時間投与し, 500 μ M IAAを実験の種類ごとに図で示した時間に投与した. RNAi法には Lipofectamine RNAiMAX (in vitrogen) を用いて, 表5に示した80 nM siRNAを加えた.

6.2. ショ糖密度勾配法

ショ糖密度勾配法は先行研究を参照した²⁸. 100%コンフルエントの細胞を回収した後, 800 μ l溶出バッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 100 μ M GTP, protease inhibitors) 中にて27 G注射針を用いて溶解した. TLA100.3ローター (Beckmann) を用いて50,000 rpmで15分間2回遠心した後, Gradient Station (BIOCOMP) を用いて10-40%のショ糖密度勾配を形成させた超遠心用のSETONチューブ (#7022) に上清500 μ lを加え, MLS-50ローター (Beckmann) を用いて 4 °C 50,000 rpmで3時間45分間超遠心した. 各フラクションはGradient Stationに連結したMicroCollector (AC-5700P, ATTO) を用いて回収した. 分子量マーカーとして Aldolase (7.4S) と thyroglobulin (19S) を用いた.

6.3. タンパク質精製およびIn vitro微小管結合能の解析法

HURPを除く importin- β , RanQ69L, RanT24Nについては, 大腸菌コンピテントセルである SoluBL21で発現を誘導し, HURPは昆虫細胞である Sf21細胞で発現を誘導することでタンパク質精製を行った. SoluBL21を用いたタンパク質精製については, 発現用プラスミドを形質転換した後, アンピシリンを含む500 ml L-rich培地を用いてOD値が0.5-1.0になるまで37 °C 200 rpmで培養した. その後終濃度10 nM IPTGを添加することで発現を誘導し, 18 °C 200 rpmで16-24時間培養した後, 遠心によって細胞を回収した. Sf21を用いたタンパク質精製については, TransIT-insect reagent (Mirus Bio) を用いて作製したバキュロウイルス液を $1.5-2.0 \times 10^6$ /mlのSf21細胞を含む50 ml PFSM培地 (Wako Chemical Industries) に加えて, 27 °C 120 rpmで48時間培養することで発現誘導を行った後, 遠心によって細胞を回収した. 回収した細胞に破砕バッファー (50 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 500 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1/2,000 benzonase, peptide cocktail (1 μ g/ml leupeptin, pepstatin, chymostatin, aprotinin), 0.5 mM PMSF, 0.5% NP40) を加え, 氷上でホモジェナイザー (450DA; Branson) により超音波破砕を行った. 破砕液を4 °C 7,900 rpmで15分間遠心分離し, Ni-NTAビーズと4 °Cで60分間反応させた. 反応後, 洗浄バッファー (破砕バッファー, 20 mM imidazole)で洗浄した後, 溶出バッファー (破砕バッファー, 250 mM imidazole)で目的タンパク質を溶出した. その後, PD MiniTrap G-25 (GEヘルスケア) を用いてバッファーを脱塩バッファー (MRB80,

75 mM KCl, 1 mM DTT, 20 % ショ糖) に置換した. 回収した溶液は液体窒素で凍結し, -80 °Cで保存した.

In vitro微小管結合能の解析は, シラン化したカバーガラスを2 mm程度の隙間を空けてスライドガラスに両面テープで固定したチャンバー上で行った. チャンバーに5 %抗ビオチン抗体 (in vitrogen) を流した後, MRB80で洗浄し, 1 % Pluronic F127 (in vitrogen) を流してブロッキング反応を行い, MRB80で洗浄した. 反応バッファー (MRB80, 75 mM KCl, 0.5 mg/ml κ -casein, 0.1 % methylcellulose, oxygen scavenger system (50 mM glucose, 400 μ g/ml glucose-oxidase, 200 μ g/ml catalase and 4 mM DTT), 50 μ M ショ糖)でGMPCPP シードビオチン化微小管 (80 μ M ブタチューブリン, 10 μ M Alexa Fluor 647標識ブタチューブリン, 10 μ M ビオチン化ブタチューブリン, 1 mM GMPCPP)を1 μ Mに希釈してチャンバーに流し, 抗ビオチン抗体と架橋させた. その後MRB80で洗浄した後, 反応液(反応バッファー, 1 μ M GMPCPP シード微小管 (90 μ M ブタチューブリン, 10 μ M Alexa Fluor 647標識ブタチューブリン, 1 mM GMPCPP), 図で示した濃度の精製タンパク質)を流し, 蠟で封じた. 作製したサンプルは即座に全反射顕微鏡を用いてイメージングを行った.

6.4. 顕微鏡を用いた生細胞の観察方法

生細胞の観察にはガラス底ディッシュ (CELLview™, #627870; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) を用いた. 観察時にはステージヒーター (Tokai Hit) を用いて37 °C 5 % CO₂を維持したが, 微小管再重合実験では主に25-26 °Cの室温で行い, 5 % CO₂のみ供給した. 微小管の可視化には50 nM SiR-tubulin (Spirochrome) で1時間以上の染色を行い, DNAの可視化には50 ng/mL Hoechst® 33342 (Sigma-Aldrich) で1時間以上の染色を行い, SNAP標識のHURPの可視化には 0.1 mM TMR-Star (New England BioLabs) で2時間以上の染色を行った後に観察前にはTMR-Star不含培地に交換した.

第一章の一部および第二章の観察実験では先行研究を参照し⁷⁴, CSU-W1 (Yokogawa Electric Corporation) とORCA-Flash4.0 digital CMOS camera (Hamamatsu Photonics) を搭載したECLIPSE Ti-E倒立顕微鏡 (Nikon) 下で60×1.40 NA レンズ (Nikon) を用いて観察が行われた. 画像取得にはMetamorph (Molecular Devices) が用いられた. 第一章では主に, A CSU-X1 (Yokogawa Electric Corporation) とEMCCD カメラImagEM (Hamamatsu Photonics) を搭載したTi-E倒立顕微鏡 (Nikon) 下で60×1.40 NA lens (Nikon) を用いて観察が行われた. 撮影取得にはNIS-Elements software (Nikon) が用いられた. 共焦点顕微鏡で生細胞を観察した際には, 1 μ m x 3枚または5枚のz-sectionで画像を取得し, 細胞分裂期の撮影では5分ごと1時間の撮影を行い, 微小管再重合実験では30秒ごと30分間の撮影を行った. 第一章で行われた全反射顕微鏡を用いた解析は先行研究を参照し⁵⁵,

EMCCDカメラEvolve (Roper) と 100×1.49 NA lens (Nikon) を搭載したEclipse Ti顕微鏡 (Nikon) を用いて観察が行われた。全反射顕微鏡で細胞表面をより鮮明に観察するために、4 mm 四方に切り出したカーバーガラスを細胞上部から押し付けた。撮影は2秒ごと30分間行い、その取得にはNIS-Elements software (Nikon) が用いられた。図で表示された画像はMaximum intensity projection (Fiji)を行っており、輝度の測定では単一焦点面画像を用いた。画像の輝度はFijiによって調整した。

6.5. 微小管再重合法

微小管再重合実験において、各試薬は図で示したフローチャートに基づいて添加した。ガラス底ディッシュで培養した細胞に対して、間期での観察では 40 ng/mL ノコダゾールを氷上で4時間処理することで微小管の脱重合を促し、分裂期前中期の観察では 40 ng/mL ノコダゾールを 37 °C で 20-24 時間処理することで微小管の脱重合を促した。微小管脱重合後、室温下で1分ごとに 700-800 μ l の培地で2回洗浄した後、即座に共焦点顕微鏡または全反射顕微鏡を用いて観察を行った。ヒト培養細胞の適温培養条件である 37 °C では微小管再重合が著しく早く、培地交換後2分以内に再重合が観察された。そのため微小管再重合の初期段階を観察するために、ほとんどの微小管再重合実験は室温下で行われた。分裂期キナーゼの阻害薬は観察の2時間前から処理しており、それぞれ 10 μ M BI2336, 10 μ M ZM447439, 0.5 μ M Alisertib の濃度で処理を行った。

6.6. 統計解析方法

-1. 分裂時間の測定

核膜崩壊期から分裂期後期までの時間を分裂時間と定義した。図では核膜崩壊期を基準に0分として、その前後の時間を示した。

-2. SAFsとSiR-tubulinの輝度測定

SAFsとSiR-tubulinの輝度は、紡錘体極間を横断した15ピクセルの直線上における輝度から測定した。紡錘体極におけるSAFsの輝度は、上記の直線上でSiR-tubulinの輝度がピークとなる地点での輝度から測定した。両者ともバックグラウンドとして細胞外の領域の輝度を減算した。

-3. デグロン効率の検証の際の輝度測定

透過光観察によって細胞輪郭を同定し、その領域内のTubG1-mCloverのシグナルを計測して平均値を算出し、そこから細胞外領域の輝度の平均値をバックグラウンドとして減算した。

-4. 全反射顕微鏡を用いた微小管再重合の開始時間の測定

微小管再重合を行った後のSiR-tubulinの観察下において、バックグラウンドより強い輝点が6秒間維持された際に、その輝点が出現した時間を微小管再重合の開始時間と定義した。

-5. 間期微小管再重合実験におけるSiR-tubulinの輝度測定

微小管付随因子の微小管再重合への寄与を解析するために、微小管再重合の30分後の細胞のSiR-tubulinの輝度を測定した。細胞核内の著しく低いSiR-tubulinの輝度を考慮するため、以下の計算式でより正確な微小管輝度を算出した。

細胞内微小管の平均輝度 = (細胞全体の輝度 - 核内の輝度) / (細胞全体の面積 - 核内の面積)

-6. 分裂期微小管再重合実験におけるde novo MTOC形成時間の測定

微小管再重合の観察を開始してからncMTOCが形成されるまでの時間を計測し、図では2.5分間隔でその分布を示した。SiR-tubulinのシグナルを観察し、細胞内バックグラウンドと比較して著しく輝度が高い点状のシグナルをde novo MTOCと定義した。

-7. 微小管再重合実験における微小管伸長速度および再重合開始時間の測定

SiR-tubulinが微小管再重合に影響を与えている可能性を考慮し、SiR-tubulinの添加/非添加条件で微小管動態を解析した。間期微小管動態の測定にはch-TOG-mCherryを用いており、ch-TOGのシグナルによって微小管プラス端が可視化される。このシグナルを解析し、微小管の伸長速度、および再重合開始時間を算出した。微小管の伸長速度は、Fijiを用いてカイモグラフを作成することで算出した。再重合開始時間については、ch-TOGのシグナルを観察し、細胞内バックグラウンドよりも強い輝点を確認され、その数秒後コメント状に移動した場合に初めて再重合した微小管であると定義し、シグナルが確認された時間を再重合開始時間と定義した。

分裂期ではTPX2-mCherryを用いて微小管再重合後のncMTOC数とその形成開始時間を測定した。ncMTOCの形成開始時間はTPX2のシグナルを観察し、細胞内バックグラウンドと比較して著しく輝度が高い点状のシグナルが出現した時間と定義した。その後中心体からの微小管再重合が確認された際、細胞質中のncMTOC数を計測した。

-8. 統計解析

全てのグラフの作成および統計解析は Prism (GraphPad) を用いて行った. 2 サンプル間の平均値の統計解析には Welch's t test を用いた. 4 サンプル間の平均値の統計解析には one-way ANOVA 解析を行った後に Tukey's test を行った. 危険率は $p < 0.05$ の場合は “*”, $p < 0.01$ の場合は “**” で図に示し, それぞれの値は図説明中に記載した. また mean \pm SD で図にエラーバーを示した.

7. 動画説明

動画1 分裂期におけるch-TOG, CLASP1, TPX2の局在

上段: TubG1-mAC+ch-TOG-mCh, 中段: TubG1-mAC+CLASP1-mCh, 下段: TubG1-mAC+TPX2-mChの分裂期タイムラプス. スケールバーは10 μm .

動画2 分裂期におけるTubG1デグロン細胞の表現型

左列: コントロール細胞, 中列, 右列: TubG1デグロン細胞の分裂期タイムラプス. TubG1をマゼンタ, SiR-tubを緑で示した.

動画3 全反射顕微鏡を用いたTubG1デグロン下での微小管再重合

TubG1デグロン下での間期微小管再重合におけるSiR-tubのタイムラプス. 生成され, ループ状の形態を持つ微小管を白矢印で示した.

動画4 各デグロン条件での間期微小管再重合

TubG1デグロン(左上), TubG1/ch-TOGダブルデグロン(右上), TubG1/CLASP1ダブルデグロン(左下), TubG1-mAC+CAMSAP3 KO+CAMSAP1/2RNAi (右下) 細胞におけるSiR-tubシグナルのタイムラプス. デグロン細胞を白丸で示した.

動画5 各デグロン条件での分裂期微小管再重合

コントロール(左上), TubG1 デグロン(右上), TubG1/ch-TOG ダブルデグロン(左下), TubG1-mAC+CLASP1-mACh+TPX2 RNAi (右下) 細胞における SiR-tub シグナルのタイムラプス. デグロン細胞を白丸で示した.

8. 図

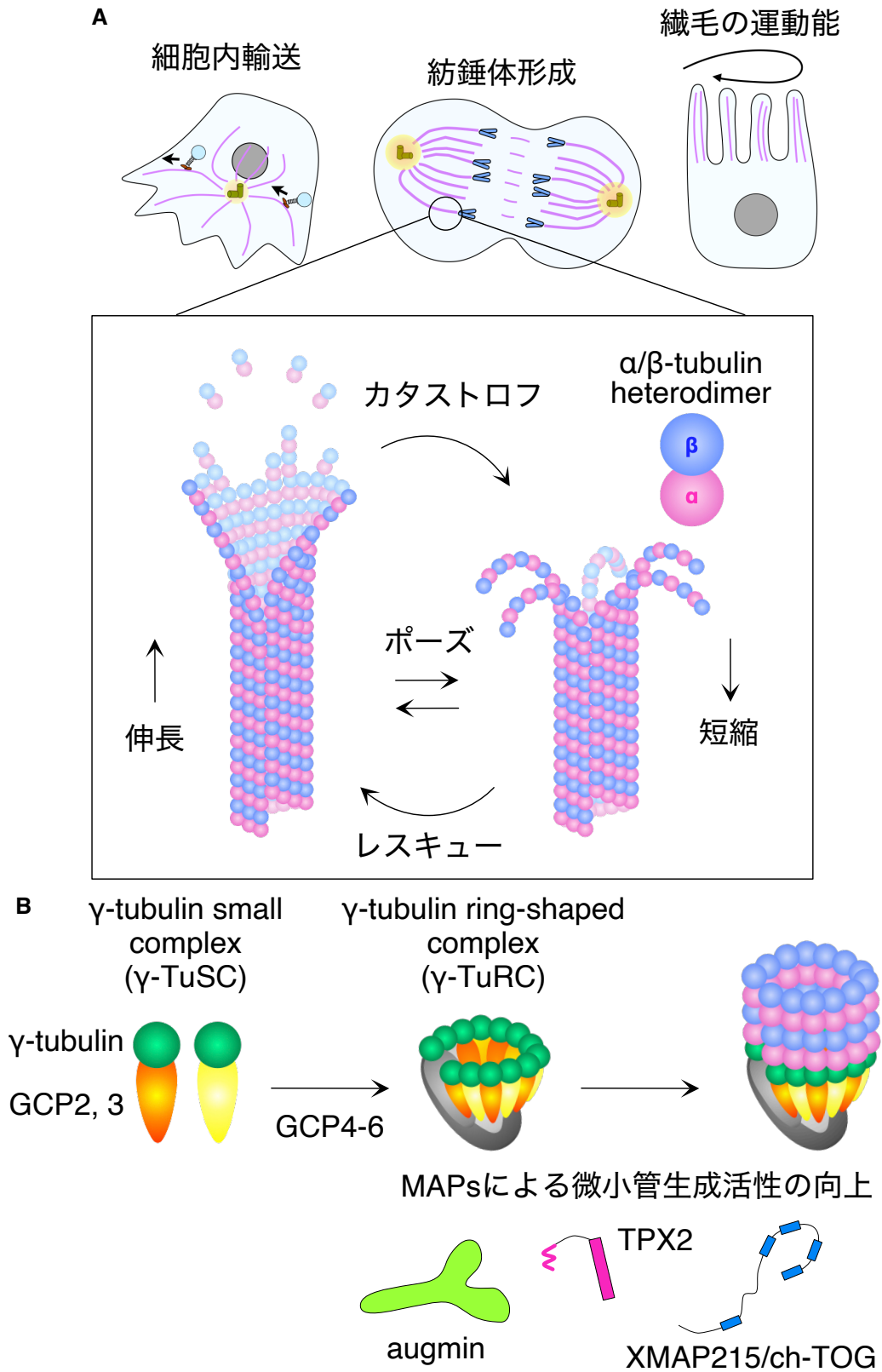
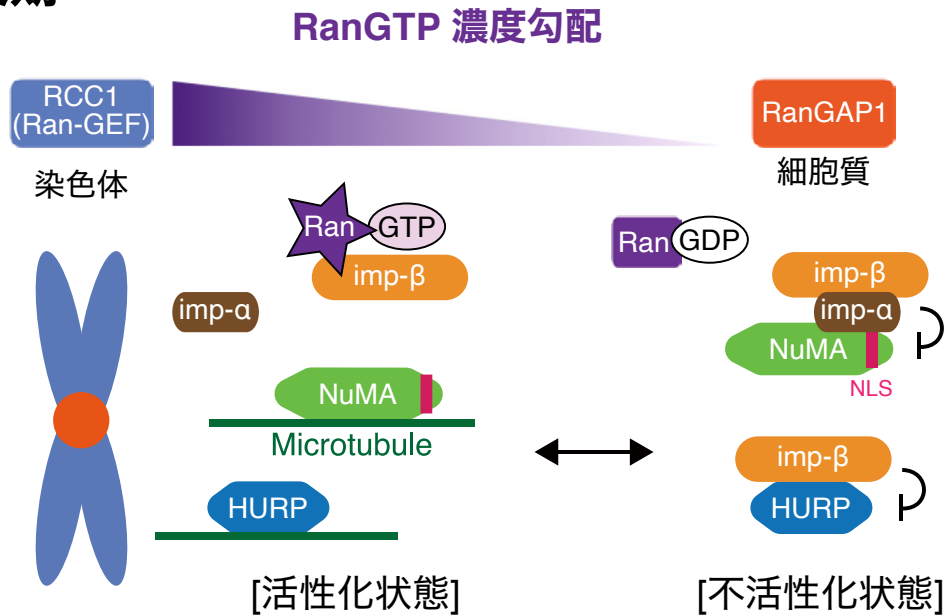


図1 微小管の構造および γ -チューブリン依存的微小管生成

A: 生命現象に幅広く関わる微小管の構造および動態. 微小管は α/β -チューブリンヘテロダイマーによって構成された中空状の重合体であり, 伸長と短縮を繰り返す動態を示す. 微小管動態の制御は間期微小管網構築, 紡錘体形成, 繊毛や鞭毛の運動能の制御など様々な細胞内機能に重要な役割を果たす. B: 主要な微小管生成因子である γ -TuRCおよびその生成活性増進因子. γ -チューブリンおよびGCP2, 3によって γ -TuSCが形成され, さらにGCP4-6によって γ -TuRCが形成される. γ -TuRCは微小管マイナス端の鋳型となることで微小管生成を促進させる. TPX2, ch-TOG, augmin等によって γ -TuRCの微小管生成活性が向上する.

分裂期



間期

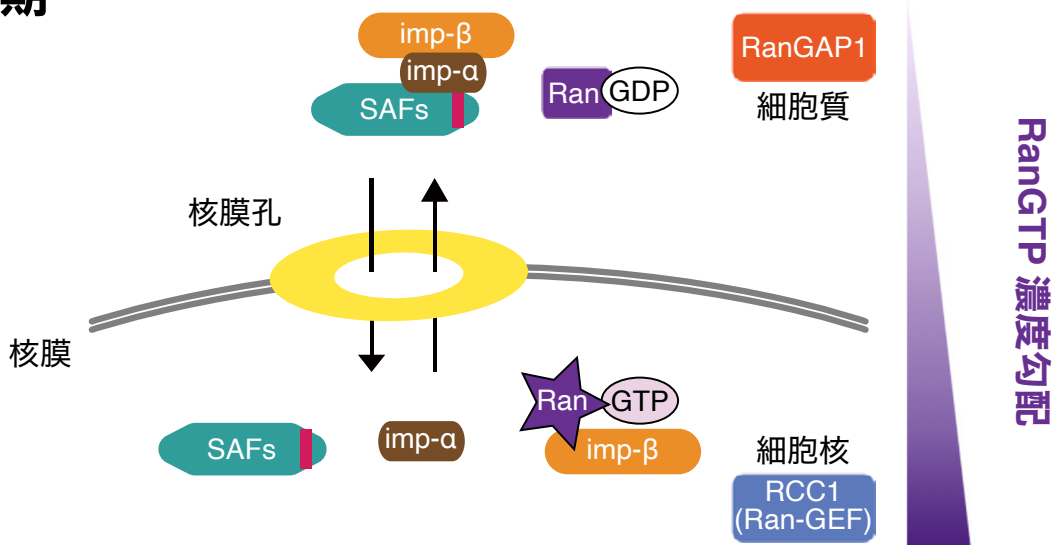


図2 Ran依存的な紡錘体形成因子の間期および分裂期局在制御の現行モデル

RCC1 は分裂期では染色体に、間期では核内に局在し、RanGAP1 は分裂期および間期ともに細胞質に拡散している。これにより、分裂期では染色体近遠軸、間期では核内外で RanGTP 濃度勾配が形成される。SAFs は importin- α および importin- β と結合すると機能が不活性化される。RanGTP の結合により importin のタンパク質結合状態が変化し、SAFs は importin と解離するとともに不活性化制御も外れる。そのため RanGTP 濃度勾配によって SAFs の局在が制御されていると考えられている。

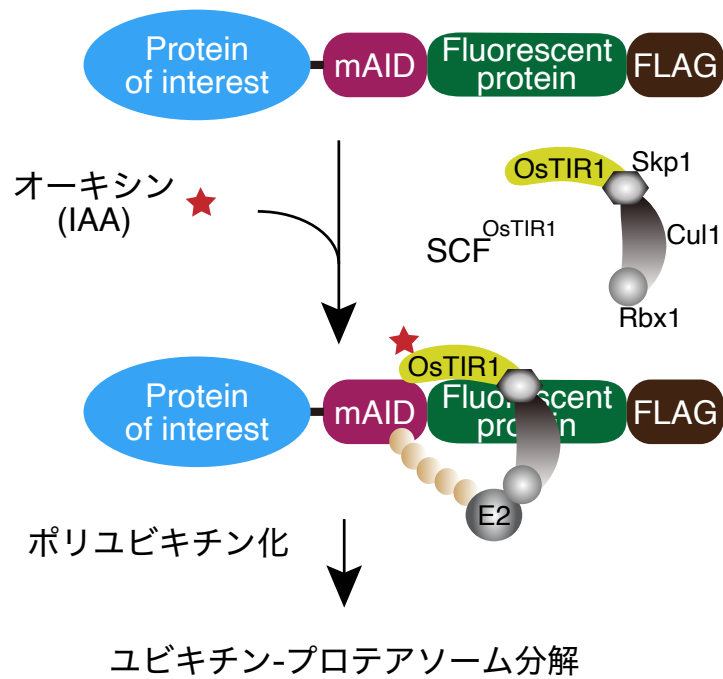
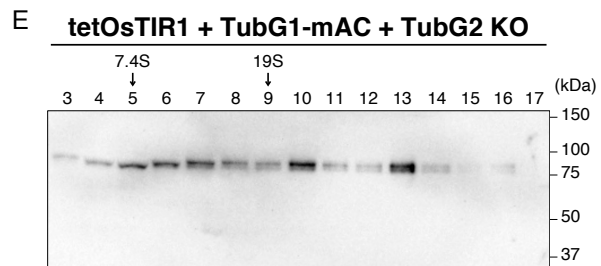
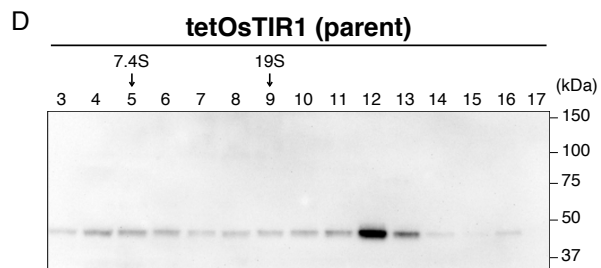
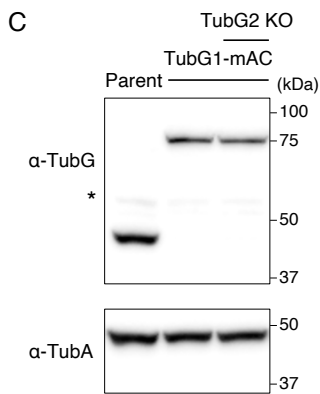
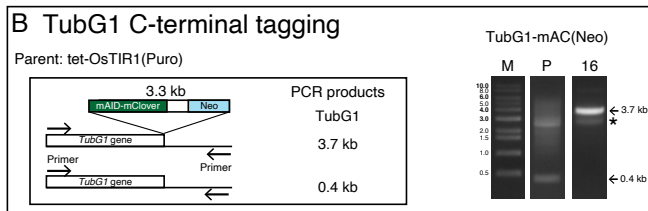
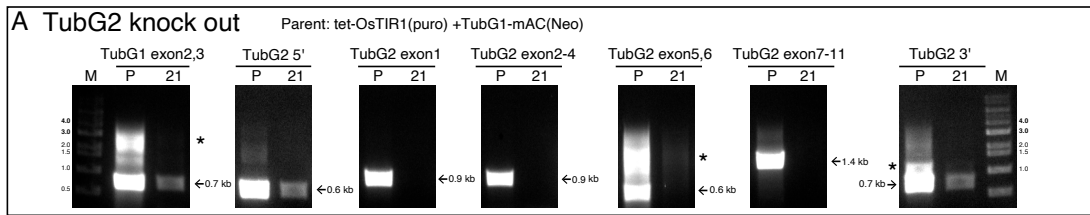


図3 AID法の作用過程の模式図

OsTIR1発現細胞にCRISPR/Cas9法によって目的遺伝子にAID配列と蛍光標識を行い、オーキシシンを投与することで、ポリユビキチン化を経てプロテアソームユビキチン分解が誘導される。



F TubG1-mAC localization in mitosis

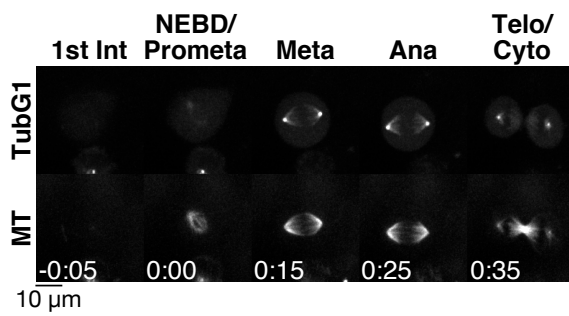


図4 内在性TubG1の蛍光標識株作製および細胞内局在

A: 親株をP (parent), 得られた株の識別番号 (16, 21) を各泳動写真の上部に記載した. 親株に対してTubG1のC末mAC標識により, 3.7 kbのDNA断片が増幅する. B: Aに対してTubG2の全長をBSD耐性遺伝子に置換した際のゲノムPCR. コントロールとしてTubG1 exon2-3, TubG2 5', TubG2 3'領域のDNA断片が増幅し, TubG2 ORF内の各エキソン内ではDNA断片は増幅しない. C: A, Bに対する免疫染色により, TubG1のバンドシフトが確認された. D, E: 親株とBの株に対するショ糖密度勾配法による γ -チューブリン複合体の分子量比較. F: 細胞分裂期を通したTubG1の局在解析.

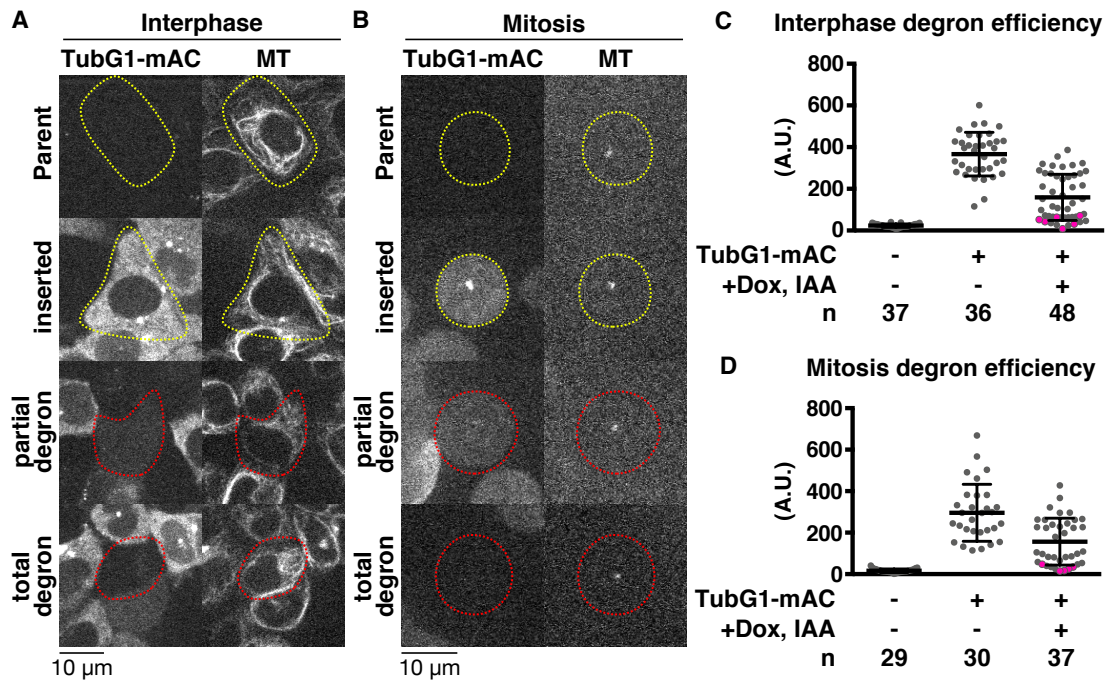


図5 TubG1のデグロン効率

A,B: 間期 (A) と分裂期 (B) における親株およびTubG1-mAC株のコントロール細胞とデグロン細胞のシグナル解析. コントロール細胞を黄点線, デグロン細胞を赤点線で示した. C: AにおけるTubG1-mACの輝度. 左から 23.4 ± 8.25 , 366 ± 104.7 , 159 ± 110.9 . D: BにおけるTubG1-mACの輝度. 左から 16.6 ± 8.78 , 295.8 ± 137.1 , 156.6 ± 113.1 . 完全にデグロンされていると判断した細胞をマゼンタで示した. エラーバーは $\text{mean} \pm \text{SD}$.

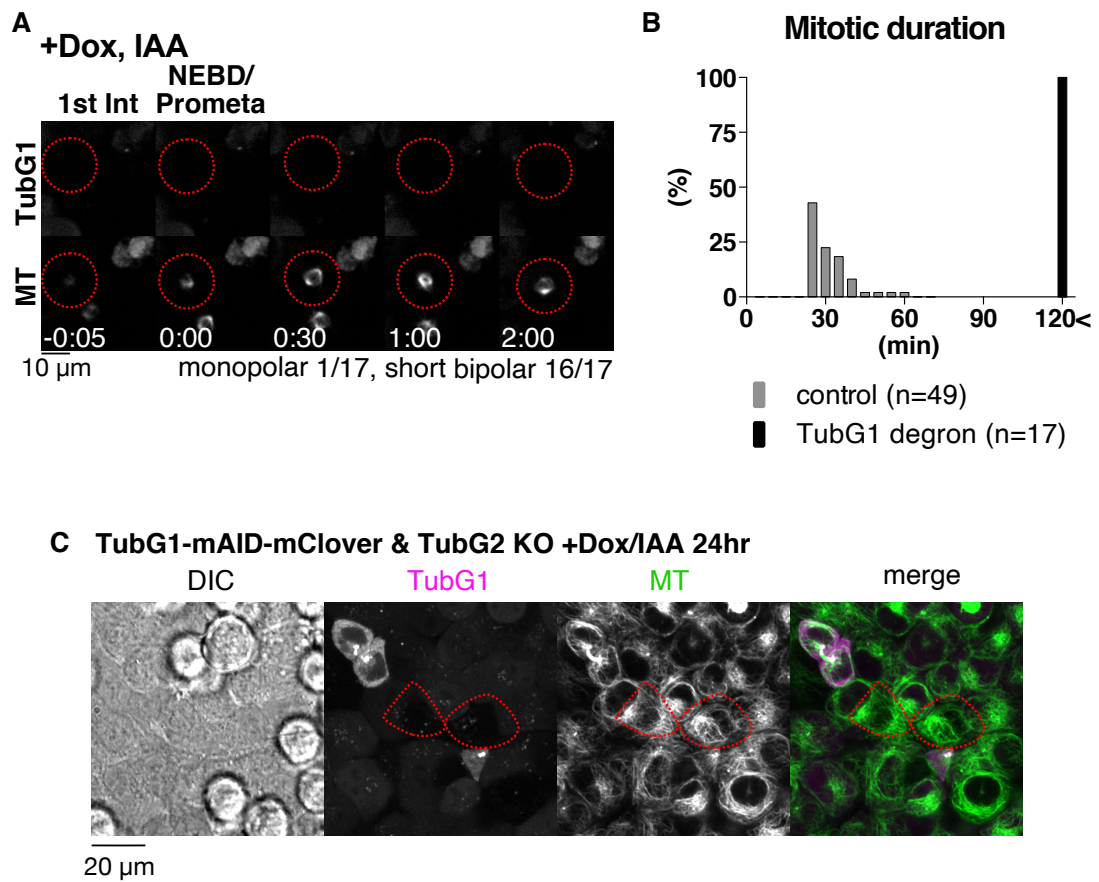
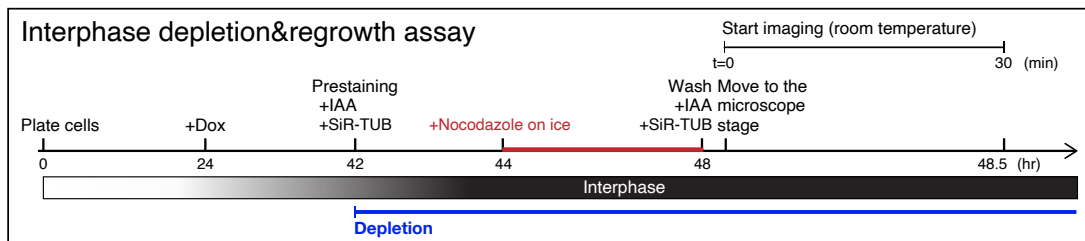


図6 TubG1のデグロンによる分裂期および間期の表現型解析

A: TubG1デグロン下での細胞分裂期を通じた表現型解析. デグロン細胞を赤点線で示した. B: コントロールとTubG1デグロン細胞の分裂時間の分布図. C: 24時間TubG1をデグロンした細胞の微小管シグナル. デグロン細胞を赤点線で示した.

A



B

Interphase regrowth in TubG1 degron

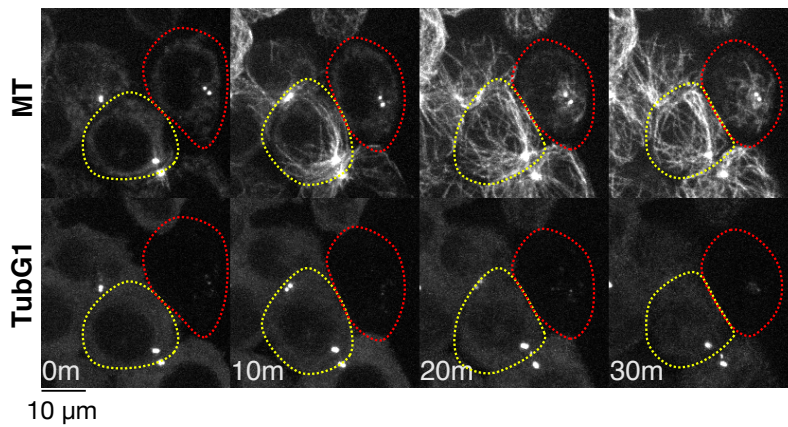


図7 TubG1デグロン下での微小管再重合実験

A: TubG1デグロン下での間期微小管再重合実験の進行手順表. B: TubG1のデグロン細胞 (赤点線) およびTubG1残存細胞 (黄点線) における時間ごとの間期微小管再重合の蛍光画像.

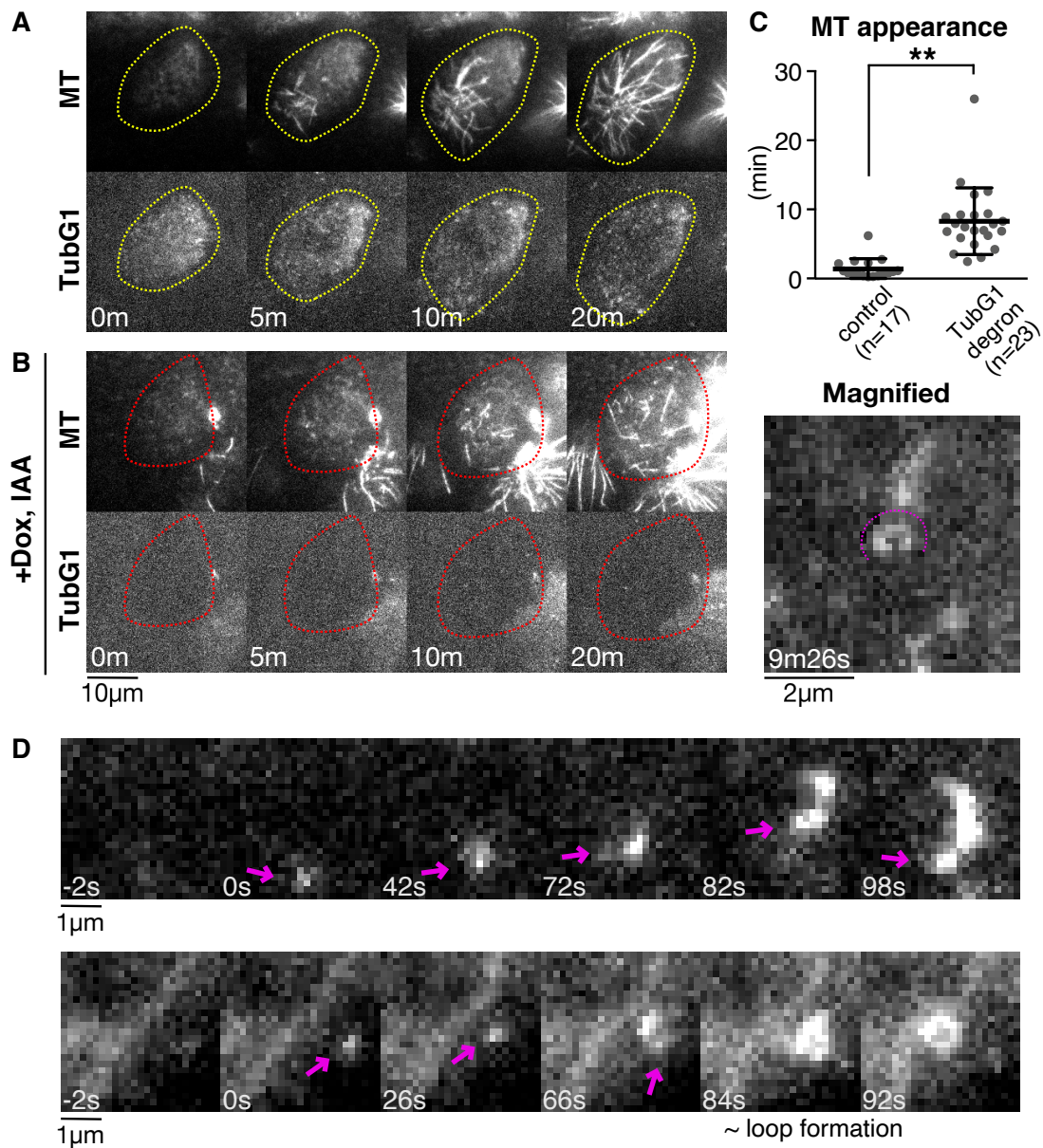


図8 全反射顕微鏡を用いたTubG1デグロン下での微小管再重合実験

A-B: 全反射顕微鏡を用いた間期コントロール細胞 (A: 黄点線) およびTubG1デグロン細胞 (B: 赤点線) における微小管再重合の蛍光画像. C: A, Bにおける生成微小管が出現した時間の計測結果. 左から 1.4 ± 1.5 , 8.3 ± 4.8 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. D: Bにおける微小管生成の拡大図. 微小管マイナス端をマゼンタ矢印で示した. エラーバーは $\text{mean} \pm \text{SD}$.

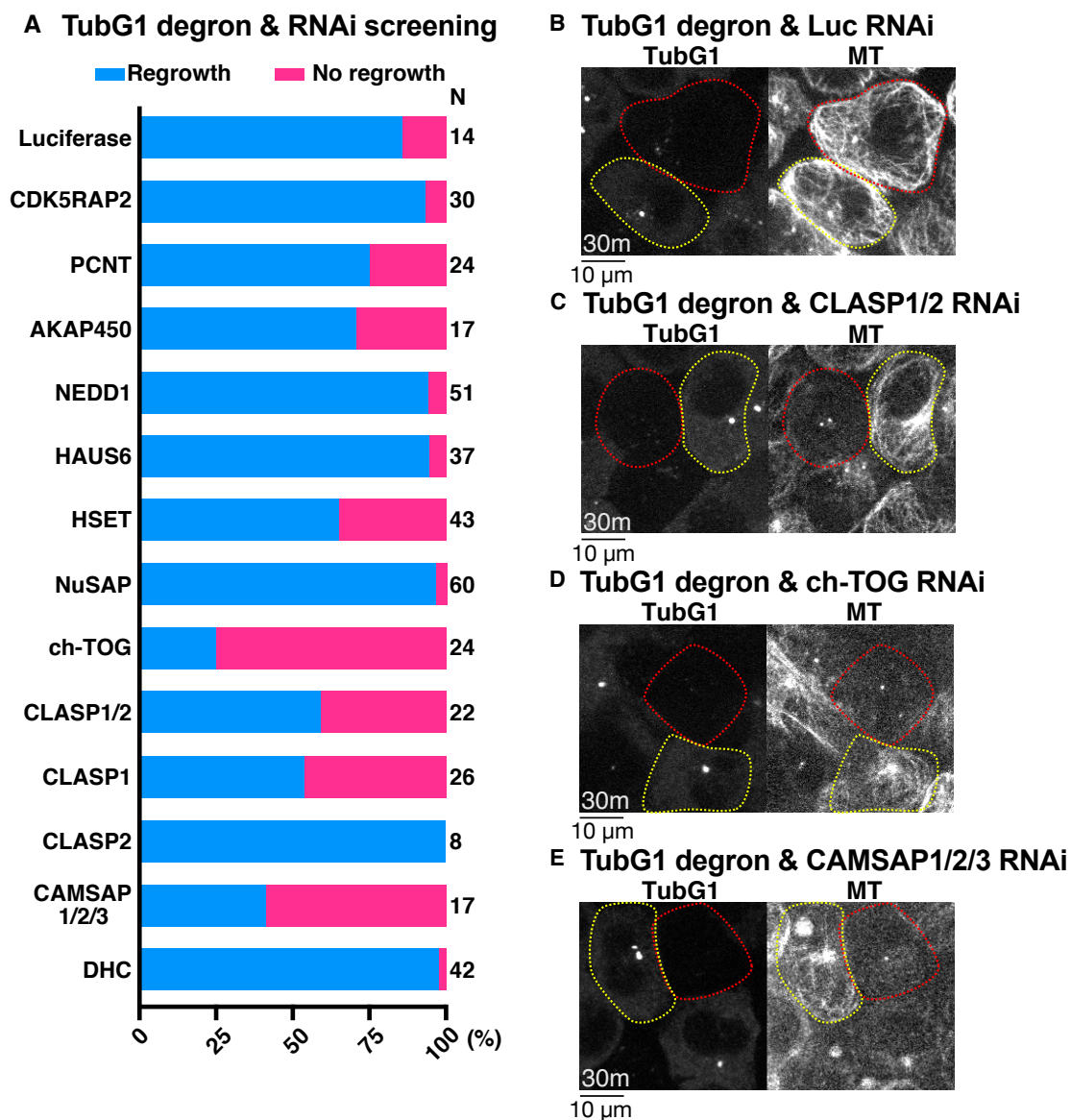


図9 RNAiを用いた微小管生成因子のスクリーニング

A: TubG1デグロン下におけるRNAiスクリーニング. 微小管再重合30分後に微小管のシグナルが確認できた細胞をRegrowth, できなかった細胞をNo regrowthとして計測した.

B-E: TubG1デグロンに対してRNAiを行った結果. コントロール (Luciferase RNAi) と微小管生成因子として特定した, CLASP1/2, ch-TOG, CAMSAP1/2/3に対するRNAi細胞の微小管再重合30分後の微小管シグナル. TubG1残存細胞を黄点線, TubG1デグロン細胞を赤点線で示した.

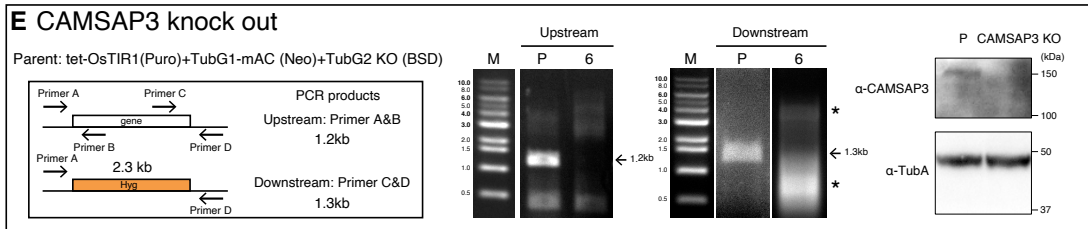
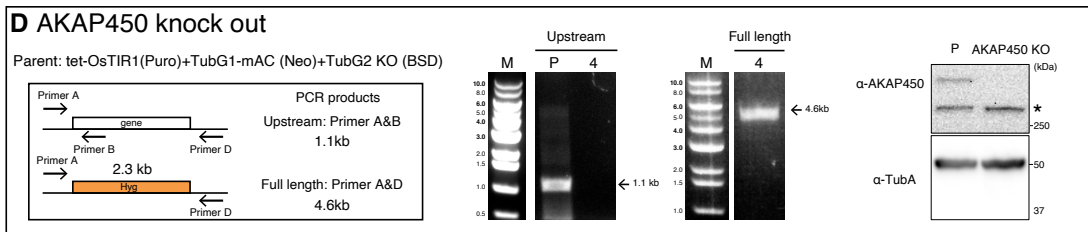
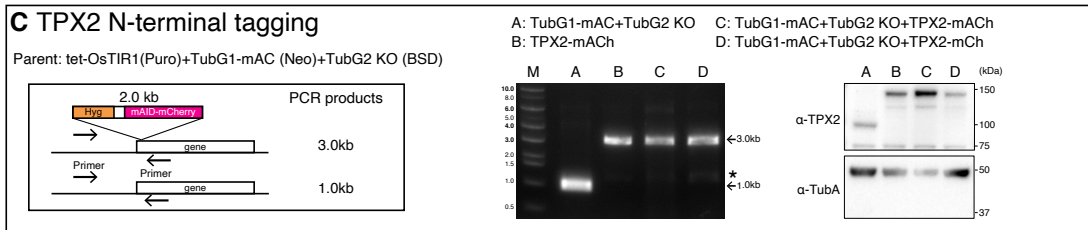
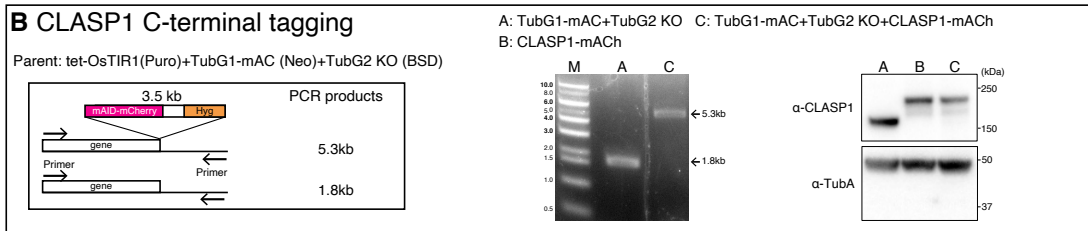
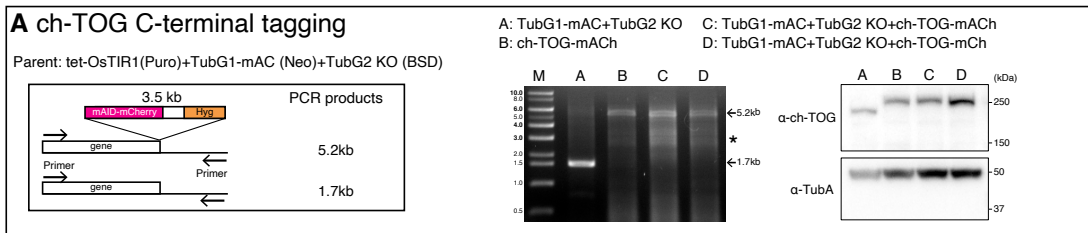
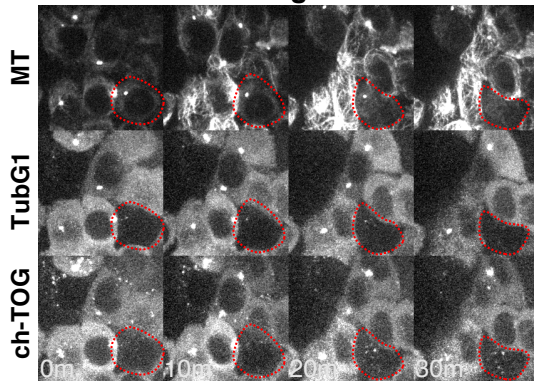


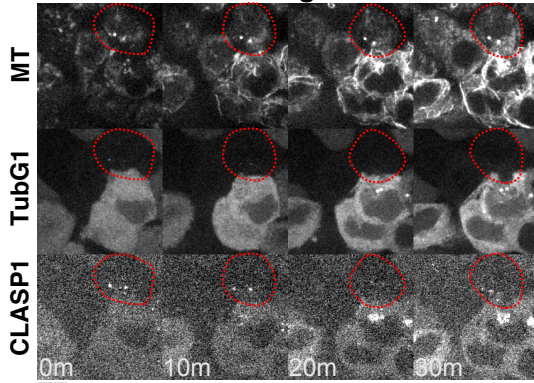
図10 第一章で用いた細胞株の取得確認方法

tetOsTIR1+TubG1-mAC+TubG2KO細胞を親株P (parent), 得られた株の識別番号 (4, 6) を各泳動写真の上部に記載した. A: 親株に対してch-TOGのC末mCh, mACh標識により, それぞれ5.2 kb, 5.0 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色により, ch-TOGのバンドシフトが確認された. B: 親株に対してCLASP1のC末mCh, mACh標識により, それぞれ5.3 kb, 5.1 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色により, CLASP1のバンドシフトが確認された. C: 親株に対してTPX2のC末mCh, mACh標識により, それぞれ3.0 kb, 2.8 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色により, ch-TOGのバンドシフトが確認された. D: 親株に対してAKAP450の全長をHyg耐性遺伝子に置換した際のゲノムPCR. 置換された場合, ORF上流では1.1 kbのDNA断片が増幅されず, 全長では4.6 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色により, AKAP450のバンドが消失した. E: 親株に対してCAMSAP3の全長をHyg耐性遺伝子に置換した際のゲノムPCR. 置換された場合, ORF上流では1.2 kb, 下流では1.3 kbのDNA断片が増幅されなくなる. 免疫染色により, CAMSAP3のバンドが消失した.

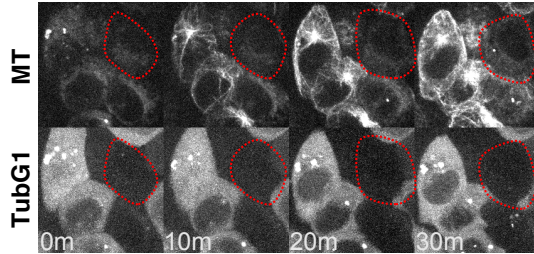
A TubG1&ch-TOG degron



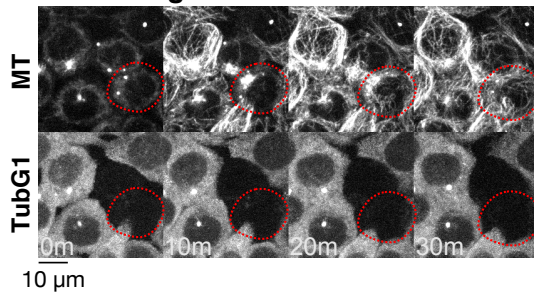
B TubG1&CLASP1 degron



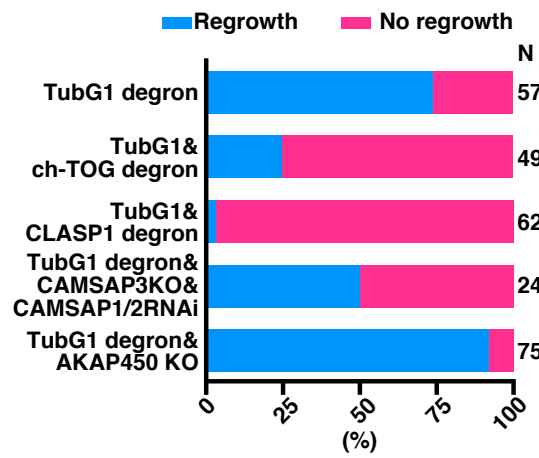
C TubG1 degron & CAMSAP3KO & CAMSAP1/2 RNAi



D TubG1 degron & AKAP450 KO



E Interphase double degron or KO



F

SiR-tub signal in double degron cells

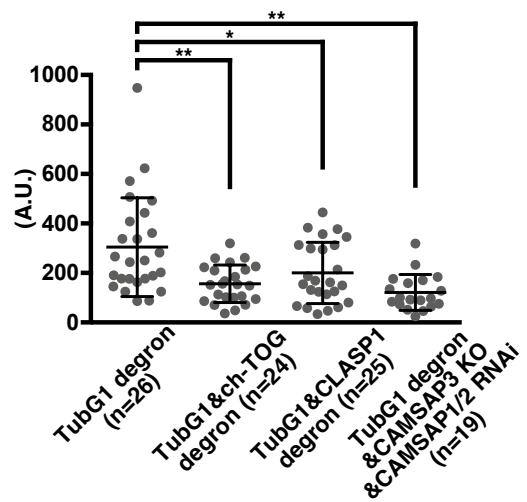


図11 TubG1と微小管生成因子のダブルデグロン下での微小管再重合実験

A: TubG1-mAC+ch-TOG-mAChのダブルデグロン細胞の微小管再重合の蛍光画像. B: TubG1-mAC+CLASP1-mAChのダブルデグロン細胞の微小管再重合の蛍光画像. C: TubG1-mAC+CAMSAP3 KO+CAMSAP1/2 RNAi細胞の微小管再重合の蛍光画像. D: TubG1-mAC+AKAP450 KO細胞の微小管再重合の蛍光画像. デグロン細胞を赤点線で示した. E: A-DおよびTubG1単独デグロン細胞において, 微小管再重合30分後に微小管のシグナルが確認できた細胞をRegrowth, できなかった細胞をNo regrowthとして計測した. F: A-CおよびTubG1単独デグロン細胞における微小管再重合30分後の微小管輝度の測定結果. 左から 304 ± 200 , 156 ± 76 , 200 ± 124 , 121 ± 7 , ANOVA test: $F = 8.437$, $p < 0.0001$, Tukey's test: $p = 0.0009$, 0.0313 , < 0.0001 . エラーバーはmean \pm SD.

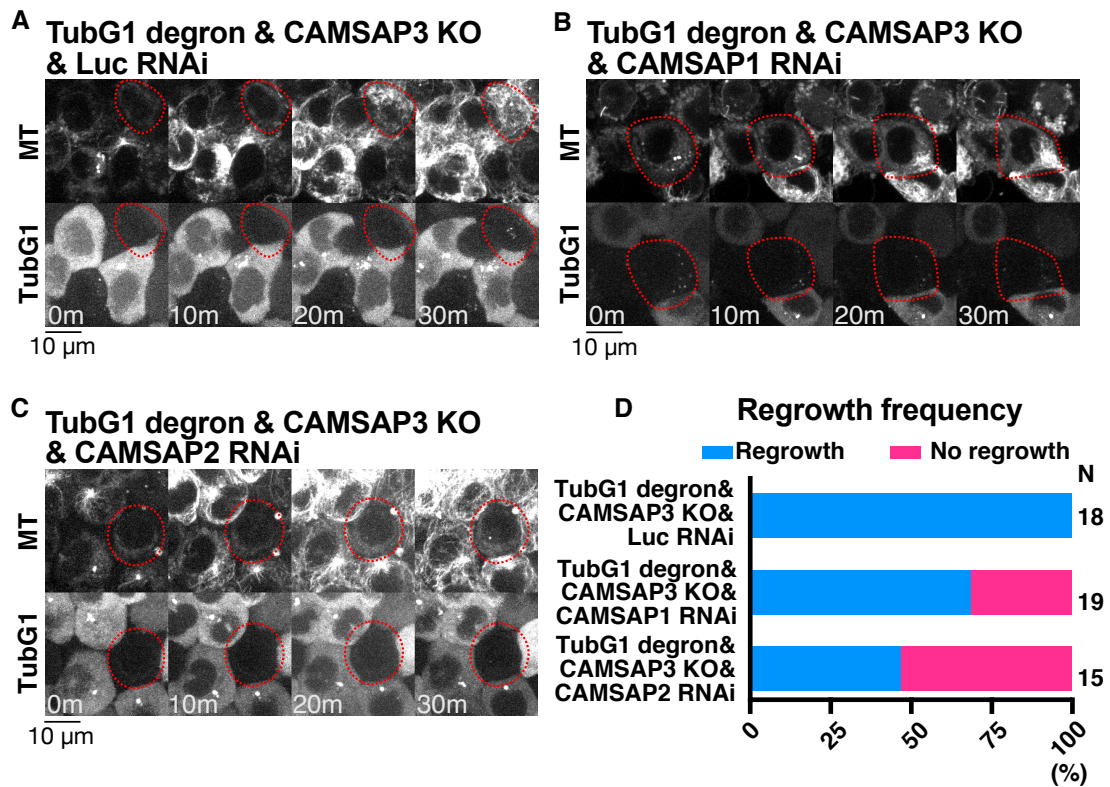


図12 CAMSAPの微小管生成に対する冗長性

A-C: TuBG1+CAMSAP3 KO細胞に対するLuciferase (A), CAMSAP1 (B), CAMSAP2 (C) RNAiを行った際の微小管再重合の蛍光画像. デグロン細胞を赤点線で示した. D: A-Cにおける微小管再重合30分後に微小管のシグナルが確認できた細胞をRegrowth, できなかった細胞をNo regrowthとして計測した.

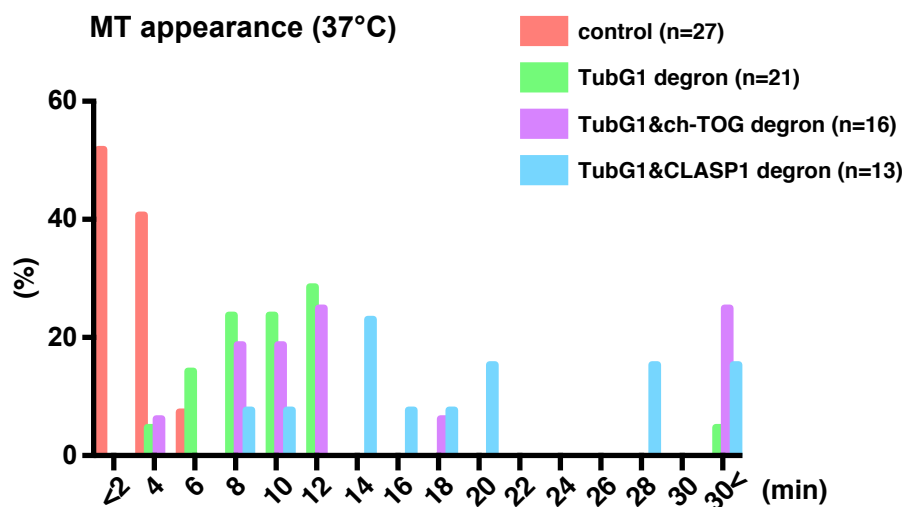


図13 37°Cにおける微小管再重合実験

微小管再重合実験を37°Cで行い、微小管が再重合した時間を計測し、その分布図を作成した。コントロール細胞を橙、TubG1デグロン細胞を緑、TubG1/ch-TOGダブルデグロン細胞を紫、TubG1/CLASP1ダブルデグロン細胞を青で示した。

A Spindle formation at 25°C

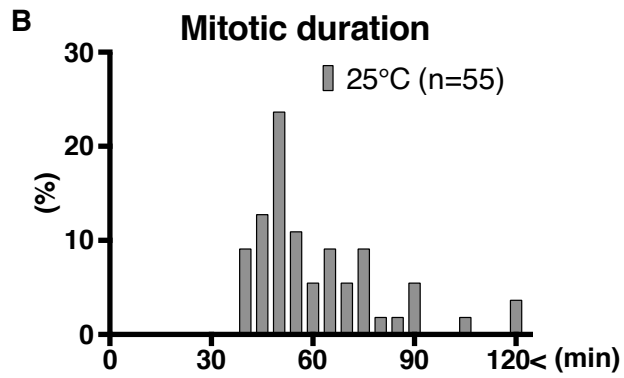
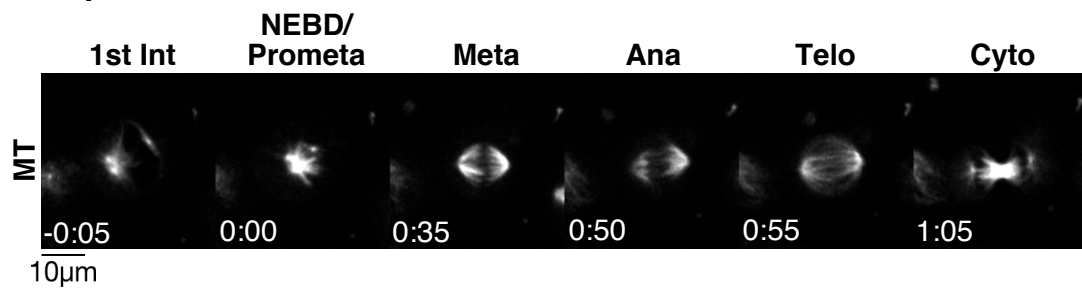


図14 25 °Cにおける紡錘体形成および分裂時間の表現型解析

A: 25 °Cにおける細胞分裂期を通した微小管の蛍光画像. B: Aにおける分裂時間の測定結果.

A TubG1-mAC + ch-TOG-mCh

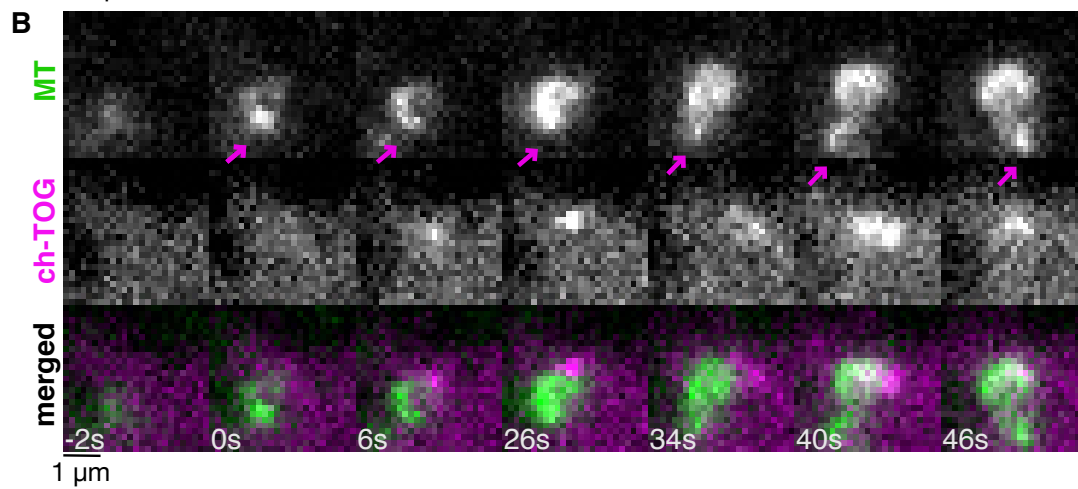
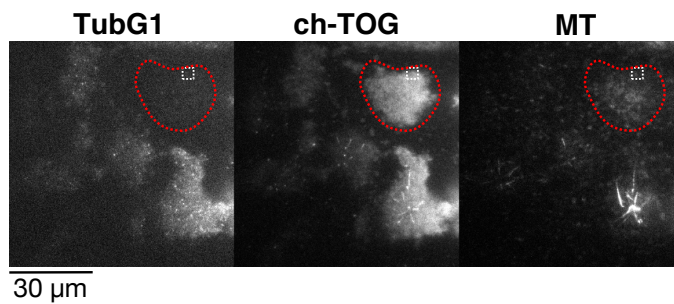
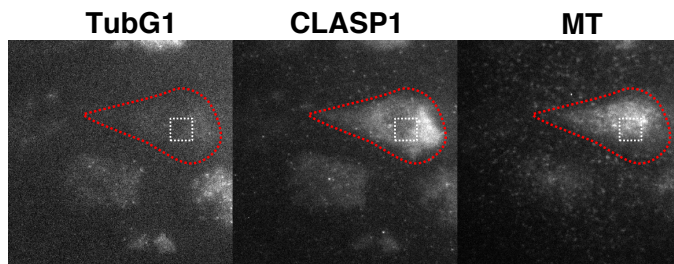


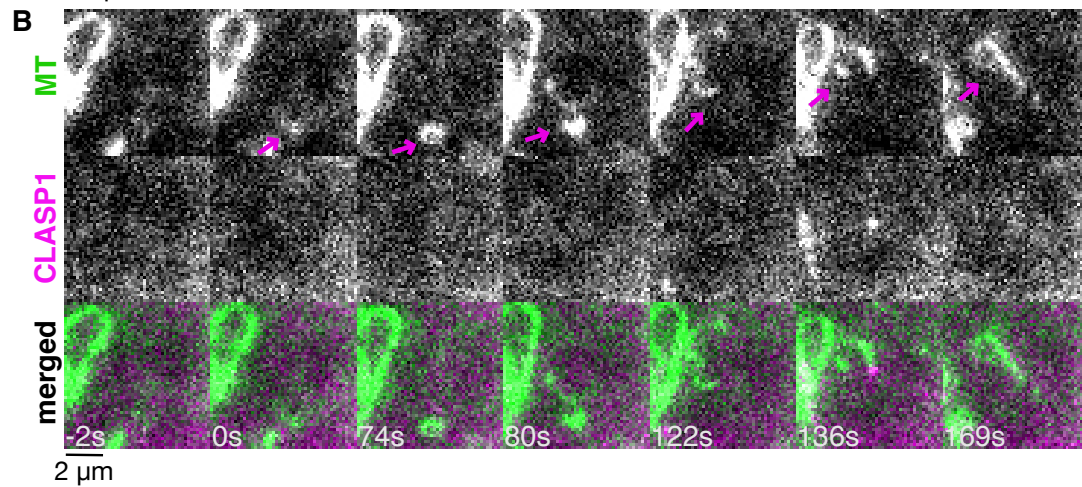
図15 TubG1デグロン細胞の微小管再重合におけるch-TOGの局在解析

A: 全反射顕微鏡を用いたTubG1デグロン細胞の微小管再重合におけるch-TOG-mChおよび微小管の蛍光画像. デグロン細胞を赤点線で示した. B: Aにおける白点線で囲われた領域を拡大した図. 微小管のマイナス端をマゼンタ矢印で示した.

A TubG1-mAC + CLASP1-mCh



30 μ m



2 μ m

図16 TubG1デグロン細胞の微小管再重合におけるCLASP1の局在解析

A: 全反射顕微鏡を用いたTubG1デグロン細胞の微小管再重合におけるCLASP1-mChおよび微小管の蛍光画像. デグロン細胞を赤点線で示した. B: Aにおける白点線で囲われた領域を拡大した図. 微小管のマイナス端をマゼンタ矢印で示した.

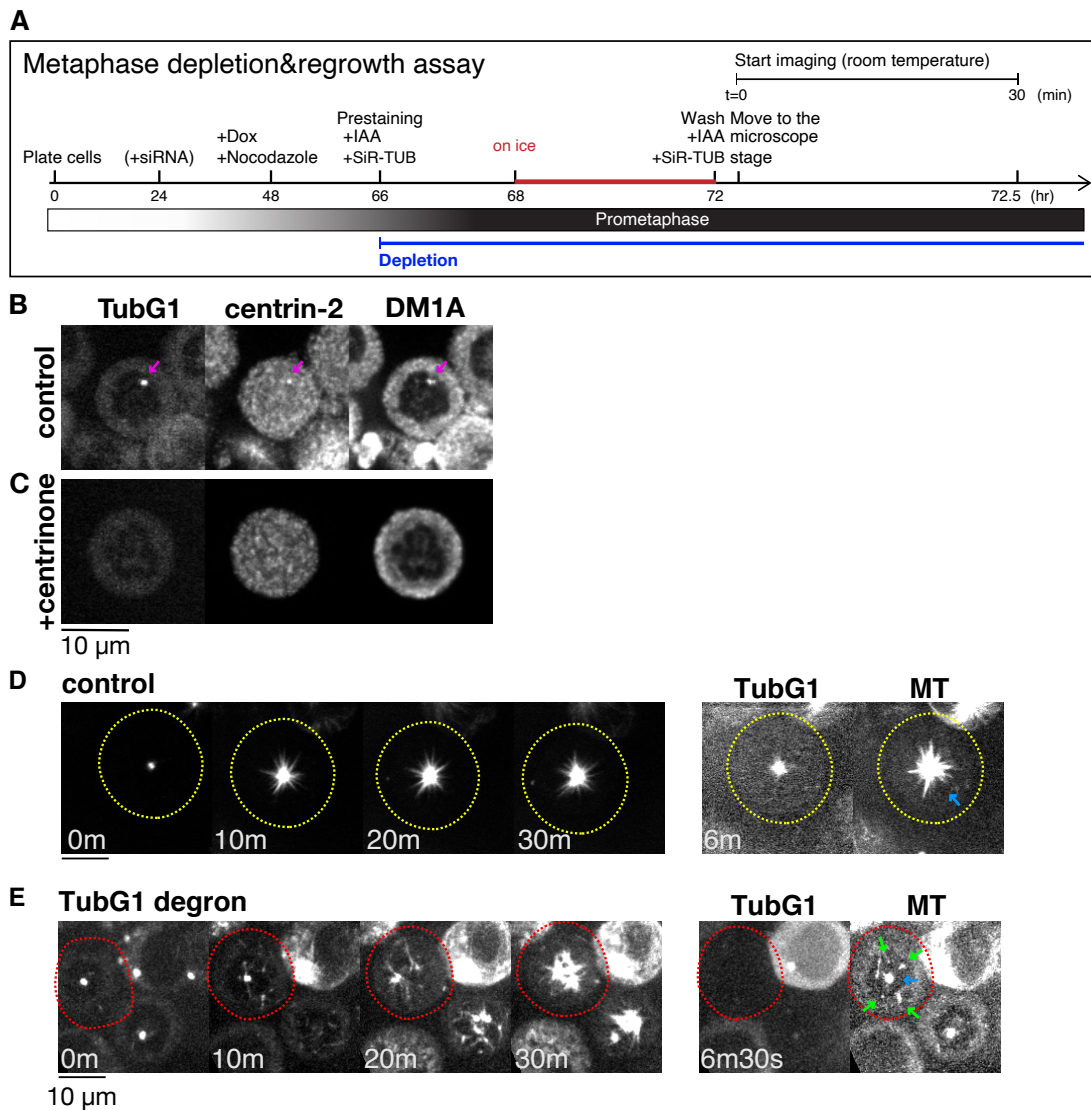


図17 分裂期前中期における微小管再重合方法の確立

A: TubG1デグロン下での分裂期前中期微小管再重合実験の進行手順表. B: ノコダゾールによる微小管脱重合した際の免疫染色画像. 中心体をcentrin-2によって特定し, マゼンタ矢印で示した. C: centrinoneを投与した細胞に対してBと同様に操作した免疫染色画像. D, E: コントロール細胞 (D: 黄点線) とTubG1デグロン細胞 (E: 赤点線) における分裂期微小管再重合の蛍光画像. 青で中心体MTOCを示し, ncMTOCを緑で示した.

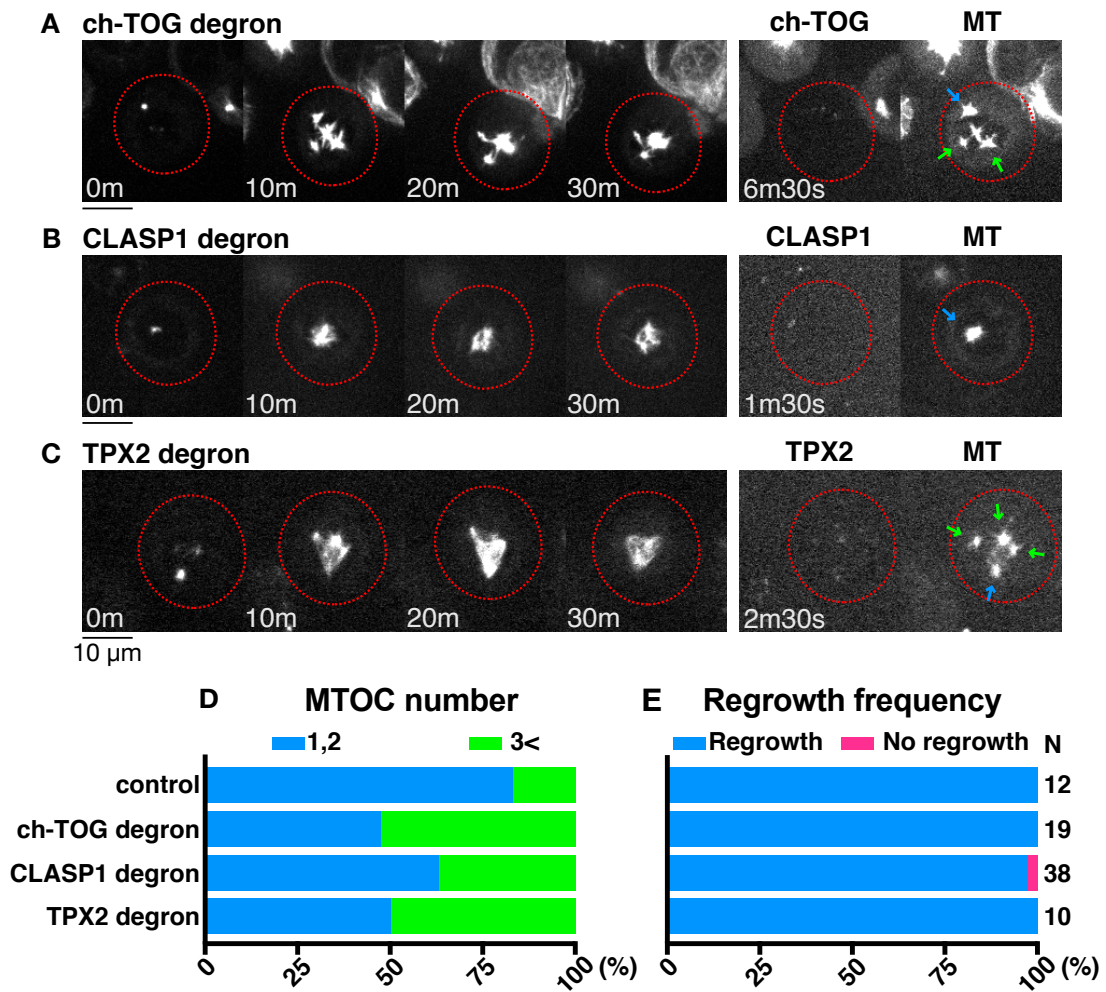


図18 微小管生成因子の単独デグロン下における微小管再重合実験

A-C: ch-TOG (A), CLASP1 (B), TPX2 (C) デグロン細胞の分裂期微小管再重合の蛍光画像. デグロン細胞を赤点線で示し, 青で中心体MTOCを示し, ncMTOCを緑で示した. D, E: A-Cにおける形成されたMTOC数 (D) とRegrowth頻度 (E) を測定した.

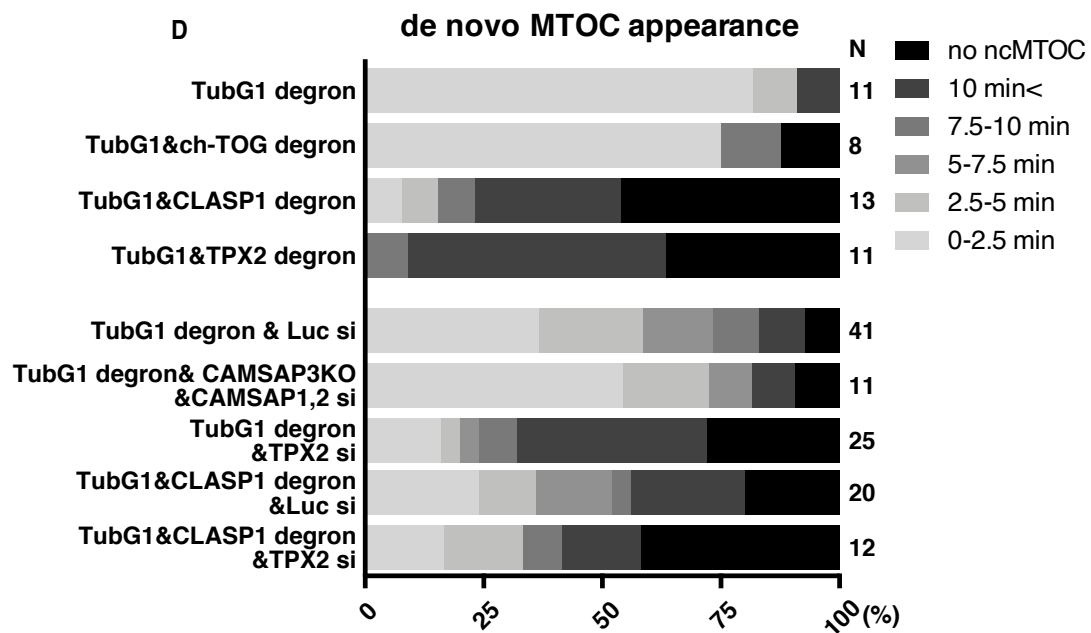
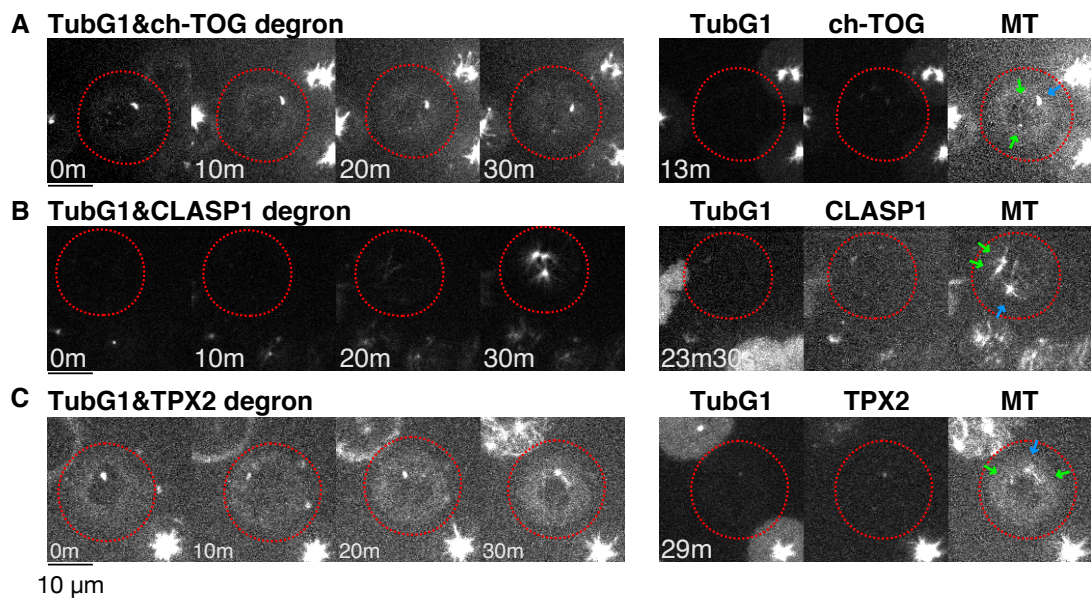
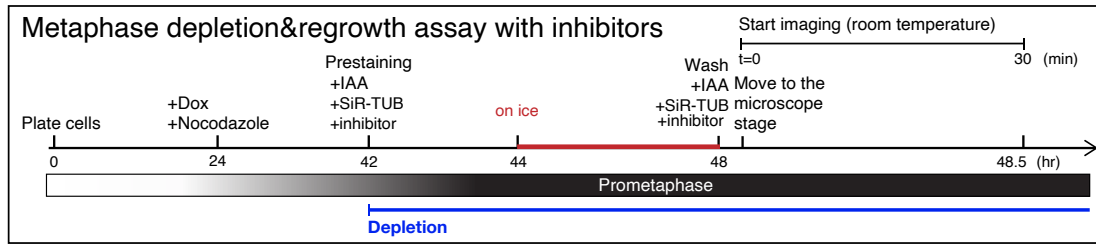


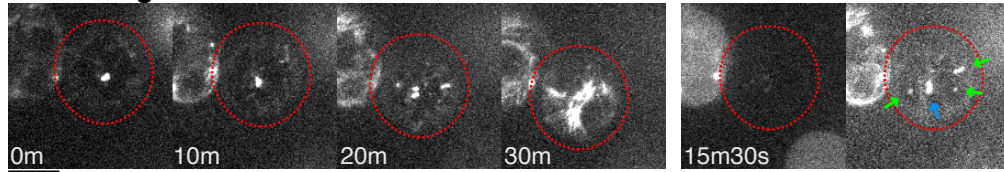
図19 TubG1および微小管生成因子のダブルデグレロン下における微小管再重合実験

A-C: TubG1-mAC+ch-TOG-mACh (A), +CLASP1-mACh (B), +TPX2-mACh (C) に対するダブルデグレロンによる微小管再重合の蛍光画像. デグレロン細胞を赤点線で示し, 青で中心体MTOCを示し, ncMTOCを緑で示した. D: A-C, 図17DEおよびRNAiを用いた微小管再重合実験において, de novo MTOCが形成された時間を計測し, その分布図を作成した.

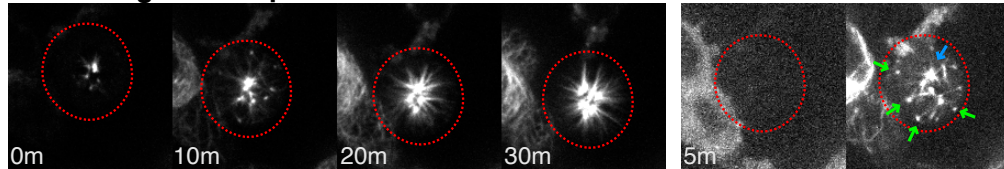
A



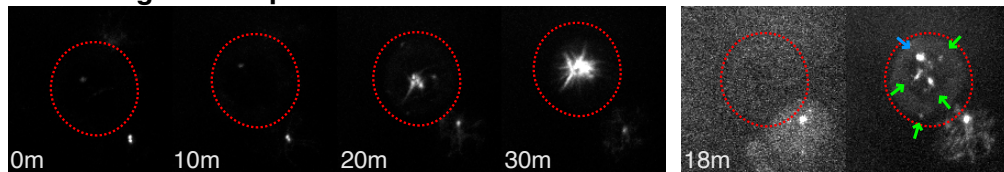
B TubG1 degran in DMSO



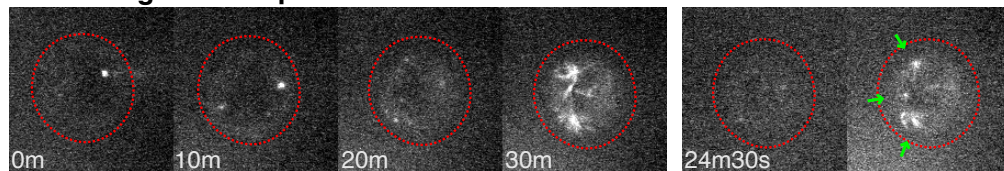
C TubG1 degran in 10µM BI2536



D TubG1 degran in 10µM ZM447439



E TubG1 degran in 0.5µM Alisertib



10 µm

F de novo MTOC appearance

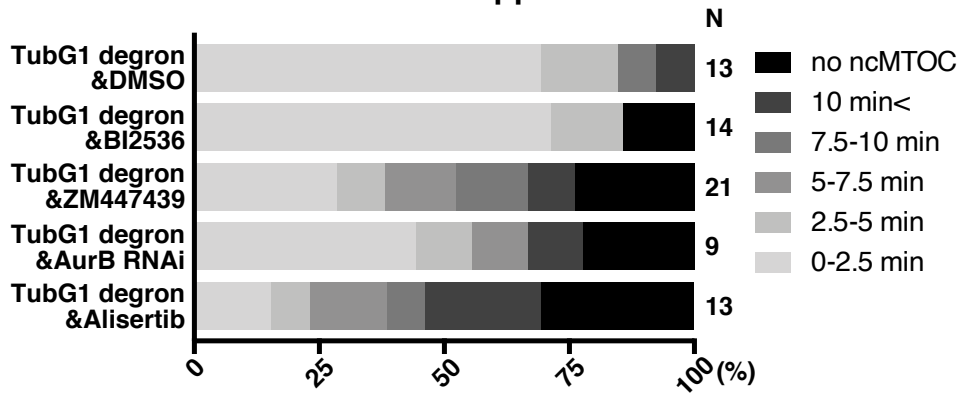


図20 分裂期キナーゼの阻害薬を用いたTubG1デグロン下における微小管再重合実験

A: 分裂期前中期TubG1デグロンおよび分裂期キナーゼ阻害薬投与下での微小管再重合実験の進行手順表. B-E: TubG1デグロン細胞に対してDMSO (B), BI2536 (C), ZM447439 (D), Alisertib (E) を投与した際の微小管再重合の蛍光画像. デグロン細胞を赤点線で示し, 青で中心体MTOCを示し, ncMTOCを緑で示した. F: B-Eにおいてde novo MTOCが形成された時間を計測し, その分布図を作成した.

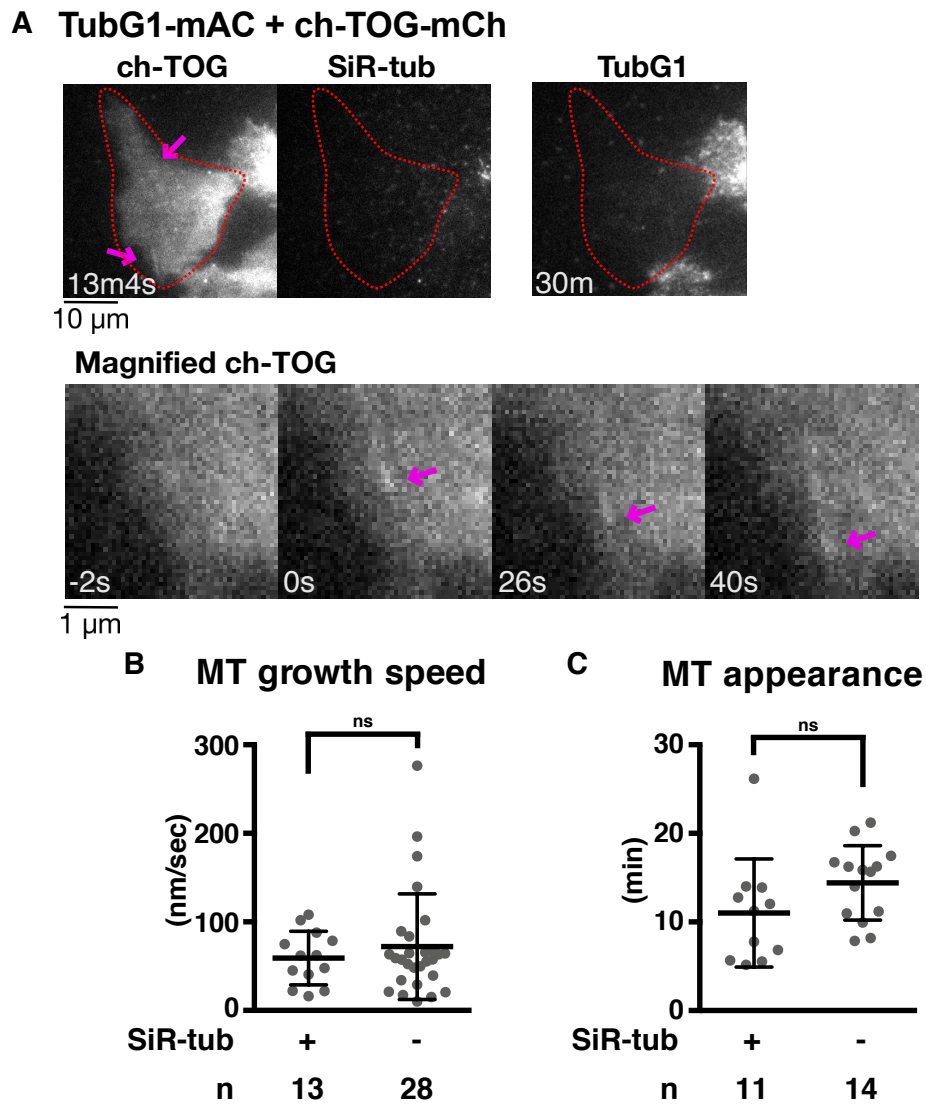
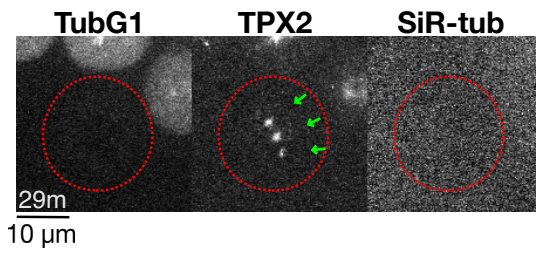


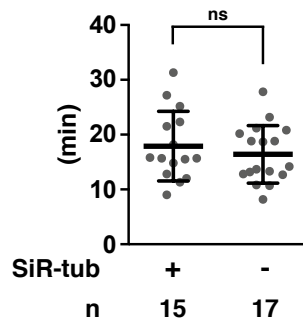
図21 間期におけるSiR-tubulinが微小管動態に与える影響

A: 全反射顕微鏡を用いた, TubG1デグロンおよびSiR-tubulin無投与下における間期微小管再重合時のch-TOG-mChの局在. デグロン細胞を赤点線で示し, 実際に微小管動態に解析した微小管の一部をマゼンタ矢印で示した. 拡大図では, ch-TOGによって同定した微小管プラス端をマゼンタ矢印で示した. B: Aにおける微小管伸長速度の測定結果. 左から 59 ± 30 , 72 ± 60 , Welch's t-test: $p = 0.3644$. C: Aにおける微小管生成時の時間測定結果. 左から 11 ± 6 , 14 ± 4 , Welch's t-test: $p = 0.1315$.

A TubG1degron & TPX2-mCh



B Non-centriolar MTOC appearance



C

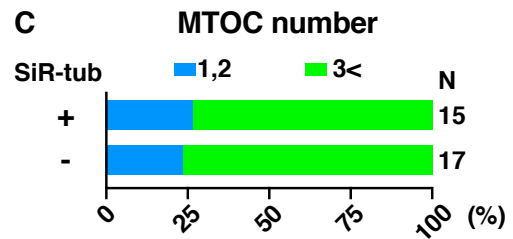


図22 分裂期におけるSiR-tubulinが微小管動態に与える影響

A: TubG1 デグロンおよび SiR-tubulin 無投与下における分裂期微小管再重合時の TPX2-mCh の局在. デグロン細胞を赤点線で示し, ncMTOC を緑で示した. B: A における de novo MTOC が観察された時間の測定結果. 左から 18 ± 6 , 16 ± 5 , Welch's t-test: $p = 0.483$. C: A における MTOC 数の測定結果.

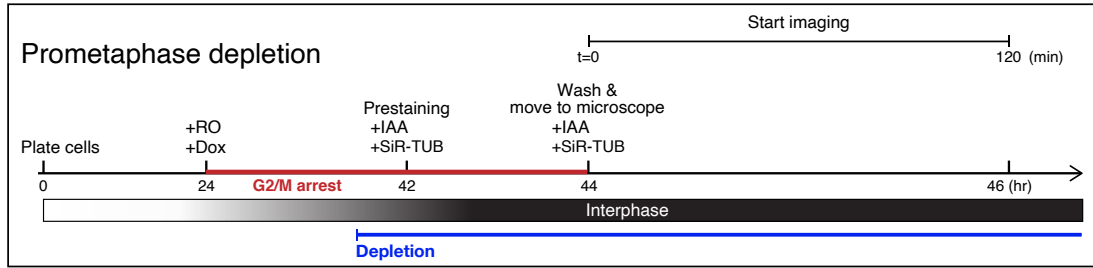
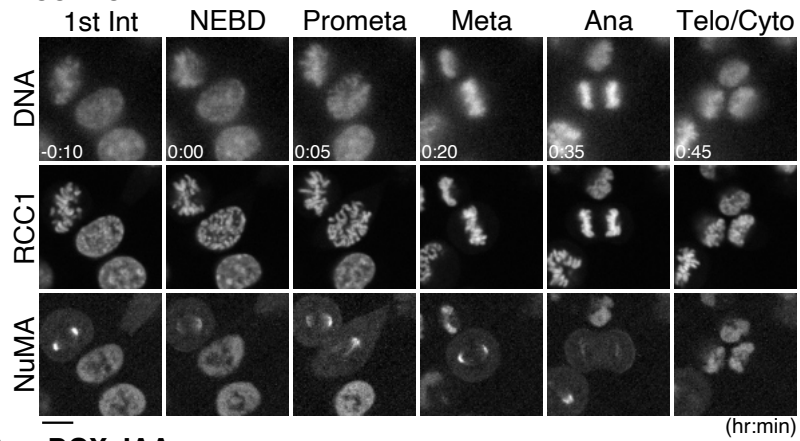
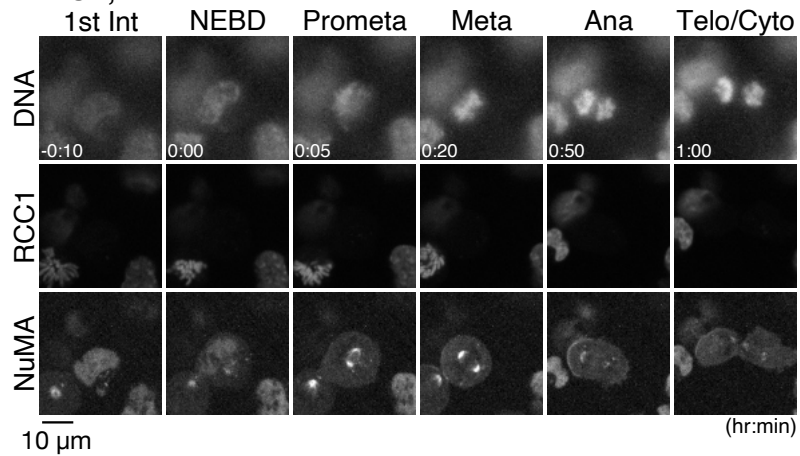
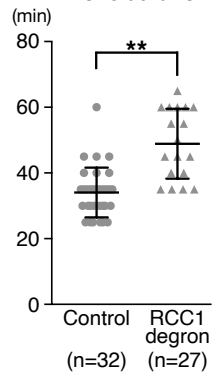
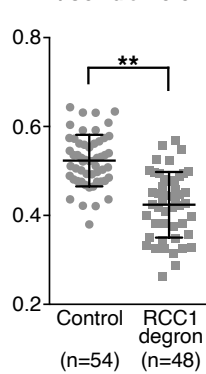
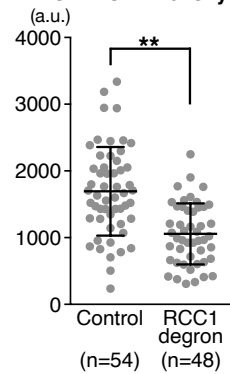
A**B Control****C +DOX, IAA****D Mitotic duration****E Spindle length / Cell diameter****F SiR-TUB intensity**

図23 RCC1デグロンによる分裂期表現型

A: 分裂期中期デグロン表現型解析の進行手順表. B, C: コントロール (B) とRCC1デグロン細胞 (C) における細胞分裂期を通じた表現型およびNuMAの局在 D: B, Cにおける核膜崩壊期から分裂期後期までの分裂時間. 左から 34.1 ± 7.6 , 47.2 ± 10.5 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. E: B, Cにおける細胞長に対する紡錘体長の比率. 左から 0.52 ± 0.06 , 0.42 ± 0.07 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. F: B, Cにおけるスピンドル上のSiR-tubulin輝度. 左から 1694 ± 663.2 , 1056 ± 457.5 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. エラーバーはmean \pm SD.

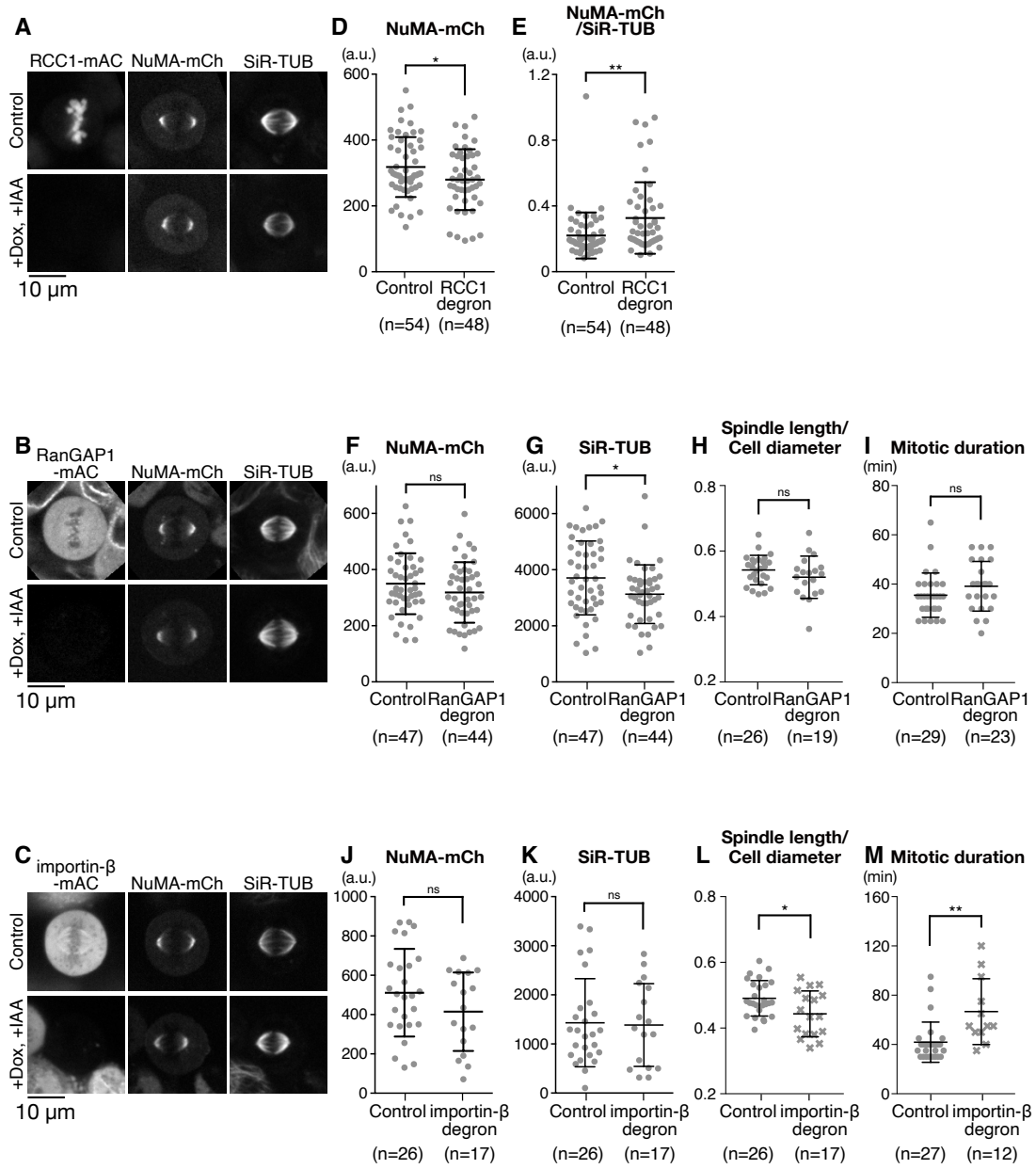


図24 RCC1, RanGAP1, importin-βのそれぞれのデグロン下におけるNuMAの局在解析
A-C: コントロール, RCC1デグロン細胞, RanGAP1デグロン細胞, importin-βデグロン細胞のNuMAの局在. D: コントロールとのNuMAの局在. Aにおける紡錘体上のNuMAの輝度. 左から318 ± 90.86, 279.6 ± 92.39, Welch's t-test: p = 0.0374. E: Aにおける紡錘体上のSiR-tubの輝度に対するNuMAの輝度の比率. 左から0.22 ± 0.14, 0.33 ± 0.22, Welch's t-test: p = 0.0049. F: Bにおける紡錘体上のNuMAの輝度. 左から349.6 ± 108.3, 318.6 ± 107.7, Welch's t-test: p = 0.1751. G: Bにおける紡錘体上のSiR-tubの輝度. 左から3707 ± 1314, 3130 ± 1044, Welch's t-test: p = 0.0223. H: Bにおける細胞長に対する紡錘体長の比率. 左から0.54 ± 0.04, 0.52 ± 0.07, Welch's t-test: p = 0.2108. I: Bにおける分裂時間. 左から35.5 ± 9.0, 39.1 ± 10.1, Welch's t-test: p = 0.1851. J: Cにおける紡錘体上のNuMAの輝度. 左から511.2 ± 223, 414.8 ± 199.5, Welch's t-test: p = 0.1477. K: Cにおける紡錘体上のSiR-tubの輝度. 左から1431 ± 897.6, 1385 ± 843.6, Welch's t-test: p = 0.8662. L: Cにおける細胞長に対する紡錘体長の比率. 左から0.49 ± 0.05, 0.44 ± 0.07, Welch's t-test: p = 0.0249. M: Cにおける分裂時間. 左から41.9 ± 16.3, 66.7 ± 26.7, Welch's t-test: p = 0.0095. エラーバーはmean ± SD.

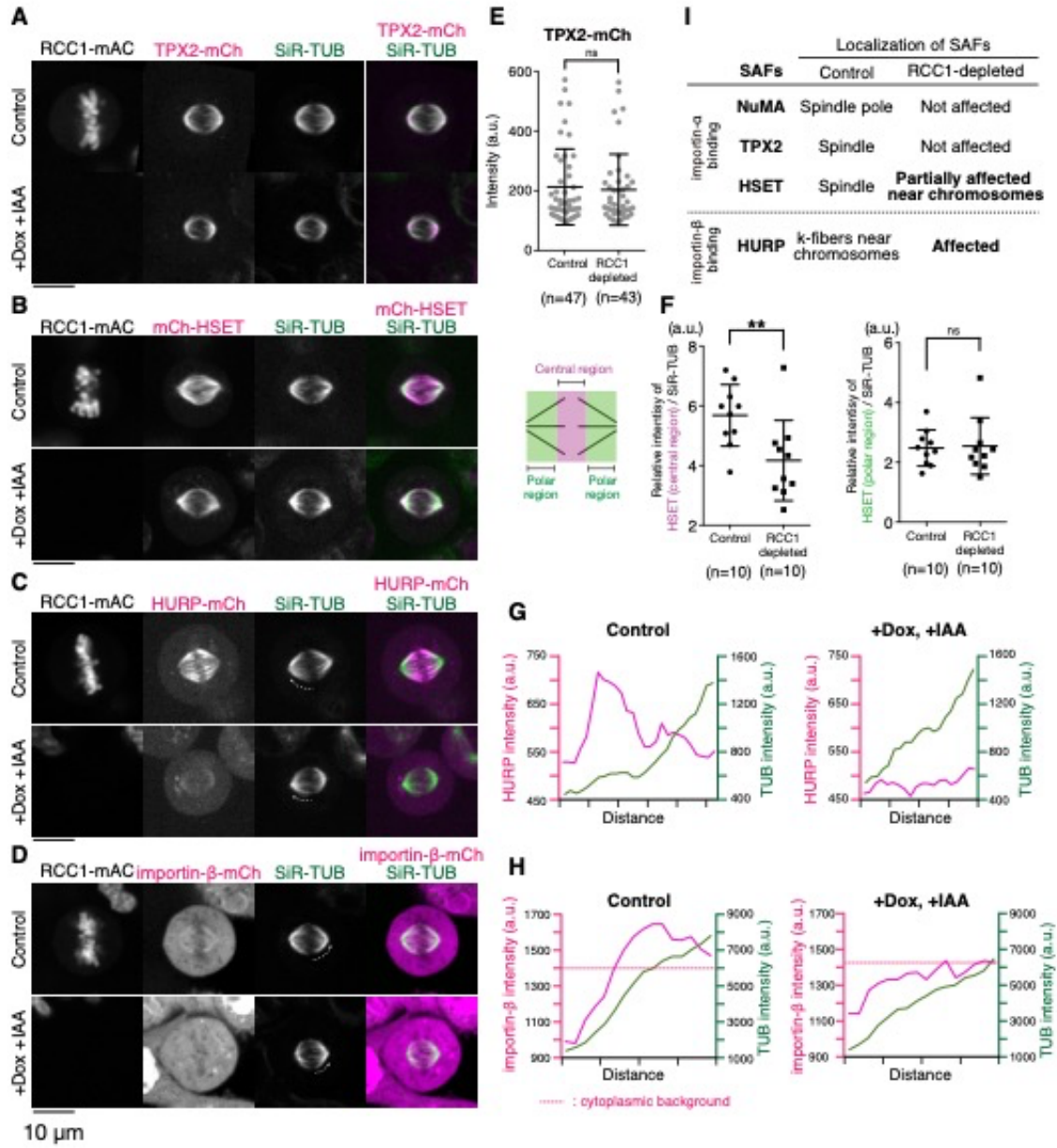


図25 RCC1デグロン下におけるSAFの局在解析

A-D: コントロールとRCC1デグロン細胞のTPX2, HSET, HURP, importin- β の局在. E: Aにおける紡錘体上のTPX2の輝度. 左から 212.7 ± 127.3 , 203.2 ± 119.1 , Welch's t-test: $p = 0.7153$. F(左): Bにおける紡錘体中央領域のSiR-tubの輝度に対するTPX2の輝度の比率. 左から 5.68 ± 1.03 , 4.16 ± 1.34 , Welch's t-test: $p < 0.01$. F(右): Bにおける紡錘体極領域のSiR-tubの輝度に対するTPX2の輝度の比率. 左から 2.48 ± 0.61 , 2.55 ± 0.95 , Welch's t-test: $p = 0.67$. G: Cにおける点線状で示した領域の輝度分布. H: Cにおける点線状で示した領域の輝度分布. I: RCC1デグロン下でのSAFの局在変化. エラーバーはmean \pm SD.

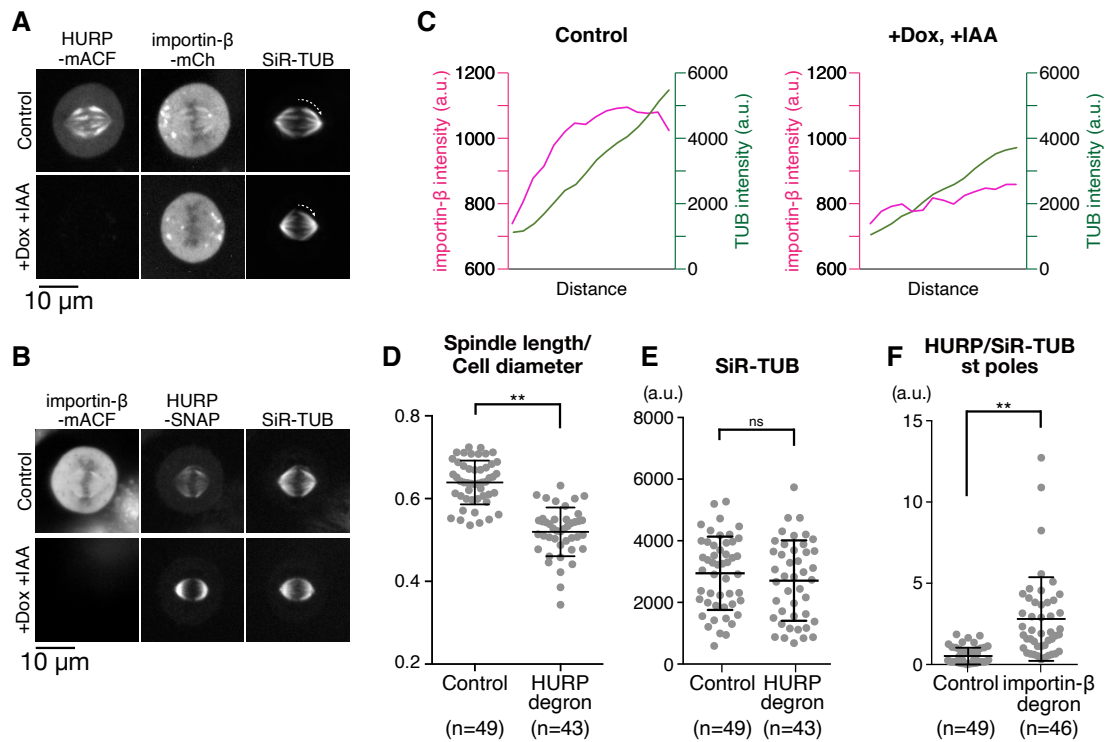


図26 HURPとimportin-βの共依存的な局在制御

A: コントロールとHURPデグロン細胞のimportin-βの局在. B: コントロールとimportin-βデグロン細胞のHURPの局在. C: Aにおける点状で示した領域の輝度分布. D: Aにおける細胞長に対する紡錘体長の比率. 左から 0.64 ± 0.05 , 0.52 ± 0.06 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. E: Aにおける紡錘体上のSiR-tubの輝度. 左から 2947 ± 1188 , 2707 ± 1303 , Welch's t-test: $p = 0.3610$. F: Bにおける紡錘体上のSiR-tubの輝度に対するHURPの輝度の比率. 左から 0.52 ± 0.52 , 2.80 ± 2.57 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. エラーバーはmean \pm SD.

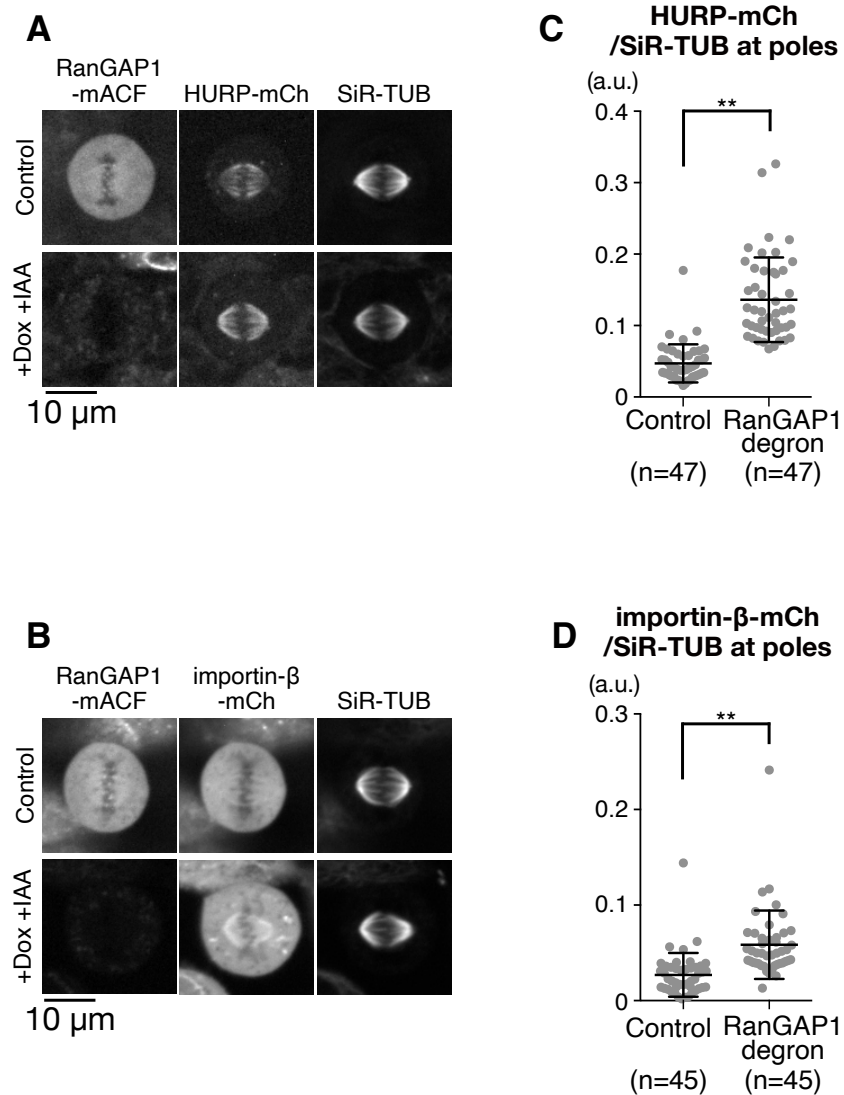


図27 RanGAP1デグロン下におけるHURP, importin- β の局在解析

A, B: コントロールとRanGAP1デグロン細胞のHURP, importin- β の局在. C: Aにおける紡錘体上のSiR-tubの輝度に対するHURPの輝度の比率. 左から 0.047 ± 0.027 , 0.136 ± 0.059 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. D: Bにおける紡錘体上のSiR-tubの輝度に対するimportin- β の輝度の比率. 左から 0.027 ± 0.0023 , 0.059 ± 0.0358 , Welch's t-test: $p < 0.0001$. エラーバーはmean \pm SD.

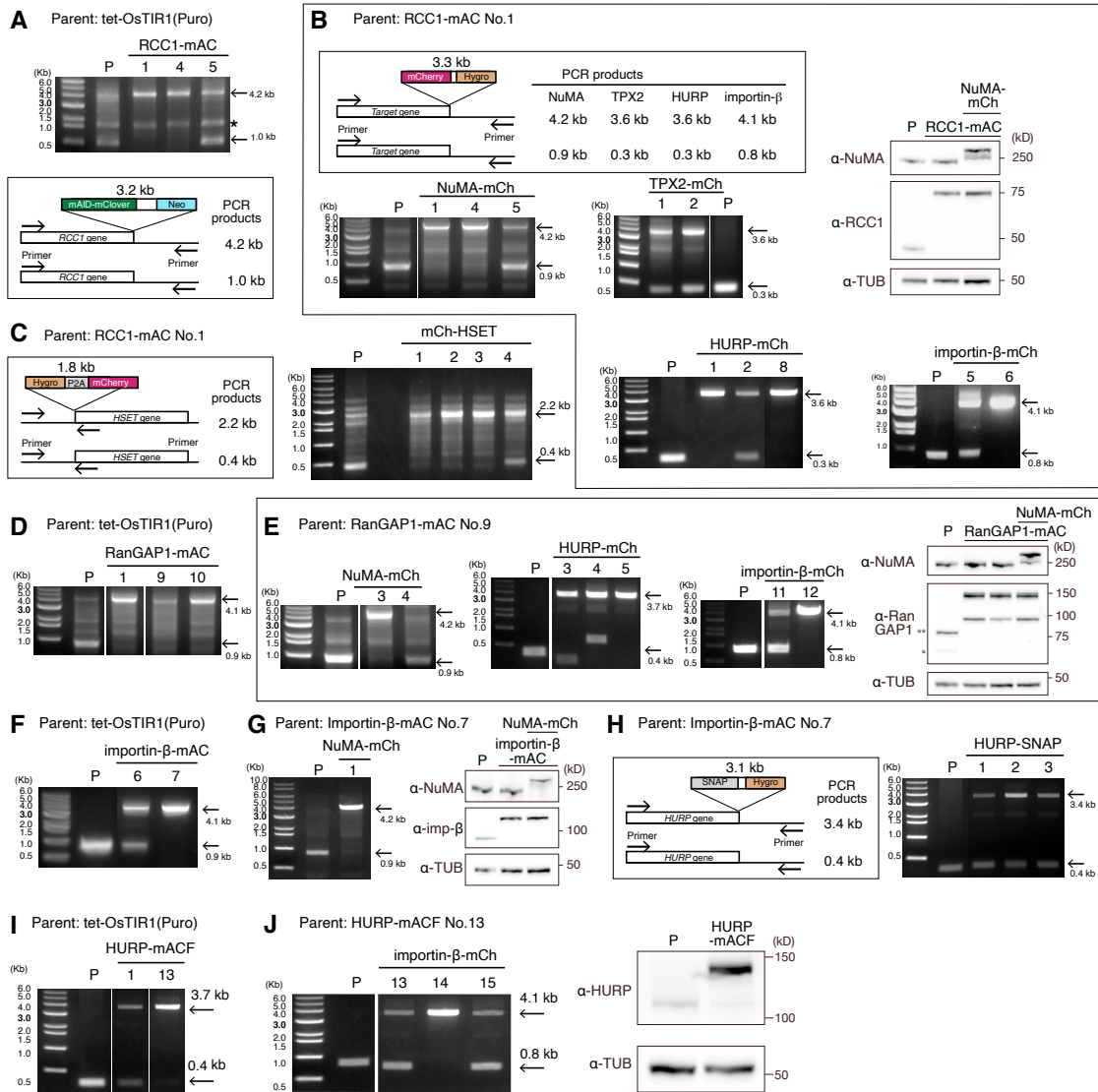


図28 第二章で用いた細胞株の取得確認方法

親株をP (parent), 得られた株の識別番号 (例: 1, 4, 5 etc.) を各泳動写真の上部に記載した. A: 親株に対してRCC1のC末mAC標識により, 4.2 kbのDNA断片が増幅する. B: Aに対してNuMA, TPX2, HURP, importin- β のC末mCh標識により, それぞれ4.2 kb, 3.6 kb, 3.6 kb, 4.1 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色により, RCC1のバンドシフトが確認された. C: Aに対してHSETのN末mCh標識により, 2.2 kbのDNA断片が増幅された. D: 親株に対してRanGAP1のC末mAC標識により, 4.1 kbのDNA断片が増幅された. E: Dの株に対してNuMA, HURP, importin- β のC末mCh標識により, それぞれ4.2 kb, 3.7 kb, 4.1 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色によりRanGAP1のバンドシフトが確認された. F: 親株に対してimportin- β のC末mAC標識により, 4.1 kbのDNA断片が増幅された. G: Fに対してNuMAのC末mCh標識により, 4.2 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色によりimportin- β のバンドシフトが確認された. H: Fに対してHURPのC末SNAP標識により, 3.4 kbのDNA断片が増幅された. I: 親株に対してHURPのC末mAC標識により, 3.7 kbのDNA断片が増幅された. J: Iに対してimportin- β のC末mCh標識により, 4.1 kbのDNA断片が増幅された. 免疫染色によりHURPのバンドシフトが確認された.

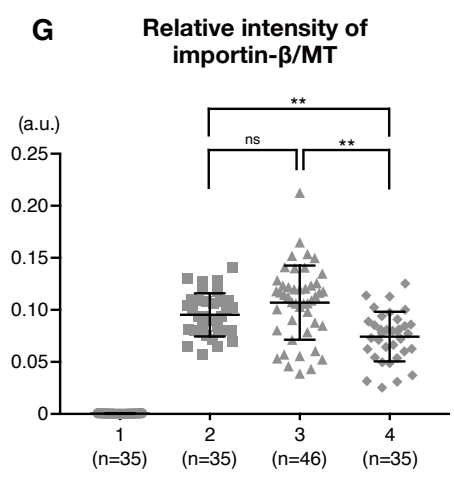
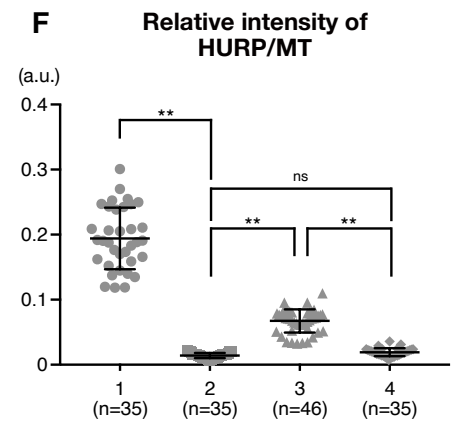
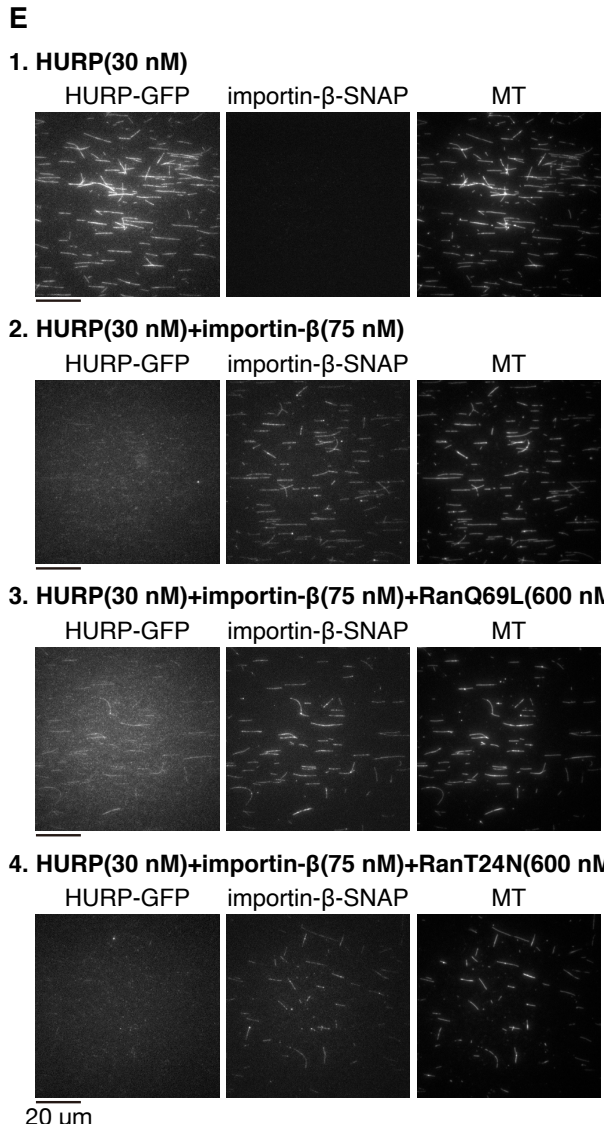
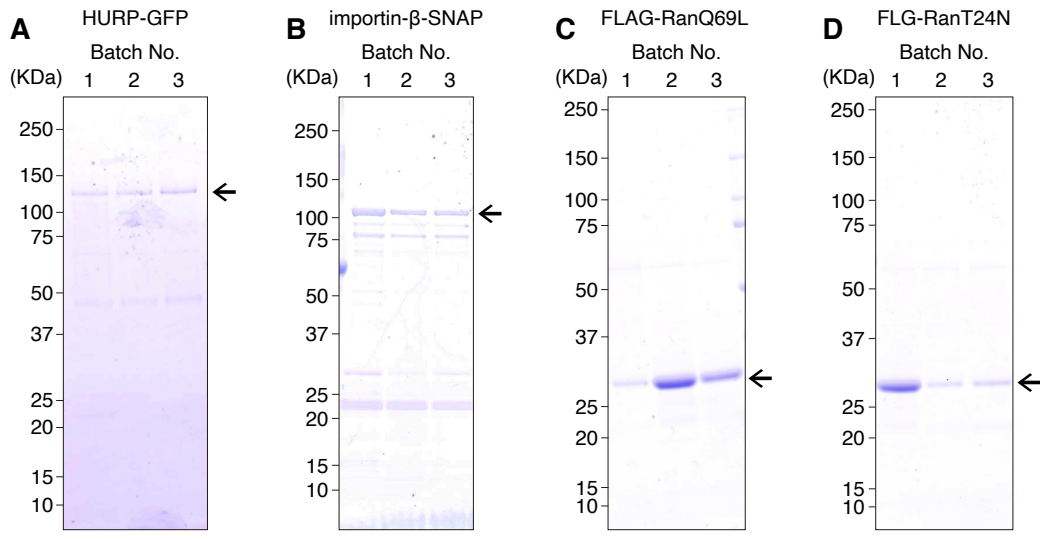


図29 In vitroにおけるRan依存的なHURP, importin-βの微小管への結合解析

A-D: HURP-GFP, importin-SNAP, FLAG-RanQ69L, FLAG-RanT24Nを精製した際のSDS-PAGEによるバンド確認. 目的精製タンパク質を矢印で示した. E: 表記した組み合わせによるHURP, importin-β, 微小管のシグナル解析. F: Eにおける微小管輝度に対するHURPの輝度比率. 左から 0.194 ± 0.047 , 0.014 ± 0.004 , 0.067 ± 0.018 , 0.019 ± 0.006 . ANOVA test: $F = 250.2$, $p < 0.0001$, Tukey's test: $p < 0.0001$ (1-2, 2-3, 3-4), $p = 0.839$ (2-4). G: Eにおける微小管輝度に対するimportin-βの輝度比率. 左から 0.0004 ± 0.0002 , 0.095 ± 0.021 , 0.107 ± 0.036 , 0.074 ± 0.024 . ANOVA test: $F = 137.7$, $p < 0.0001$, Tukey's test: $p < 0.0001$ (3-4), $p = 0.0032$ (2-4), $p = 0.1556$ (2-3). エラーバーはmean \pm SD.

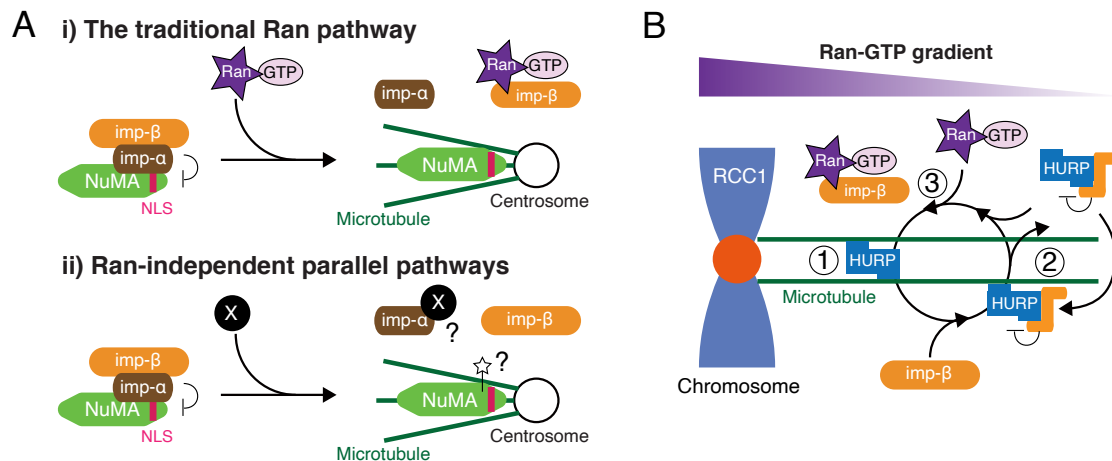


図30 本研究で修正された分裂期におけるRan依存的なSAF局在制御

A: NuMA の局在制御に関する現行モデルと修正モデル. 現行モデルでは, NuMA は importin- α , importin- β によって局在が制御されているとされていたが, 本研究では上流とされる RCC1, RanGAP1, importin- β 非存在下で NuMA の局在は変化しないことが明らかになった. そのため, Ran 非依存的な経路によって NuMA の局在が制御されるという仮説のもと修正モデルを提唱した. B: HURP-importin- β の Ran 依存的な紡錘体局在制御の修正モデル. 現行モデルでは, 染色体近傍では RanGTP によって importin- β の HURP への不活性化制御が外れ, HURP は恒常的にキネトコア微小管に局在および機能すると考えられていた. しかし RanGAP1, importin- β 非存在下での HURP または importin- β の局在や清光 智美博士による HURP の FRAP 実験などから, HURP と importin- β はキネトコア微小管上にダイナミックに結合と解離を繰り返すことが明らかになった. そのため, この HURP と importin- β の結合解離サイクルを修正モデルとして提唱した.

9. 表

表 1 使用した組換えベクターリスト

Name	Purpose	Insertion site	Selection
pHH45	RCC1-mAID-mClover integration	C-terminus	G418
pHH51	RanGAP1-mAID-mClover integration	C-terminus	G418
pTK435	NuMA-mCherry integration	C-terminus	hygromycin
pTK502	TPX2-mCherry integration	C-terminus	hygromycin
pTK531	HSET-mCherry integration	N-terminus	hygromycin
pTK481	importin- β -mAID-mClover integration	C-terminus	G418
pHH57	importin- β -mCherry integration	C-terminus	hygromycin
pTK596	HURP-mAID-mClover integration	C-terminus	G418
pTK541	HURP-mCherry integration	C-terminus	hygromycin
pTK589	HURP-SNAP integration	C-terminus	hygromycin
pKT1	TubG1-mClover-mAID integration	C-terminus	G418
pKT11	TubG2 knock out	ORF	blasticidin
pKT35	ch-TOG-mAID-mCherry integration	C-terminus	hygromycin
pKT52	ch-TOG-mCherry integration	C-terminus	hygromycin
pKT90	CLASP1-mAID-mCherry integration	C-terminus	hygromycin
pKT43	TPX2-mAID-mCherry integration	N-terminus	hygromycin
pKT53	TPX2-mCherry integration	N-terminus	hygromycin
pKT55	AKAP450 knock out	ORF	hygromycin

pKT58	CAMSAP3 knock out	ORF	hygromycin
-------	-------------------	-----	------------

表 2 使用した Cas9-sgRNA ベクターリスト

Gene	sgRNA (5'-3')	PAM	plasmid
RCC1	GACTGTATGCTGGCCCCCGC	TGG	pTK361
RanGAP1	TCTGCTGCAGACGCTGTACA	AGG	pHH49
NuMA	GTGGGGCCACTCACTGGTAC	TGG	pTK372
TPX2	TGCGGATACCGCCCGGCAAT	GGG	pTK527
HSET	TGCATTCCCCGGCGCGTGT	GGG	pTK523
importin- β	AGTTCGAGCCGCGCCCGAA	AGG	pHH50
HURP	CAAAATTCTCCTGGTTGTAG	AGG	pTK532
TubG1	AGTCTGGCCGTGTGGCCGCA	TGG	pTK611
TubG2 (N-terminus)	TGCAGGGTGATGATCTCCCG	GGG	pKT13
TubG2 (C-terminus)	CTAGAAGGAGAAGGAGTAGT	GGG	pKT14
ch-TOG	CTGCAGGGTGCCGGGGGAGT	GGG	pKT36
CLASP1	CCTGGGCTGATACGCACACC	TGG	pKT76
TPX2	GAAATCCGAGGGGGCATCAT	AGG	pTK526
AKAP450 (N-terminus)	GCTGGAGGCCGGCAAAGCCA	AGG	pKT7
AKAP450 (C-terminus)	GAGCTGTGGGTCTCGCACTG	TGG	pKT8

CAMSAP3 (N-terminus)	TGGACCAGTACGATTTCTCG	CGG	pKT56
CAMSAP3 (C-terminus)	GGTGAAGGCATCGACGCTCA	TGG	pKT57

表 3 ゲノム PCR に用いたプライマーリスト

Gene	Primer sequences (5'-3')	
RCC1 (C-terminus)	GAATGCCATTCCAGGCAG	oHH88
	TTCTGCACGTTCTCTGG	oHH89
RanGAP1 (C-terminus)	GCTGCCGCAGGACCAGGGCTTGGTG	oHH93
	ATTCCCTGGCCTATGTCTGCTGGAA	oHH94
NuMA (C-terminus)	GAGCCTCAAAGAAGGCC	oTK542
	AGCAGGAACCAGGGCCTAC	oTK566
TPX2 (C-terminus)	TCTGACATCCCTCTCACTG	oTK660
	GGAGTCTAATCGAGACATTC	oTK661
HSET (N-terminus)	GGCCCTCGGCTGTGGC	oTK766
	CTCCCCGGGTGCTCTAAG	oTK767
importin- β (C-terminus)	GGAGTAAGGAGTTTTGAGAGTATCG	oHH97
	AAATCTTCTCTAGAGCTAGGCAACG	oHH98
HURP (C-terminus)	CTCTTGATGGATACTTTACTG	oTK749
	CCCTTGAGAAAGAGTATATCTA	oTK750
TubG1 (C-terminus)	CCAAGCTCTTCGAGAGAAC	oTK848
	GTGTTTGCAGGCCAACAG	oTK849
TubG1 (exon2,3)	GTCCTTTCCTCAGACACGGG	oKT107
	ACGTCATAGAGCCTGTCCCT	oKT108
TubG2	GCCAAGGCAGGAGGATTGAT	oKT33

(5' upstream)	TTTTCTCCCTCAGCAGTCGC	oKT97
TubG2 (exon1)	ACACGGTGAGATCCCCATCT	oKT38
	CATGGAAGGGAAAGGGGGAC	oKT34
TubG2 (exon2-4)	CAGTTGGGTTTCGAGTTCTGGA	oKT98
	CCCCCACTCCATAACTTCACC	oKT99
TubG2 (exon5,6)	GTTGTGAGAGTGTGGCAGGA	oKT147
	TTCTGCGTCAGCCTCTTGAG	oKT101
TubG2 (exon7-11)	TTCTCTCCACCCTCCCTCTG	oKT150
	GAGCTCCTGAACAACCTCCC	oKT105
TubG2 (3'UTR)	TTCCATTGGCATCCCTCACC	oKT151
	GGGAAGTCTGGACACCACAG	oKT152
ch-TOG (C-terminus)	TCAGCCCTGGGATTACTGGA	oKT117
	CTTGTGTGCCTTTGGTCAGC	oKT118
CLASP1 (C-terminus)	CTTGGCGAGGGAGTTTCACT	oKT304
	CCCCTTGCCAATTCCTCCT	oKT305
TPX2 (N-terminus)	CCACTGCTCCTGGCCTAAAA	oKT196
	TGTGGCTGCCATCACTACAG	oKT172
AKAP450 (N-terminus)	GAGGGAGGGACTTTTCAGGC	oKT27
	CACCCTGGAAAGCACAATGC	oKT286
AKAP450 (Full length)	CAGGTAGGCTCAGGGAGGAT	oKT285
	CCCCCAAGGTGGAGTGTTAC	oKT287
CAMSAP3 (N-terminus)	ACTCCTGCATTGACAGAGGC	oKT219
	AATCGTACTGGTCCAGCGAC	oKT258
CAMSAP3 (C-terminus)	AGGTCCACGGCTGTACAAAG	oKT288
	GACTTTGCAGGGAGGTGACA	oKT222

表 4 使用した抗体リスト

Target protein	Source	Dilution rate
α -tubulin	Sigma-Aldrich, DM1A	1:2,000
NuMA	Abcam, ab36999	1:1,000
RCC1	Cell Signaling Technology, D15H6	1:100
RanGAP1	Santa Cruz Biotechnology, H-180	1:200
importin- β	GeneTex, 3E9 Mouse mAb	1:100
HURP	Nigg laboratory ⁷⁹	1:200
γ -tubulin	Sigma, GTU88	1:10,000
ch-TOG	QED Bioscience, #34032	1:1,000
CLASP1	Abcam, ab108620	1;1,000
TPX2	Vernos laboratory ¹⁷	1:200
CAMSAP3	Takeichi laboratory ¹³⁶	1:200
AKAP450	Ono laboratory ¹³⁷	1:1,000

表 5 RNAi に用いたプライマーリスト

siRNA	Sequences (5'-3')	Note
Luciferase	CGUACGCGGAAUACUUCGATT	35
CDK5RAP2	UGGAAGAUCUCCUAACUAATT	138
pericentrin	GCAGCUGAGCUGAAGGAGATT	139
AKAP450	AACUUUGAAGUUAACUAUCAA	140
NEDD1	GCAGACAUGUGUCAUUUATT	99
HAUS6	CAGUUAAGCAGGUACGAAATT	35
HSET	UCAGAAGCAGCCUGUCAATT	77
NuSAP	GGUGCAAGACUGUCCGUGUTT	141
ch-TOG	GAGCCCAGAGUGGUCCAAA	142

CLASP1	GGAUGAUUUACAAGACUGGTT	143
CLASP2	GACAUACAUGGGUCUUAGATT	143
CAMSAP1	CAUCGAGAAGCUUAACGAATT	144
CAMSAP2	UUGCAUGUGCUCAACAGUTT	145
CAMSAP3	CAGCAGCCACCAACUCCGAGGUGAAT	146
DHC	GCCAAAAGUUACAGACUUUTT	147
TPX2	GGGCAAAACUCCUUUGAGATT	148
Aurora B	GUCCCAGAUAGAGAAGGAGTT	149

10. 参考文献

1. Desai, A. & Mitchison, T. J. MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83–117 (1997).
2. Li, H., DeRosier, D. J., Nicholson, W. V., Nogales, E. & Downing, K. H. Microtubule Structure at 8 Å Resolution. *Structure* **10**, 1317–1328 (2002).
3. Mitchison, T. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044–1047 (1993).
4. Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242 (1984).
5. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 711–726 (2015).
6. Gudimchuk, N. B. & McIntosh, J. R. Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2021) doi:10.1038/s41580-021-00399-x.
7. Komarova, Y. *et al.* Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *Journal of Cell Biology* **184**, 691–706 (2009).
8. Maurer, S. P., Fourniol, F. J., Bohner, G., Moores, C. A. & Surrey, T. EBs Recognize a Nucleotide-Dependent Structural Cap at Growing Microtubule Ends. *Cell* **149**, 371–382 (2012).
9. Zhang, R., Alushin, G. M., Brown, A. & Nogales, E. Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell* **162**, 849–859 (2015).
10. Li, W. *et al.* Reconstitution of dynamic microtubules with Drosophila XMAP215, EB1, and Sentin. *Journal of Cell Biology* **199**, 849–862 (2012).
11. Brouhard, G. J. *et al.* XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase. *Cell* **132**, 79–88 (2008).
12. Al-Bassam, J. *et al.* CLASP Promotes Microtubule Rescue by Recruiting Tubulin Dimers to the Microtubule. *Developmental Cell* **19**, 245–258 (2010).
13. Jiang, K. *et al.* Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. *Developmental Cell* **28**, 295–309 (2014).
14. Moriwaki, T. & Goshima, G. Five factors can reconstitute all three phases of microtubule polymerization dynamics. *Journal of Cell Biology* **215**, 357–368 (2016).
15. Akhmanova, A. & Hoogenraad, C. C. Microtubule Minus-End-Targeting Proteins. *Current Biology* **25**, R162–R171 (2015).

16. Brunet, S. *et al.* Characterization of the TPX2 Domains Involved in Microtubule Nucleation and Spindle Assembly in *Xenopus* Egg Extracts. *MBoC* **15**, 5318–5328 (2004).
17. Gruss, O. J. *et al.* Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol* **4**, 871–879 (2002).
18. Roostalu, J., Cade, N. I. & Surrey, T. Complementary activities of TPX2 and chTOG constitute an efficient importin-regulated microtubule nucleation module. *Nat Cell Biol* **17**, 1422–1434 (2015).
19. Asenjo, A. B. *et al.* Structural Model for Tubulin Recognition and Deformation by Kinesin-13 Microtubule Depolymerases. *Cell Reports* **3**, 759–768 (2013).
20. Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J. & Walczak, C. E. Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes. *Cell* **96**, 69–78 (1999).
21. Oakley, C. E. & Oakley, B. R. Identification of γ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662–4 (1989).
22. Tovey, C. A. & Conduit, P. T. Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes and beyond. *Essays in Biochemistry* **62**, 765–780 (2018).
23. Kollman, J. M., Polka, J. K., Zelter, A., Davis, T. N. & Agard, D. A. Microtubule nucleating γ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature* **466**, 879–882 (2010).
24. Liu, P., Würtz, M., Zupa, E., Pfeffer, S. & Schiebel, E. Microtubule nucleation: The waltz between γ -tubulin ring complex and associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **68**, 124–131 (2021).
25. Oegema, K. *et al.* Characterization of Two Related *Drosophila* γ -tubulin Complexes that Differ in Their Ability to Nucleate Microtubules. *The Journal of Cell Biology* **144**, 721–33 (1999).
26. Zheng, Y., Wong, M. L. & Alberts, B. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578–83 (1995).
27. Alfaro-Aco, R., Thawani, A. & Petry, S. Biochemical reconstitution of branching microtubule nucleation. *eLife* **9**, e49797 (2020).
28. Choi, Y.-K., Liu, P., Sze, S. K., Dai, C. & Qi, R. Z. CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the γ -tubulin ring complex. *Journal of Cell Biology* **191**, 1089–1095 (2010).
29. Consolati, T. *et al.* Microtubule Nucleation Properties of Single Human γ TuRCs Explained by Their Cryo-EM Structure. *Developmental Cell* **53**, 603–617.e8 (2020).

30. Flor-Parra, I., Iglesias-Romero, A. B. & Chang, F. The XMAP215 Ortholog Alp14 Promotes Microtubule Nucleation in Fission Yeast. *Current Biology* **28**, 1681–1691.e4 (2018).
31. Tariq, A., Green, L., Jeynes, J. C. G., Soeller, C. & Wakefield, J. G. In vitro reconstitution of branching microtubule nucleation. *eLife* **9**, e49769 (2020).
32. Thawani, A., Kadzik, R. S. & Petry, S. XMAP215 is a microtubule nucleation factor that functions synergistically with the γ -tubulin ring complex. *Nat Cell Biol* **20**, 575–585 (2018).
33. Conduit, P. T., Wainman, A. & Raff, J. W. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 611–624 (2015).
34. Murata, T. *et al.* Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ -tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol* **7**, 961–968 (2005).
35. Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N. & Vale, R. D. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *Journal of Cell Biology* **181**, 421–429 (2008).
36. Meireles, A. M., Fisher, K. H., Colombié, N., Wakefield, J. G. & Ohkura, H. Wac: a new Augmin subunit required for chromosome alignment but not for acentrosomal microtubule assembly in female meiosis. *Journal of Cell Biology* **184**, 777–784 (2009).
37. Chan, J., Sambade, A., Calder, G. & Lloyd, C. Arabidopsis Cortical Microtubules Are Initiated along, as Well as Branching from, Existing Microtubules. *The Plant Cell* **21**, 2298–2306 (2009).
38. Uehara, R. & Goshima, G. Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase. *Journal of Cell Biology* **191**, 259–267 (2010).
39. Kamasaki, T. *et al.* Augmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in the spindle. *Journal of Cell Biology* **202**, 25–33 (2013).
40. Gruss, O. J. & Vernos, I. The mechanism of spindle assembly. *Journal of Cell Biology* **166**, 949–955 (2004).
41. Heald, R. *et al.* Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* **382**, 420–425 (1996).
42. Scrofani, J., Sardon, T., Meunier, S. & Vernos, I. Microtubule Nucleation in Mitosis by a RanGTP-Dependent Protein Complex. *Current Biology* **25**, 131–140 (2015).

43. Colombié, N. *et al.* Dual roles of Incenp crucial to the assembly of the acentrosomal metaphase spindle in female meiosis. *Development* **135**, 3239–3246 (2008).
44. Sampath, S. C. *et al.* The Chromosomal Passenger Complex Is Required for Chromatin-Induced Microtubule Stabilization and Spindle Assembly. *Cell* **118**, 187–202 (2004).
45. Verma, V. & Maresca, T. J. Direct observation of branching MT nucleation in living animal cells. *Journal of Cell Biology* **218**, 2829–2840 (2019).
46. Sanders, A. A. W. M. & Kaverina, I. Nucleation and Dynamics of Golgi-derived Microtubules. *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
47. Gavilan, M. P. *et al.* The dual role of the centrosome in organizing the microtubule network in interphase. *EMBO Rep* **19**, (2018).
48. Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M. & Rios, R. M. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* **28**, 1016–1028 (2009).
49. Wu, J. *et al.* Molecular Pathway of Microtubule Organization at the Golgi Apparatus. *Developmental Cell* **39**, 44–60 (2016).
50. Gimpel, P. *et al.* Nesprin-1 α -Dependent Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is Necessary for Nuclear Positioning in Muscle Cells. *Current Biology* **27**, 2999-3009.e9 (2017).
51. Noguchi, T., Koizumi, M. & Hayashi, S. Sustained Elongation of Sperm Tail Promoted by Local Remodeling of Giant Mitochondria in *Drosophila*. *Current Biology* **21**, 805–814 (2011).
52. Chen, J. V., Buchwalter, R. A., Kao, L.-R. & Megraw, T. L. A Splice Variant of Centrosomin Converts Mitochondria to Microtubule-Organizing Centers. *Current Biology* **27**, 1928-1940.e6 (2017).
53. Lynch, E. M., Grocock, L. M., Borek, W. E. & Sawin, K. E. Activation of the γ -Tubulin Complex by the Mto1/2 Complex. *Current Biology* **24**, 896–903 (2014).
54. Moutinho-Pereira, S., Debec, A. & Maiato, H. Microtubule Cytoskeleton Remodeling by Acentriolar Microtubule-organizing Centers at the Entry and Exit from Mitosis in *Drosophila* Somatic Cells. *MBoC* **20**, 2796–2808 (2009).
55. Nakaoka, Y., Kimura, A., Tani, T. & Goshima, G. Cytoplasmic Nucleation and Atypical Branching Nucleation Generate Endoplasmic Microtubules in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* **27**, 228–242 (2015).
56. Yamada, M. & Goshima, G. Mitotic Spindle Assembly in Land Plants: Molecules and Mechanisms. *Biology* **6**, 6 (2017).

57. 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).
58. Hannak, E. *et al.* The kinetically dominant assembly pathway for centrosomal asters in *Caenorhabditis elegans* is γ -tubulin dependent. *Journal of Cell Biology* **157**, 591–602 (2002).
59. Rogers, G. C., Rusan, N. M., Peifer, M. & Rogers, S. L. A Multicomponent Assembly Pathway Contributes to the Formation of Acentrosomal Microtubule Arrays in Interphase *Drosophila* Cells. *MBoC* **19**, 3163–3178 (2008).
60. Sallee, M. D., Zonka, J. C., Skokan, T. D., Raftrey, B. C. & Feldman, J. L. Tissue-specific degradation of essential centrosome components reveals distinct microtubule populations at microtubule organizing centers. *PLoS Biol* **16**, e2005189 (2018).
61. Wang, S. *et al.* NOCA-1 functions with γ -tubulin and in parallel to Patronin to assemble non-centrosomal microtubule arrays in *C. elegans*. *eLife* **4**, e08649 (2015).
62. Imasaki, T. *et al.* CAMSAP2 organizes a γ -tubulin-independent microtubule nucleation centre. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.03.01.433304> (2021) doi:10.1101/2021.03.01.433304.
63. King, M. R. & Petry, S. Phase separation of TPX2 enhances and spatially coordinates microtubule nucleation. *Nat Commun* **11**, 270 (2020).
64. Slep, K. C. & Vale, R. D. Structural Basis of Microtubule Plus End Tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Molecular Cell* **27**, 976–991 (2007).
65. Kapoor, T. Metaphase Spindle Assembly. *Biology* **6**, 8 (2017).
66. Reber, S. & Hyman, A. A. Emergent Properties of the Metaphase Spindle. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a015784 (2015).
67. Forbes, D. J., Travesa, A., Nord, M. S. & Bernis, C. Reprint of “Nuclear transport factors: global regulation of mitosis”. *Current Opinion in Cell Biology* **34**, 122–134 (2015).
68. Kalab, P. & Heald, R. The RanGTP gradient – a GPS for the mitotic spindle. *Journal of Cell Science* **121**, 1577–1586 (2008).
69. Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. & Ponstingl, H. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 2587–2591 (1994).
70. Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**, 80–82 (1991).

71. Stewart, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 195–208 (2007).
72. Cavazza, T. & Vernos, I. The RanGTP Pathway: From Nucleo-Cytoplasmic Transport to Spindle Assembly and Beyond. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, (2016).
73. Hueschen, C. L., Kenny, S. J., Xu, K. & Dumont, S. NuMA recruits dynein activity to microtubule minus-ends at mitosis. *eLife* **6**, e29328 (2017).
74. Okumura, M., Natsume, T., Kanemaki, M. T. & Kiyomitsu, T. Dynein–Dynactin–NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble. *eLife* **7**, e36559 (2018).
75. Garrett, S., Auer, K., Compton, D. A. & Kapoor, T. M. hTPX2 Is Required for Normal Spindle Morphology and Centrosome Integrity during Vertebrate Cell Division. *Current Biology* **12**, 2055–2059 (2002).
76. Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. & Vernos, I. Tpx2, a Novel Xenopus Map Involved in Spindle Pole Organization. *Journal of Cell Biology* **149**, 1405–1418 (2000).
77. Cai, S., Weaver, L. N., Ems-McClung, S. C. & Walczak, C. E. Kinesin-14 Family Proteins HSET/XCTK2 Control Spindle Length by Cross-Linking and Sliding Microtubules. *MBoC* **20**, 1348–1359 (2009).
78. Ems-McClung, S. C. *et al.* RanGTP induces an effector gradient of XCTK2 and importin α/β for spindle microtubule cross-linking. *Journal of Cell Biology* **219**, (2020).
79. Silljé, H. H. W., Nagel, S., Körner, R. & Nigg, E. A. HURP Is a Ran-Importin β -Regulated Protein that Stabilizes Kinetochore Microtubules in the Vicinity of Chromosomes. *Current Biology* **16**, 731–742 (2006).
80. Chang, C.-C., Huang, T.-L., Shimamoto, Y., Tsai, S.-Y. & Hsia, K.-C. Regulation of mitotic spindle assembly factor NuMA by Importin- β . *Journal of Cell Biology* **216**, 3453–3462 (2017).
81. Ems-McClung, S. C., Zheng, Y. & Walczak, C. E. Importin α/β and Ran-GTP Regulate XCTK2 Microtubule Binding through a Bipartite Nuclear Localization Signal. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 46–57 (2004).
82. Giesecke, A. & Stewart, M. Novel Binding of the Mitotic Regulator TPX2 (Target Protein for Xenopus Kinesin-like Protein 2) to Importin- α . *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **285**, 17628-17635 (2010).
83. Kalab, P., Weis, K. & Heald, R. Visualization of a Ran-GTP Gradient in Interphase and Mitotic Xenopus Egg Extracts. *Science* **295**, 2452–2456 (2002).

84. Nachury, M. V. *et al.* Importin beta Is a Mitotic Target of the Small GTPase Ran in Spindle Assembly. *Cell* **104**, 95–106 (2001).
85. Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A. & Guarguaglini, G. Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin α on TPX2 Activity. *Cell* **104**, 83–93 (2001).
86. Wiese, C. *et al.* Role of Importin- β in Coupling Ran to Downstream Targets in Microtubule Assembly. *Science* **291**, 653–656 (2001).
87. Dumont, J. *et al.* A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *Journal of Cell Biology* **176**, 295–305 (2007).
88. Kaláb, P., Pralle, A., Isacoff, E. Y., Heald, R. & Weis, K. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* **440**, 697–701 (2006).
89. Drutovic, D., Duan, X., Li, R., Kalab, P. & Solc, P. RanGTP and importin β regulate meiosis I spindle assembly and function in mouse oocytes. *EMBO J* **39**, (2020).
90. Kapheim, K. M. *et al.* Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science* **348**, 1139–1143 (2015).
91. Furuta, M., Hori, T. & Fukagawa, T. Chromatin binding of RCC1 during mitosis is important for its nuclear localization in interphase. *MBoC* **27**, 371–381 (2016).
92. Hasegawa, K., Ryu, S. J. & Kaláb, P. Chromosomal gain promotes formation of a steep RanGTP gradient that drives mitosis in aneuploid cells. *Journal of Cell Biology* **200**, 151–161 (2013).
93. Moutinho-Pereira, S. *et al.* Genes involved in centrosome-independent mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 19808–19813 (2013).
94. Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. & Brattain, D. E. Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonie Carcinoma. *CANCER RESEARCH* **41**, 1751–6 (1981).
95. Tungadi, E. A., Ito, A., Kiyomitsu, T. & Goshima, G. Human microcephaly ASPM protein is a spindle pole-focusing factor that functions redundantly with CDK5RAP2. *Journal of Cell Science* jcs.203703 (2017) doi:10.1242/jcs.203703.
96. Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y. & Kanemaki, M. T. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. *Cell Reports* **15**, 210–218 (2016).

97. Ohashi, T., Yamamoto, T., Yamanashi, Y. & Ohsugi, M. Human TUBG2 gene is expressed as two splice variant mRNA and involved in cell growth. *FEBS Lett* **590**, 1053–1063 (2016).
98. Andresen, M., Schmitz-Salue, R. & Jakobs, S. Short Tetracysteine Tags to N¹-Tubulin Demonstrate the Significance of Small Labels for Live Cell Imaging. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 5616–22 (2004).
99. Lüders, J., Patel, U. K. & Stearns, T. GCP-WD is a γ -tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol* **8**, 137–147 (2006).
100. Liu, L., Tüzel, E. & Ross, J. L. Loop formation of microtubules during gliding at high density. *J. Phys.: Condens. Matter* **23**, 374104 (2011).
101. Yu, N. *et al.* Isolation of Functional Tubulin Dimers and of Tubulin-Associated Proteins from Mammalian Cells. *Current Biology* **26**, 1728–1736 (2016).
102. Li, G. & Moore, J. K. Microtubule dynamics at low temperature: evidence that tubulin recycling limits assembly. *MBoC* **31**, 1154–1166 (2020).
103. Rieder, C. L. & Cole, R. W. Cold-Shock and the Mammalian Cell Cycle. *Cell Cycle* **1**, 168–174 (2002).
104. David, A. F. *et al.* Augmin accumulation on long-lived microtubules drives amplification and kinetochore-directed growth. *Journal of Cell Biology* **218**, 2150–2168 (2019).
105. Wong, Y. L. *et al.* Reversible centriole depletion with an inhibitor of Polo-like kinase 4. *Science* **348**, 1155–1160 (2015).
106. Cavazza, T., Margaretti, P. & Vernos, I. The sequential activation of the mitotic microtubule assembly pathways favors bipolar spindle formation. *MBoC* **27**, 2935–2945 (2016).
107. Katayama, H., Sasai, K., Kloc, M., Brinkley, B. R. & Sen, S. Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells. *Cell Cycle* **7**, 2691–2704 (2008).
108. Tulu, U. S., Fagerstrom, C., Ferenz, N. P. & Wadsworth, P. Molecular Requirements for Kinetochore-Associated Microtubule Formation in Mammalian Cells. *Current Biology* **16**, 536–541 (2006).
109. Magnaghi-Jaulin, L., Eot-Houllier, G., Gallaud, E. & Giet, R. Aurora A Protein Kinase: To the Centrosome and Beyond. *Biomolecules* **9**, 28 (2019).
110. Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H. & Earnshaw, W. C. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 789–803 (2012).

111. Motegi, F., Velarde, N. V., Piano, F. & Sugimoto, A. Two Phases of Astral Microtubule Activity during Cytokinesis in *C. elegans* Embryos. *Developmental Cell* **10**, 509–520 (2006).
112. Amos, L. A. & Lijwe, J. How Taxol@ stabilises microtubule structure. *Chemistry & Biology* **6**, R65-9 (1999).
113. Holubcová, Z., Blayney, M., Elder, K. & Schuh, M. Human oocytes. Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science* **348**, 1143–1147 (2015).
114. Gaglio, T., Saredi, A. & Compton, D. A. NuMA Is Required for the Organization of Microtubules into Aster-Like Mitotic Arrays. *Journal of Cell Biology* **131**, 693–708 (1995).
115. Silk, A. D., Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *Journal of Cell Biology* **184**, 677–690 (2009).
116. Roscioli, E. *et al.* Importin- β negatively regulates multiple aspects of mitosis including RANGAP1 recruitment to kinetochores. *Journal of Cell Biology* **196**, 435–450 (2012).
117. Efimov, A. *et al.* Asymmetric CLASP-Dependent Nucleation of Noncentrosomal Microtubules at the trans-Golgi Network. *Developmental Cell* **12**, 917–930 (2007).
118. Wieczorek, M., Bechstedt, S., Chaaban, S. & Brouhard, G. J. Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation. *Nat Cell Biol* **17**, 907–916 (2015).
119. Logarinho, E. *et al.* CLASPs prevent irreversible multipolarity by ensuring spindle-pole resistance to traction forces during chromosome alignment. *Nat Cell Biol* **14**, 295–303 (2012).
120. Maffini, S. *et al.* Motor-Independent Targeting of CLASPs to Kinetochores by CENP-E Promotes Microtubule Turnover and Poleward Flux. *Current Biology* **19**, 1566–1572 (2009).
121. Woodruff, J. B. *et al.* The Centrosome Is a Selective Condensate that Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin. *Cell* **169**, 1066-1077.e10 (2017).
122. Roostalu, J. & Surrey, T. Microtubule nucleation: beyond the template. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 702–710 (2017).
123. Brouhard, G. J. & Rice, L. M. The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. *Journal of Cell Biology* **207**, 323–334 (2014).

124. Nawrotek, A., Knossow, M. & Gigant, B. The Determinants That Govern Microtubule Assembly from the Atomic Structure of GTP-Tubulin. *Journal of Molecular Biology* **412**, 35–42 (2011).
125. Ayukawa, R. *et al.* GTP-dependent formation of straight tubulin oligomers leads to microtubule nucleation. *Journal of Cell Biology* **220**, e202007033 (2021).
126. Zheng, Y. *et al.* A perinuclear microtubule-organizing centre controls nuclear positioning and basement membrane secretion. *Nat Cell Biol* **22**, 297–309 (2020).
127. Richardson, C. E. *et al.* PTRN-1, a microtubule minus end-binding CAMSAP homolog, promotes microtubule function in *Caenorhabditis elegans* neurons. *eLife* **3**, e01498 (2014).
128. Wu, C., Singaram, V. & McKim, K. S. mei-38 Is Required for Chromosome Segregation During Meiosis in *Drosophila* Females. *Genetics* **180**, 61–72 (2008).
129. Wei, J.-H., Zhang, Z. C., Wynn, R. M. & Seemann, J. GM130 Regulates Golgi-Derived Spindle Assembly by Activating TPX2 and Capturing Microtubules. *Cell* **162**, 287–299 (2015).
130. Brownlee, C. & Heald, R. Importin α partitioning to the plasma membrane regulates intracellular scaling. *Cell* **176**, 805–815.e8 (2019).
131. Eibes, S. *et al.* Nek9 Phosphorylation Defines a New Role for TPX2 in Eg5-Dependent Centrosome Separation before Nuclear Envelope Breakdown. *Current Biology* **28**, 121–129.e4 (2018).
132. Weaver, L. N. *et al.* The Ran-GTP Gradient Spatially Regulates XCTK2 in the Spindle. *Current Biology* **25**, 1509–1514 (2015).
133. Breuer, M. *et al.* HURP permits MTOC sorting for robust meiotic spindle bipolarity, similar to extra centrosome clustering in cancer cells. *Journal of Cell Biology* **191**, 1251–1260 (2010).
134. Wong, J. & Fang, G. HURP controls spindle dynamics to promote proper interkinetochore tension and efficient kinetochore capture. *Journal of Cell Biology* **173**, 879–891 (2006).
135. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281–2308 (2013).
136. Tanaka, N., Meng, W., Nagae, S. & Takeichi, M. Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 20029–20034 (2012).

137. Takahashi, M. *et al.* Characterization of a Novel Giant Scaffolding Protein, CG-NAP, That Anchors Multiple Signaling Enzymes to Centrosome and the Golgi Apparatus. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17267–17274 (1999).
138. Fong, K.-W., Choi, Y.-K., Rattner, J. B. & Qi, R. Z. CDK5RAP2 Is a Pericentriolar Protein That Functions in Centrosomal Attachment of the gamma-Tubulin Ring Complex. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 115–125 (2008).
139. Dammermann, A. & Merdes, A. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *Journal of Cell Biology* **159**, 255–266 (2002).
140. Wang, Z. *et al.* Conserved Motif of CDK5RAP2 Mediates Its Localization to Centrosomes and the Golgi Complex. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 22658–22665 (2010).
141. Sironi, L. *et al.* Automatic quantification of microtubule dynamics enables RNAi-screening of new mitotic spindle regulators. *Cytoskeleton* **68**, 266–278 (2011).
142. Cassimeris, L. & Morabito, J. TOGp, the Human Homolog of XMAP215/Dis1, Is Required for Centrosome Integrity, Spindle Pole Organization, and Bipolar Spindle Assembly. *MBoC* **15**, 1580–1590 (2004).
143. Mimori-Kiyosue, Y. *et al.* CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *Journal of Cell Biology* **168**, 141–153 (2005).
144. Wei, J., Xu, H. & Meng, W. Noncentrosomal microtubules regulate autophagosome transport through CAMSAP2-EB1 cross-talk. *FEBS Lett* **591**, 2379–2393 (2017).
145. Yau, K. W. *et al.* Microtubule Minus-End Binding Protein CAMSAP2 Controls Axon Specification and Dendrite Development. *Neuron* **82**, 1058–1073 (2014).
146. Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T. & Takeichi, M. Anchorage of Microtubule Minus Ends to Adherens Junctions Regulates Epithelial Cell-Cell Contacts. *Cell* **135**, 948–959 (2008).
147. Splinter, D. *et al.* Bicaudal D2, Dynein, and Kinesin-1 Associate with Nuclear Pore Complexes and Regulate Centrosome and Nuclear Positioning during Mitotic Entry. *PLoS Biol* **8**, e1000350 (2010).
148. Bird, A. W. & Hyman, A. A. Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *Journal of Cell Biology* **182**, 289–300 (2008).

149. Yüce, Ö., Piekny, A. & Glotzer, M. An ECT2–centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *Journal of Cell Biology* **170**, 571–582 (2005).

11. 謝辞

指導教官である五島剛太博士に感謝いたします。私は博士後期課程に進学する際に、研究領域および研究題目を変えようと一念発起しました。細胞生物学会で知り合ってから、その後快く所属を許可していただいた五島博士には感謝の念に堪えません。所属後も手厚く指導や議論をしていただいたことで、研究者としてより一層成長することが出来ました。心より感謝申し上げます。

清光智美博士には、五島研究室所属後、HCT116細胞の操作方法、CRISPR/Cas9法やAID法など本研究の基盤となる技術を指導していただきました。研究に向かう姿勢やアウトプットの方法など非常に参考になりました。OISTに栄転されてからも連絡をした時には快くお返事をいただき、厚く感謝いたします。

山田萌恵博士には、様々な実験方法、顕微鏡の操作方法や試薬等について教えていただいたとともに、原著の添削で非常にお世話になりました。細胞生物学会にて知り合うことがなければ、五島研究室に所属しなかったかもしれないと考えると、あの時声を掛けていただきありがとうございます。厚く感謝いたします。

江塚智哉博士には、特にタンパク質精製やIn vitro実験の操作方法で多くのアドバイスをいただきました。また私生活でも、ジャズライブにご一緒させていただいたり、外食をしたりと楽しい時間を過ごさせていただき、厚く感謝いたします。

上原亮太博士が以前に作製した試料を原著第一章にて使わせていただきました。また試料について快く情報開示していただいたこと、厚く感謝いたします。

Elsa Amelia Tungadiさん、武田葵さん、西川真利恵さんとは、同じヒト培養細胞を用いてグループとして活動させていただき、指導もさせていただきました。とても貴重な経験となりました、厚く感謝いたします。

稲葉理絵さん、奥村雅子さん、川村京子さん、前佛恭子さん、上田美紀さん、瀨瀬知枝美さん、箱崎まやさんには、実験の補助から事務手続きまで幅広くサポートしていただきました。移籍後の環境の変化に困惑したこともありましたが、みなさまのおかげで雑念なく研究に没頭することが出来ました。厚く感謝いたします。

五島研究室のみなさま、ならびに菅島臨海実験所のみなさまには、気さくに話しかけてくださり、また議論もしていただき、厚く感謝いたします。研究の良いモチベーションとなりました。

また博士前期過程までお世話になった、東北大学大学院杉本研究室のみなさまに感謝申し上げます。杉本亜砂子博士、春田奈美博士、久保田幸彦博士、住吉英輔博士、本多優博士、生井聡史博士、津山研二博士には、研究活動の基礎を教えてくださいました。この教えがなければ原著を記すことは叶わなかったと思います、厚く感謝いたします。

最後に、大学入学での仙台への移住、また博士後期課程での名古屋への移住を快く受け入れてくれたとともに、約1年間のオーバードクターを含めて温かく見守ってくれた家族、所属を変えても連絡を取り続けてくれた友人に感謝いたします。