

主論文

小頭症原因遺伝子 Asp/ASPM による
紡錘体の極収束機構の解析

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

伊藤 亜実

《目次》

| | |
|--|----|
| 要旨 | 2 |
| 序論 | 4 |
| 結果 | 12 |
| 第一部 ショウジョウバエ S2 細胞における Asp の機能解析 | 12 |
| 第二部 ヒト HCT116 細胞における ASPM の機能解析 | 19 |
| 考察 | 25 |
| 材料と方法 | 28 |
| 図 | 33 |
| 表 | 56 |
| 動画の説明 | 63 |
| 参考文献 | 66 |
| 謝辞 | 74 |

《要旨》

生命体は、細胞分裂を繰り返すことで自身を構成する細胞を増殖させる。そのため、細胞分裂の際に遺伝物質を正確に配分することは、遺伝情報を維持する上で非常に重要である。紡錘体は、遺伝物質である染色体の分配に必要とされる巨大な構造物であり、主に微小管と呼ばれる極性を持った細胞骨格によって形成される。動物細胞の有糸分裂では、紡錘体は2つの極を持った菱形をしており、微小管のプラス端側が紡錘体中央に、マイナス端側が極に集積することが知られている。紡錘体の極には中心体と呼ばれる微小管形成を行う構造体が存在する。そのため長い間、中心体から伸長した微小管が紡錘体を形成することで、極を持った紡錘体構造が形成されると考えられていた。ところが、近年、中心体非依存的な微小管形成経路が明らかになったことで、紡錘体形成機構が改めて見直されるようになった。現在では、紡錘体内部にも様々な長さの微小管が存在しており、それらのマイナス端が何らかの働きで収束することで、紡錘体の極が形成されると考えられている。しかしながら、これまでに報告された極形成に関するモデルはどれも限定的であり、不明な点が多い。

Asp は、ショウジョウバエで同定された極形成因子である。小頭症原因遺伝子として有名なヒト ASPM のオーソログであり、変異により脳サイズの減少が認められる。細胞レベルでは、Asp の機能を阻害すると、紡錘体の極領域で微小管マイナス端が収束せずに広がり、染色体の分配異常が誘発される。しかしながら、Asp や ASPM が極形成時に果たす具体的な機能は明らかになっていない。また、ショウジョウバエでは、極形成に関わるもう1つの因子としてキネシン 14 が同定されているが、Asp とキネシン 14 がどのような協調関係で機能するかについても不明である。

そこで本研究では、極形成時における Asp の機能を解明するために、ショウジョウバエ S2 細胞を用いた細胞生物学的、生化学的解析を行った。まず、生細胞観察と多重阻害実験により、Asp がキネシン 14 とは独立に機能していることを明らかにした。この際、各タンパク質を欠損した細胞の詳細な比較から、極の収束を直接担うのは Asp であり、キネシン 14 は様々な場所で微小管を架橋し、紡錘体全体をまとめる機能を果たしていることが示唆された。次に、Asp の部分欠失断片を作成し、細胞内における局在と機能を評価した。その結果、紡錘体微小管を収束させるために必要かつ十分な領域を同定した。同時に、Asp の部分欠失断片を使った試験管内実験を行い、Asp が微小管架橋活性を持つことを明らかにした。また興味深いことに、生細胞観察の結果、Asp-GFP が極付近に蓄積すると同時に、紡錘体内部で形成された微小管のマイナス端にも蓄積し、微小管の動きに伴い極方向へ移動することを見出した。さらに、Asp 欠損細胞における微小管マイナス端の追跡実験から、Asp が紡錘体内部で形成された微小管のマイナス端を別の微小管と架橋することで、全ての微小管の極付近での収束を保障していることを示した。

一方、ヒト ASPM に関しては、最も一般的な小頭症原因遺伝子であるにもかかわらず、細胞

内における機能がほとんど明らかになっていない。そこで ASPM の紡錘体内機能を検証するため、ヒト培養細胞である HCT116 細胞を用いた細胞生物学的解析を行った。まず、ASPM ノックアウト株を作成し、生細胞観察を行ったが、紡錘体の形態や分裂期の進行に関する異常は認められなかった。ところが、ASPM ノックアウト株にキネシン 14 の阻害剤を加えたところ、紡錘体極の異常な分離が発生することが明らかになった。また、中心体依存的な微小管形成の活性化因子である CDK5RAP2 を分解すると、ASPM ノックアウト株で紡錘体の極収束異常と分裂期の著しい遅延が引き起こされることを発見した。これにより、紡錘体の極形成過程において、ASPM が中心体やキネシン 14 と冗長的に機能することが示された。さらに、小頭症患者の ASPM 変異が細胞内で及ぼす影響を検証するため、患者から同定された ASPM 変異を導入した株を作成した。その結果、CDK5RAP2 が存在しない条件で、同じような極収束異常が観察された。これにより、紡錘体の極収束異常が小頭症を発症させる原因であるという可能性が示唆された。

本研究では、ショウジョウバエ *Asp* の極収束機能を明らかにし、紡錘体極形成機構の新たな分子モデルを構築した。また、ヒト ASPM が極収束因子であること、そして、小頭症患者の変異でも極収束異常が見られることを示した。これらの結果は、紡錘体構造の理解を深めるだけでなく、小頭症の研究を推進する新たな知見となるだろう。

《序論》

細胞分裂

細胞分裂は、新たな細胞を作り出すための唯一のプロセスである。生命体は、自身を構成する細胞を増殖することで、個体の成長や組織の分化、生命の維持等を行う。そのため、既存の細胞(母細胞)から新たな細胞(娘細胞)を作り出す細胞分裂という現象は、あらゆる生命体にとって必要不可欠であり、正しい遺伝情報を持った正常な細胞の産生を保障しなくてはならない。真核生物の体細胞分裂では、遺伝情報の正確な引き継ぎを行うため、非常に秩序だった細胞周期に沿って細胞分裂が繰り返される。細胞周期は間期(interphase)と分裂期(Mitotic phase, M 期)に分かれており、まず間期の間に DNA の複製が行われる。その後、分裂期に入ると、核の分裂を行う有糸分裂(mitosis)と、細胞の分裂を行う細胞質分裂(cytokinesis)が行われ、母細胞と同一の遺伝情報を持った娘細胞が 2 つ形成される。動物細胞の有糸分裂は、細胞内の劇的な構造変化に基づき、以下の 5 つの時期に分けられる(図 1)。

- 1) 前期(prophase) : 染色体の凝集が開始される。
微小管の重合が起こり、紡錘体の形成が始まる。
- 2) 前中期(prometaphase) : 核膜崩壊が起こり、染色体に結合する微小管が現れる。
- 3) 中期(metaphase) : 染色体が紡錘体の中央に並び、
2 つの極を持った紡錘体が完成する。
- 4) 後期(anaphase) : 染色体が分離し、極方向へ移動する。
紡錘体の伸長が起こり、極の距離が広がる
- 5) 終期(telophase) : 分離した染色体が紡錘体極に到達し、脱凝集する。
核膜が再形成され、紡錘体が解体される。

紡錘体

細胞分裂の際に最も重要なことは、分裂後の細胞でも元の遺伝情報を正確に維持することである。真核生物の有糸分裂では、遺伝物質である染色体を均等に分配するために、有糸分裂紡錘体という巨大な構造体を必要とする(本論文では、有糸分裂紡錘体を「紡錘体」と記載する)。紡錘体は、主に微小管と呼ばれる細胞骨格によって形成されており、動物細胞では 2 つの極を持った菱形をしている(図 1[中期]、2A、3)。

多くの場合、極には中心体が存在する(図 2A、3)。中心体は微小管形成の核となる γ -チュ

ーブリン複合体 (γ -tubulin ring complex) を構成因子としており、分裂期前期の紡錘体形成時には、中心体周辺から多数の微小管が伸長する。そのため、中心体は長年唯一の微小管形成中心だとされており、中心体から伸長した微小管が染色体の探索と捕捉を行うことで、中心体を極とした菱形の中期紡錘体が形成されるというモデルが提唱されていた (Mitchison et al., 1986; Wadsworth and Khodjakov, 2004)。ところが、その後行われたショウジョウバエの研究により、中心体を欠損しても紡錘体の形状や機能に著しい変化が起こらないことが明らかになった (Basto et al., 2006; Megraw et al., 2001)。それにより、中心体を持つ細胞でも、中心体非依存的に伸長した微小管が紡錘体形成に寄与していることが示唆され、従来の紡錘体形成モデルが見直されるようになった。

中心体非依存的な微小管形成経路は、当初、中心体を持たない卵母細胞や卵抽出液を使った研究によって発見された。これらの細胞や実験系では、染色体近傍から伸長した微小管がモータータンパク質によって並べられることで、収束した 2 つの極を持つ紡錘体が形成される (Heald et al., 1996; Matthies et al., 1996; Merdes and Cleveland, 1997)。この染色体依存的な微小管形成は中心体を持つ細胞でも認められることから、モータータンパク質による微小管の自己集合も紡錘体形成に寄与していることが明らかになった (Khodjakov et al., 2000; Walczak and Heald, 2008)。

さらに近年、紡錘体形成時に見られる第三の微小管形成経路として、微小管依存的な微小管形成が報告された。この経路を担う主要な因子はオーグミン複合体であり、自身を介して γ -チューブリン複合体を既存の微小管 (母微小管) 上に局在させ、新たな微小管 (娘微小管) を形成する (図 2B; Goshima et al., 2008)。オーグミンの機能を阻害すると、中心体からの微小管形成が見られるにもかかわらず、分裂期の進行や染色体の整列に異常が引き起こされる。そのため、オーグミンを介した微小管依存的な微小管形成もまた、紡錘体の形成に寄与することが明らかになった (Goshima et al., 2008; Uehara et al., 2009)。実際、いくつかの研究結果から、紡錘体は中心体から染色体まで届くような長い微小管だけで形成されているのではなく、短い微小管が多数架橋しあうことでその形を維持しているということが示唆されている (Burbank et al., 2006; Kamasaki et al., 2013; Mastronarde et al., 1993; McIntosh and Hays, 2016; Yang et al., 2007)。

現在では、上記の 3 経路から伸長した様々な長さの微小管によって紡錘体が形成されることが広く認識されている。紡錘体は古くから研究対象とされてきた非常に有名な構造物であるが、中心体以外の微小管形成経路が明らかになったことで、近年、従来の紡錘体形成モデルを改訂する必要が出てきた。特に紡錘体の極に関しては、単純に中心体によって形成されるのではなく、紡錘体内部に存在する様々な長さの微小管が何らかの働きで収束することによって形成されると考えられる。しかしながら、これまでに報告された極収束モデルはどれも限定的であり、紡錘体を形成する全ての微小管を包括した極収束機構は、まだ明らかになっていない。

微小管

微小管は真核生物で広く保存された、極性を持った繊維状の細胞骨格である。紡錘体形成に限らず、細胞内の物質輸送や細胞の成長、移動などに重要な役割を多数果たしていることが知られている。 α -チューブリンと β -チューブリンが結合したヘテロ二量体を最小構成単位としており、それらが規則的に重合することで極性を持った構造を取る。端に露出するチューブリンの違いから、微小管の両端は安定性に違いが見られ、重合や脱重合が起こりやすい動的な方をプラス端、起こりにくい安定な方をマイナス端と呼ぶ。試験管内では、高濃度のチューブリン二量体さえあれば微小管を形成できることが知られているが、細胞内では微小管形成中心を介して形成されるのが一般的である。その多くが、 γ -チューブリン複合体を微小管重合核として利用しており、そこからプラス端が伸長する。そのため、中心体依存的に伸長した微小管は中心体側がマイナス端であり、放射状に伸びた先は全てプラス端となる(図 2A)。また、オーグミン依存的に形成された微小管は、 γ -チューブリン複合体を起点として母微小管と平行に伸長するため、マイナス端側を極へ向けた状態で紡錘体内に存在する(図 2B)。

紡錘体を形成する微小管は、その特徴によって動原体微小管(kinetochore microtubule)、非動原体微小管(non-kinetochore microtubule)、星状体微小管(astral microtubule, aster)の3種類に分けられる(図 2A; Goshima et al., 2005a; Uehara and Goshima, 2010)。動原体微小管は、中心体と動原体(染色体上に存在する微小管結合領域)を結ぶ微小管であり、染色体の分離と移動に密接に関わる。一方、動原体と結合していない紡錘体内部の微小管は非動原体微小管と呼ばれ、紡錘体構造の維持に寄与すると考えられている。残りの微小管は星状体微小管に分類され、中心体から紡錘体外部に伸長しているものを指す。星状体微小管の中には細胞表層に到達するものもあり、紡錘体の細胞内配置に影響することが知られている。なお、動原体微小管と非動原体微小管は紡錘体内部に存在するため、本論文で紡錘体内部の微小管(intraspindle microtubule)と記述した場合には、両方の微小管を意味する。

紡錘体内部の微小管は、特徴的な微小管の流れを示すことが知られている。この流れはフラックス(flux)と呼ばれ、2つの方法によって生み出される。1つは、重合脱重合によって起こる微小管のトレッドミル(treadmilling)である。紡錘体中央から極まで到達する微小管は、紡錘体中央側のプラス端でチューブリンを重合し、極側のマイナス端で脱重合することで、自身の長さを一定に保つ。この状態はトレッドミルと呼ばれ、微小管を構成するチューブリンが常に極方向へと移動する。もう1つは、プラス端指向性のモータータンパク質による微小管滑動(sliding)である。非動原体微小管のうち、紡錘体中央付近に存在する微小管は、逆の極性を持つ微小管のプラス端と自身のプラス端を架橋させていることが知られている(図 2A[下])。この架橋を行っているのがプラス端指向性のモータータンパク質であり、反平行微小管のマイナス端側を反対方向に滑らせることで、それぞれの微小管を極方向へ移動させるのである。これらの流れは、中期紡錘体の長さの維持や、染色体の分配、後期で起こる微小管の伸長に関与

することが報告されている (Goshima and Scholey, 2010; Khodjakov and Kapoor, 2005; Rogers et al., 2005)。

紡錘体極の形成

紡錘体形成や染色体分配に異常が見られると、異数性の核や小核を持つ細胞が発生し、ガン、小頭症などの疾患を引き起こす原因となる (Maiato and Logarinho, 2014; Rujano et al., 2013; Zhang et al., 2015)。しかしながら、現在、紡錘体形成機構は完全には解明されておらず、特に紡錘体極で起こる微小管収束に関する理解は不十分である。

紡錘体の極は、微小管のマイナス端の集合地である (図 2A)。中心体から伸長した微小管が極側にマイナス端を持つのは勿論のこと、染色体依存的に形成された微小管も、モータータンパク質の働きによって染色体からマイナス端側を遠ざけるように並べられるためである (Merdes and Cleveland, 1997)。また、紡錘体内部の γ -チューブリンの動態を観察した最近の研究から、紡錘体内部の微小管マイナス端が極へ向かって移動していることが示唆された (Lecland and Luders, 2014)。これにより、オーグミン依存的に形成された微小管もまた、マイナス端を極へ移動させていると考えられる。集められた微小管マイナス端は、中心体非存在下であっても、1 つの収束点を形成し極として機能する (図 2A[下])。そのため、極の形成機構を解明するためには、極で微小管マイナス端がどのようにして収束しているのかという問題を明らかにする必要がある。

これまでに、紡錘体の極形成に関わる因子として 4 つのタンパク質が同定されている。そのうち 2 つは、モータータンパク質である細胞質ダイニンとキネシン 14 である (Endow et al., 1994; Goshima et al., 2005a; Heald et al., 1996; Heald et al., 1997; Morales-Mulia and Scholey, 2005; Mountain et al., 1999; Walczak et al., 1998)。細胞質ダイニンは微小管上をプラス端からマイナス端へ移動するモータータンパク質であり、ダイニン重鎖と呼ばれる大きなモータードメインを含んだポリペプチドの二量体と、いくつかの関連した小さなサブユニットで構成されている (Hirokawa, 1998; Vale, 2003)。ショウジョウバエでは、ダイニン重鎖 (Dhc64C) のノックダウンによって細胞質ダイニンの機能を阻害すると、中心体が微小管マイナス端の収束点から解離した紡錘体が観察される (図 3; Goshima et al., 2005a; Morales-Mulia and Scholey, 2005)。一方、キネシン 14 は、モータードメインを共通に持つ巨大なキネシンスーパーファミリーの一員である。他のキネシンとは異なり、微小管上をマイナス端へ向かって歩くことができるという特徴を持つ (McDonald et al., 1990; Walker et al., 1990)。ショウジョウバエでは Ncd、ヒトでは HSET と呼ばれ、Ncd を欠損したショウジョウバエ細胞では極の収束異常が見られる (図 3; Goshima et al., 2005a; McDonald et al., 1990)。これら 2 つのモータータンパク質は微小管架橋活性とマイナス端指向性の移動能力を持つため、細胞質ダイニンが微小管をマイナス端方向へ運び、Ncd がそのマイナス端同士を架橋するという極収束モデルが広く認識されている (Baumbach et al.,

2015; Endow et al., 1994; Goshima et al., 2005a; Maiato et al., 2004)。

残りの 2 つは、非モータータンパク質の NuMA と Asp であり、どちらも極の収束に関わることが知られている。このうち NuMA (nuclear mitotic apparatus) に関しては、微小管架橋活性を持ち、紡錘体の極に局在することが報告されている (Merdes et al., 1996)。また、細胞質ダイニンと結合し、極へ運ばれるため、細胞質ダイニンとの相互作用を介して微小管を架橋させることも可能である (Merdes et al., 2000; Radulescu and Cleveland, 2010)。一方で、Asp が極形成時に果たす具体的な機能は、これまであまり明らかになっていない。

Drosophila Asp

Asp (abnormal spindle) は、当初、紡錘体の形態異常を示すショウジョウバエ変異体から同定された。現在では、家族性小頭症の原因遺伝子であるヒト ASPM (abnormal spindle-like microcephaly associated) のオーソログとしても有名である (Bond et al., 2002; Ripoll et al., 1985)。ショウジョウバエの細胞では、Asp が欠損すると、微小管マイナス端が収束せず、中心体が解離した紡錘体が形成される (図 3; Morales-Mulia and Scholey, 2005; Saunders et al., 1997; Schoborg et al., 2015; Wakefield et al., 2001)。また、免疫染色による観察から、Asp が紡錘体極に局在することが知られている。なお、この局在は中心体非存在下でも認められるため、Asp は中心体だけでなく微小管マイナス端の収束点にも集積すると考えられている (Morales-Mulia and Scholey, 2005; Saunders et al., 1997; Wakefield et al., 2001)。興味深いことに、近年、ショウジョウバエの *asp* 変異体でも脳サイズの減少が報告された (Rujano et al., 2013; Schoborg et al., 2015)。この表現型を起こす原因の 1 つとしては、紡錘体の極収束異常による染色体分配の失敗が挙げられている (Rujano et al., 2013)。しかしながら、Asp がどのようにして極収束機能を果たすのかは不明である。

当初、細胞抽出液から集めた Asp タンパク質を使った生化学実験により、Asp は中心体周辺で微小管形成を起こす活性を持つと報告されていた (do Carmo Avides and Glover, 1999)。ところが、後に行われた *asp* 変異体細胞の研究で、Asp 欠損時も中心体から微小管が形成されることや、中心体の有無にかかわらず Asp 欠損が極収束異常を引き起こすことが報告され、生化学実験と矛盾することが明らかになった (Wakefield et al., 2001)。また、Asp がモータータンパク質であるミオシンや細胞質ダイニンを制御する活性を持ち、それらのタンパク質を介して紡錘体の回転や配置の制御に関わるという可能性も議論されている (Morales-Mulia and Scholey, 2005; Rujano et al., 2013; van der Voet et al., 2009)。しかしながら、ショウジョウバエの細胞では、ミオシンや細胞質ダイニンを欠損しても Asp 欠損時のような極収束異常は観察されない (Goshima et al., 2007)。そのため、少なくともショウジョウバエ細胞では、これらのタンパク質との相互作用は極収束に影響しないと考えられる。このように、現状、Asp の機能に関する研究は十分に進んでいるとは言えない状態である。

Human ASPM

ASPM は、原発性の常染色体劣性遺伝性疾患である小頭症 (autosomal recessive primary microcephaly, MCPH) の原因遺伝子として同定された (Bond et al., 2002)。現在までに、MCPH の原因として 12 の遺伝子が特定されているが、そのうち最も一般的なのが ASPM である (Abdel-Hamid et al., 2016; Bond et al., 2003; Faheem et al., 2015; Tan et al., 2014)。

ASPM が細胞内で果たす機能は、RNA 干渉 (RNAi) による発現抑制を利用して研究されている。ヒト培養細胞である U2OS 細胞を使って行われた研究では、低分子干渉 RNA (small interfering RNA, siRNA) を用いた ASPM の発現抑制によって、紡錘体の回転異常や細胞質分裂の失敗、分裂期細胞の減少、アポトーシスが引き起こされた (Higgins et al., 2010)。ASPM はシロンキナーゼと相互作用するという報告もあるため、前述の異常がシロンキナーゼを介して起こっている可能性も考えられる (Gai et al., 2016; Paramasivam et al., 2007)。また、別の研究では、癌抑制遺伝子である BRCA1 の発現が ASPM ノックダウンによって低下する様子が観察されている (Zhong et al., 2005)。

一方で、ショウジョウバエ *Asp* の欠損と同じような極収束異常が ASPM ノックダウンでも見られたという例は、未だ報告されていない。この違いは、RNAi によるタンパク質ノックダウンの限界を反映しているのかもしれない。つまり、RNAi 後に残ってしまったタンパク質の発現量が、ASPM の機能を果たすのに十分であったという可能性が考えられるのである。また、これまで行われてきた ASPM の RNAi は、非特異的な遺伝子発現阻害 (オフターゲット効果) が発生している可能性を除外できていない。オフターゲット効果は通常、レスキュー実験によって検証される。レスキュー実験とは、内在性タンパク質を阻害した細胞に外来性タンパク質を導入することで、内在性タンパク質の欠損による異常が見られなくなるかを観察し、外来性のタンパク質が内在性タンパク質と同様の機能を有するか判定する実験である。つまり、ASPM RNAi 細胞に外来性の ASPM を発現させても異常が残るならば、その RNAi による表現型は ASPM 以外の遺伝子に作用した結果であるということの意味する。以上のことから、ASPM 欠損が分裂期に示す表現型を正しく知るために、確実な実験に基づいた検証を行う必要がある。さらに、小頭症患者から同定された変異が及ぼす影響に関して、培養細胞を使った研究はこれまで行われていない。そのため、培養細胞で ASPM 変異を検証することができれば、小頭症を引き起こす原因の解明へとつながる新たな知見を得られる可能性がある。

ショウジョウバエ S2 細胞

ショウジョウバエ S2 細胞は、本研究を行う上でいくつかの有利な条件を備えた培養細胞で

ある。1つ目は、容易な RNAi 法が確立されている点である。S2 細胞は二重鎖 RNA (dsRNA) を自ら取りこむという特徴を持つため、dsRNA を培養している細胞に加えるだけで 90% 以上の高効率でタンパク質を発現抑制することが可能である (Bettencourt-Dias and Goshima, 2009; Goshima and Vale, 2003)。2つ目は、紡錘体のイメージングに適している点である。S2 細胞は半接着性の細胞であるため、観察時には薬剤を利用してガラス面に接着させる必要がある。この際、Concanavalin A (Con-A) という薬剤を利用すると、細胞膜がガラス面に広がった状態で固定されるため、通常は様々な方向を向いている紡錘体の軸方向がガラス底面に対して平行に維持される。これにより、紡錘体の回転による焦点面のずれを回避できるだけでなく、丸い細胞のままでは判別しにくい非収束の紡錘体の形態観察が容易になるのである (Goshima and Vale, 2003; Rogers et al., 2002)。なお、Con-A による細胞固定は細胞質分裂を阻害するが、分裂期終期までは通常通り進行するため、本研究で行う有糸分裂の観察には影響を及ぼさない。3つ目は、NuMA のオーソログである Mud を欠損しても極収束異常を示さない点である。前述のように、NuMA は紡錘体の極形成に関わる因子であると考えられているが、極収束への影響は生物種によって異なる (Moutinho-Pereira et al., 2013; Seldin et al., 2016; Silk et al., 2009)。ショウジョウバエ S2 細胞では、Mud RNAi による極構造の異常は観察されないため (Capalbo et al., 2011; Goshima et al., 2007)、少ない因子 (Asp, Ncd) で極収束機構を考えることが可能である。

ヒト HCT116 細胞

ヒト HCT116 細胞は、ヒトの結腸癌から樹立された細胞株である。癌細胞でありながら、染色体数がほぼ二倍体に近く、培養を続けてもあまり染色体数が変化しないという特徴を持つ (Brattain et al., 1981)。そのため、相同組み換えによる遺伝子破壊が行われていた頃から、CRISPR/Cas9 システムによる効率的なゲノム編集技術が確立した現在に至るまで、ホモ接合型の株の取得に利用されている (Natsume et al., 2016; Waldman et al., 1995)。本研究では、ASPM が持つ細胞内機能を調べるために、ASPM を確実に欠失させた細胞を取得する必要がある。また、小頭症の原因となる ASPM 変異は劣性遺伝性であるため、ASPM 変異による細胞内の異常を観察するには、変異を対立遺伝子の両方に導入しなければならない。そのため、安定なホモ接合型の株を取得でき、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集方法が確立されている HCT116 細胞は、非常に有用な培養細胞である。

本研究では、まず、ショウジョウバエ S2 細胞を使って Asp の機能と動態の解析を行い、紡錘体の極収束機構の解明に取り組んだ。極収束因子である Asp と Ncd の RNAi 細胞を観察

した結果、前中期初期から中期にかけて、Asp が Ncd とは独立に紡錘体極へ集積し、極収束機能を果たしていることを示した。同時に、Ncd の欠損により、紡錘体全体をまとめる機能が阻害されることを明らかにした。さらに、Asp がオーグミン依存的に形成された微小管のマイナス端に結合し、フラックスによって極へ向かって運ばれることを示した。この結果は、Asp がオーグミン依存的に形成された微小管マイナス端を認識し、他の微小管に架橋させていることを示唆している。

次に、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集をヒト HCT116 細胞に対して行い、ASPM が分裂期に果たす機能を調べた。その結果、ASPM ノックアウト細胞で中心体タンパク質やキネシン 14 を欠損すると、極形成に異常が見られることが明らかになった。また、小頭症の原因となる ASPM 変異を導入した細胞でも、同じような異常が認められた。

最後に、以上の結果を踏まえ、ショウジョウバエ S2 細胞における紡錘体の極収束モデルと、ヒト HCT116 細胞における ASPM の機能について考察する。

《結果》

第一部 ショウジョウバエ S2 細胞における Asp の機能解析

Asp は Ncd と独立して紡錘体微小管の収束に関わる

ショウジョウバエ S2 細胞では、これまでに、紡錘体の極収束に関わる因子として Asp と Ncd が同定されている (Goshima et al., 2007)。このうち Ncd に関しては、細胞質ダイニンによって運ばれた微小管を架橋することで極を収束するというモデルが報告されている (Goshima et al., 2005a)。一方、Asp が持つ極収束機能はほとんど明らかになっていないが、Asp 欠損時に観察される中期紡錘体は極の収束異常と中心体の解離を示すことが知られている (Morales-Mulia and Scholey, 2005; Saunders et al., 1997; Schoborg et al., 2015; Wakefield et al., 2001)。この表現型は、一見すると、Ncd や細胞質ダイニンを欠損した際に見られる表現型に似ているという印象を受ける (図 3)。そのため、もし紡錘体の形態異常が同じであるならば、Asp は Ncd と同じ経路で機能している可能性が高い。

そこでまず、Asp あるいは Ncd の欠損による紡錘体の極収束異常を詳細に比較するため、紡錘体形成過程のライブイメージングを行った。この際、各因子が極収束に与える影響を正確に検証するために、中心体を欠損した細胞で実験を行うことにした。通常、細胞は 2 つの中心体を持つが、S2 細胞ではそれ以上の中心体を有する細胞がしばしば観察される。加えて、Asp や Ncd の欠損により、中心体の数や紡錘体内での配置が変化するため (Goshima and Vale, 2003; Goshima et al., 2007; Morales-Mulia and Scholey, 2005)、極における収束異常の定量的な評価が困難である。一方、S2 細胞では中心体が存在しない細胞でも、2 つの収束した極を持った機能的な双極性の紡錘体が形成されることが知られている (Mahoney et al., 2006; Moutinho-Pereira et al., 2013)。さらに、中心体非存在下で紡錘体形成に関わる因子は、中心体がある場合でも同じように機能することが報告されている (Moutinho-Pereira et al., 2013)。そこで、主要な中心体構成因子である centrosomin (Cnn) の RNAi を利用し (Li and Kaufman, 1996; Moutinho-Pereira et al., 2013)、中心体を欠損した状態で極収束異常の観察を行った。

GFP-Tubulin を安定に発現する細胞に対して、各タンパク質と Cnn の RNAi を同時に行い、スピニングディスク共焦点顕微鏡で GFP-Tubulin の 3D 観察を行った (図 4、5A; 動画 1)。その結果、コントロールである Cnn 単独の RNAi 細胞では、核膜崩壊前に 1 個以上 (多くは 2 個) の微小管集合領域が形成され、核膜崩壊後、その領域の周囲に収束した紡錘体極が形成された (図 4A,D,E; この様子は観察した 26 細胞全てで確認された; Mahoney et al., 2006; Moutinho-Pereira et al., 2013)。ところが、Asp/Cnn RNAi 細胞では、観察した 23 個の細胞のうち 15 個の細胞で、前中期を通して一度も極の収束が見られなかった (図 4B,D,E)。これにより、Asp は前中期初期から重要な役割を担っていることが明らかになった。一方、Ncd/Cnn RNAi

細胞では、予想通り中期紡錘体の極収束異常が観察されたが、興味深いことに、前中期初期で一過的な極の収束を1回以上起こす紡錘体が30細胞中28個観察された(図4C,D,E; Cの矢尻は一過的な極の収束を示している)。これにより、前中期初期における極収束の表現型は、Asp欠損細胞とNcd欠損細胞で異なることが示された。

次に、AspとNcdの相互関係を明らかにするため、RNAiによる多重機能阻害実験を行い、それぞれの細胞が持つ紡錘体の極の幅を比較した。なお、極の幅は最も外側に位置する微小管の間の距離を意味しており、2つの微小管マイナス端の間を測定して得た値である。その結果、Asp/Ncd RNAiによって両方の機能を欠損した細胞では、各タンパク質を単独で欠損した細胞に比べて極の幅が著しく増加しており、紡錘体微小管の収束が損なわれていることが明らかになった(図6A[左])。さらに、AspとNcdが互いの機能を補うことが可能か検証するため、レスキュー実験を行った。ここでは、それぞれのタンパク質を欠損した細胞にもう一方のタンパク質を過剰発現させることで、収束異常の表現型が見られなくなるか調べた。これまでに、外来性のNcd-GFPはNcd RNAiによる微小管収束異常を補うことができ、過剰発現することで微小管の束化を増加させることが報告されている(Goshima and Vale, 2005; Goshima et al., 2005b; 束化とは、複数の微小管が多数架橋され、束状にまとめられることを意味する)。そこで、Ncd-GFPを過剰発現した細胞に対してAsp RNAiを行ったところ、微小管の束化が増加している様子が観察されたにもかかわらず、Asp RNAiによる収束異常を補うことはできなかった(図6C)。反対に、紡錘体極の収束に機能的なAsp-GFPを異所的に発現したところ(図5B,C)、強い発現レベルを示す細胞ラインであっても、Ncd RNAiによる収束異常を補うことができなかった(図6D)。つまり、AspとNcdは、極における紡錘体微小管の収束に関して独立に機能しており、互いの機能を補うことはできないと考えられる。

この結果を踏まえると、もし本当に2つのタンパク質が独立して微小管収束に関わるならば、前中期初期で観察されたNcd非依存的な微小管収束の際に(図4)、Asp-GFPが微小管先端へ蓄積し、機能している可能性が高い。そこでこの仮説を検証するため、Asp-GFPとmCherry-Tubulinを発現する細胞の経時観察を行った(図6E,F; 動画2)。コントロールであるCnn RNAi細胞では、極領域にある微小管収束点にAsp-GFPの局在が観察された(観察された71個の極のうち、68個がGFPシグナルを有していた)。同様に、Ncd欠損細胞でも、前中期初期で観察された38個の微小管収束点のうち、33個が著しいAsp-GFPシグナルを有していた(図6F[矢尻])。以上の結果から、AspがNcdとは独立して微小管先端に局在し、少なくとも一時的には微小管の架橋を保証しているというモデルが示唆された。

さらに、これまでの観察結果から、Ncd欠損による紡錘体異常について新たな解釈が可能である。以前に行われた研究では、Ncd RNAi細胞の極の幅を測定した結果を受けて、Ncdが紡錘体微小管の収束に必要な因子であると結論づけていた(Endow et al., 1994; Goshima et al., 2005a)。ところが、各細胞で紡錘体の幅を測定したところ、コントロール細胞やAsp RNAi

細胞と比べて、Ncd RNAi 細胞では紡錘体の幅も広がっていることが明らかになった(図 6A [中央,右]; 紡錘体の幅は紡錘体の中央部分で測定した)。その上、Ncd 欠損によって極の幅が増加しているにもかかわらず、隣接した微小管同士の局所的な架橋が頻繁に現れ(図 6A,B; いくつかの微小管はマイナス端同士を結合することで V 字型の状態になっている)、その収束点には強い Asp-GFP シグナルが観察された(図 6D,F[右]; それぞれ固定細胞と生細胞の例を示している)。これらの結果は、Ncd が極だけでなく紡錘体全体をまとめる機能を果たしており、極特異的な収束は Asp の活性によって保証されていることを示唆する。実際、Ncd は紡錘体全体に局在しており、伸長する微小管のプラス端に多いという報告があり(Goshima et al., 2005a; Hatsumi and Endow, 1992a)、局在データからもこのモデルが支持される。

微小管架橋活性を持った Asp ドメインの同定

これまでの結果は、Asp が単なるモータータンパク質の制御因子ではなく、微小管に関連する分子活性を直接持つことを示唆する。そこで、Asp が持つ活性を明らかにするため、精製タンパク質を用いた生化学的な検証、及び、S2 細胞を使った細胞生物学的な検証を行った。当初、全長の Asp 組換えタンパク質(1954 アミノ酸)を精製し、その機能を評価しようとしたが、上手く精製することができなかった。代わりに、Asp の部分欠失断片をいくつか作成し、内在性の Asp を欠損した細胞で各断片の細胞内における局在と機能を評価することにより、Asp が持つ活性の検証を行った(図 7A)。

Asp のアミノ末端領域は、以前、変性タンパク質を使ったファーウエスタン解析の結果から、微小管結合領域として報告されていた(Saunders et al., 1997)。ところが、アミノ末端側の 500 アミノ酸を削った部分欠失断片(ΔN_{1-500})を発現した細胞では、Asp 欠損による紡錘体微小管の収束異常が補われ、収束した紡錘体が観察された(図 7A)。この断片は極領域に局在しており、過剰発現した場合には、過剰に束化した微小管が極に存在する異常に伸長した紡錘体が観察される。これにより、微小管の端が ΔN_{1-500} によって安定化され、架橋されることが示唆された。次に、さらに 500 アミノ酸を削った部分欠失断片(ΔN_{1-1000})を発現した細胞を観察したところ、 ΔN_{1-1000} では Asp 欠損による収束異常を補うことができず、紡錘体への局在も損なわれていた。この結果から、Asp の中央領域は機能的に重要であると考えられる。実際、中央領域に含まれる 574-972 アミノ酸断片は紡錘体全体に局在しており、過剰発現時には微小管を非常に強く束化する様子が観察された(図 7B; ただし、紡錘体中央の局在は弱い)。この断片領域は、微小管結合ドメインとしても知られているカルポニン相同ドメインを 2 つ持つことが知られているため(Rujano et al., 2013)、微小管架橋活性を持つ可能性が考えられる。そこで、試験管内で活性の検証を行うため、大腸菌を利用して 574-972 アミノ酸断片の遺伝子組み換えタンパク質の発現と精製を行った(図 7C[左])。蛍光ラベルした安定な微小管を用意し、精製したタンパク質と混ぜたところ、精製断片によって微小管が修飾され束化する様子が観察された

(図 7C)。これにより、Asp の 574-972 アミノ酸断片が微小管架橋活性を持つことが示された。ところが、この断片を発現した細胞では、Asp 欠損による紡錘体の収束異常を補うことができなかった(図 7A)。そのため、574-972 アミノ酸断片が持つ微小管架橋活性は、全長 Asp の機能を果たすには不十分であると言える。実際に、この断片によって過剰に束化された微小管は、内在性の Asp が存在していても上手く収束することができず、優性阻害(ドミナントネガティブ効果)を起こす(図 7B)。これらの結果は、Asp が機能するためには極への集合が必要であるという仮説と一致する。さらに、カルポニン相同ドメインに続く IQ モチーフ群とカルボキシル末端の領域が微小管マイナス端への局在化に必要であることを示している。

Asp は紡錘体を構成する微小管の流れに沿って極へ移動する

次に、Asp-GFP が中期の紡錘体で示す動態を明らかにするため、Asp-GFP と mCherry-Tubulin を安定に発現する細胞を高スピードで撮影した。すると、極に蓄積する強いシグナルに加えて、いくつかの Asp-GFP シグナルが紡錘体微小管に沿って存在している様子が観察された。興味深いことに、その多くが $2.0 \pm 0.7 \mu\text{m}/\text{min}$ (平均 \pm 標準偏差; 54 個の点状 GFP を計測した) の速度で極方向へ移動していることが明らかになった(図 8A; 動画 3)。観察に使用した顕微鏡は 1 分子の GFP シグナルの検出ができる仕様ではないため、観察された点状のシグナルは Asp-GFP の集合体だと考えられる。さらに、紡錘体内での局在や極に向かう動きは、Cnn RNAi 細胞でも同じように観察されたことから、Asp-GFP の動態は中心体非依存的であることが示された(動画 4)。

非モータータンパク質である Asp が移動しているということは、マイナス端指向性のモータータンパク質によって運ばれている可能性が高い。これは、Asp と NuMA の機能類似性が多いこと、そして、NuMA が細胞質ダイニンのようなマイナス端指向性のモータータンパク質によって運ばれることから考えても、妥当な仮説だと思われる。そこで、マイナス端指向性のモータータンパク質を全て阻害した状態で Asp を観察し、移動に変化が見られるか検証した。ショウジョウバエが持つマイナス端指向性のモータータンパク質は細胞質ダイニンと Ncd の 2 つであるため、Asp-GFP を発現する細胞に対してダイニン重鎖(Dhc64C)と Ncd の RNAi を同時に行い、GFP シグナルの移動速度を測定した。すると驚くべきことに、RNAi によって 90% 以上のタンパク質が失われ(図 5A; Goshima and Vale, 2003)、確実に紡錘体の極収束異常が見られるにもかかわらず、Asp-GFP の移動への影響は見られなかった(図 8B,C; 動画 3)。RNAi で全てのタンパク質を除くことができず、残ってしまった僅かな量のモータータンパク質が Asp の輸送を行うのに十分であった可能性は除外できないが、これらのデータは、Asp-GFP の移動を主体的に担う仕組みが他に存在することを示唆している。

Asp を極へ移動させる要素として次に考えられるのは、紡錘体を形成する微小管自身の流れ(フラックス)である。そこで、フラックスを阻害した状態で Asp を観察し、移動に変化が見ら

れるか検証した。S2 細胞では、CLASP によるプラス端での重合と、Klp10A/キネシン 13 によるマイナス端での脱重合によって、微小管のトレッドミルが起こる (Laycock et al., 2006; Maiato et al., 2005; Rogers et al., 2004)。また、キネシン 5 である Klp61F が反平行の微小管を滑動させ、極方向へ動かしていることが知られている (Goshima et al., 2005b)。そこで、Asp-GFP 発現細胞に対して Klp10A と CLASP のダブル RNAi、あるいは、Klp61F の単独 RNAi を行い、GFP シグナルの移動速度を測定した。すると興味深いことに、どちらの細胞でも Asp-GFP の移動速度が有意に低下した (図 8C; 動画 3)。これらの結果は、紡錘体内における Asp-GFP の移動をフラックスが担っていることを示している。

Asp は紡錘体内部で形成された微小管のマイナス端に局在する

中期紡錘体における Asp-GFP の移動がフラックスに依存的であるということは、Asp の微小管局在と具体的な移動方法に関して、以下の 2 つの説が挙げられる。1 つは、Asp-GFP 集合体が微小管の側面へ安定に結合することで、フラックスに従って移動するという説である。そしてもう 1 つは、Asp が紡錘体内に存在する微小管のマイナス端に付着しており、キネシン 5 による微小管滑動のような微小管の移動に従って、マイナス端に結合した Asp も移動するという説である。この 2 つの可能性を検証するためには、移動している Asp-GFP が微小管マイナス端に付着しているか調べる必要がある。しかし、紡錘体には多くの微小管が存在しているため、正常な中期紡錘体で視覚的に評価することは非常に難しい。そこで、微小管依存的な微小管形成を担う主要因子であるオーグミン複合体の欠損を利用することにした (Goshima et al., 2008)。これまでに、ヒト培養細胞の電子顕微鏡観察から、オーグミン欠損時には微小管マイナス端が紡錘体内部にほとんど見られないことが示されている (Kamasaki et al., 2013)。そのため、S2 細胞でも、オーグミンのコアサブユニットである Dgt6 の RNAi を行うことで、紡錘体内の微小管マイナス端を著しく減少させることが可能である。Asp-GFP 発現細胞に対して Dgt6 RNAi を行い、紡錘体内部にある GFP シグナルの数を測定したところ、8 個の細胞のうち 7 個で明らかな減少が見られた (図 8D; 動画 3)。この結果は、Asp が紡錘体内部でオーグミン依存的に形成された微小管のマイナス端に付着していることを意味しており、2 つ目の説を支持する。さらに、オーグミン欠損細胞を詳細に観察したところ、いくつかの点状 GFP シグナルが極領域で検出された (動画 5; 矢尻は中心体より内側で観察された GFP シグナルを示している)。これにより、Asp の極への集積は、フラックスによる移動だけでなく、微小管マイナス端への特異的な局在にも起因することが示唆された。この解釈は、マイナス端指向性のモータータンパク質を欠損した細胞で、収束異常を示す紡錘体の微小管マイナス端に、時折 Asp-GFP シグナルが見られることと一致する (図 8B; 拡大図の矢印と次の段落を参照)。

Asp は、極と紡錘体内部で、微小管マイナス端を他の微小管に架橋する

最後に、微小管マイナス端に付着した Asp が紡錘体内部で果たす機能の解明を試みた。しかしながら、現状では、紡錘体の内部で機能する Asp のみを特異的に阻害する方法は存在しない。そこで、微小管のマイナス端を可視化し、Asp 存在下、あるいは非存在下での挙動を比較することで、何らかの有用な情報が得られると推測した。

機能的な Asp が存在しない状態での微小管マイナス端の可視化には、機能的なドメイン探索の過程で得られた Asp1-1500 アミノ酸断片 ($\Delta C_{1501-1954}$, Asp ΔC) が利用可能である。Asp ΔC は、IQ モチーフを多数含む領域 (IQ モチーフ領域) の一部とそれに続くカルボキシル末端領域全てを欠失した断片であり、レスキュー実験の結果、Asp 欠損による微小管収束異常を補うことができなかった (図 7A)。これは、IQ モチーフが結合するカルモジュリンの RNAi が Asp RNAi と同じ収束異常を示すという報告から考えても妥当な結果である (Goshima et al., 2007; Schoborg et al., 2015)。ところがこの断片は、Asp の機能を失っているにもかかわらず、依然として極領域へ集積した (図 7A)。さらに Asp ΔC -GFP を発現した細胞をライブイメージングしたところ、全長 Asp と同じように紡錘体微小管のマイナス端に局在し、極へ移動している様子が観察された (図 9A,C; 動画 6,7)。そのため、内在性の Asp を欠損した状態で Asp ΔC -GFP を観察することによって、Asp 欠損による収束異常を示す紡錘体で微小管マイナス端を可視化することが可能となった。そこで、Asp ΔC -GFP、あるいは、全長の Asp-GFP (以降、Asp(FL)-GFP と記載する) を発現した細胞に対して内在性 Asp の RNAi を行い、機能的な Asp の有無による微小管マイナス端動態の違いを検証した。

まず、紡錘体全体での GFP シグナルの分布を比較したところ、機能的な Asp が存在しない状態でも、Asp ΔC -GFP のシグナルの多くが紡錘体の端に局在していた (図 9A)。しかしながら、極で 1 つの大きな集合体を形成する Asp(FL)-GFP とは異なり、Asp ΔC -GFP 発現細胞では、点状の動的な GFP シグナルが散乱している様子が観察された (図 9A,B; 動画 6)。このような Asp ΔC -GFP シグナルのいくつかは、明確に微小管マイナス端を修飾していたことから、極に機能的な Asp が存在しない場合、微小管マイナス端同士の凝集が安定に維持されないことが明らかになった。

次に、極領域以外に位置する微小管マイナス端の観察を試みた。本来ならば、点状の GFP シグナルが他の微小管と接触しているかを紡錘体内部で検証する必要があるが、紡錘体内部には多くの微小管が存在するため、機能的な Asp の有無にかかわらず、判定することができなかった。しかし、時折、紡錘体本体から離れた微小管の束が紡錘体の外側に現れることがあり、その端に着いた GFP シグナルを観察することが可能であった (図 9C,D; 動画 7)。そこで、紡錘体から外れた微小管の端を観測し、微小管が現れる頻度とその動態を定量化した。まず、コントロールとして Asp(FL)-GFP を発現した細胞を観察したところ、8 個の紡錘体を観察した合計 117 分間に、紡錘体から離れた微小管を 7 本見つけることができた。また、この 7 本の微小管は全て、マイナス端が極領域へ到達する前に隣接する微小管に結合された (図 9D,E)。

一方で、機能的な Asp が存在しない状態では、Asp Δ C-GFP に修飾された紡錘体外側の微小管が約 2 倍の頻度で検出された。具体的には、11 個の紡錘体を観察した合計 147 分間に、17 本の微小管を紡錘体の外側で見つけることができた。検出された 17 本の微小管のうち 15 本は、隣接した微小管と結合することなく極まで伸長し、収束を起こさなかった(図 9C,E)。これらの結果から、Asp は極だけでなく紡錘体内部でも微小管マイナス端と他の微小管を架橋しており、それによって紡錘体の形成を補助していることが示唆された。

第二部 ヒト HCT116 細胞における ASPM の機能解析

ヒト HCT116 細胞における ASPM ノックアウトは有糸分裂異常を引き起こさない

第一部の結果から、ショウジョウバエ Asp が極収束時に果たす具体的な機能が明らかになった。一方で、小頭症患者から最も多く同定された原因遺伝子であるにも関わらず、ヒト ASPM の細胞内機能に関する知見は不十分である。これは、RNAi による ASPM の欠損が不確かであることに起因する。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を利用し、ASPM 遺伝子がノックアウトされた HCT116 細胞株の作成を試みた。

以前の報告から、ASPM はいくつかのアイソフォームを持ち、その全てがエキソン 1 の開始コドンから翻訳されることが知られている (Kouprina et al., 2005)。そこで、ASPM のエキソン 1 にある開始コドンを削除し、代わりに薬剤耐性遺伝子を挿入することで、2 対立遺伝子が破壊された細胞のクローン株を取得した (図 10A,B)。実際に取得ラインで ASPM の発現が失われているかを確認するため、抗 ASPM 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、ASPM が著しく失われている様子が観察された (図 10C)。これにより、ASPM ノックアウトの成功を確認することができた。ところが、本研究を進めるうちに、抗 ASPM 抗体の撮影画像を高いコントラストに設定すると、いくつかの残存タンパク質が検出されることに気がついた (図 11A)。そこで、ASPM の翻訳領域全てを欠失させ、薬剤耐性遺伝子と入れ替えた細胞株を作成した (図 11B,C; このゲノム編集は「完全な (complete)」遺伝子破壊を行ったものであるため、取得した株は KO^c と記載する)。同じように 2 対立遺伝子が破壊された細胞のクローン株を取得し、抗 ASPM 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、極に存在する ASPM の完全な欠失が観察された (図 11D)。これにより、取得したクローン株で ASPM 遺伝子は完全に破壊されおり、残存タンパク質を発現しないことが証明された。そこで、2 種類の遺伝子破壊方法によって得られたクローン株をライブイメージングしたところ、どの株でも有糸分裂紡錘体の形成や有糸分裂の進行に全く異常が見られなかった (図 10D,E, 11E,F; 動画 8)。これにより、HCT116 細胞では、ASPM は有糸分裂に必須の遺伝子ではないことが示された。

ASPM と HSET の二重阻害によって紡錘体極の異常な分裂が引き起こされる

ショウジョウバエ Asp と異なり、ヒト ASPM の単独欠失では紡錘体の極収束異常が観察されなかった。しかし、このような違いが起こる原因として、この細胞種では他の極形成因子の影響が強いため、ASPM 単独で異常が見られないという可能性も考えられる。実際に、細胞質ダイニンやキネシン 14、NuMA などが紡錘体の極形成因子として報告されているが、これらの因子が極収束へ寄与する程度は細胞種によって大きく異なる (Gaglio et al., 1996; Goshima et al.,

2005a; Hatsumi and Endow, 1992b; Manning and Compton, 2007; Merdes et al., 2000; Walczak et al., 1998)。さらに、ショウジョウバエ S2 細胞では、キネシン 14 である Ncd と Asp が独立に作用することで極の収束を保障している(図 4, 6)。そのため、この仮説が正しいとするならば、HCT116 細胞で極収束に強い影響を及ぼす因子として、キネシン 14 は最有力候補である。

そこで、キネシン 14 の活性が抑制された際に ASPM の機能が必要とされる可能性を検証するため、ASPM ノックアウト細胞とコントロール細胞に対して、ヒトのキネシン 14 である HSET の阻害を行った。なお、使用した ASPM ノックアウト株は、エキソン 1 の開始コドンを削除した方のクローン株である。プロテアソーム阻害剤である MG132 によって細胞を中期で停止させた後、HSET 阻害剤である CW069 を添加したところ(Watts et al., 2013)、観察した 34 個のコントロール細胞のうち 32 個で正常な紡錘体が維持されていた(図 12; 動画 9)。これは、他のヒト細胞種に対して行われた CW069 添加実験の報告と一致している(Watts et al., 2013)。反対に、観察した 63 個の ASPM ノックアウト細胞のうち 33 個の細胞で、阻害剤添加後 3 時間以内に紡錘体極の分裂(pole splitting)が観察された(図 12; 動画 9)。また、分裂した極は紡錘体微小管を常に収束させており、新たな極として安定に確立されるため、紡錘体は多極性を示すようになった(図 12A[矢尻])。この結果から、完全な HSET の活性が無い場合、ASPM が紡錘体極の形成に必要であると考えられる。

ASPM と CDK5RAP2 の二重欠損は紡錘体極の収束異常を引き起こす

さらに、ASPM 単独の欠失で表現型が観察されない原因として、中心体から伸長した微小管の影響が挙げられる。ハエや哺乳類では、中心体が極の収束に必須ではないことが示されている(Megraw et al., 2001; Wong et al., 2015)。しかしながら、モータータンパク質や微小管結合タンパク質が相互作用するための微小管を提供する存在として、紡錘体微小管の収束に補助的な役割を担っているとも考えられている(Baumbach et al., 2015; Chavali et al., 2016; Goshima et al., 2005a; Heald et al., 1997; Mountain et al., 1999; Silk et al., 2009; Wakefield et al., 2001)。そのため、HCT116 細胞では中心体から伸長した微小管が多く存在するために、ASPM 欠失による異常が検出されないという可能性が考えられる。

そこで、この仮説を検証するため、小頭症原因遺伝子としても知られている CDK5RAP2(別名:CEP215)の欠損を利用した(Bond et al., 2005)。CDK5RAP2 は、ショウジョウバエの中心体タンパク質 Cnn のオーソログであり、中心体に γ -チューブリン複合体を付着させる働きをするため、CDK5RAP2 を欠損することで中心体からの微小管を減少させることができる(Choi et al., 2010; Fong et al., 2008)。本実験では、ASPM ノックアウト細胞とコントロール細胞に対して、オーキシンドegradon(auxin-inducible degron, AID)システムを使った CDK5RAP2 の分解を行い、違いが見られるか検証した。AID システムとは、オーキシン(indole-3-acetic acid, IAA)応答性の F-box タンパク質である、イネの TIR1 タンパク質(*Oryza sativa* TIR1, OsTIR1)を利用したシ

システムである。具体的には、オーキシン存在下で活性化された OsTIR1 が、機能的な SCF ユビキチンリガーゼを形成し、基質である AID タグをポリユビキチン化することで AID 融合タンパク質が迅速に分解されるのである (Natsume et al., 2016)。現在では AID タグが持つ機能的な最少配列が報告されており、mini-AID (mAID) 配列と呼称されている (Kubota et al., 2013; Natsume et al., 2016)。この分解システムは本来、植物細胞が自然に持つものであるが、TIR1 以外の SCF サブユニットが広く保存されているため、TIR1 を発現させればヒト培養細胞でも利用可能である。そこで、ドキシサイクリン (doxycycline, Dox) 誘導的に発現する OsTIR1 遺伝子を持った HCT116 細胞に対して、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、CDK5RAP2 遺伝子へ mAID-mCherry タグを挿入した (図 13A; この実験と図 13B の実験は清光智美博士と仁科桃子氏によって行われた)。対立遺伝子の両方に mAID-mCherry が挿入されたクローン株を取得した後、その株に対して ASPM のノックアウトを行った (図 13B,C; 図 10 と同様に開始コドン を削除することで ASPM のノックアウト株を作成した)。なお、取得した株の CDK5RAP2 の発現を抗 CDK5RAP2 抗体によって検出したところ、全ての CDK5RAP2 に mAID-mCherry タグが挿入されていること、および、培地への Dox と IAA の添加によって CDK5RAP2 の急激な分解が起こることが確認された (図 13D; この実験は Elsa A. Tungadi 氏によって行われた)。その後、作成した細胞株に対して IAA の添加を行い、24 時間後に紡錘体の動態を観察した (図 14A; 動画 10)。なお、この実験では、2つのコントロールサンプルが得られる。1つは外部のコントロールで、Dox と IAA を添加していない細胞である (図 14B; “Untreated” と記載)。もう 1つは内部のコントロールで、Dox と IAA を添加した細胞のうち、CDK5RAP2 の分解が起こらなかった分集団を指す (図 14B; “CDK5RAP2 remains” と記載)。

実験の結果、内在性の ASPM を完全に有する細胞では、たとえ CDK5RAP2-mAID-mCherry のシグナルが見られない場合であっても、収束した極を持つ双極性の紡錘体が観察された (図 14A [2 段目])。具体的には、観察した 22 細胞のうち 21 細胞が正常な紡錘体を有しており、僅かな遅延は見られたものの全て後期へ進行した (図 14B; 核膜崩壊から後期開始までの時間は 22 個の細胞で 30 ± 8 分 [平均 \pm 標準偏差] であった)。また、ASPM を欠失した細胞株の内部コントロールでは、23 細胞中 22 細胞が収束した極を持つ紡錘体を形成しており、遅延することなく後期へ進行した (図 14A [3 段目], B; 24 ± 3 分, $n = 22$)。ところが一転して、ASPM ノックアウト株で CDK5RAP2-mAID-mCherry が分解されると、中期紡錘体は持続的な極の形成を維持することができなくなる (図 14A [4 段目])。そのような表現型を見せる細胞は、観察した 83 細胞中 66 細胞存在し、後期開始までの時間が著しく遅延した (図 14B; 核膜崩壊から後期開始まで 1 時間以上必要とする細胞が 44 個観測された)。この結果から、中心体の機能が損なわれた場合、ASPM が紡錘体極の微小管収束に必要であると結論付けられる。

なお、最近報告された研究結果では、CDK5RAP2 が HSET に結合することで中心体と HSET の会合が促進されることが示されている (Chavali et al., 2016)。そのため、CDK5RAP2 の欠損による影響は、中心体で HSET 活性が失われることによって引き起こされているという

可能性も十分考えられる。しかしながら、CDK5RAP2 欠損と HSET 阻害による紡錘体極の形態異常を比較すると、それぞれ異なる性質を持つことがわかる。HSET を阻害した細胞では極の分裂が引き起こされるが、一旦形成された極は微小管の収束を安定に維持する(図 12A; 矢尻は収束した極を示している)。つまり、HSET の活性が失われていても微小管の一部を収束し続けることができるため、新たに出現した極が壊れずに残るのである。一方で、CDK5RAP2 を欠損させた細胞では、極領域の微小管は常に動的である。そのため、たとえ一過的に収束したような形態を示したとしても、すぐに微小管が分散してしまい、極の収束を維持することができない(図 14A[4 段目]; 矢尻は収束した極を、垂直線は収束していない極を示している)。これにより、CDK5RAP2 欠損時に見られる結果は、中心体における HSET 活性の欠損だけでなく、中心体から伸長した微小管の減少といった他の要素からの影響も受けていると推測される(Choi et al., 2010; Fong et al., 2008)。

ASPM RNAi による表現型は ASPM ノックアウト株と一致する

ASPM ノックアウト株が紡錘体の極収束異常を示さない理由として、クローン株取得に数週間要したことで、他の遺伝子座に抑制変異が挿入されてしまったという可能性がもう 1 つ挙げられる。そこでこの仮説を検証するため、RNAi による ASPM の迅速な発現抑制を利用することにした。

ASPM の RNAi には、別のエクソンを標的とした 4 つの低分子干渉 RNA (siRNA) を使用した。なお、そのうちの 1 つ (siRNA #1) は、ヒトの U2OS 細胞を使った実験により、RNAi 後 72 時間で紡錘体の回転や有糸分裂の進行に異常が見られることが報告されている(表 3; Higgins et al., 2010)。まず、4 つの siRNA が効果的に ASPM をノックダウンできるか確認するため、各 siRNA を HCT116 細胞に導入し、48 時間後に抗 ASPM 抗体を使って免疫染色した。その結果、全ての siRNA が ASPM を確実にノックダウンしており、RNAi 細胞は ASPM ノックアウト株と同程度の ASPM シグナルを示すことが明らかになった(図 15A,B; この実験は Elsa A. Tungadi 氏と共同で行った)。ただし、siRNA #2 が強い毒性を、siRNA #3 が有糸分裂の加速を引き起こしている様子が観察されたことから、これらの siRNA は ASPM 以外の重要なタンパク質に対して非特異的な影響を持つことが示唆された(表 3)。一方で、他の 2 つの siRNA による RNAi は、ASPM ノックアウトと同様、細胞増殖や紡錘体の形態、有糸分裂の進行に何の影響も示さなかった。以上の結果から、RNAi による急激な ASPM ノックダウンもまた、紡錘体の形成にほとんど影響を与えないことが強く示唆された。

次に、ASPM ノックアウト株で観察された CDK5RAP2 欠損との総合的な表現型が、ASPM RNAi によるノックダウンでも現れるか検証した。実験には、強い毒性を示した siRNA #2 以外の siRNA を使用し、それぞれを CDK5RAP2-mAID-mCherry 発現株に導入した後、AID システムによる CDK5RAP2 の分解を行った。経時観察を行った結果、各 siRNA による ASPM ノック

クダウンと CDK5RAP2 の分解が行われた細胞で、ASPM ノックアウト株と同じような極収束異常が頻繁に観測された(図 15C)。以上の結果は、中心体機能が損なわれた場合、極収束に関する ASPM の機能が重要となるという結論を支持する。

小頭症の原因となる ASPM 変異は CDK5RAP2 非存在下で極の収束異常を引き起こす

最後に、小頭症患者で見られる ASPM 変異が紡錘体極形成にどのような影響を及ぼすかを検証するため、CDK5RAP2-mAID-mCherry 発現株に対して小頭症変異を導入し、CDK5RAP2 を分解した際に見られる表現型を観察した。これまで、小頭症患者から同定された ASPM の劣性変異が遺伝子配列の様々な部位に存在していること、その多くが早期の終止コドン誘導する終止変異(nonsense mutation)であることが報告されている(Abdel-Hamid et al., 2016; Bond et al., 2002; Bond et al., 2003; Nicholas et al., 2009; Tan et al., 2014)。つまり、小頭症患者の細胞では ASPM の部分欠失断片が発現していると考えられるのである。そのため、ASPM 変異による影響を調べるには、最も長い部分欠失断片を発現する変異を模倣する必要がある。そのような条件に合致する、最もカルボキシル末端側に位置するホモ接合型変異は、これまでに2つ同定されている(Abdel-Hamid et al., 2016; Bond et al., 2003; Tan et al., 2014)。1つは3233 アミノ酸に起こる終止変異、もう1つは3252 アミノ酸で1塩基失われることにより3261 アミノ酸に終止コドンが誘導される変異であり、どちらの変異も HEAT リピートモチーフの前に位置する(図 16A)。変異を導入するにあたり、CRISPR による遺伝子切断に適した配列を検索したところ、3233 アミノ酸に近い部位に最適な配列が見つかった。そのため、3232 アミノ酸の後ろに mClover タグを挿入することで、小頭症変異を模倣した株(ASPM 変異株, ASPM [1-3232]-mClover)を作成した(図 16A, 17A)。また、コントロールとして、ASPM 遺伝子のカルボキシル末端に mClover を挿入した株(全長 ASPM 発現株, ASPM-mClover)も同様に作成した(図 16A, 図 17B)。なお、これまでと同様、どちらの株でも2対立遺伝子に mClover が挿入されたクローン株を取得することができた(図 17C)。

まず、CDK5RAP2 の分解を起こさずに各株の mClover シグナルを観察したところ、ASPM-mClover と同じく、ASPM [1-3232]-mClover も極へ局在することがわかった。この結果は、ショウジョウバエ Asp で作成した HEAT リピートモチーフを持たない部分欠失断片(Asp Δ C)も、微小管マイナス端へ局在することができるという結果と一致する(図 7A, 9A,C)。また、CDK5RAP2 が存在している状態では、ASPM 変異株であっても、紡錘体の極収束に異常は見られなかった(図 16B,C; 動画 11; この実験は Elsa A. Tungadi 氏と共同で行った)。ところが CDK5RAP2 を AID システムによって分解すると、ASPM 変異株で ASPM ノックアウト株と同じような極収束異常が観測された(図 16B,C; 動画 11)。これにより、小頭症患者の変異を模倣した細胞では、ASPM の極形成に関わる機能が損なわれていることが明らかになった。なお、本研究では HEAT リピートモチーフの前にある変異を検証したが、他の小頭症患者から同定

された ASPM 変異はさらに上流の配列に存在するため、全ての変異で同じような極収束異常が観察されると推測される。

《考察》

ショウジョウバエ Asp の機能と新たな紡錘体極収束モデル

第一部では、Asp の極収束機能を明らかにすることを目的とし、ショウジョウバエ S2 細胞による解析を行った。ここでは、本研究の結果とこれまでの研究から得られた知見を総合し、ショウジョウバエ細胞における紡錘体微小管の収束に関して、新たなモデルを提案する(図 18)。

まず、本研究のモデルでは、Ncd が微小管マイナス端特異的な架橋因子であるという従来のモデルとは対照的に、前中期初期から中期にかけて Asp がその役割を果たしていることを提唱する。Asp の具体的な機能は、本研究の結果から、微小管マイナス端に直接結合して安定化し、他の微小管と架橋させることだと考えられる。反対に Ncd は、微小管の側面全体やプラス端への集積を通して微小管の架橋を行っており、紡錘体全体をまとめる機能を果たしていると推測される。とはいえ、Ncd が極収束に全く関与しないわけではない。Ncd が存在していない状態で前中期に過度な微小管の広がりが発生すると、前中期初期に一過的に収束していたにもかかわらず、Asp の機能だけで収束状態に回復させることができないのである。そのため、Ncd による微小管架橋も、収束した極を維持する上で重要な機能であると言える。加えて、中心体もまた極収束機構を考える上で無視できない要素である。これまでに、Ncd や Asp を中心体と同時に欠損させた場合、それぞれの単独欠損に比べて極の幅が広がることが知られている(Goshima et al., 2005a; Wakefield et al., 2001)。そのため中心体は、モータータンパク質や Asp が相互作用するための微小管を形成することで、極の収束に補助的な役割を担っていると考えられる(実際に、本論文の HCT116 細胞を使った実験でも示唆されている)。一方、細胞質ダイニンや Asp を欠損した細胞で、中心体が紡錘体から解離する理由は未だ不明である(図 3; Goshima et al., 2005a; Maiato et al., 2004; Morales-Mulia and Scholey, 2005; Wakefield et al., 2001)。この問題に関しては、本研究で行った実験により、Asp の微小管架橋活性が中心体を極へ会合させるのに必要であることが示唆されたため(図 7A)、中心体解離と Asp の関係を調べるのが解明への糸口になると予想される。また、Asp が細胞質ダイニンの活性を制御しているという可能性も考えられるため、Asp と細胞質ダイニンの協調関係の検証も今後の重要な研究課題である。

本モデルでは、もう 1 つの新たな要素として、紡錘体内部の微小管について言及している。本研究の結果から、オーグミン依存的に形成された微小管は、Asp によってマイナス端を修飾され、微小管のフラックスに従って極方向へ移動すると考えられる。また、機能的な Asp が存在しない場合、微小管の「自由な」マイナス端が望ましくない方向へと移動し、他の紡錘体微小管と架橋しないことから(図 9C)、Asp による架橋が紡錘体形態の維持に必要なだと推測される。残念ながら、顕微鏡分解能の限界のために、解析対象が紡錘体本体から外れた外側の微小管に限定されてしまったが、紡錘体内部でも同様に Asp による架橋が起こっていると考えら

れる。つまり Asp は、多数の微小管が存在する紡錘体内部で、オーグミン依存的に形成された短い娘微小管を長い母微小管へ架橋させ、紡錘体内部に維持していると推測されるのである。なお、オーグミン自身が微小管を束化する活性を持つという報告もされているため (Hsia et al., 2014; Wu et al., 2008)、この機能を担うのがオーグミンである可能性も考えられる。しかし、電子顕微鏡による観察では、オーグミンによる母微小管と娘微小管の架橋が永続的ではないことが示唆されており (Kamasaki et al., 2013)、オーグミンだけでは不十分である。そのため、Asp が微小管マイナス端を他の微小管に架橋させながら極へ移動することで、微小管を紡錘体内部に維持し、極付近で収束させていると考えられるのである。

近年、ヒト細胞で行われた研究で、微小管マイナス端の移動が細胞質ダイニンやキネシンの活性によって起こることが報告された (Lecland and Luders, 2014)。これは、 γ -チューブリンの観察によって微小管マイナス端の動きを検証した結果であり、本研究の Asp-GFP 観察から得られた結果とは異なる。一方で、同研究では移動を制御する因子としてキネシン 5 も同定された。そのため、フラックスによる微小管の移動が種を超えて保存されていることは示唆されている。上記の研究結果の矛盾を説明する解釈としては、2 つ挙げられる。1 つは、微小管と結合していない γ -チューブリンがマイナス端指向性のモータータンパク質によって輸送されているという説である。実際に、紡錘体に局在する全ての γ -チューブリンが微小管マイナス端に結合しているわけではないという報告があるため (Hallen et al., 2008)、非常に有力な解釈だと言える。もう 1 つは、Asp が紡錘体内部の微小管の一部、例えば束化した微小管のみを修飾しているという解釈である。この場合 Asp-GFP の観察でモータータンパク質による移動を検出できないのは、Asp が修飾した微小管はフラックスだけに依存して移動するからだと考えられる。今後は、紡錘体内部の微小管の動態を詳細に知るためにも、これらの可能性を検証する必要があるだろう。

ヒト ASPM の機能と小頭症

第二部では、ASPM が細胞内で果たす機能を明らかにするため、ASPM を欠失したヒト HCT116 細胞を中心に実験を行った。その結果、ショウジョウバエ Asp と同じく、ヒト ASPM も紡錘体の極収束因子であることが示された。局在の様子から、ASPM も微小管マイナス端に結合し近隣の微小管を架橋すると考えられる。さらに、小頭症患者が持つ変異を導入した細胞を観察したところ、ASPM ノックアウトと同様の極収束異常が観察された。これらの結果を踏まえ、ASPM が持つ極収束機能と小頭症との関連について、ここに記述する。

ショウジョウバエ Asp の単独欠損は、様々な細胞種で重度の異常を引き起こし、脳サイズの減少や致死を誘発することが知られている (Ripoll et al., 1985; Rujano et al., 2013; Saunders et al., 1997; Schoborg et al., 2015; Wakefield et al., 2001)。一方で、結腸癌患者由来の細胞株である HCT116 細胞では、ヒト ASPM を単独でノックアウトしても異常が見られなかった (図 10、

11)。ところが、阻害剤やオーキシン誘導性デグロンを使った実験の結果、キネシン 14 の活性や中心体からの微小管形成を阻害した条件では、極形成に ASPM が不可欠であることが明らかになった(図 12、14)。つまりこの細胞種では、通常、ASPM の機能を覆い隠すほどキネシン 14 や CDK5RAP2 が活性化しているのである。このような紡錘体極の形成に関する冗長性は、哺乳類の多くの細胞種でも同じであると推測される。例えば、マウスの *Aspm* 変異体では、脳や精巣、卵巣の縮小が見られるが、致死にならない(Fujimori et al., 2014; Pulvers et al., 2010)。これは、影響が出ている器官以外では *Aspm* の欠損を他因子が補填しているためだと考えられる。一般的に、有糸分裂は動物の発生の全過程で重要な役割を果たすため、紡錘体形成に重要な因子の変異は、重度の発生異常と初期胚の致死を引き起こすことが多い(Aguirre-Portoles et al., 2012; Castillo and Justice, 2007; Silk et al., 2009; Watanabe et al., 2016)。そのため、ASPM や他の中心体関連因子(小頭症原因遺伝子の CDK5RAP2 や SAS-4 など)の変異が哺乳類で胚致死性を示さないのは、極形成に関する冗長性が高いという性質に起因すると思われるのである。なお、別の極収束因子である NuMA が細胞種特異的に欠損異常を示すことも(Seldin et al., 2016; Silk et al., 2009)、この考えを支持する。また、ヒトの小頭症が脳だけに重篤な表現型を示すのは、神経細胞における紡錘体極の形成では、他の極形成因子よりも ASPM への依存度が高いためだと推測することができる。

これまで、小頭症を引き起こす主因は、紡錘体の回転異常や分裂時の対称性の崩壊だと考えられていた(Feng and Walsh, 2004; Fish et al., 2008; Fish et al., 2006; Gai et al., 2016; Lizarraga et al., 2010; Thornton and Woods, 2009)。実際に、ヒトの U2OS 細胞で行われた ASPM RNAi による研究では、紡錘体の回転異常が報告されている(Higgins et al., 2010)。しかしながら、紡錘体の回転に関わる他の因子(LGN、aPKC λ)を欠損したマウスでは、小頭症は発症しないことが報告されている(Imai et al., 2006; Konno et al., 2008; Megraw et al., 2011)。また、マウスの *Sas-4* 変異体を使った最近の研究から、小頭症を引き起こす原因は分裂期の遅延やアポトーシスであり、紡錘体の回転とは無関係であることが示されている(Insolera et al., 2014)。本研究の結果からは、小頭症を引き起こす原因が紡錘体極の崩壊に伴う分裂期の遅延にあるという可能性を新たに挙げることができる。

《材料と方法》

プラスミド

プラスミドの情報は表 2、6 に記載した。CRISPR/Cas9 プラスミドのベクターには、X330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene #42230; Cong et al., 2013) を使用した。作成方法は (Ran et al., 2013) に従い、20 塩基対の sgRNA 配列とそれに続く PAM 配列の選択には、Optimized CRISPR Design tool (<http://crispr.mit.edu>) を利用した (表 4)。

細胞の培養と細胞株の作成

[ショウジョウバエ S2 細胞]

ショウジョウバエ S2 細胞の培養方法は (Bettencourt-Dias and Goshima, 2009; Goshima et al., 2007) の方法に従い、10% のウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich もしくは biowest) と 1% の抗生物質 (Sigma-Aldrich の Antibiotic Antimycotic Solution、もしくは、Wako の penicillin-streptomycin-amphotericin B suspension) を添加した Schneider's medium (Gibco) を使用した。細胞株の作成方法は基本的に (Bettencourt-Dias and Goshima, 2009) に従ったが、プラスミド導入には Cellfectin II (Invitrogen) を使用した。使用したプラスミドは表 2 に示す通りである。これらのプラスミドは、目的の遺伝子配列の 3' 末端に GFP の遺伝子配列をつけ、Metallothionein プロモーター (pMT) を持つベクターに組み込んで作成した。pMT は金属イオンによって誘導されるプロモーターであるため、観察の際には 50-500 μ M の CuSO_4 を添加することでタンパク質の発現誘導を行った。また、細胞株作成時には、薬剤選択用のベクターとして pCOHYGRO を使用した。各プラスミドと pCOHYGRO を導入した細胞は、3 日後から 0.35 mg/ml のハイグロマイシン (Wako) 入りの培地で継代し、薬剤選択を行った。なお、図 6C に使用した Ncd-GFP 発現細胞は (Goshima and Vale, 2005) で使用した細胞である。

[ヒト HCT116 細胞]

オリジナルの HCT116 細胞、および、HCT116 Tet-OsTIR1 細胞 (Tet プロモーターに続く OsTIR1 遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を持った HCT116 細胞) は、遺伝研の鐘巻将人教授から頂いた (Natsume et al., 2016)。細胞の培養は 5% の CO_2 で満たされた 37°C インキュベーターで行い、10% のウシ胎児血清 (Gibco) と 1% の抗生物質 (Wako の penicillin-streptomycin-amphotericin B suspension) を添加した McCoy's 5A medium (Gibco) を使用した。各細胞株は、Effectine (Qiagen) によるプラスミド導入と薬剤選択によって取得した。使用したプラスミドと親株の詳細は、表 6 および以下に記載する通りである。ASPM ノックアウト株 (ASPM KO) は、sgRNA 配列と SpCas9 配列を持った CRISPR/Cas9 プラスミド (pAI112) と、相同配列の間にネオマイシン耐性遺伝子を持つドナープラスミド (pAI114) を用意し、オリジナルの HCT116 細胞へ同時に導入した。ASPM の完全ノックアウト株 (ASPM KO^c) は、sgRNA 配

列と SpCas9 配列のセットを 2 つ持ち、それぞれが ASPM のアミノ末端とカルボキシル末端を標的にしている CRISPR/Cas9 プラスミド (pAI119) と、相同配列の間にネオマイシン耐性遺伝子を持つドナープラスミド (pAI118) を用意し、オリジナルの HCT116 細胞へ同時に導入した。CDK5RAP2-mAID-mCherry 発現株は、(Natsume et al., 2016) に記載された mAID タグの細胞株取得方法に従った。本研究では、CRISPR/Cas9 プラスミド (pTK478) と、相同配列の間に mAID-mCherry とハイグロマイシン耐性遺伝子を持つドナープラスミド (pTK472) を用意し、HCT116 Tet-OsTIR1 細胞へ同時に導入した。CDK5RAP2-mAID-mCherry を発現する ASPM ノックアウト株 (ASPM-KO/CDK5RAP2-mAID-mCherry) は、CRISPR/Cas9 プラスミド (pAI112) とドナープラスミド (pAI114) を CDK5RAP2-mAID-mCherry 発現株へ同時に導入した。全長 ASPM 発現株 (ASPM-mClover) および ASPM 変異株 (ASPM [1-3232]-mClover) は、CRISPR/Cas9 プラスミド (pAI113, pAI121) と、相同配列の間に mClover とネオマイシン耐性遺伝子を持つドナープラスミド (pAI110, pAI120) を CDK5RAP2-mAID-mCherry 発現株へ同時に導入した。プラスミド導入した細胞は、2-3 日後に 10cm ディッシュへ移動し、200 $\mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシン (Wako)、1 $\mu\text{g/ml}$ のピューロマイシン (Wako)、800 $\mu\text{g/ml}$ の G-418 (Roche) をそれぞれ加えた培地で 10-18 日間培養した。その後、単一コロニーを 24 穴プレートへ移し、細胞を増殖させるてクローン株を樹立した。2 対立遺伝子が編集されたクローン株の確認には、(Natsume et al., 2016) の方法に従い、Tks Gflex DNA polymerase (TaKaRa) と表 5 のプライマーによる PCR を利用した。なお、多くの株では薬剤耐性クローン株からゲノム DNA を取得して PCR を行ったが、全長 ASPM 発現株と ASPM 変異株は細胞を直接 PCR テンプレートとして使用した。また、PCR によって取得した DNA 断片のシーケンス解析により、全長 ASPM 発現株と ASPM 変異株のタグ導入が適切な場所で行われていることを確認した。

AID システム

mAID タグを持った CDK5RAP2 の分解には、OsTIR1 発現の発現を誘導するドキシサイクリンと mAID 融合タンパク質の分解を誘導する IAA を利用した。具体的には、CDK5RAP2-mAID-mCherry 発現株に 2 $\mu\text{g/ml}$ のドキシサイクリン (Sigma-Aldrich) と 500 μM の IAA (Wako) を添加し、24 時間処理することで CDK5RAP2-mAID-mCherry の分解を誘導した。

RNAi

[ショウジョウバエ S2 細胞]

RNAi 方法は基本的に (Bettencourt-Dias and Goshima, 2009; Goshima et al., 2007) の方法に従った。Asp RNAi とコントロールに使用したプライマーの情報は表 1 に記載した。また、他の二重鎖 RNA (dsRNA) の配列は、(Goshima et al., 2007) に記載されているものを使用した。S2 細胞の RNAi には特別な試薬を必要としないため、各 dsRNA を直接培養液に添加した。

4-7 日後、細胞を Con-A でコーティングしたガラスボトムディッシュへ移動し、顕微鏡観察を行った。なお一部の実験では、中期の細胞数を増やすために、後期促進複合体 (anaphase-promoting complex, APC) のサブユニットである Cdc16 や Cdc27 の RNAi を同時に行った (Goshima et al., 2005a; Goshima et al., 2007)。

[ヒト HCT116 細胞]

siRNA に使用したプライマーの情報は表 3 に記載した(このうち、少なくとも 2 つの siRNA でオフターゲット効果が見られた)。なお、コントロールとして luciferase siRNA を使用した。siRNA の導入には Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用し、13.3nM の siRNA と一緒に 42 時間(ライブイメージング)、もしくは 48 時間(免疫染色)処理することで、対象遺伝子の発現抑制を誘導した。また、AID システムによる CDK5RAP2 の分解を同時に行う場合は、siRNA 導入後 24 時間の時点でドキシサイクリンと IAA を添加した。

顕微鏡観察

[ライブイメージング]

スピニングディスク共焦点顕微鏡で観察を行った。ショウジョウバエ S2 細胞の撮影は主に、共焦点スキャナユニット CSU-X1 (横河電機) と EMCCD カメラ ImagEM (浜松ホトニクス) を取り付けた倒立顕微鏡 Te (ニコン) を使用した。また、一部のデータ(図 8, 9)では、共焦点スキャナユニット CSU-W1 (横河電機) と EMCCD カメラ iXON DU888E (Andor Technology) を取り付けた倒立顕微鏡 Ti (ニコン) を使用した。ヒト HCT116 細胞の撮影では、共焦点スキャナユニット CSU-X1 (横河電機) と EMCCD カメラ ImagEM (浜松ホトニクス) を取り付けた倒立顕微鏡 Ti を使用した。さらに、ImagEM をチラー (Julabo USA Inc.) で -80°C に冷却し、サンプルを安定に保つため、5% の CO₂ で満たされた 37°C 顕微鏡用培養装置 (ステージトップインキュベーター) を使用した。対物レンズは 100 倍 (1.40NA, 1.49NA) と 60 倍 (1.40NA) を使用し、顕微鏡の制御を Micro-Manager (カリフォルニア大学の Vale 研で作成された) と NIS-Elements (ニコン) で行った。なお、ヒト HCT116 細胞の観察では、撮影開始の 1 時間以上前に 30 nM の SiR-Tubulin (Spirochrome) を添加し、微小管の染色を行った。また HSET 阻害実験では、撮影開始の 1 時間以上前に 10 μM の MG132 (Wako) と SiR-Tubulin の添加を行い、その後、200 μM の CW069 (Selleck Chemicals) を加えた。

[固定サンプル観察]

免疫染色サンプルの観察は蛍光顕微鏡で、試験管内での微小管架橋活性検定の観察は全反射顕微鏡で行った。撮影には、EMCCD カメラ Evolve (Roper Scientific) を取り付けた倒立顕微鏡 Ti を使用した。対物レンズは 100 倍 (1.49NA, 1.45NA) と 40 倍 (1.30NA) を使用し、Micro-Manager で顕微鏡の制御を行った。

データ解析

取得した画像は、ImageJ (アメリカ国立衛生研究所) を使って解析した。Asp-GFP の移動速度は、紡錘体微小管に沿って取得したカイモグラフから計測した。また、極に局在する ASPM の蛍光強度は、免疫染色したサンプルから取得した単一焦点面画像の中で、焦点が合っている方の極から計測した。図 15B で表示した値は、各測定値からバックグラウンド値を引いたものである。なお、ヒト HCT116 細胞の実験では、データのグラフ化や統計解析に GraphPad Prism 6.0 を使用した。

免疫染色

細胞の固定には 6.4% パラホルムアルデヒドによる一般的な方法を用いた。染色には、抗 α -チューブリン抗体 (YOL1/34; 1:500 希釈、ラットモノクローナル、AbD Serotec)、抗 γ -チューブリン抗体 (GTU88; 1:500 希釈、マウスモノクローナル、Sigma-Aldrich; Goshima et al., 2008)、抗 ASPM 抗体 (1:1000 希釈、ウサギポリクローナル、Bethyl Laboratories, Inc.) を使用した。なお、抗 ASPM 抗体の抗原は ASPM の 3425–3477 アミノ酸領域である。DNA は 1 μ g/ml の DAPI で染色した。

ウェスタンブロッティング

(Rujano et al., 2013) でも報告されている通り、一般的な SDS サンプルバッファーによる処理では Asp タンパク質を検出することができなかった。そこで本研究では、次の 2 通りの方法で細胞抽出液を準備した。まず図 5B では、2-メルカプトエタノールを添加した尿素入りの SDS サンプルバッファー (62.5 mM Tris [pH 6.8], 10% glycerol, 2% SDS, 4 M urea) に回収した細胞を入れ、室温に 1 時間以上静置することでサンプルを作成した。一方、図 5A、13D では、最初に benzonase、DTT、プロテアーゼ阻害剤 (Roche の complete, EDTA-free を使用) を添加した Cytobuster (EMD Millipore) 溶液へ回収した細胞を入れ、氷上で 30 分静置した。その後、DTT と 2-メルカプトエタノールを添加した尿素入りの SDS サンプルバッファーを混ぜ、室温に 1 時間以上静置してサンプルを作成した。サンプルの検出には、抗 Asp 抗体 (1:500 希釈、ウサギポリクローナル、自作)、抗 Ncd 抗体 (1:500 希釈、ウサギポリクローナル、カリフォルニア大学の J. Scholey 教授から頂いた; Morales-Mulia and Scholey, 2005)、抗 GFP 抗体 (JL-8; 1:2000 希釈、マウスモノクローナル、Takara)、抗 CDK5RAP2 抗体 (1:10000 希釈、ウサギポリクローナル、Abcam) をそれぞれ使用した。抗 Asp 抗体は、大腸菌で発現させた Asp の 1-500 断片を抗原として作成し、未精製の血清をそのまま使用した。なお、大腸菌発現用のプラスミド (pAI2; 表 2) は、invitrogen の Gateway システムを使い、pDEST17 に 1-500 断片の塩基配列を導入して作成したものである。

タンパク質精製

Asp の 574-972 アミノ酸断片の精製は、以下のように行った。まず、GST-Asp [574-972 aa]-GFP-His の配列を持つプラスミド (pGG914; 表 2) を大腸菌の SoluBL21 に形質転換し、0.2 mM の IPTG でタンパク質発現を誘導した。その後、18°C で 22 時間培養した細胞を回収し、溶解バッファー (50 mM Hepes-KOH [pH 7.6]、250 mM NaCl、1 mM MgCl₂、2 mM CaCl₂、10 mM イミダゾール、5 mM 2-メルカプトエタノール、プロテアーゼ阻害剤) 液中で超音波処理した。遠心後のサンプル上清と Ni-NTA ビーズを 4°C で 1 時間混ぜ、ビーズを洗浄して不純物を取り除いてから、350 mM イミダゾールで標的タンパク質を溶出した。次に、溶出液と glutathione Sepharose ビーズ (GE Healthcare) を 4°C で 1 時間混ぜた。その後、ビーズを PreScission protease 入りの GST 切断バッファー (50 mM Tris-Cl [pH 7.5]、0.5 M NaCl、1 mM EDTA、0.1% Tween 20、1 mM DTT) に混ぜ、4°C で一晩処理した。これにより、GST タグと Asp 断片の間に存在する PreScission protease 標的配列が切断されるため、溶液中に Asp [574-972 aa]-GFP-His が含まれるようになる。取得した精製タンパク質入りの溶液は、PD MiniTrap G-25 column (GE Healthcare) で保存バッファー (80 mM K-Pipes [pH 6.8]、4 mM MgCl₂、1 mM EGTA、1 mM DTT、20% グリセロール) に置換した後、急速に冷凍して保存した。

試験管内での微小管架橋活性検定

精製タンパク質の微小管架橋活性の検証は、基本的に (Goshima, 2011) の方法に従った。まず、ブタの脳から取得したチューブリンを 20 μM タキソール (脱重合阻害剤) の存在下で重合させ、安定化された微小管を作成した。この際、ローダミンの蛍光ラベルを付加したチューブリンを、重合させるチューブリン全体の 4% になるように混ぜた。次に、50 mM KCl、1 mM DTT、20 μM タキソールを含む MRB80 バッファー (80 mM K-Pipes [pH 6.8]、4 mM MgCl₂、1 mM EGTA) の中で、400 nM の Asp [574-972 aa]-GFP-His と 4 μM の微小管を混ぜ、30 分間室温で静置した。その後、1% のグルタルアルデヒドを添加し、室温で 3 分間反応させて固定した。最後に、作成したサンプルをカバースリップ上に載せ、全反射蛍光顕微鏡で観察した。

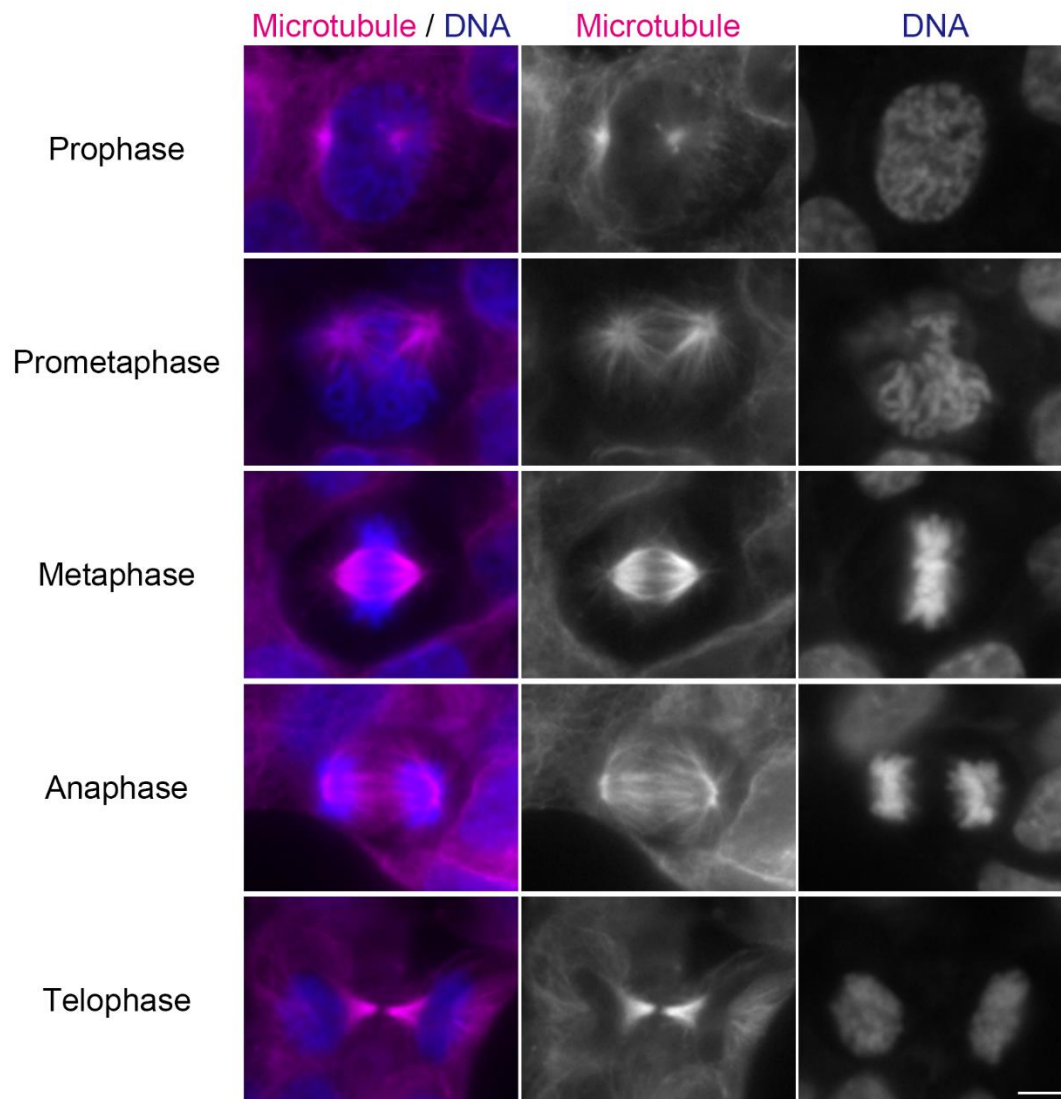


図1 動物細胞における分裂期の様子

ヒトHCT116細胞の免疫染色画像を示した。マゼンダ色は微小管、青色は染色体を表す。スケールバーは5 μm 。

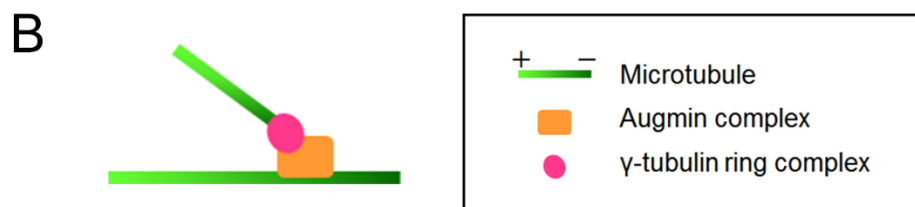
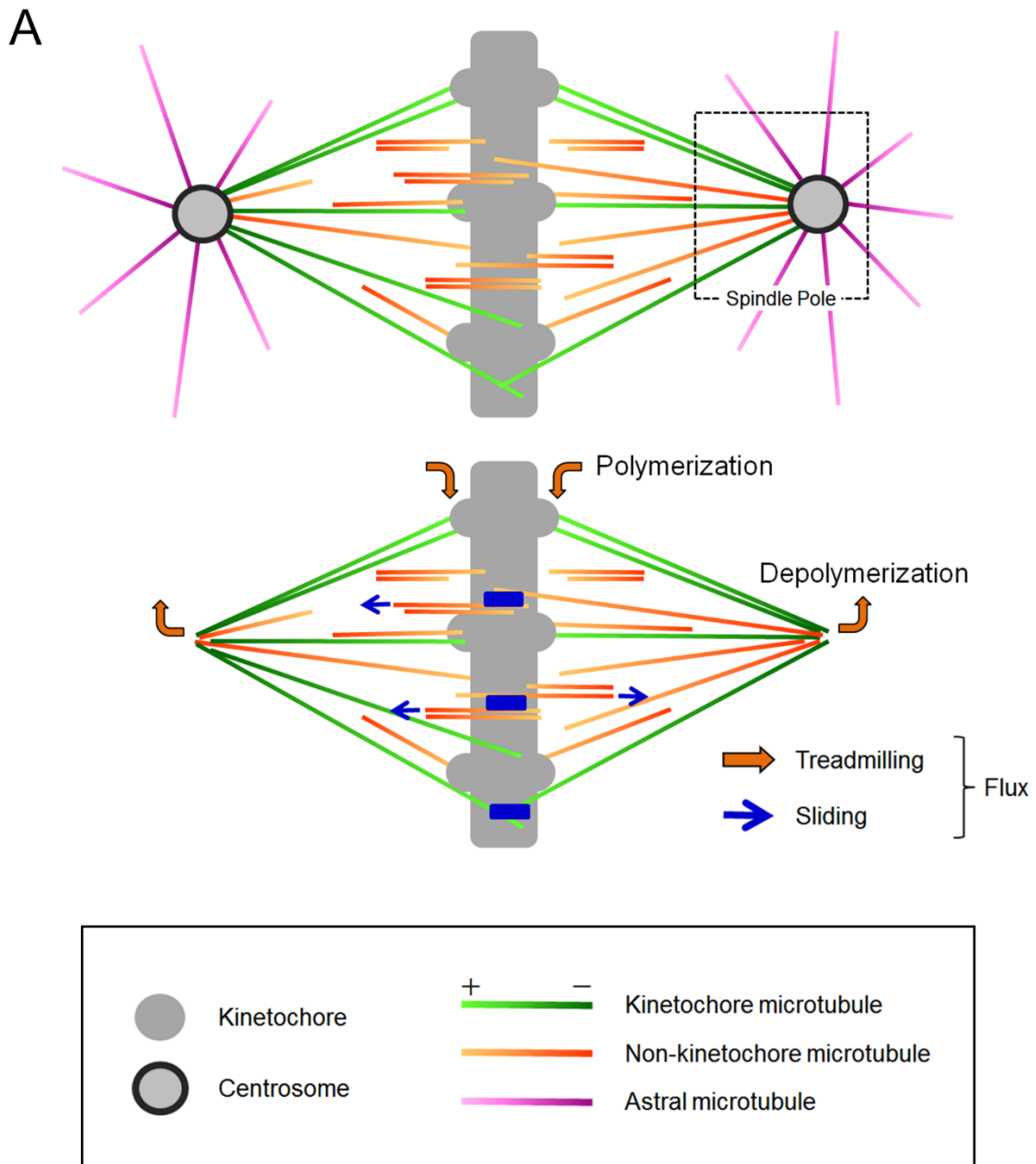


図2 中期紡錘体と微小管依存的な微小管形成の模式図

(A) 中期紡錘体の模式図。微小管の極性を色の濃淡で示しており、薄い色の方がプラス端、濃い色の方がマイナス端を意味する。中心体が無い場合でも、微小管マイナス端が収束した極を作るため、下図のような双極性の紡錘体が形成される。矢印はフラックスの流れを、青色の四角は微小管滑動(sliding)を起こすモータータンパク質を表している。

(B) オーグミン依存的な微小管形成の模式図。新しく伸長した娘微小管は、母微小管と同じ極性を持つ。なお、動原体微小管だけでなくオーグミン依存的に伸長した他の娘微小管も、母微小管としてオーグミンの足場を提供する。

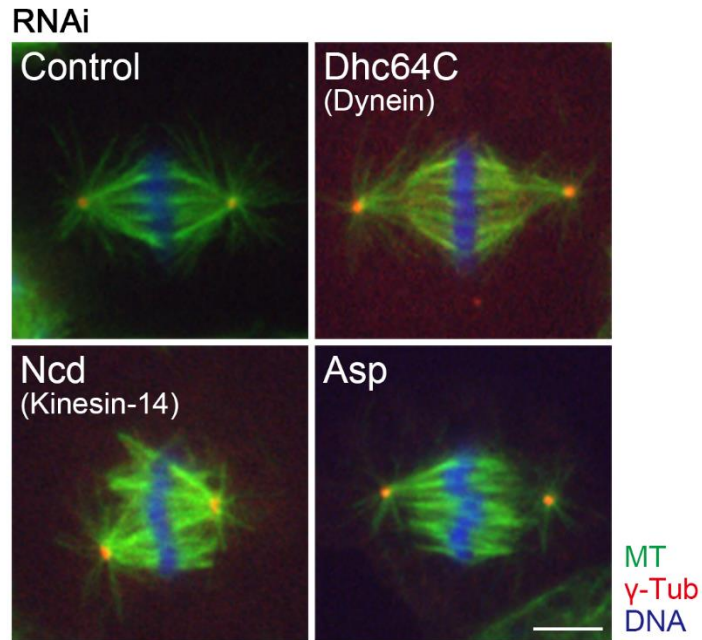


図3 ショウジョウバエS2細胞における極形成因子

ショウジョウバエS2細胞において、極形成因子を欠損した際に見られる紡錘体の表現型を示した。画像は、各因子のRNAi細胞を免疫染色したものである。スケールバーは5 μm。

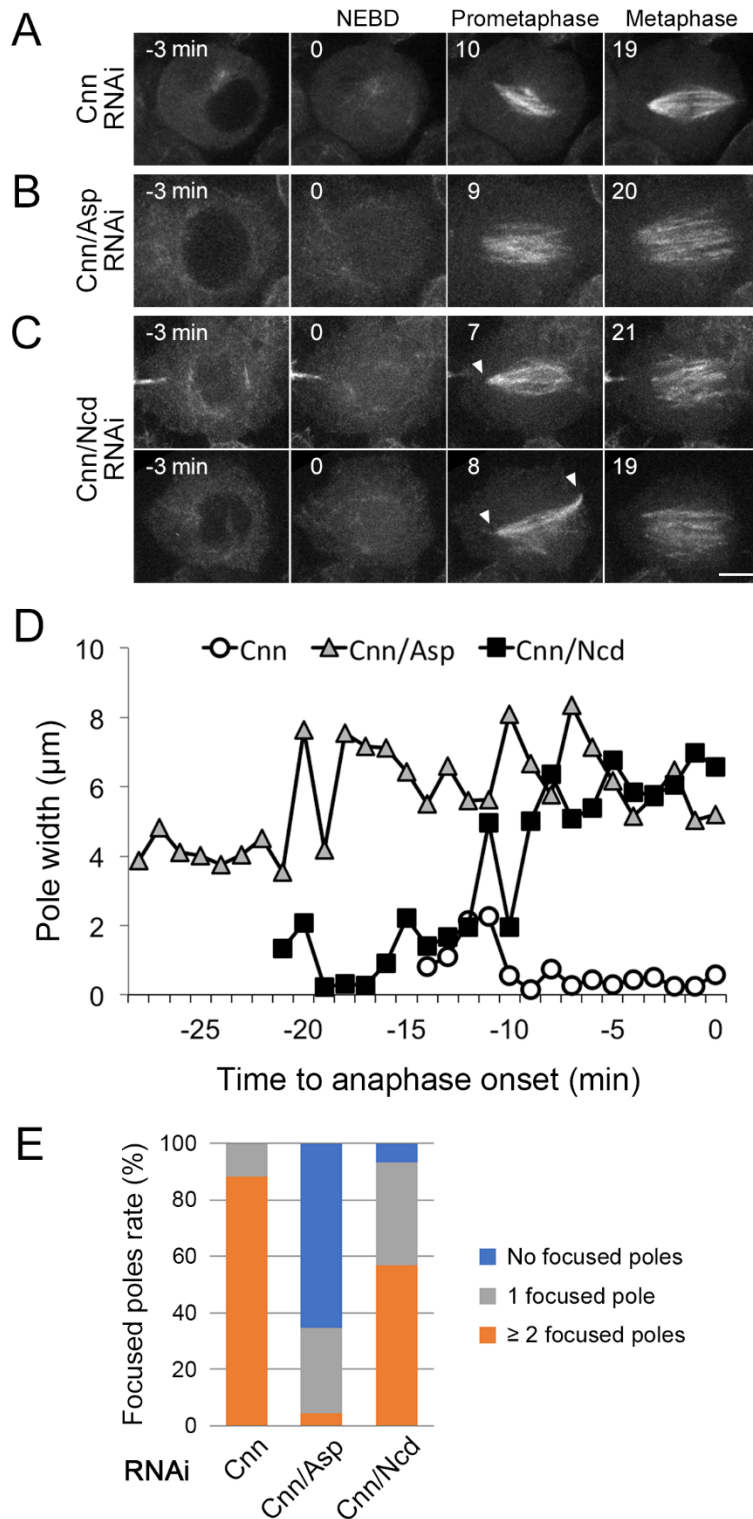


図4 Asp欠損とNcd欠損で見られる極収束異常の比較

(A-C) GFP-Tubulin発現細胞に対してAspあるいはNcdのRNAiを行い、紡錘体の形成過程を撮影した。観察した細胞は全てCnn RNAiによって中心体を欠損している。Aspを欠損した細胞では、前中期から中期を通して一度も極の収束が見られなかったが(Bの9-20分のパネル)、Ncd欠損細胞では、その多くが前中期の間に一過的な極の収束を示した。Cの矢尻は収束した極を表す。画像はz軸に沿って1 μm間隔で6枚ずつ取得しており、表示している画像は三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの(maximum projection)である。スケールバーは5 μm。(参照:動画1)

(D) 各RNAi細胞が前中期から中期の間に見せる極幅の変化を示した。グラフには代表的なデータを載せた。核膜崩壊を起こしてから数分後、形成途中の紡錘体が双極性を確立した時点と各データの最初の点とし、後期開始である0分までの測定結果を描写した。極の幅は、三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化した画像(maximum projection)から測定した。

(E) 各タンパク質のRNAiによって現れる紡錘体の表現型を定量化した。前中期の間に観測された、一過的、あるいは、連続的に収束した極の数で分類し、それぞれの割合をグラフで示した。

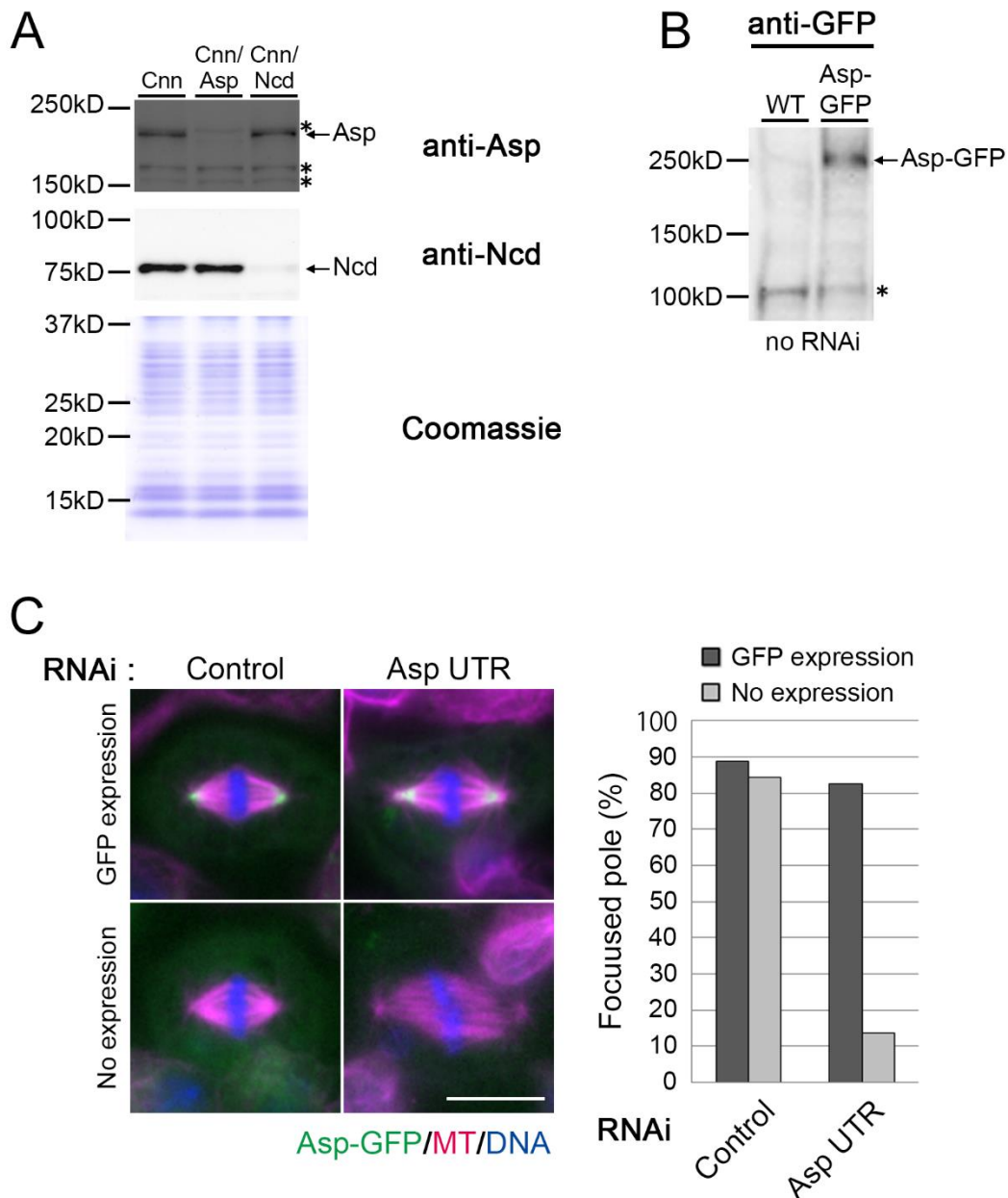


図5 RNAiによるノックダウンの確認とAsp-GFPの機能性の検証

(A) Ncd RNAiとAsp RNAiのノックダウン効率を確認するため、ウエスタンブロッティングを行った。使用した細胞抽出液は、図4Aで使用したGFP-Tubulin発現細胞から作成したものである。検出されたバンドを計測したところ、内在性のNcdとAspはそれぞれ>95%、90%の割合でノックダウンされていた。アスタリスクは抗Asp抗体が認識した非特異的なバンドを示している。下の画像は、ローディングコントロールとして行ったクマシー染色である。

(B) 抗GFP抗体を使ったウエスタンブロッティングにより、作成した株でAsp-GFPが発現していることを確認した。アスタリスクは抗GFP抗体が認識した非特異的なバンドを示している。

(C) Asp-GFPが機能的であることを確認するため、レスキュー実験を行い、免疫染色した。この際、内在性Aspのノックダウンを行うために、AspのUTR領域を標的としたRNAi (Asp UTR RNAi) を利用した。Asp-GFP発現細胞に対してAsp UTR RNAiを行ったところ、内在性Aspのノックダウンによる極収束異常は観察されなかった。実験は2度試行しており、それぞれ収束した極を持つ細胞の割合を計測した。そのうち、1回分の計測結果をグラフに表示した。測定数はn = 18-51。なお、左上の画像は図7Aと同じものである。スケールバーは10 μm。

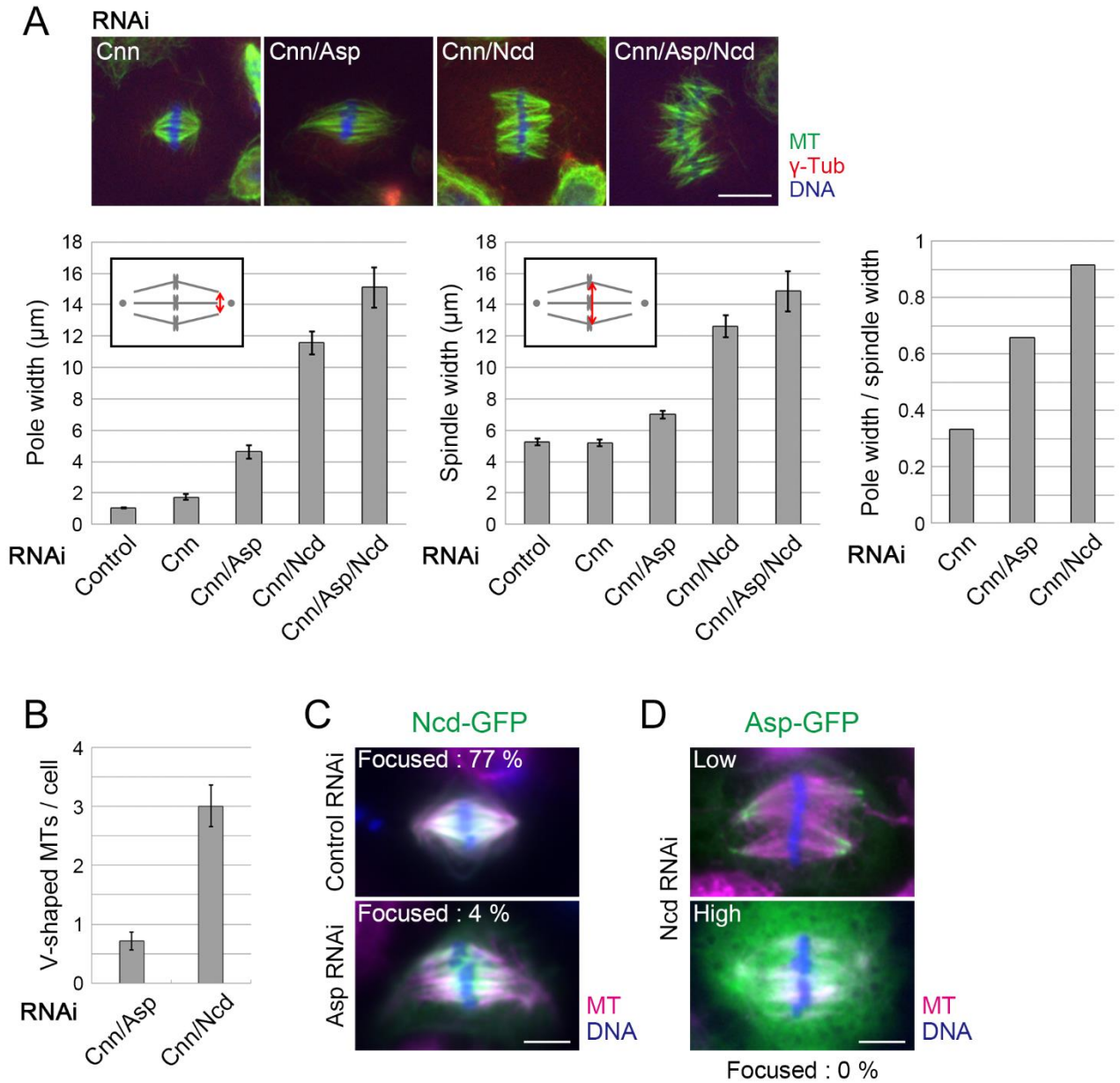


図6 中心体を持たない紡錘体の極収束においてAspはNcdと独立に機能する

(A) Asp RNAi細胞とNcd RNAi細胞を免疫染色し、それぞれの細胞が見せる紡錘体極の幅(左)、紡錘体の幅(中央)、および、それらの比率(右)を定量した。なお、観察した細胞は全てCnn RNAiによって中心体を欠損している。グラフ中にある挿入図は、それぞれ測定した位置を示している。エラーバーは標準誤差を示す。測定数はn = 18-54。スケールバーは10 μm。

(B) Aの細胞から、V字型に収束した微小管の観測頻度を定量した。測定数は、Cnn/Asp RNAiがn = 32、Cnn/Ncd RNAiがn = 38。

(C) Ncd-GFP発現細胞に対して各RNAiを行い、免疫染色した。また、収束した極を持つ細胞の割合を定量し、結果を画像の中に表示した。外来性のNcd-GFP発現は、Asp RNAiによる極収束異常を補うことができなかった。測定数はコントロールがn = 13、Asp RNAiがn = 23。スケールバーは5 μm。

(D) Asp-GFP発現細胞に対してNcd RNAiを行い、免疫染色した。また、収束した極を持つ細胞の割合を定量し、結果を画像の下に表示した。外来性のAsp-GFP発現は、発現量の高低にかかわらず、Ncd RNAiによる極収束異常を補うことができなかった。測定数はコントロールがn = 25。スケールバーは5 μm。

(次ページへ続く)

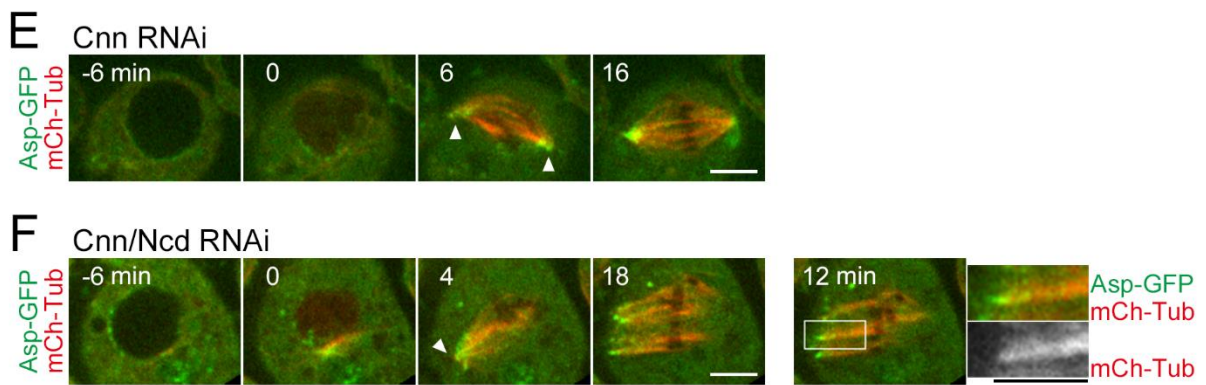


図6 続き

(E,F) Asp-GFPとmCherry-Tubulinを発現した細胞に対して各RNAiを行い、Asp-GFPの局在の変化を観察した。観察した細胞は全てCnn RNAiによって中心体を欠損している。どちらのRNAi細胞でも、前中期の収束した極(矢尻)にAsp-GFPシグナルが観察された。なお、Fでは右側の極が焦点面からずれてしまっている。左に拡大図を表示した。スケールバーは5 μm 。(参照:動画2)

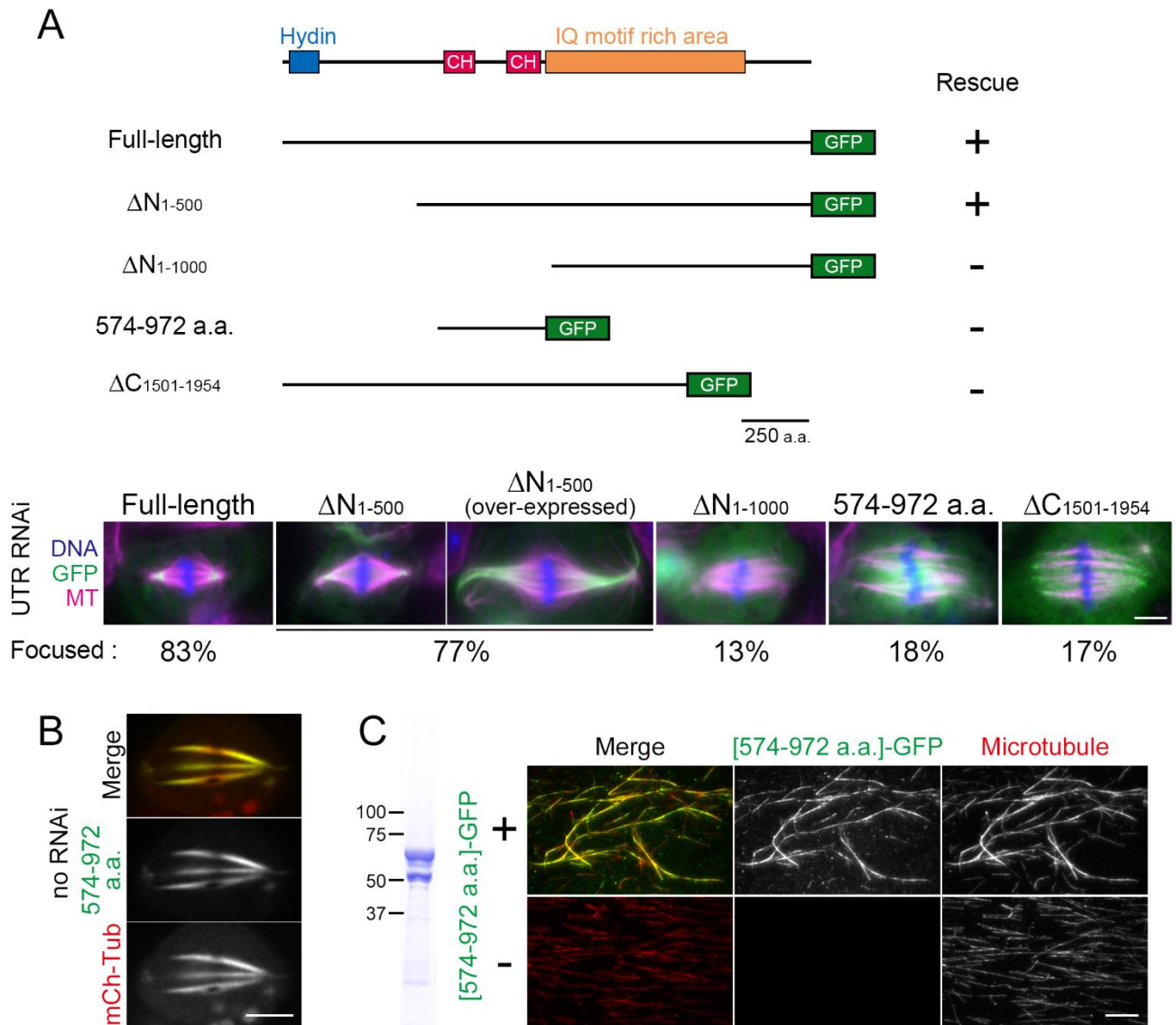


図7 Aspの中央領域は微小管架橋活性を持つ

(A) Asp UTR RNAiを用いたレスキュー実験を行った。GFP融合したAsp(全長、あるいは、部分欠失タンパク質)を発現した細胞に対してAsp UTR RNAiを行い、免疫染色した。また、収束した極を持つ細胞の割合を定量し、結果を画像の下に表示した。測定数はn = 23-32。スケールバーは5 μ m。

(B) Asp [574-972 aa]-GFPとmCherry-Tubulinを発現した細胞の生細胞画像を示した。この断片を発現した細胞は、内在性の全長Aspが発現している場合であっても、紡錘体微小管の過剰な束化と極の収束異常を引き起こした。スケールバーは5 μ m。

(C) 精製したAsp [574-972 aa]-GFPと微小管を混ぜ、Asp断片が微小管架橋活性を持つか検証した。実験には、微小管脱重合阻害剤のタキソールによる安定化とローダミンの蛍光ラベルを施した微小管を使用した。上はAsp [574-972 aa]-GFPと微小管を混ぜた場合、下は微小管のみの場合のデータである。精製時、左に示すように、Asp [574-972 aa]-GFPの分解産物と思われる小さなサイズのバンドが検出されたが、精製の過程で取り除くことができなかった。スケールバーは10 μ m。

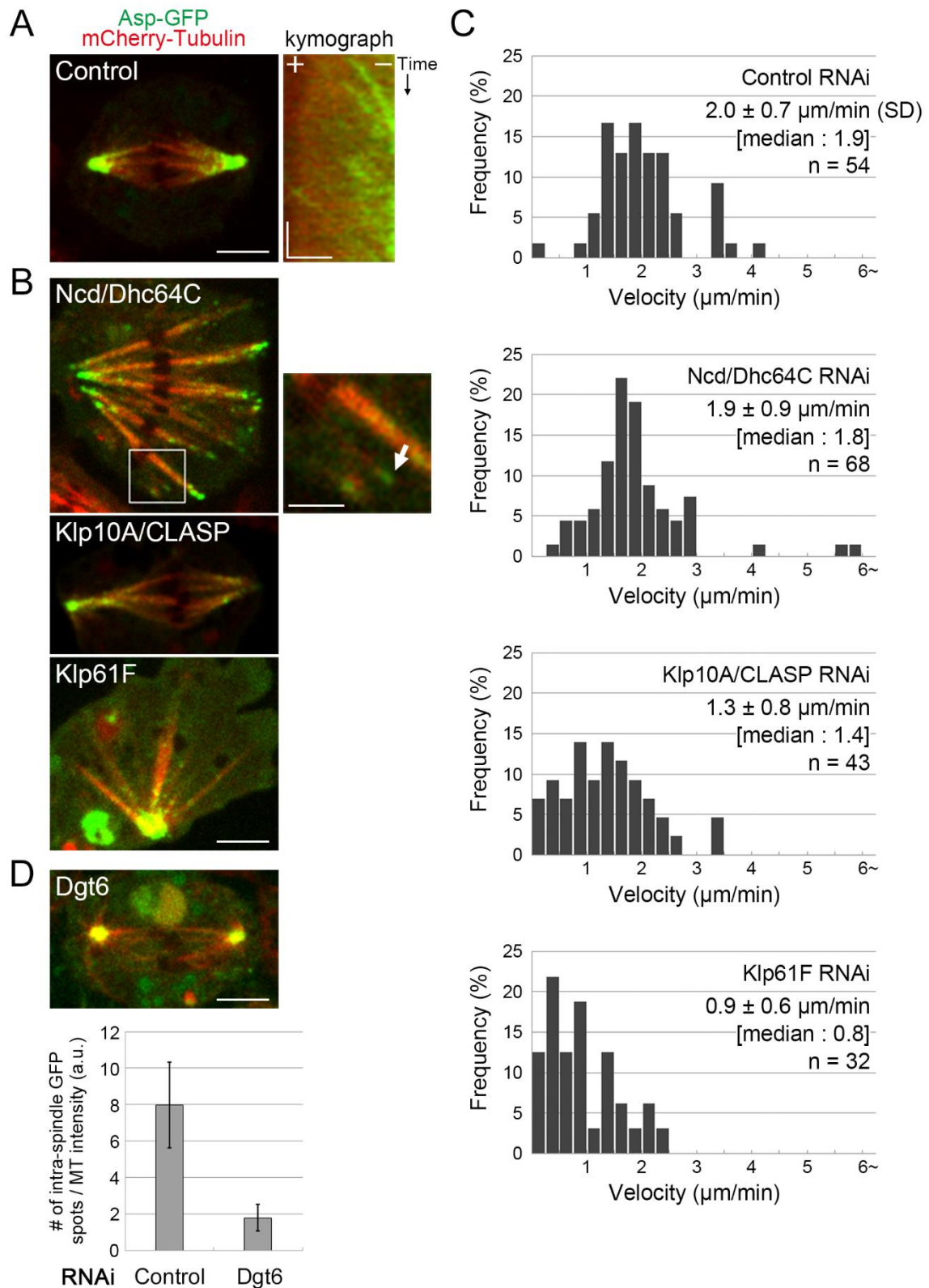


図8 紡錘体内の微小管マイナス端に局在するAspはフラックスによって極へ移動する

(A) Asp-GFPとmCherry-Tubulinを発現した細胞を経時観察し、紡錘体内で見せる動きを観察した。右は代表的なカイモグラフ(ある微小管の経時的な画像を上から順に並べたもの)であり、“+”は微小管のプラス端側を、“-”は微小管のマイナス端側を意味する。観察の結果、Asp-GFPシグナルが極方向へ移動していることが明らかになった。スケールバーは5 μm(左)、2 μm(右・横)、1分(右・縦)。(参照: 動画3)

(B) Asp-GFPとmCherry-Tubulinを発現した細胞に対して各RNAiを行い、Asp-GFPの移動を観察した。右はNcd/Dhc64C RNAi細胞の拡大図で、矢印は紡錘体内の微小管末端に見られるAsp-GFP局在を示している。スケールバーは5 μm(左)、2 μm(右)。(参照: 動画3)

(次ページへ続く)

図8 続き

(C) 各RNAi細胞におけるAsp-GFPシグナルの移動速度を測定し、その分布をグラフにした。Klp10A/-CLASP RNAi細胞、および、Klp61F RNAi細胞では平均速度の著しい低下が見られたが($P < 0.0001$)、Ncd/Dhc64C RNAi細胞では見られなかった($P > 0.29$)。統計的有意差はマン・ホイットニーのU検定によって算出したものである。

(D) Asp-GFPとmCherry-Tubulinを発現した細胞に対してオーグミンサブユニットであるDgt6のRNAiを行い、紡錘体内に見られるAsp-GFPを定量した。分裂期を通して撮影した動画のうち、中期の紡錘体が確認できた最初の時点の単一焦点画像を選択し、紡錘体内部に見られるAsp-GFPの点を計測した。グラフは、Asp-GFPの点の数を紡錘体微小管の蛍光強度で割った値の平均値を表示しており、Dgt6 RNAi細胞で著しい低下が観察された($P < 0.021$)。なお、紡錘体の極領域はAsp-GFPの大きな集合体を持つため、微小管の蛍光強度には紡錘体の中央60%の範囲から計測した値を使用した。また、Asp-GFPの発現量の違いによる影響を除外するため、細胞全体が持つGFPの蛍光強度が同程度の細胞を選び、Asp-GFPの点状シグナルの計測に使用した(選択した細胞のGFP蛍光強度の平均 \pm 標準偏差は、それぞれ4つのコントロールRNAi細胞で 5.3 ± 1.4 、4つのDgt6 RNAi細胞で 5.5 ± 1.5 であった)。グラフのエラーバーは標準誤差を、a.u.は任意単位を示している。統計的有意差はマン・ホイットニーのU検定によって算出したものである。スケールバーは $5 \mu\text{m}$ 。(参照:動画3)

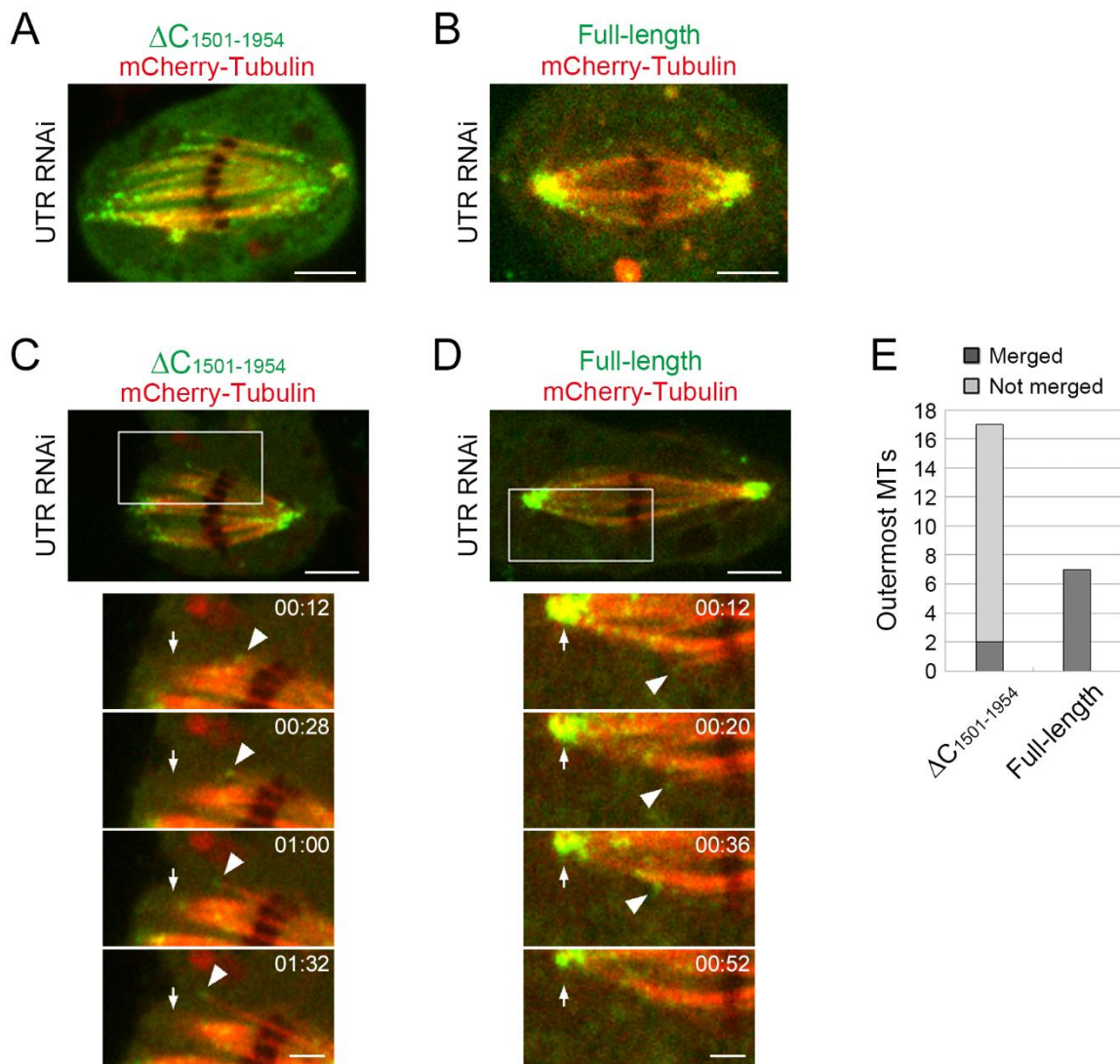


図9 機能的なAspが存在しない条件で観察される微小管マイナス端の動態

(A,B) Asp ΔC -GFP、あるいは、Asp(FL)-GFPをmCherry-Tubulinと一緒に発現した細胞に対して内在性AspのRNAiを行い、微小管マイナス端の動態を観察した。Asp ΔC -GFPの局在から、機能的なAspの非存在下では微小管マイナス端が極領域に散乱していることが確認できる。一方、Asp(FL)-GFPを発現するコントロール細胞では、微小管の収束点に1つの大きなGFPシグナル集合体が作られている。スケールバーは5 μm 。(参照:動画6)

(C-E) 紡錘体の外側にある微小管のマイナス端の動態を定量した。機能的なAspを持たない場合(C,E)、微小管マイナス端は他の微小管と結合することなく極領域まで運ばれる。一方、機能的なAspが存在する場合(D,E)、このような微小管は極へ移動する間に近くの微小管と結合する。矢尻は最も外側に観察される微小管のマイナス端を、矢印は極の場所を示している。時間は分と秒を表す。スケールバーは5 μm (上)と2 μm (下)。(参照:動画7)

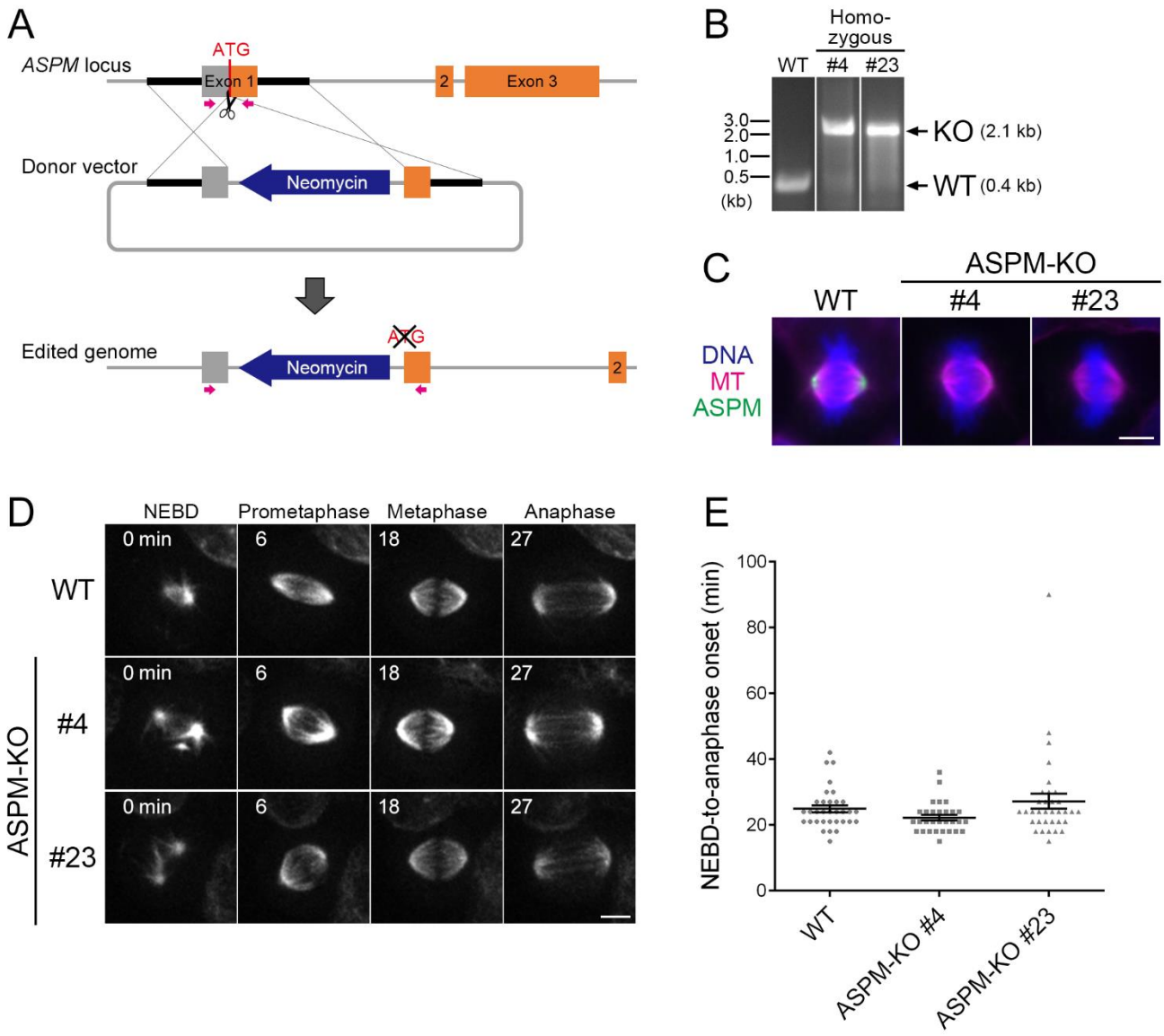


図10 ASPMノックアウトは有糸分裂異常を示さない

(A) ASPMノックアウト株作成の模式図。ASPM遺伝子のエキソン1にある開始コドンの周囲を削除し、ネオマイシン耐性遺伝子に置換した。

(B) 薬剤耐性遺伝子が2対立遺伝子に挿入されていることを確認するため、取得したクローン株に対してPCRを行った。PCRプライマーは、Aにマゼンダ色の矢印として示したものを使用した。

(C) 2つのASPMノックアウト株(KO #4およびKO #23)の免疫染色を行い、ASPMの極局在が減少していることを確認した。スケールバーは5 μm。

(D) ASPMノックアウト株(KO #4およびKO #23)で見られる紡錘体の動態を調べるため、ライブイメージングを行った。SiR-Tubulin染色によって可視化された微小管を3分ごとに観察したが、異常は見られなかった。なお、各時点の画像はz軸に沿って3 μm間隔で5枚ずつ取得しており、表示している画像は三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの(maximum projection)である。スケールバーは5 μm。(参照:動画8)

(E) 各細胞株における有糸分裂の時間を測定し、グラフで表した。各データの平均 ± 標準誤差は、コントロールが25 ± 1 (n = 33)、KO #4が22 ± 1 (n = 30, p > 0.05)、KO #23が27 ± 2 (n = 34, p > 0.3)であった。統計的有意差はスチューデントのt検定によって算出したものである。

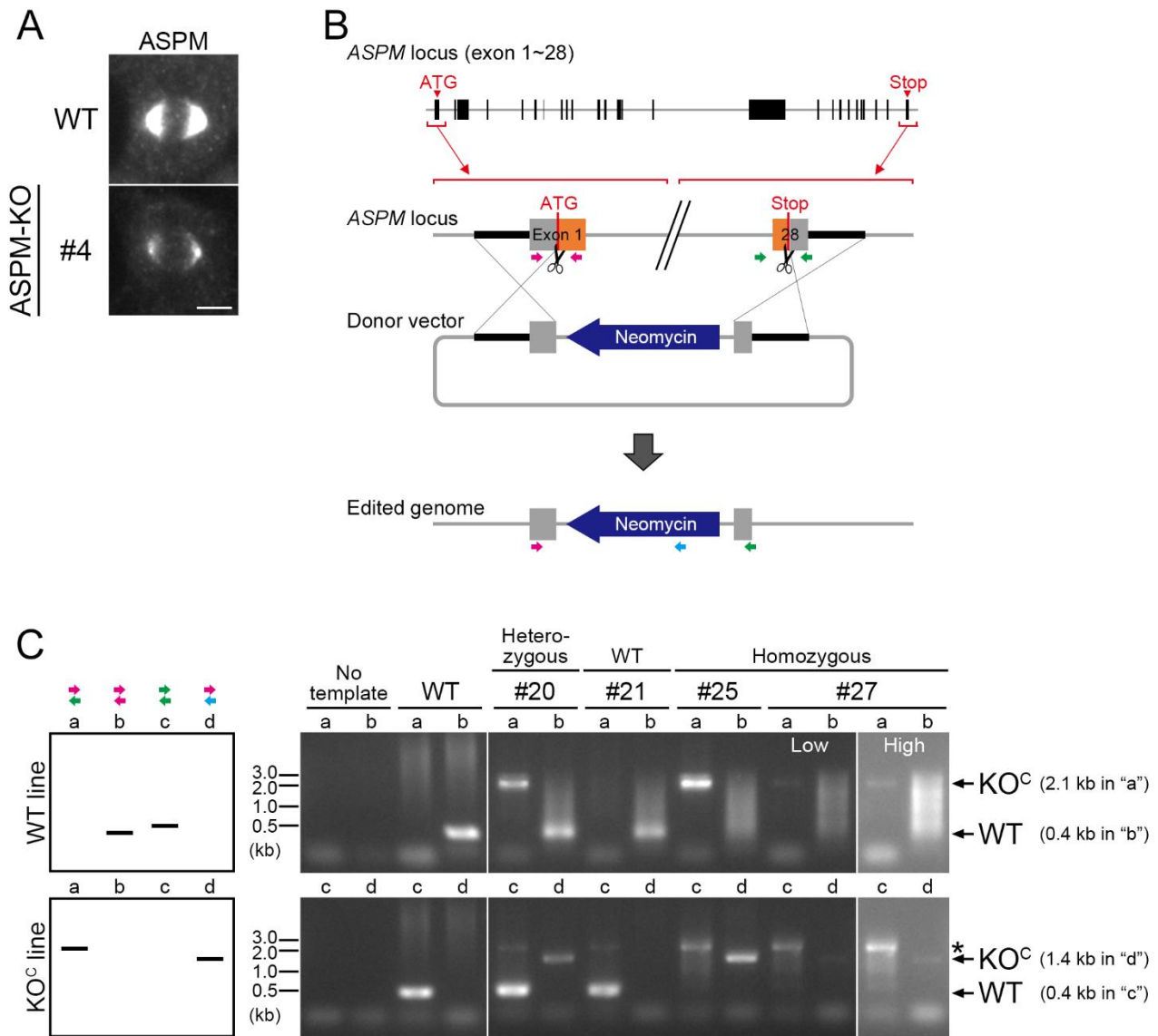


図11 完全なASPMノックアウト株の作成

(A) ASPMノックアウト株では、ASPMの断片が僅かに発現しており、弱いASPMシグナルが検出される。画像は図10Cと同じものであるが、ASPMシグナルを見やすくするため、高いコントラストで表示している。スケールバーは5 μ m。

(B) 完全なASPMノックアウト株作成の模式図。ASPM遺伝子の翻訳領域全てをネオマイシン耐性遺伝子に置換した。

(C) 薬剤耐性遺伝子が2対立遺伝子に挿入されていることを確認するため、取得したクローン株に対してPCRを行った。PCRプライマーは、Bに各色の矢印で示したものをそれぞれ使用した。左に使用したプライマーの組み合わせと、それによって検出される予定のバンドを示している。右下の画像にあるアスタリスクは、非特異的なバンドを意味する。

(次ページへ続く)

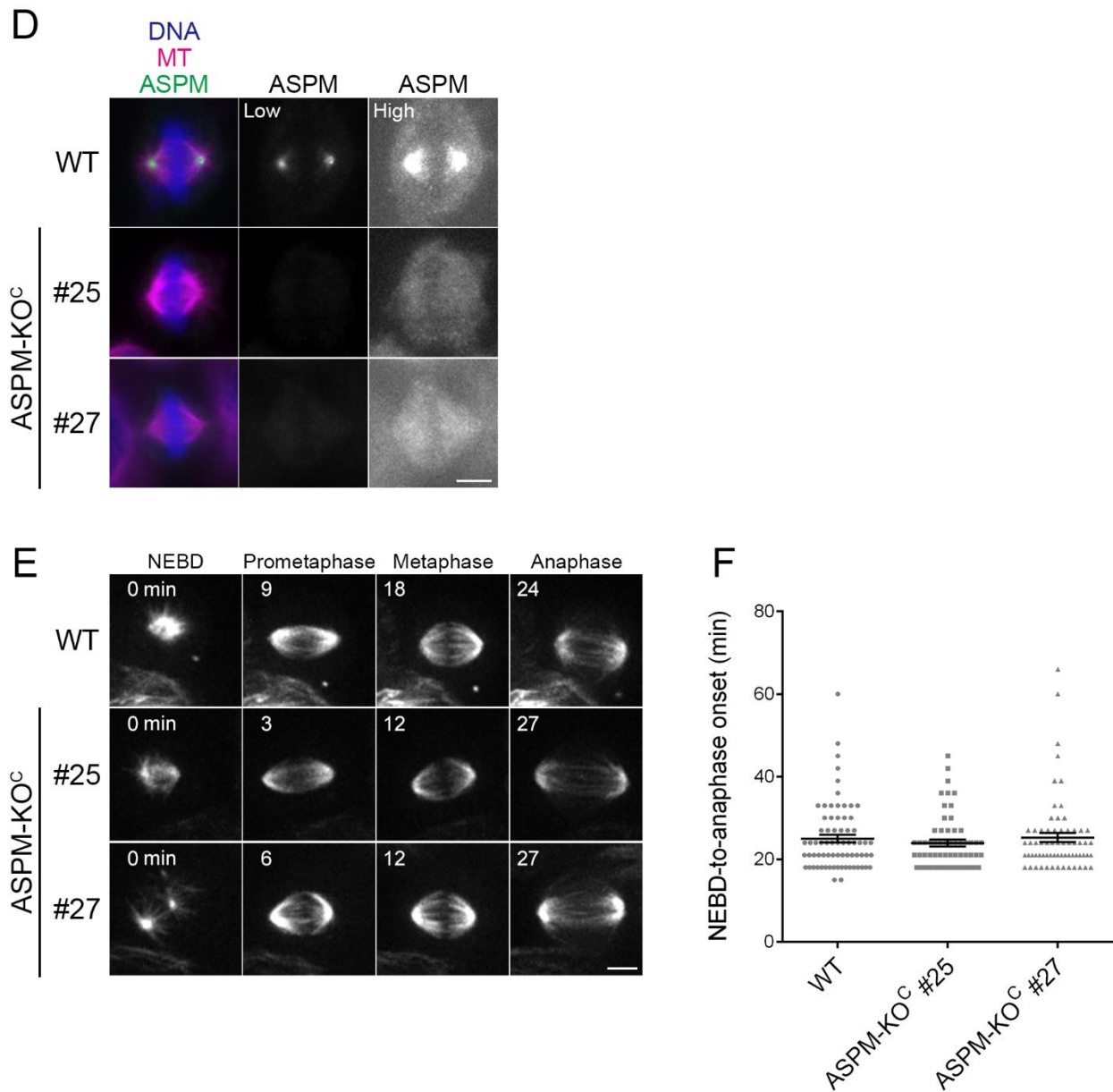


図11 続き

(D) 完全なASPMノックアウト株(KO^c #25およびKO^c #27)の免疫染色を行い、ASPMの極局在が失われていることを確認した。右側にある画像は、コントラストを高くしたものである。スケールバーは5 μ m。

(E) 完全なASPMノックアウト株(KO^c #25およびKO^c #27)で見られる紡錘体の動態を調べるため、ライブイメージングを行った。SiR-Tubulin染色によって可視化された微小管を3分ごとに観察したが、異常は見られなかった。なお、各時点の画像はz軸に沿って3 μ m間隔で5枚ずつ取得しており、表示している画像は三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの(maximum projection)である。スケールバーは5 μ m。(参照:動画8)

(F) 各細胞株における有糸分裂の時間を測定し、グラフで表した。各データの平均 \pm 標準誤差は、コントロールが25 \pm 1 (n = 71)、KO^c #25が24 \pm 1 (n = 59, p > 0.4)、KO^c #27が25 \pm 1 (n = 66, p > 0.8)であった。統計的有意差はスチューデントのt検定によって算出したものである。

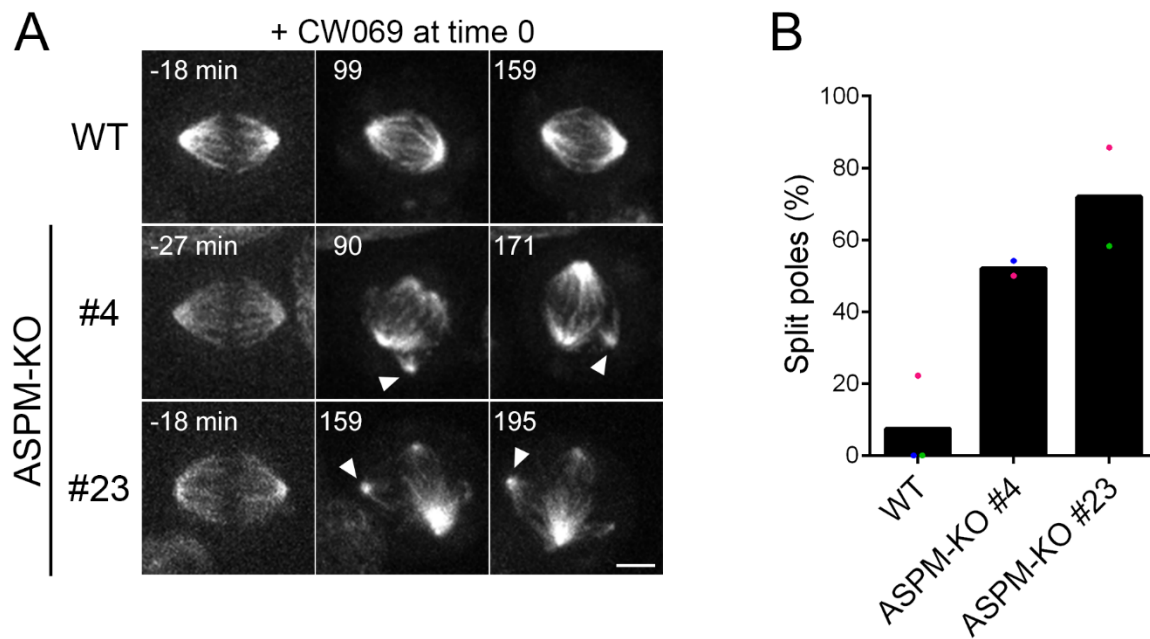


図12 ASPMとHSETの二重障害は紡錘体極の異常な分裂を引き起こす

(A) HSET阻害剤(CW069, 200 μ M)の添加による紡錘体の形態変化を観察した。微小管はSiR-Tubulin染色によって可視化されており、矢尻は分裂した極を示している。実験には、2つの独立したASPMノックアウト株(KO #4およびKO #23)を使用した。各時点の画像はz軸に沿って3 μ m間隔で5枚ずつ取得しており、表示している画像は三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの(maximum projection)である。スケールバーは5 μ m。(参照: 動画9)

(B) CW069添加後に観察される分裂した極の観測頻度を定量した。2-3回の独立した実験結果を各色の点で表示し、その平均値を黒い棒で示した。各実験では7-24個の紡錘体を測定した。

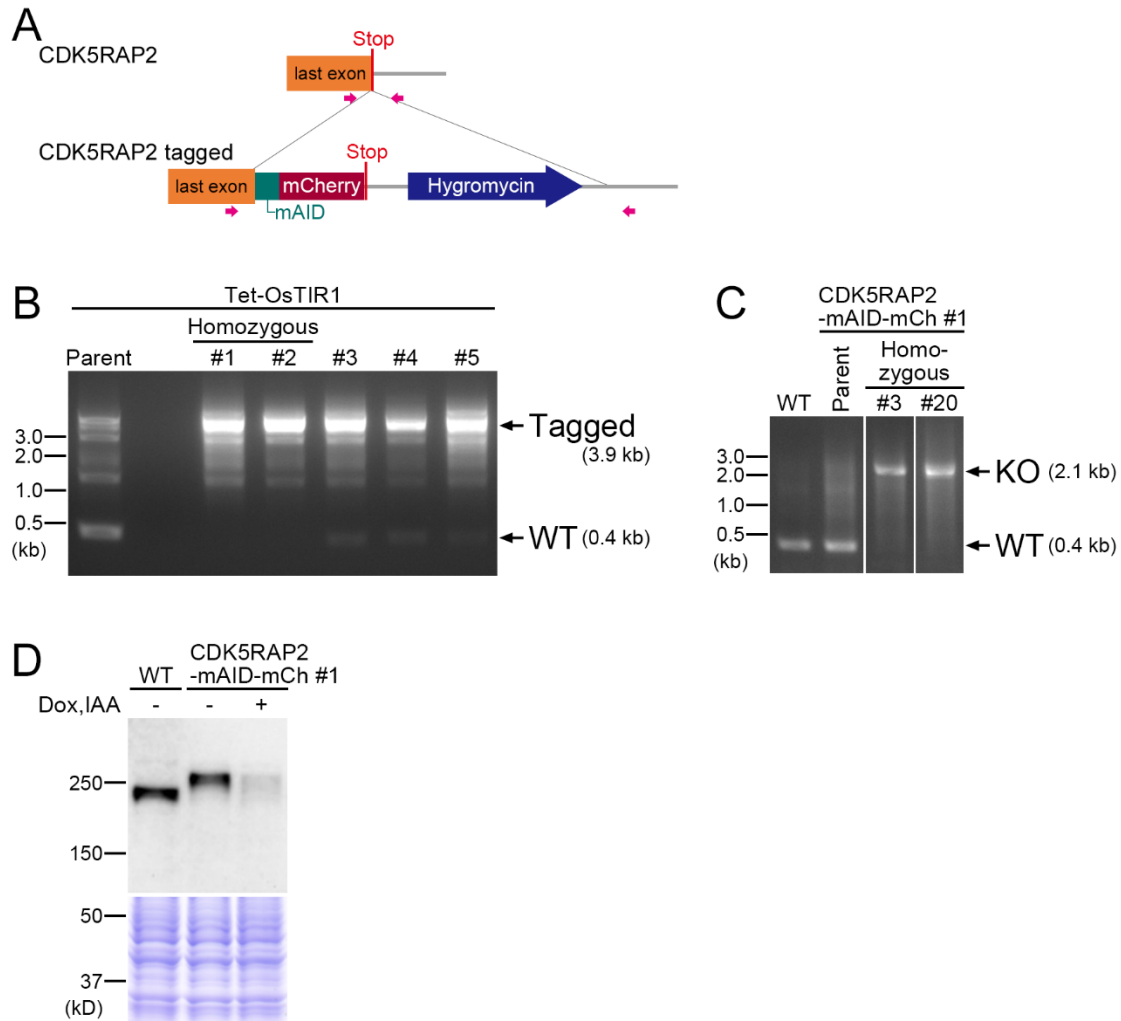
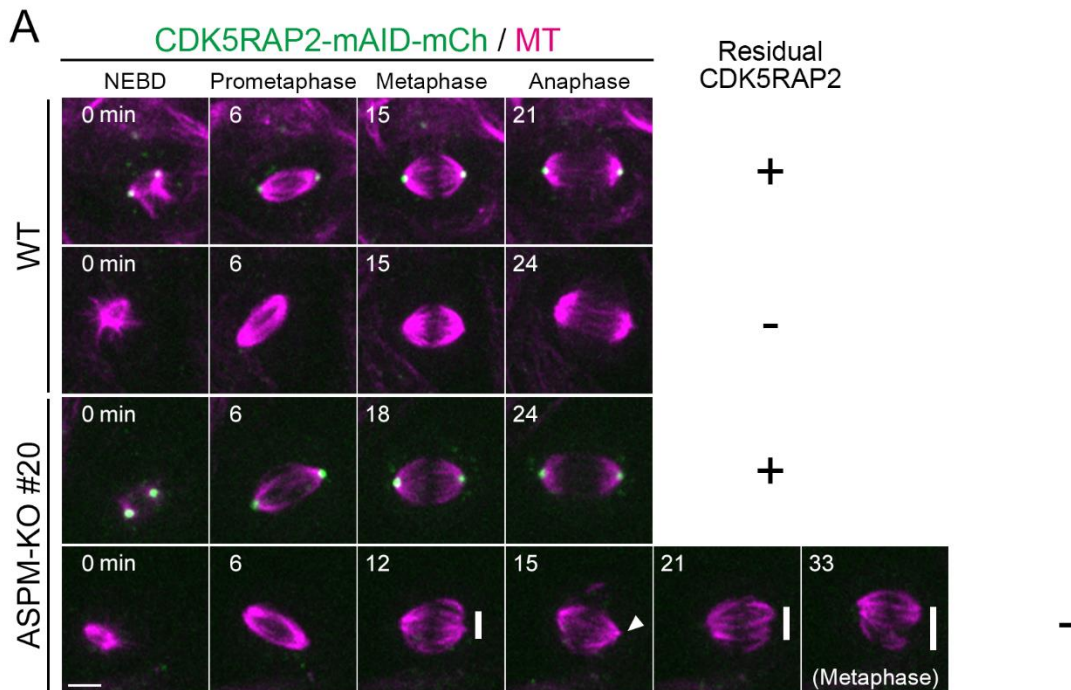


図13 CDK5RAP2-mAID-mCherry(デグロン)株の作成

- (A) CDK5RAP2タンパク質へ挿入されたmAID-mCherryタグとハイグロマイシン耐性遺伝子の模式図。この株の作成は清光智美博士と仁科桃子氏によって行われた。
- (B) mAID-mCherryタグと薬剤耐性遺伝子が2対立遺伝子に挿入されていることを確認するため、取得したクローン株に対してPCRを行った。PCRプライマーは、Aにマゼンダ色の矢印として示したものを使用した。取得したクローンラインのうち、#1を以降の実験の親株とした。この実験は清光智美博士と仁科桃子氏によって行われた。
- (C) 図10Aに記載した方法に従い、CDK5RAP2-mAID-mCherry発現株に対してASPMノックアウトを行った。図10Bと同様に、PCRによって薬剤耐性遺伝子が2対立遺伝子に挿入されていることを確認した。PCRプライマーは、図10Aにマゼンダ色の矢印として示したものを使用した。
- (D) CDK5RAP2-mAID-mCherry発現株で、DoxとIAA添加によるCDK5RAP2の分解が機能することを確認した。全細胞抽出液を作成し、抗CDK5RAP2抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。この結果は、CDK5RAP2の対立遺伝子の両方にmAID-mCherryタグが挿入されていることも証明している。下の画像は、ローディングコントロールとして行ったクマシー染色である。この実験はElsa A. Tungadi氏によって行われた。



B

- +Dox, IAA (CDK5RAP2 remains)
- ▒ +Dox, IAA (CDK5RAP2 disappears)
- Untreated

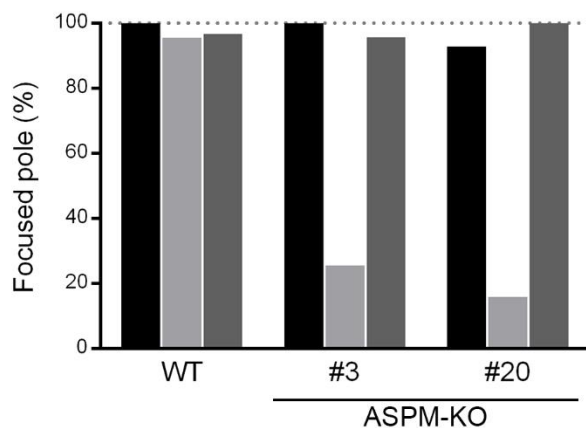


図14 ASPMとCDK5RAP2の二重欠損は紡錘体の極収束異常を引き起こす

(A,B) ASPMとCDK5RAP2の非存在下で見られる極収束異常を観察した。DoxとIAAの添加によってCDK5RAP2-mAID-mCherryが分解された細胞を“-”、分解されずに残った細胞を“+”として表示した。実験は、2つのライン(#3および#20)で行った。矢尻と垂直線はそれぞれ収束した極と収束していない極を表しており、この画像から、極の収束が一時的なものであることがわかる。各時点の画像はz軸に沿って3 μm間隔で5枚ずつ取得しており、表示している画像は三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの(maximum projection)である。実験は2度試行し、そのうち1回分のデータをグラフに表示した(n = 8-44)。スケールバーは5 μm。(参照: 動画10)

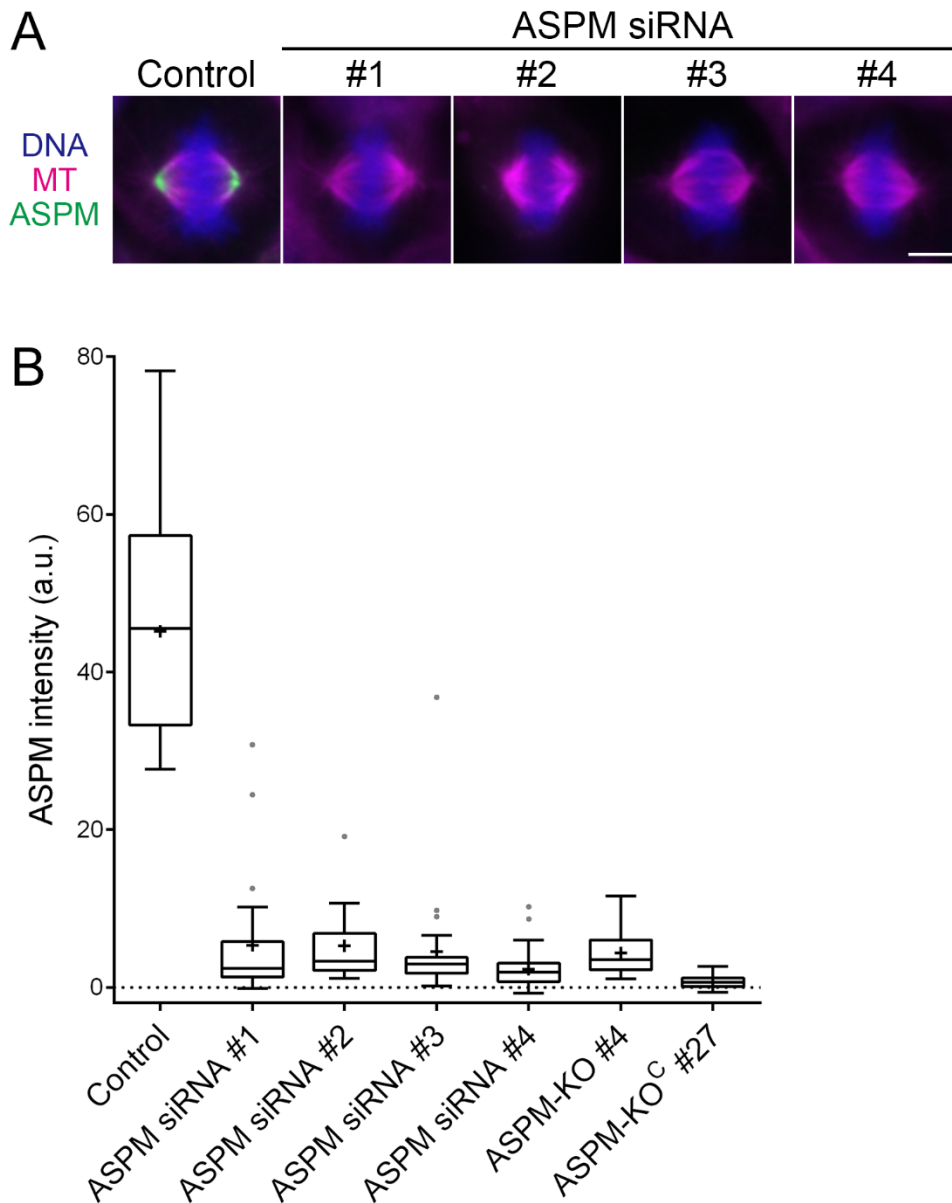


図15 RNAiによるASPMノックダウンはASPMノックアウト株と同じ表現型を示す

(A) 各siRNAによるノックダウンを行い、免疫染色を行った。全てのsiRNAでASPMのシグナルの減少が確認された。スケールバーは5 μ m。

(B) RNAiによるノックダウン効率を調べるため、免疫染色画像からASPMのシグナル強度を計測した。グラフは箱ひげ図で表しており、箱中央の線が中央値を、箱の上下が上部・下部四分位点を、ひげの端が最大値・最小値を、点が外れ値を示している。また、グラフ内の“+”は平均値を表している。実験は2度試行し、そのうち1回分のデータをグラフに表示した(n = 13-55)。この実験はElsa A. Tungadi氏と共同で行った。

(次ページへ続く)

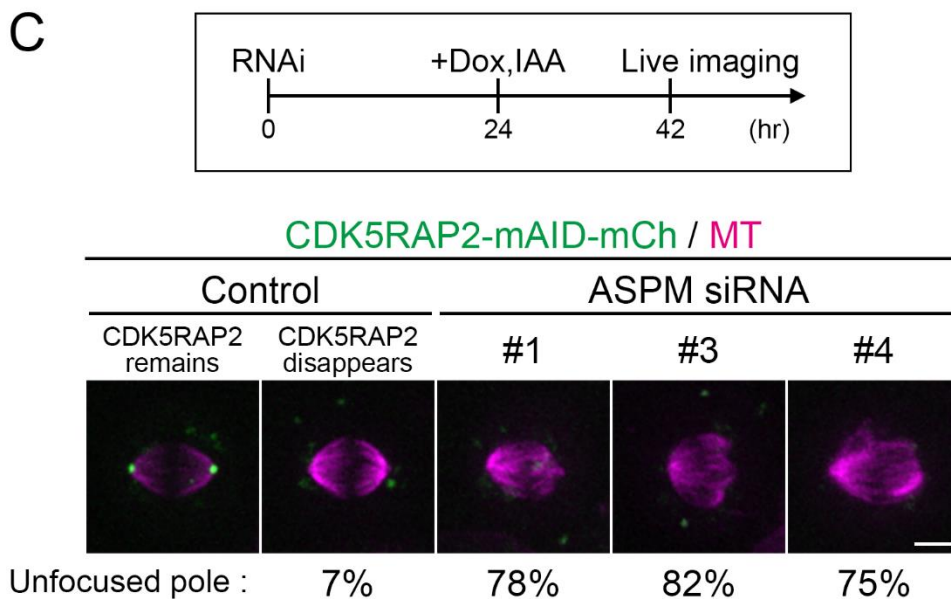


図15 続き

(C) CDK5RAP2-mAID-mCherry発現細胞に対して各RNAiを行った後、DoxとIAAの添加によるCDK5RAP2の分解を行った。コントロール細胞は、CDK5RAP2-mAID-mCherryのシグナルが残っているものと分解されているものをそれぞれ提示した。RNAiによるASPMのノックダウンとAIDシステムによるCDK5RAP2分解により、紡錘体の極収束異常が観察された。実験の時間経過は、箱の中に示した通りである。画像はz軸に沿って3 μm間隔で5枚ずつ取得しており、表示している画像は三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの(maximum projection)である。実験は2度試行し、そのうち1回分の計測結果を画像の下に表示した(n = 9-30)。スケールバーは5 μm。

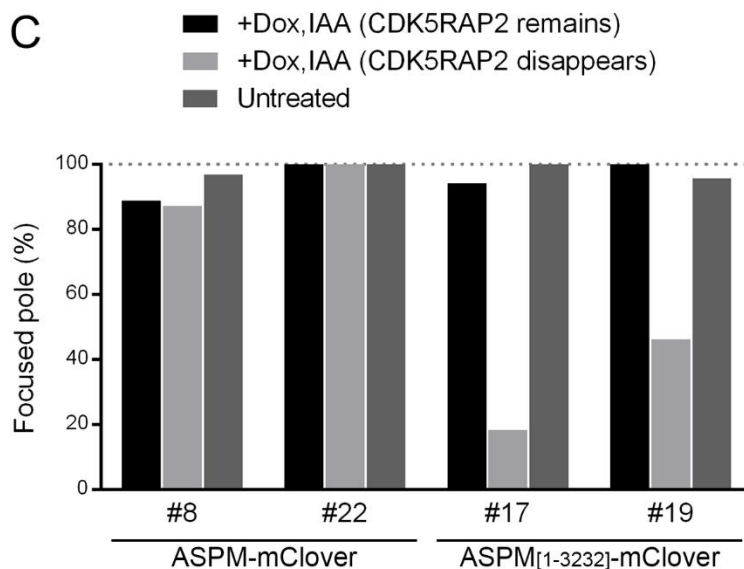
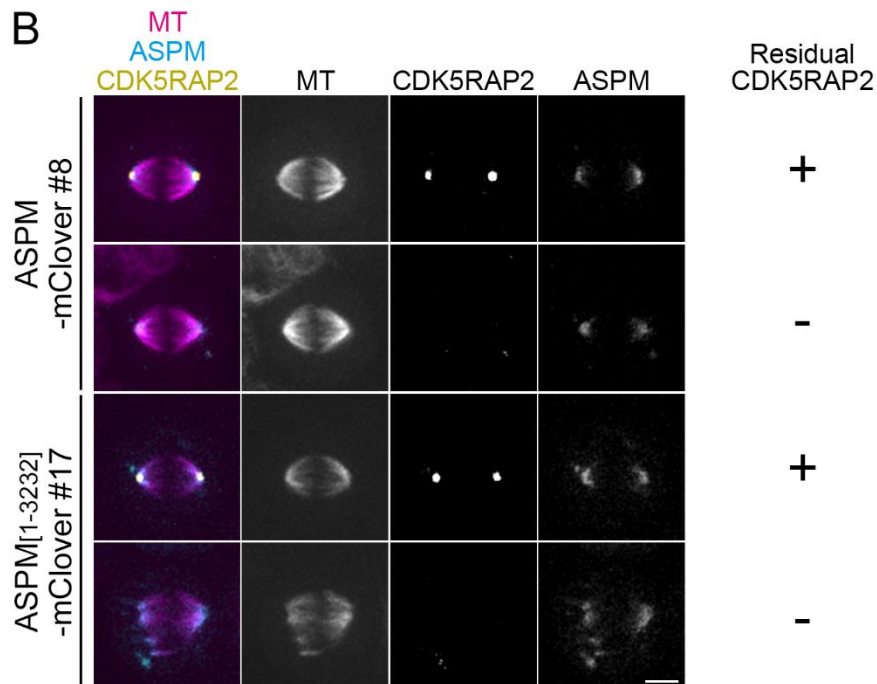
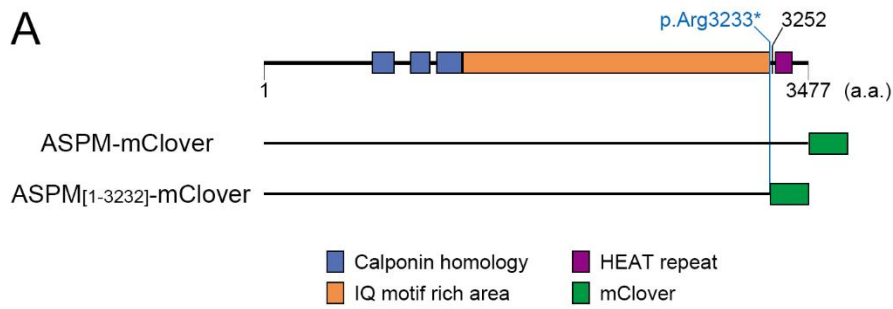


図16 機能低下型の小頭症突然変異はASPMの紡錘体極収束機能を損なう

(A) 小頭症の変異を導入した株で発現する部分欠失タンパク質の模式図。小頭症患者で同定された変異のうち、2番目に長い部分欠失断片を発現するホモ接合型変異を模倣するため、3232アミノ酸の後ろにmCloverを挿入した(Abdel-Hamid et al., 2016; Bond et al., 2003; Tan et al., 2014)。また、コントロールとして、カルボキシル末端にmCloverタグをつけた全長ASPMを利用した。なお、3252アミノ酸はカルボキシル末端に最も近いホモ接合型変異の挿入部位である(Bond et al., 2003)。(参照: 図17)

(次ページへ続く)

図16 続き

(B,C) CDK5RAP2非存在下で、ASPM変異が引き起こす紡錘体極収束異常を観察した。DoxとIAAの添加によってCDK5RAP2-mAID-mCherryが分解された細胞を“-”、分解されずに残った細胞を“+”として表示した。実験は、2つのASPM変異株(#17および#19)と、2つの全長ASPM発現株(#8および#22)で行った。なお、全長ASPM発現株はASPM変異株に対するコントロールである。各時点の画像はz軸に沿って3 μm 間隔で5枚ずつ取得しており、表示している画像は三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの(maximum projection)である。グラフとして表示したデータの測定数は、左から順に、n = 9, 47, 31 (全長ASPM発現株#8) / 12, 19, 33 (全長ASPM発現株#22) / 17, 38, 15 (ASPM変異株#17) / 6, 26, 23 (ASPM変異株#19)である。スケールバーは5 μm 。この実験はElsa A. Tungadi氏と共同で行った。(参照:動画11)

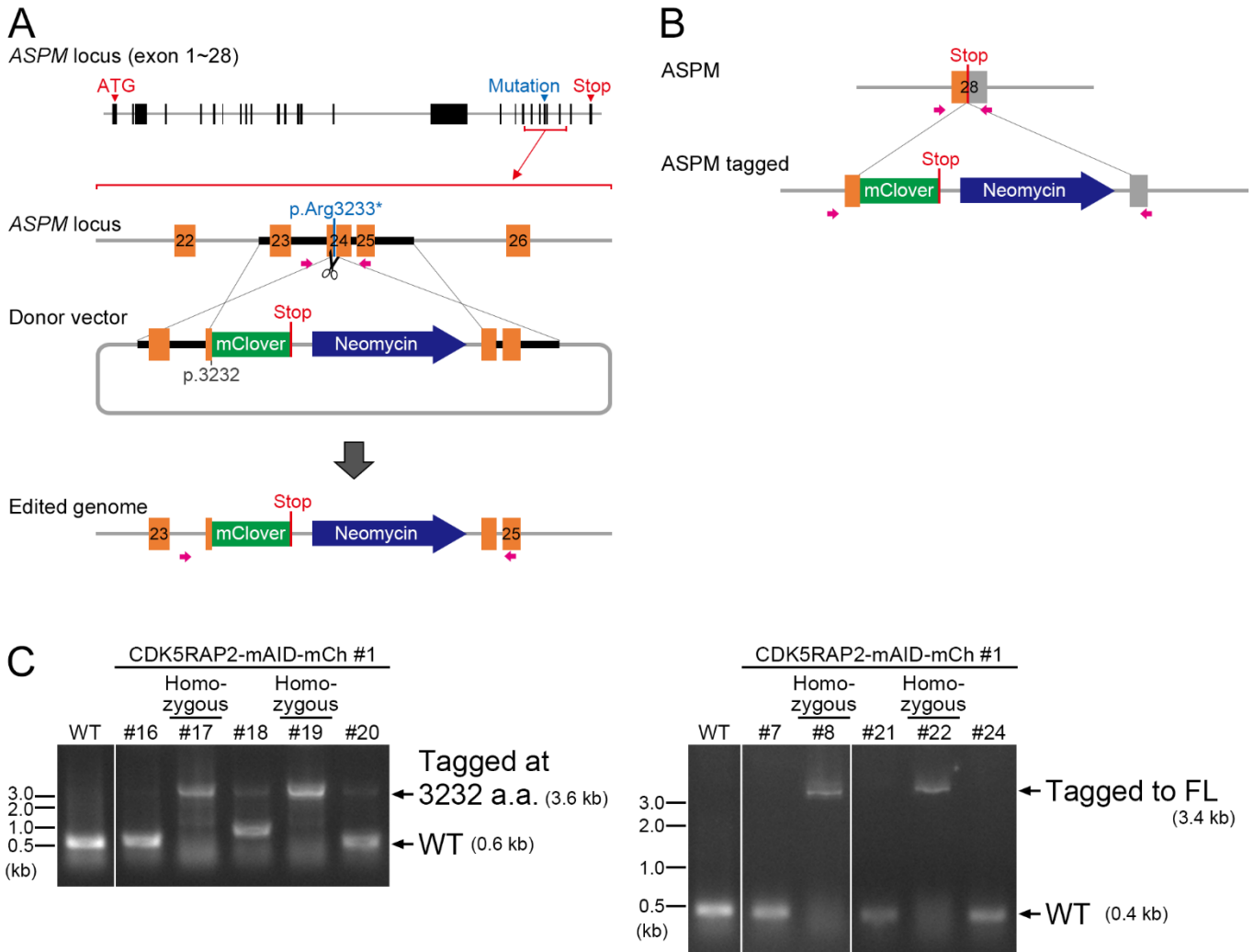


図17 mClover蛍光タグを持ったASPM変異株と全長ASPM発現株の作成

(A) ASPM変異株作成の模式図。小頭症患者で同定された変異のうち、カルボキシル末端に2番目に近いホモ接合型変異は、3233アミノ酸の終止変異である（通常はアルギニンに翻訳されるが、コドンの最初の塩基が変化し終止コドンが誘発される）。エキソン24にある変異部位にmCloverとネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、蛍光タグを持った部分欠失タンパク質を発現するASPM変異株を作成した。親株には、CDK5RAP2-mAID-mCherry株の#1（図13B）を使用した。

(B) ASPMタンパク質のカルボキシル末端へ挿入されたmCloverタグとハイグロマイシン耐性遺伝子の模式図。Aで作成したASPM変異株のコントロールとして使用するために作成した。親株には、CDK5RAP2-mAID-mCherry株の#1（図13B）を使用した。

(C) mCloverタグと薬剤耐性遺伝子が2対立遺伝子に挿入されていることを確認するため、取得したクローン株に対してPCRを行った。PCRプライマーは、AおよびBにマゼンダ色の矢印として示したものを使用した。なお、図16の実験に使用したクローン株（ASPM-mClover #8および#22と、ASPM[1-3232a.a.]-mClover #17および#19）は全て、PCRによって取得したDNA断片のシーケンス解析を行い、正しいゲノム編集が行われたことを確認した。

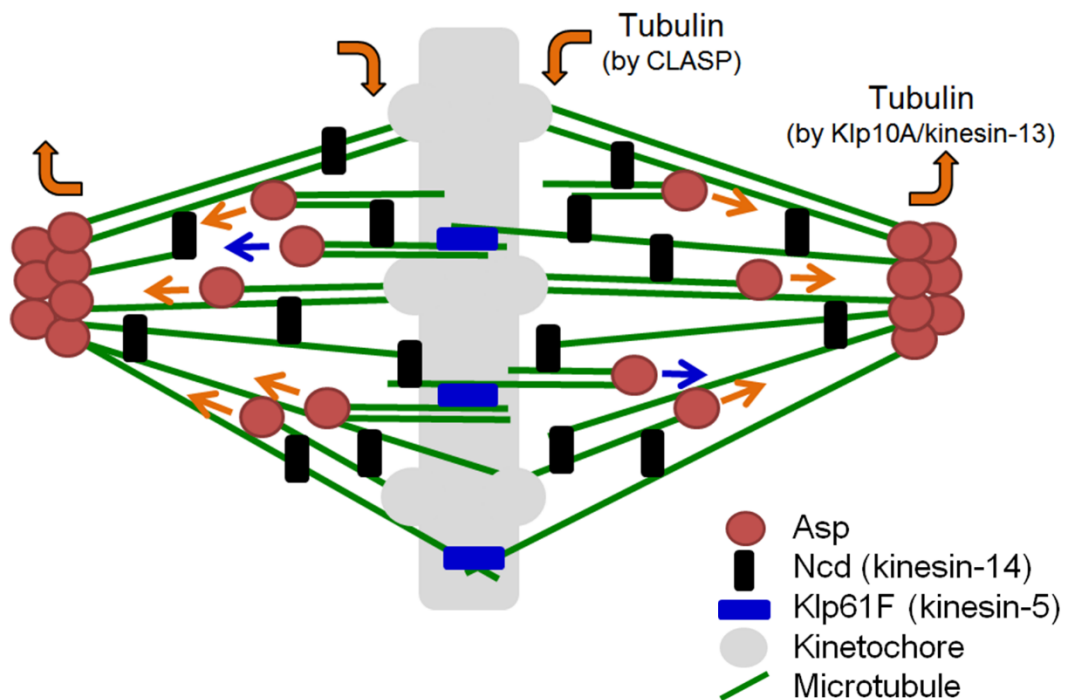


図18 ショウジョウバエAspによる紡錘体微小管のマイナス端収束モデル

Aspは、分裂期初期に紡錘体微小管のマイナス端へ結合し、それらを架橋する。一方Ncdは、紡錘体全体に渡って機能する動的な微小管架橋因子であり、極特異的に機能するわけではない(Goshima et al., 2005a; 実際、Ncd-GFPを光退色させた際の回復半減期は2.5秒である)。紡錘体微小管が極で形成されると、極領域に存在するAspによって即座に収束される。また、紡錘体内部でオーグミン依存的に形成された微小管は、マイナス端に付着したAspによって他の微小管と架橋され、微小管のフラックスに従って極へと運ばれる。つまり、Aspは紡錘体内部で形成された微小管の収束も保障しているのである。フラックスは、青色の矢印(キネシン5による微小管滑動)と橙色の矢印(CLASPとキネシン依存的な微小管のトレッドミル)で表している。なお、図中には記載していないが、中心体も微小管供給源として働くことでNcdやAspの機能を補助していると考えられる。

《表》

表 1 ショウジョウバエ S2 細胞の RNAi に使用したプライマー配列

| Gene | Primer sequences (5'-3') |
|--------------------------|---------------------------------|
| Control (pBluescript) | TAAATTGTAAGCGTTAATATTTTG |
| | AATTCGATATCAAGCTTATCGAT |
| Asp (exon) | CTTATTTACAAATTCCGCTCGC |
| | ACTTTCTCATTGAAAGCTTCGC |
| Asp (5'UTR)* | CGACGCTCTAATTTGTTTAATTTTTGTTTCG |
| | GGCGCTCATTGCAGGGAATGG |
| Asp (3'UTR)* | ACATGTTTTAGATTTAGGAAAATTC |
| | TTTGACTTTCAATTGTCTTTATTCTTC |

使用した dsRNA 配列は、末端に T7 プロモーター配列 (TAATACGACTCACTATAGGG) が付加されている。

*5'UTR と 3'UTR の配列を融合することで、UTR RNAi 用の dsRNA として使用した。

表 2 ショウジョウバエ S2 細胞の研究に使用したプラスミド

細胞株取得に使用

| lines | plasmid |
|----------------------------|---------|
| Asp Full-length | pAI26 |
| Asp ΔN_{1-500} | pAI30 |
| Asp ΔN_{1-1000} | pAI31 |
| Asp 574-972 a.a. | pAI83 |
| Asp $\Delta C_{1501-1954}$ | pAI29 |
| mCherry-Tubulin | pGG308 |

大腸菌でのタンパク質精製に使用

| protein | plasmid |
|------------------------------|---------|
| His-Asp [1-500 aa] | pAI2 |
| GST-Asp [574-972 aa]-GFP-His | pGG914 |

表 3 ヒト HCT116 細胞の RNAi に使用したプライマー配列

| siRNA | Sequences | Note |
|---------|------------------------|------------------------|
| ASPM -1 | UGCCAUGGUGCAACUUGCU | (Higgins et al., 2010) |
| ASPM -2 | GCACAUUAUGAAGGUCAAACUG | HSS138109 (Invitrogen) |
| | GACUGUGC | Toxic effect |
| ASPM -3 | GCGCUUUUAGGCUGCAACACGA | HSS138110 (Invitrogen) |
| | AACAGCGC | Shorter mitosis |
| ASPM -4 | GGAGAAAUUCUUGCAGCUUUCU | HSS138111 (Invitrogen) |
| | CUCUCUCC | |

表 4 CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集で使⽤した sgRNA 配列

| Gene | sgRNA | PAM |
|---------------------------|----------------------|-----|
| ASPM (N-terminus) | TGCCATGGCGAACCGGCGAG | TGG |
| ASPM (C-terminus) | CAAATGGTGATGGATACGCT | TGG |
| ASPM (mutation insertion) | CATTATGGAGAGGCTATTCT | TGG |
| CDK5RAP2 (C-terminus) | AAGAGACAGCGTGAGCTCGG | TGG |

表 5 ゲノム編集を確認するための PCR に使用したプライマー配列

| Gene | Primer sequences (5'-3') | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------|
| ASPM | TTGCGAGTTTATTGGGCTTG | Fig. 10A,11B |
| (N-terminus) | AGGGTTGTCTAGGGCCAG | Fig. 10A,11B |
| ASPM | TCTCCCACCTCTTTGAGC | Fig. 11B,17B |
| (C-terminus) | AATCATCTTATGACATATTAGTTTATTACATGC | Fig. 11B,17B |
| ASPM | TGGTCGATAAATGCTGTCC | Fig. 17A |
| (mutation insert) | AGAAATTGCTCCACTCTGG | Fig. 17A |
| CDK5RAP2 | GGTAAATATTTACTGACCAAAC | Fig. 13A |
| (C-terminus) | GGTGCCTGCCCCTGATC | Fig. 13A |
| Neomycin | CCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATC | Fig. 11B |

表 6 ヒト HCT 116 細胞の研究に使用したプラスミド

| lines | gRNA plasmid | Donor vector |
|-----------------------|--------------|--------------|
| ASPM-KO | pAI112 | pAI114 |
| ASPM-KO ^c | pAI119 | pAI118 |
| ASPM-mClover | pAI113 | pAI110 |
| ASPM[1-3232]-mClover | pAI121 | pAI120 |
| CDK5RAP2-mAID-mCherry | pTK478 | pTK472 |

| Plasmid | Vector information | Description |
|---------|--|--|
| pAI110 | pAI109, which contained each ~800-bp DNA sequence of the <i>ASPM</i> gene flanking the stop codon in exon 28. The vector of this plasmid was pCR2.1-TOPO. The sequences corresponding to sgRNA and PAM were altered to encode amino acids, and a BamHI site was inserted in front of the stop codon. | The BamHI fragment containing mClover and the neomycin-resistant gene were extracted from pMK277 (a gift from Dr M. Kanemaki (Natsume et al., 2016)), and inserted into the BamHI site of pAI109. |
| pAI112 | pX330 | The following two oligos containing 20-nt guide sequence were annealed and inserted into the BbsI site of pX330: CACCGtgccatggcgaaccggcgag (top) and AAACctcgccggttcgcatggcaC (bottom) |
| pAI113 | pX330 | The following two oligos containing 20-nt guide sequence were annealed and inserted into the BbsI site of pX330: CACCGcaaagtgtgatggatagcct (top) and AAACagcgtatccatcaccattgC (bottom) |
| pAI114 | pAI108, the donor vector of mClover-ASPM that contained mClover, the blasticidin-resistant gene, and each ~850-bp DNA sequence of the <i>ASPM</i> gene flanking the start codon in exon 1. The vector of this plasmid was pCR2.1-TOPO. | The ~850-bp DNA sequences after the start codon of the <i>ASPM</i> gene were amplified by genomic PCR, in which <i>Ascl</i> and <i>XhoI</i> sites were added. The neomycin-resistant gene that contained <i>Ascl</i> / <i>NotI</i> sites was purified from pAI110. These two fragments were inserted into the <i>NotI</i> / <i>XhoI</i> sites of pAI108, which contained the upstream sequences of the <i>ASPM</i> gene. The sequences corresponding to sgRNA, PAM, and the start codon were deleted (see Fig. 10A). |
| pAI118 | pAI114 | The ~800-bp DNA sequences of the <i>ASPM</i> gene that contained <i>Ascl</i> / <i>XhoI</i> sites and the <i>ASPM</i> 3' untranslated region (UTR) of exon 28 were obtained from pAI110 and inserted into the <i>Ascl</i> / <i>XhoI</i> sites of pAI114, which contained the <i>ASPM</i> 5' UTR of exon 1 and the neomycin-resistant gene. Note that the |

| | | |
|--------|--|--|
| | | sequences of sgRNAs, PAMs, and start/stop codons were not included in this plasmid (see Fig. 11B). |
| pAI119 | pAI112 | The XbaI fragment containing the U6 promoter, 20-nt guide sequence targeting the C-terminal region of ASPM, and gRNA scaffold were purified from pAI113 and inserted into the XbaI site of pAI112. |
| pAI120 | pCR2.1-TOPO | Four fragments were connected with In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech® Laboratories, Inc). (1, 2) Each ~750-bp DNA sequence of the <i>ASPM</i> gene flanking the mutation site in exon 24 (see Fig. 17A) was amplified by genomic PCR (note that the sequences of sgRNA, PAM, and the region between sgRNA and the mutation site were altered to encode amino acids). (3) The BamHI fragment containing mClover and the neomycin-resistant gene was purified from pAI110. (4) The KpnI/XhoI fragment was extracted from pCR2.1-TOPO. |
| pAI121 | pX330 | The following two oligo DNAs containing 20-nt guide sequence were annealed and inserted into the BbsI site of pX330: CACCGcattatggagaggctattct (top) and AAACagaatagcctctccataatgC (bottom) |
| pTK472 | pUC57-amp, ~400-bp DNA sequences containing the last exon of the <i>CDK5RAP2</i> gene (190,738–191,188: NC_000009) were synthesised. The STOP codon (tga) was mutated and replaced by (Gga GGA TCC) to insert a BamHI site. The sequences corresponding to sgRNA and PAM were deleted. | The BamHI fragment containing mAID-mCherry and the hygromycin-resistant gene was purified from pMK293 (a gift from Dr M. Kanemaki (Natsume et al., 2016)) and inserted into the BamHI site of the synthesised vector plasmid. |
| pTK478 | pX330 | The following two oligos containing 20-nt guide sequence were annealed and inserted into the BbsI site of pX330: CACCGaagagacagcgtgagctcgg (top) and AAACccgagctcacgctgtctcttC (bottom) |

《動画の説明》

動画 1

Asp RNAi 細胞と Ncd RNAi 細胞における紡錘体形態の経時観察

GFP-Tubulin 発現細胞に対して各 RNAi を行い、1 分ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。Asp 欠損細胞では紡錘体極の収束は起こらないが、Ncd 欠損細胞では核膜崩壊後に一過的な極収束が見られた。各時点の画像は、z 軸に沿って 1 μm 間隔で 6 枚ずつ取得しており、その三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの (maximum projection) を動画にした。0 分は核膜崩壊を示している。スケールバーは 5 μm 。

動画 2

Ncd RNAi 細胞における Asp-GFP の局在

Asp-GFP と mCherry-Tubulin を発現した細胞に対して各 RNAi を行い、2 分ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。Asp-GFP は、Ncd 欠損細胞でも微小管の収束点に局在していた。0 分は核膜崩壊を示している。スケールバーは 5 μm 。

動画 3

紡錘体における Asp-GFP の動態観察

Asp-GFP と mCherry-Tubulin を発現した細胞に対して各 RNAi を行い、4.8 秒ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。Asp-GFP は紡錘体内を極方向へ移動するが、オーグミンサブユニットである Dgt6 ノックダウンされた細胞では、紡錘体内の GFP シグナルがほとんど観察されなかった。スケールバーは 5 μm 。

動画 4

中心体を持たない紡錘体における Asp-GFP の動態観察

Asp-GFP と mCherry-Tubulin を発現した細胞に対して Cnn RNAi を行い、5 秒ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。時間は分と秒を表す。スケールバーは 5 μm 。

動画 5

オーグミン欠損細胞における Asp-GFP の極局在

Asp-GFP と mCherry-Tubulin を発現した細胞に対して Dgt6 RNAi (オーグミンノックダウン) を行い、4.8 秒ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。下の拡大図に矢尻で示すように、時折、点状の GFP シグナルが中心体よりも内側の領域で観察された。なお、この動画の細胞は動画 3 の右下と同じものであり、GFP のコントラストが低い状態で表示している。スケールバーは上が 5 μm 、下が 2 μm 。

動画 6

機能的な Asp を欠損した細胞における微小管マイナス端の動態観察

Asp Δ C-GFP(左)もしくは Asp(FL)-GFP(右)を mCherry-Tubulin と一緒に発現した細胞に対して内在性 Asp の RNAi を行い、4 秒ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。時間は分と秒を表す。スケールバーは 5 μm 。

動画 7

機能的な Asp に依存した紡錘体内微小管の収束

Asp Δ C-GFP(左)もしくは Asp(FL)-GFP(右)を mCherry-Tubulin と一緒に発現した細胞に対して内在性 Asp の RNAi を行い、4 秒ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。矢尻は最も外側に観察される微小管のマイナス端を、矢印は極の場所を示している。時間は分と秒を表す。スケールバーは 2 μm 。

動画 8

ASPM ノックアウト細胞における紡錘体形態と有糸分裂進行の経時観察

SiR-Tubulin 染色によって微小管を可視化し、3 分ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。各時点の画像は、z 軸に沿って 3 μm 間隔で 5 枚ずつ取得しており、その三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの (maximum projection) を動画にした。0 分は核膜崩壊を示している。「不完全な」ASPM ノックアウト株 (KO #4 および KO #23) と「完全な」ASPM ノックアウト株 (KO^c #25 および KO^c #27) の代表例を提示した。

動画 9

ASPM ノックアウト細胞で HSET 阻害剤が引き起こす紡錘体極の異常分裂

SiR-Tubulin 染色によって微小管を可視化し、3 分ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。各時点の画像は、z 軸に沿って 3 μm 間隔で 5 枚ずつ取得しており、その三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの (maximum projection) を動画にした。0 分は核膜崩壊を示している。ASPM ノックアウト株は、KO #4 および KO #23 を使用した。

動画 10

ASPM ノックアウト細胞で CDK5RAP2 の分解が引き起こす紡錘体極収束と有糸分裂進行の異常

各細胞株を 3 分ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。緑色は CDK5RAP2-mAID-mCherry を、マゼンダ色は SiR-Tubulin によって染色された微小管を表す。各時点の画像は、z 軸に沿って 3 μm 間隔で 5 枚ずつ取得しており、その三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの (maximum projection) を動画にした。0 分は核膜崩壊を示している。

動画 11

ASPM の小頭症変異株が CDK5RAP2 の非存在下で引き起こす紡錘体極収束と有糸分裂進行の異常

各細胞株を 5 分ごとにスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮影した。黄色は CDK5RAP2-mAID-mCherry を、マゼンダ色は SiR-Tubulin によって染色された微小管を、シアン色は ASPM-mClover (全長、および、小頭症変異を模倣する部分欠失断片) を表す。各時点の画像は、z 軸に沿って 3 μm 間隔で 5 枚ずつ取得しており、その三次元データを最大蛍光強度で投影し平面化したもの (maximum projection) を動画にした。0 分は核膜崩壊を示している。

《参考文献》

- Abdel-Hamid, M.S., M.F. Ismail, H.A. Darwish, L.K. Effat, M.S. Zaki, and G.M. Abdel-Salam. 2016. Molecular and phenotypic spectrum of ASPM-related primary microcephaly: Identification of eight novel mutations. *Am J Med Genet A*. 170:2133-2140.
- Aguirre-Portoles, C., A.W. Bird, A. Hyman, M. Canamero, I. Perez de Castro, and M. Malumbres. 2012. Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. *Cancer Res*. 72:1518-1528.
- Basto, R., J. Lau, T. Vinogradova, A. Gardiol, C.G. Woods, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2006. Flies without centrioles. *Cell*. 125:1375-1386.
- Baumbach, J., Z.A. Novak, J.W. Raff, and A. Wainman. 2015. Dissecting the function and assembly of acentriolar microtubule organizing centers in *Drosophila* cells in vivo. *PLoS Genet*. 11:e1005261.
- Bettencourt-Dias, M., and G. Goshima. 2009. RNAi in *Drosophila* S2 cells as a tool for studying cell cycle progression. *Methods Mol Biol*. 545:39-62.
- Bond, J., E. Roberts, G.H. Mochida, D.J. Hampshire, S. Scott, J.M. Askham, K. Springell, M. Mahadevan, Y.J. Crow, A.F. Markham, C.A. Walsh, and C.G. Woods. 2002. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nature genetics*. 32:316-320.
- Bond, J., E. Roberts, K. Springell, S.B. Lizarraga, S. Scott, J. Higgins, D.J. Hampshire, E.E. Morrison, G.F. Leal, E.O. Silva, S.M. Costa, D. Baralle, M. Raponi, G. Karbani, Y. Rashid, H. Jafri, C. Bennett, P. Corry, C.A. Walsh, and C.G. Woods. 2005. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nature genetics*. 37:353-355.
- Bond, J., S. Scott, D.J. Hampshire, K. Springell, P. Corry, M.J. Abramowicz, G.H. Mochida, R.C. Hennekam, E.R. Maher, J.P. Fryns, A. Alswaid, H. Jafri, Y. Rashid, A. Mubaidin, C.A. Walsh, E. Roberts, and C.G. Woods. 2003. Protein-truncating mutations in ASPM cause variable reduction in brain size. *Am J Hum Genet*. 73:1170-1177.
- Brattain, M.G., W.D. Fine, F.M. Khaled, J. Thompson, and D.E. Brattain. 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res*. 41:1751-1756.
- Burbank, K.S., A.C. Groen, Z.E. Perlman, D.S. Fisher, and T.J. Mitchison. 2006. A new method reveals microtubule minus ends throughout the meiotic spindle. *The Journal of cell biology*. 175:369-375.
- Capalbo, L., P.P. D'Avino, V. Archambault, and D.M. Glover. 2011. Rab5 GTPase controls chromosome alignment through Lamin disassembly and relocation of the NuMA-like protein Mud to the poles during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:17343-17348.
- Castillo, A., and M.J. Justice. 2007. The kinesin related motor protein, Eg5, is essential for maintenance of pre-implantation embryogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*.

357:694-699.

- Chavali, P.L., G. Chandrasekaran, A.R. Barr, P. Tatrai, C. Taylor, E.K. Papachristou, C.G. Woods, S. Chavali, and F. Gergely. 2016. A CEP215-HSET complex links centrosomes with spindle poles and drives centrosome clustering in cancer. *Nat Commun.* 7:11005.
- Choi, Y.K., P. Liu, S.K. Sze, C. Dai, and R.Z. Qi. 2010. CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the gamma-tubulin ring complex. *The Journal of cell biology.* 191:1089-1095.
- Cong, L., F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339:819-823.
- do Carmo Avides, M., and D.M. Glover. 1999. Abnormal spindle protein, Asp, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing centers. *Science.* 283:1733-1735.
- Endow, S.A., R. Chandra, D.J. Komma, A.H. Yamamoto, and E.D. Salmon. 1994. Mutants of the *Drosophila ncd* microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. *Journal of cell science.* 107 (Pt 4):859-867.
- Faheem, M., M.I. Naseer, M. Rasool, A.G. Chaudhary, T.A. Kumosani, A.M. Ilyas, P. Pushparaj, F. Ahmed, H.A. Algahtani, M.H. Al-Qahtani, and H. Saleh Jamal. 2015. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics.* 8 Suppl 1:S4.
- Feng, Y., and C.A. Walsh. 2004. Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron.* 44:279-293.
- Fish, J.L., C. Dehay, H. Kennedy, and W.B. Huttner. 2008. Making bigger brains-the evolution of neural-progenitor-cell division. *Journal of cell science.* 121:2783-2793.
- Fish, J.L., Y. Kosodo, W. Enard, S. Paabo, and W.B. Huttner. 2006. Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103:10438-10443.
- Fong, K.W., Y.K. Choi, J.B. Rattner, and R.Z. Qi. 2008. CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex. *Molecular biology of the cell.* 19:115-125.
- Fujimori, A., K. Itoh, S. Goto, H. Hirakawa, B. Wang, T. Kokubo, S. Kito, S. Tsukamoto, and S. Fushiki. 2014. Disruption of Aspm causes microcephaly with abnormal neuronal differentiation. *Brain Dev.* 36:661-669.
- Gaglio, T., A. Saredi, J.B. Bingham, M.J. Hasbani, S.R. Gill, T.A. Schroer, and D.A. Compton. 1996. Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. *The Journal of cell biology.* 135:399-414.
- Gai, M., F.T. Bianchi, C. Vagnoni, F. Verni, S. Bonaccorsi, S. Pasquero, G.E. Berto, F. Sgro, A.M. Chiotto, L. Annaratone, A. Sapino, A. Bergo, N. Landsberger, J. Bond, W.B. Huttner, and F. Di Cunto. 2016. ASPM and CITK regulate spindle orientation by affecting the dynamics of astral microtubules. *EMBO reports.* 17:1396-1409.

- Goshima, G. 2011. Identification of a TPX2-like microtubule-associated protein in *Drosophila*. *PLoS one*. 6:e28120.
- Goshima, G., M. Mayer, N. Zhang, N. Stuurman, and R.D. Vale. 2008. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *The Journal of cell biology*. 181:421-429.
- Goshima, G., F. Nedelec, and R.D. Vale. 2005a. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *The Journal of cell biology*. 171:229-240.
- Goshima, G., and J.M. Scholey. 2010. Control of mitotic spindle length. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 26:21-57.
- Goshima, G., and R.D. Vale. 2003. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *The Journal of cell biology*. 162:1003-1016.
- Goshima, G., and R.D. Vale. 2005. Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in *Drosophila* S2 cells. *Molecular biology of the cell*. 16:3896-3907.
- Goshima, G., R. Wollman, S.S. Goodwin, N. Zhang, J.M. Scholey, R.D. Vale, and N. Stuurman. 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science*. 316:417-421.
- Goshima, G., R. Wollman, N. Stuurman, J.M. Scholey, and R.D. Vale. 2005b. Length control of the metaphase spindle. *Current biology : CB*. 15:1979-1988.
- Hallen, M.A., J. Ho, C.D. Yankel, and S.A. Endow. 2008. Fluorescence recovery kinetic analysis of gamma-tubulin binding to the mitotic spindle. *Biophys J*. 95:3048-3058.
- Hatsumi, M., and S.A. Endow. 1992a. The *Drosophila* *ncd* microtubule motor protein is spindle-associated in meiotic and mitotic cells. *Journal of cell science*. 103 (Pt 4):1013-1020.
- Hatsumi, M., and S.A. Endow. 1992b. Mutants of the microtubule motor protein, nonclaret disjunctional, affect spindle structure and chromosome movement in meiosis and mitosis. *Journal of cell science*. 101 (Pt 3):547-559.
- Heald, R., R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*. 382:420-425.
- Heald, R., R. Tournebize, A. Habermann, E. Karsenti, and A. Hyman. 1997. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *The Journal of cell biology*. 138:615-628.
- Higgins, J., C. Midgley, A.M. Bergh, S.M. Bell, J.M. Askham, E. Roberts, R.K. Binns, S.M. Sharif, C. Bennett, D.M. Glover, C.G. Woods, E.E. Morrison, and J. Bond. 2010. Human ASPM participates in spindle organisation, spindle orientation and cytokinesis. *BMC cell biology*. 11:85.
- Hirokawa, N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 279:519-526.
- Hsia, K.C., E.M. Wilson-Kubalek, A. Dottore, Q. Hao, K.L. Tsai, S. Forth, Y. Shimamoto, R.A. Milligan,

- and T.M. Kapoor. 2014. Reconstitution of the augmin complex provides insights into its architecture and function. *Nature cell biology*. 16:852-863.
- Imai, F., S. Hirai, K. Akimoto, H. Koyama, T. Miyata, M. Ogawa, S. Noguchi, T. Sasaoka, T. Noda, and S. Ohno. 2006. Inactivation of aPKC λ results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development*. 133:1735-1744.
- Insolera, R., H. Bazzi, W. Shao, K.V. Anderson, and S.H. Shi. 2014. Cortical neurogenesis in the absence of centrioles. *Nature neuroscience*. 17:1528-1535.
- Kamasaki, T., E. O'Toole, S. Kita, M. Osumi, J. Usukura, J.R. McIntosh, and G. Goshima. 2013. Augmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in the spindle. *The Journal of cell biology*. 202:25-33.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, B.R. Oakley, and C.L. Rieder. 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Current biology : CB*. 10:59-67.
- Khodjakov, A., and T. Kapoor. 2005. Microtubule flux: what is it good for? *Current biology : CB*. 15:R966-968.
- Konno, D., G. Shioi, A. Shitamukai, A. Mori, H. Kiyonari, T. Miyata, and F. Matsuzaki. 2008. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nature cell biology*. 10:93-101.
- Kouprina, N., A. Pavlicek, N.K. Collins, M. Nakano, V.N. Noskov, J. Ohzeki, G.H. Mochida, J.I. Risinger, P. Goldsmith, M. Gunsior, G. Solomon, W. Gersch, J.H. Kim, J.C. Barrett, C.A. Walsh, J. Jurka, H. Masumoto, and V. Larionov. 2005. The microcephaly ASPM gene is expressed in proliferating tissues and encodes for a mitotic spindle protein. *Hum Mol Genet*. 14:2155-2165.
- Kubota, T., K. Nishimura, M.T. Kanemaki, and A.D. Donaldson. 2013. The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol Cell*. 50:273-280.
- Laycock, J.E., M.S. Savoian, and D.M. Glover. 2006. Antagonistic activities of Klp10A and Orbit regulate spindle length, bipolarity and function in vivo. *Journal of cell science*. 119:2354-2361.
- Lecland, N., and J. Luders. 2014. The dynamics of microtubule minus ends in the human mitotic spindle. *Nature cell biology*. 16:770-778.
- Li, K., and T.C. Kaufman. 1996. The homeotic target gene centrosomin encodes an essential centrosomal component. *Cell*. 85:585-596.
- Lizarraga, S.B., S.P. Margossian, M.H. Harris, D.R. Campagna, A.P. Han, S. Blevins, R. Mudbhary, J.E. Barker, C.A. Walsh, and M.D. Fleming. 2010. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development*. 137:1907-1917.
- Mahoney, N.M., G. Goshima, A.D. Douglass, and R.D. Vale. 2006. Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Current biology : CB*. 16:564-569.
- Maiato, H., A. Khodjakov, and C.L. Rieder. 2005. Drosophila CLASP is required for the incorporation of

- microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres. *Nature cell biology*. 7:42-47.
- Maiato, H., and E. Logarinho. 2014. Mitotic spindle multipolarity without centrosome amplification. *Nature cell biology*. 16:386-394.
- Maiato, H., C.L. Rieder, and A. Khodjakov. 2004. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *The Journal of cell biology*. 167:831-840.
- Manning, A.L., and D.A. Compton. 2007. Mechanisms of spindle-pole organization are influenced by kinetochore activity in mammalian cells. *Current biology : CB*. 17:260-265.
- Mastrorarde, D.N., K.L. McDonald, R. Ding, and J.R. McIntosh. 1993. Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *The Journal of cell biology*. 123:1475-1489.
- Matthies, H.J., H.B. McDonald, L.S. Goldstein, and W.E. Theurkauf. 1996. Anastral meiotic spindle morphogenesis: role of the non-claret disjunctional kinesin-like protein. *The Journal of cell biology*. 134:455-464.
- McDonald, H.B., R.J. Stewart, and L.S. Goldstein. 1990. The kinesin-like ncd protein of *Drosophila* is a minus end-directed microtubule motor. *Cell*. 63:1159-1165.
- McIntosh, J.R., and T. Hays. 2016. A Brief History of Research on Mitotic Mechanisms. *Biology (Basel)*. 5.
- Megraw, T.L., L.R. Kao, and T.C. Kaufman. 2001. Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Current biology : CB*. 11:116-120.
- Megraw, T.L., J.T. Sharkey, and R.S. Nowakowski. 2011. Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes. *Trends Cell Biol*. 21:470-480.
- Merdes, A., and D.W. Cleveland. 1997. Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *The Journal of cell biology*. 138:953-956.
- Merdes, A., R. Heald, K. Samejima, W.C. Earnshaw, and D.W. Cleveland. 2000. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *The Journal of cell biology*. 149:851-862.
- Merdes, A., K. Ramyar, J.D. Vechio, and D.W. Cleveland. 1996. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell*. 87:447-458.
- Mitchison, T., L. Evans, E. Schulze, and M. Kirschner. 1986. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell*. 45:515-527.
- Morales-Mulia, S., and J.M. Scholey. 2005. Spindle pole organization in *Drosophila* S2 cells by dynein, abnormal spindle protein (Asp), and KLP10A. *Molecular biology of the cell*. 16:3176-3186.
- Mountain, V., C. Simerly, L. Howard, A. Ando, G. Schatten, and D.A. Compton. 1999. The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *The Journal of cell biology*. 147:351-366.
- Moutinho-Pereira, S., N. Stuurman, O. Afonso, M. Hornsveld, P. Aguiar, G. Goshima, R.D. Vale, and H. Maiato. 2013. Genes involved in centrosome-independent mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

110:19808-19813.

- Natsume, T., T. Kiyomitsu, Y. Saga, and M.T. Kanemaki. 2016. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. *Cell Rep.* 15:210-218.
- Nicholas, A.K., E.A. Swanson, J.J. Cox, G. Karbani, S. Malik, K. Springell, D. Hampshire, M. Ahmed, J. Bond, D. Di Benedetto, M. Fichera, C. Romano, W.B. Dobyns, and C.G. Woods. 2009. The molecular landscape of ASPM mutations in primary microcephaly. *J Med Genet.* 46:249-253.
- Paramasivam, M., Y.J. Chang, and J.J. LoTurco. 2007. ASPM and citron kinase co-localize to the midbody ring during cytokinesis. *Cell Cycle.* 6:1605-1612.
- Pulvers, J.N., J. Bryk, J.L. Fish, M. Wilsch-Brauninger, Y. Arai, D. Schreier, R. Naumann, J. Helppi, B. Habermann, J. Vogt, R. Nitsch, A. Toth, W. Enard, S. Paabo, and W.B. Huttner. 2010. Mutations in mouse *Aspm* (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107:16595-16600.
- Radulescu, A.E., and D.W. Cleveland. 2010. NuMA after 30 years: the matrix revisited. *Trends Cell Biol.* 20:214-222.
- Ran, F.A., P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, and F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 8:2281-2308.
- Ripoll, P., S. Pimpinelli, M.M. Valdivia, and J. Avila. 1985. A cell division mutant of *Drosophila* with a functionally abnormal spindle. *Cell.* 41:907-912.
- Rogers, G.C., S.L. Rogers, T.A. Schwimmer, S.C. Ems-McClung, C.E. Walczak, R.D. Vale, J.M. Scholey, and D.J. Sharp. 2004. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature.* 427:364-370.
- Rogers, G.C., S.L. Rogers, and D.J. Sharp. 2005. Spindle microtubules in flux. *Journal of cell science.* 118:1105-1116.
- Rogers, S.L., G.C. Rogers, D.J. Sharp, and R.D. Vale. 2002. *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *The Journal of cell biology.* 158:873-884.
- Rujano, M.A., L. Sanchez-Pulido, C. Penner, G. le Dez, and R. Basto. 2013. The microcephaly protein *Asp* regulates neuroepithelium morphogenesis by controlling the spatial distribution of myosin II. *Nature cell biology.* 15:1294-1306.
- Saunders, R.D., M.C. Avides, T. Howard, C. Gonzalez, and D.M. Glover. 1997. The *Drosophila* gene abnormal spindle encodes a novel microtubule-associated protein that associates with the polar regions of the mitotic spindle. *The Journal of cell biology.* 137:881-890.
- Schoborg, T., A.L. Zajac, C.J. Fagerstrom, R.X. Guillen, and N.M. Rusan. 2015. An *Asp*-CaM complex is required for centrosome-pole cohesion and centrosome inheritance in neural stem cells. *The Journal of cell biology.* 211:987-998.

- Seldin, L., A. Muroyama, and T. Lechler. 2016. NuMA-microtubule interactions are critical for spindle orientation and the morphogenesis of diverse epidermal structures. *Elife*. 5.
- Silk, A.D., A.J. Holland, and D.W. Cleveland. 2009. Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *The Journal of cell biology*. 184:677-690.
- Tan, C.A., D. del Gaudio, M.A. Dempsey, K. Arndt, S. Botes, A. Reeder, and S. Das. 2014. Analysis of ASPM in an ethnically diverse cohort of 400 patient samples: perspectives of the molecular diagnostic laboratory. *Clinical genetics*. 85:353-358.
- Thornton, G.K., and C.G. Woods. 2009. Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? *Trends Genet*. 25:501-510.
- Uehara, R., and G. Goshima. 2010. 分裂期スピンドル形成における微小管生成機構. *細胞工学*. 29:885-889.
- Uehara, R., R.S. Nozawa, A. Tomioka, S. Petry, R.D. Vale, C. Obuse, and G. Goshima. 2009. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:6998-7003.
- Vale, R.D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 112:467-480.
- van der Voet, M., C.W. Berends, A. Perreault, T. Nguyen-Ngoc, P. Gonczy, M. Vidal, M. Boxem, and S. van den Heuvel. 2009. NuMA-related LIN-5, ASPM-1, calmodulin and dynein promote meiotic spindle rotation independently of cortical LIN-5/GPR/Galpha. *Nature cell biology*. 11:269-277.
- Wadsworth, P., and A. Khodjakov. 2004. E pluribus unum: towards a universal mechanism for spindle assembly. *Trends Cell Biol*. 14:413-419.
- Wakefield, J.G., S. Bonaccorsi, and M. Gatti. 2001. The drosophila protein asp is involved in microtubule organization during spindle formation and cytokinesis. *The Journal of cell biology*. 153:637-648.
- Walczak, C.E., and R. Heald. 2008. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int Rev Cytol*. 265:111-158.
- Walczak, C.E., I. Vernos, T.J. Mitchison, E. Karsenti, and R. Heald. 1998. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Current biology : CB*. 8:903-913.
- Waldman, T., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*. 55:5187-5190.
- Walker, R.A., E.D. Salmon, and S.A. Endow. 1990. The Drosophila claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule. *Nature*. 347:780-782.
- Watanabe, S., G. Shioi, Y. Furuta, and G. Goshima. 2016. Intra-spindle Microtubule Assembly Regulates Clustering of Microtubule-Organizing Centers during Early Mouse Development. *Cell Rep*. 15:54-60.
- Watts, C.A., F.M. Richards, A. Bender, P.J. Bond, O. Korb, O. Kern, M. Riddick, P. Owen, R.M. Myers, J.

- Raff, F. Gergely, D.I. Jodrell, and S.V. Ley. 2013. Design, synthesis, and biological evaluation of an allosteric inhibitor of HSET that targets cancer cells with supernumerary centrosomes. *Chem Biol.* 20:1399-1410.
- Wong, Y.L., J.V. Anzola, R.L. Davis, M. Yoon, A. Motamedi, A. Kroll, C.P. Seo, J.E. Hsia, S.K. Kim, J.W. Mitchell, B.J. Mitchell, A. Desai, T.C. Gahman, A.K. Shiau, and K. Oegema. 2015. Cell biology. Reversible centriole depletion with an inhibitor of Polo-like kinase 4. *Science.* 348:1155-1160.
- Wu, G., Y.T. Lin, R. Wei, Y. Chen, Z. Shan, and W.H. Lee. 2008. Hice1, a novel microtubule-associated protein required for maintenance of spindle integrity and chromosomal stability in human cells. *Molecular and cellular biology.* 28:3652-3662.
- Yang, G., B.R. Houghtaling, J. Gaetz, J.Z. Liu, G. Danuser, and T.M. Kapoor. 2007. Architectural dynamics of the meiotic spindle revealed by single-fluorophore imaging. *Nature cell biology.* 9:1233-1242.
- Zhang, C.Z., A. Spektor, H. Cornils, J.M. Francis, E.K. Jackson, S. Liu, M. Meyerson, and D. Pellman. 2015. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature.* 522:179-184.
- Zhong, X., L. Liu, A. Zhao, G.P. Pfeifer, and X. Xu. 2005. The abnormal spindle-like, microcephaly-associated (ASPM) gene encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle.* 4:1227-1229.

《謝辞》

本研究を進めるにあたり、日々ご指導いただきました五島剛太教授に深く御礼申し上げます。実験方法や研究の進め方、研究生生活における心構えに至るまで、非常に多くのことを教えていただきました。また、研究を進めやすいようにお気遣いしていただいたおかげで、6年間、大変充実した研究生生活を過ごすことができました。五島研究室で過ごした日々は、私にとってかけがえのない財産です。心より感謝いたします。

清光智美博士には、ヒト培養細胞の実験に関する指導をしていただいただけでなく、本論文の作成に関しても多くのアドバイスをいただきました。清光博士のご助力なしには、ここまで研究を進めることができなかつたと思っております。心より感謝いたします。

上原亮太博士には、プラスミドの作り方や試薬、抗体についての知識など、実験の基礎を教えていただきました。加えて、ショウジョウバエ S2 細胞を観察する際のアドバイスや、研究の進め方に関する助言をいただきました。釜崎とも子博士には、Asp と Ncd の関係について重要なお意見をいただきました。また、丁寧なデータ解析をされている姿を身近で見て、研究者の在り方を学ばせていただきました。幸節健博士には、研究生生活が充実したものとなるよう、常々気にかけていただきました。一般的な知識に留まらず、植物の専門家として、動物細胞のみを扱っていると不足しがちな知識も数多く教えていただきました。渡邊定則博士には、培養細胞やマウスに関することから分野外の研究に至るまで、様々な知識を教えていただきました。また、日々の議論を通して、豊富な知識に基づいた数々のアドバイスをいただきました。皆様に心より感謝いたします。

李文静博士には、S2 細胞を使った実験の方法や注意点、研究を進める上で必要な知識など、多くのことを教えていただきました。また、日々研究に邁進する姿から、研究生生活に対する姿勢を学ばせていただきました。三木智博博士には、図を作る上でのアドバイスや作成のテクニックなどを教えていただきました。また、日々の議論を通じて、データの解析法や数多くの意見を提示していただきました。中岡由貴博士には、抗体の作成方法について教えていただきました。研究に関する些細な疑問点にも快く応じていただいただけでなく、計画的に研究を進める姿から多くの刺激を受けました。皆様の後輩になれたこと、本当に嬉しく思います。日々の雑談も楽しかったです。ありがとうございました。

森脇崇史さんには、S2 細胞を扱う同期として大変お世話になりました。実験に関して議論を行い、建設的な意見を与えてくれる同期がいることは、研究を進める上でいつも心強く感じていました。江塚智哉さん、山田萌恵さんからは、知識の多さ、仕事への取り組みなど、後輩でありながら学ぶことが数多くありました。また、多くの時間を共有し、たくさんの議論と雑談をしてもらったおかげで、最後まで研究室の生活を楽しむことができました。Elsa Amelia Tungadi さんとは、共同研究者として一緒に研究を進める機会を得ることができました。拙い指導しかできなかったにもかかわらず、重要なデータをしっかりと出してくれたこと、感謝いたします。また、

五島研究室に所属されていた全ての皆さまに御礼申し上げます。特に、稲葉理絵さん、仁科桃子さんには、事務手続きや培地の作成、プラスミドの作成など、多大なご支援をいただきました。研究に集中できる環境を整えていただいたおかげで、6年間の研究生活を快適に過ごすことができました。ありがとうございました。

染色体生物学グループの西山朋子博士には、実験全般に関するアドバイスを数多くいただきました。近くで研究を行うことができたことは、大変幸運だったと感じています。また、本研究で行った実験の一部は、西山研究室の顕微鏡を使用させていただきました。心より感謝いたします。

トランスフォーマティブ生命分子研究所 ライブイメージングセンターの佐藤良勝博士には、顕微鏡使用方法の指導や撮影条件の設定をしていただきました。また、創薬科学研究科の廣明秀一教授と廣明研究室の皆さまには、Asp断片の精製につながる大変有益な情報を教えていただきました。皆様に心より感謝いたします。

最後に、ここまで支援してくれた家族に感謝いたします。私の研究をやりたいという気持ちを尊重し、暖かく見守ってくれたおかげで、非常に幸せな日々を送ることができました。本当にありがとうございました。

2017年3月 伊藤 亜実