

主論文

微小管プラス端動態の試験管内再構成

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

森脇崇史

目次

要旨	1
序論	3
結果	9
考察	15
材料と手法	19
図	26
表	44
参考文献	48
謝辞	56

要旨

微小管はチューブリンタンパク質で構成された繊維状の細胞内ポリマーである。動的に重合・脱重合する微小管は細胞分裂期の紡錘体形成や細胞極性など、真核生物の様々な細胞内現象に重要な役割を担っている。それらの役割においては、伸長と短縮を繰り返す動的な微小管が必須であることが知られている。生体内において、動的な微小管を形成するには複数の微小管関連タンパク質による制御が必要であり、環境や細胞周期などにより時空間的な制御があることも知られている。基本的な動態として、他の細胞内構造に結合していない細胞質中の微小管は伸長、短縮、停止（ポーズ）という状態を繰り返している。しかし、これまで、既知の微小管関連因子を用いた試験管内 (*in vitro*) 反応において3状態をランダムに遷移する微小管重合・脱重合サイクルの再現に成功しておらず、分子レベルで如何にこの微小管動態が生み出され、時空間的に調節されているかは明らかとなっていない。本研究では、キイロショウジョウバエ培養細胞である S2 細胞およびショウジョウバエタンパク質を用いて、細胞内の微小管動態の再現を目指した。

ショウジョウバエの微小管制御タンパク質を用いた先行研究において、EB1、Sentin、XMAP215^{Msp} の3因子が *in vitro* において動的な微小管を生み出すことが示された。しかし、これら3因子を様々な濃度で混合しても、細胞内で観察される伸長、短縮、停止（ポーズ）という3状態のサイクルを再現することはできなかった。そこで、本研究では、*in vitro* で細胞内の微小管動態をより忠実に再現することを目指した。そのために、これまでの再構成系では不足している因子があると仮説を立て、構成要素を拡張した。

不足している因子としては、細胞において微小管動態に重要であることが知られ、他生物種において *in vitro* で微小管動態への活性が示されている kinesin-13^{Klp10A} および CLASP^{Mast/Orbit} を候補とし、最終的にチューブリンおよび5つのタンパク質 (EB1、XMAP215^{Msp}、Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、CLASP^{Mast/Orbit}) を混合することにより、3状態全てを含む動的な微小管プラス端の振る舞いを再構成した。

まず、加える2つのタンパク質 (kinesin-13^{Klp10A}、CLASP^{Mast/Orbit}) をそれぞれ単独でチューブリンと混合し、その分子活性を調べた。kinesin-13 はツメガエル

およびヒトホモログで詳細な解析がされており、ショウジョウバエホモログ Klp10A においても同様に微小管脱重合活性を示した。次に、CLASP^{Mast/Orbit} は微小管のカタストロフを強く抑制し、伸長速度を低下させた。カタストロフ抑制活性については分裂酵母ホモログと同様であったが、伸長抑制活性は報告されておらず、酵母と昆虫の CLASP では活性が少し異なる可能性が示唆された。また、この実験条件ではカタストロフがほぼ完全に抑制され、レスキュー活性は検証できなかった。これら 2 因子を加え、チューブリンおよび 5 つのタンパク質 (EB1、XMAP215^{Msp}s、Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、CLASP^{Mast/Orbit}) を混合することにより、3 状態全てを含む動的な微小管プラス端の振る舞いを再現することに成功した。この時、これまで *in vitro* では再現されていなかったポーズ状態と頻繁なレスキューが観察された。CLASP^{Mast/Orbit} を除くと、ポーズもレスキューもほとんど観察されないことから、4 因子の存在下では CLASP^{Mast/Orbit} がポーズとレスキューを引き起こすことが示唆された。

さらに、動態の再現から一歩進み、微小管動態の細胞周期制御についての解析を試みた。細胞周期の間期から分裂期に移行する際に、微小管はより動的になることが以前より知られているが、その分子機構は不明なままだった。そこで、分裂期特異的なタンパク質リン酸化酵素 (キナーゼ) が微小管動態を制御しているのではないかと仮説を立てた。分裂期への移行に際して複数のキナーゼが活性化されることが知られているが、その中で、Plk1^{Polo} キナーゼが *in vitro* において CLASP^{Mast/Orbit} と kinesin-13^{Klp10A} をリン酸化修飾し、その活性を調節して微小管の動的不安定性を増加させることが示された。また、Plk1^{Polo} キナーゼ阻害剤による実験により、細胞内においても分裂期微小管の動態に Plk1^{Polo} キナーゼが寄与していることが示された。これらの結果から、進化上保存された上記 5 つのタンパク質が、細胞内で動的な微小管を形成するための中心的な因子であり、Plk1^{Polo} によるリン酸化が間期から分裂期への微小管動態の転換に重要なイベントであることが示唆された。

序論

in vitro 再構成の意義

遺伝学的解析により同定された因子を使って細胞内のプロセスを *in vitro* で再構成することは、細胞内プロセスを分子レベルで理解する上で必須である。これによりその効果が直接的にその因子によるものであると決定し、プロセスを遂行するための最小の構成要素を特定することが可能である。

これまで、再構成的手法により、アクチンフィラメント依存的な細菌の運動や分裂期染色体構築、DNA 複製開始など、幅広い現象において理解を深める重要な解析が行われてきた (Garner et al., 2007, Loisel et al., 1999, Shintomi et al., 2015, Yeeles et al., 2015)。アクチンフィラメント依存的な細菌の運動についての解析では、この運動がモータータンパク質などに依らず単純なアクチン重合により再現可能であることが示された (Garner et al., 2007)。分裂期染色体についての解析では、凝縮の階層とそれに必要な因子が同定された (Shintomi et al., 2015)。

これらの解析は遺伝学的解析による知見を確認するとともに、複雑な細胞内のプロセスにおける DNA や細胞骨格などの構成要素の物理化学的な性質の寄与など、細胞内で発見の難しい知見を得ることも多い。しかし、*in vitro* 再構成は遺伝学的解析により蓄積された知見に基づいて行われるべきであり、*in vitro* 再構成により得られた知見はさらに遺伝学的解析により確認される必要がある。

微小管

動的な微小管はチューブリンタンパク質で構成されており、分裂期紡錘体形成や細胞極性等の真核細胞の様々な細胞内プロセスに必須の役割を担っている。それらの役割においては、伸長と短縮を繰り返す動的な微小管が必須である。微小管は重合することで伸長し、脱重合することで短縮する。微小管には極性 (プラス端とマイナス端) があり、2つの先端のうち、プラス端の方が動的である。また、プラス端では様々なタンパク質により重合・脱重合が制御されていることが知られている (Akhmanova and Steinmetz, 2008, Howard and Hyman, 2007)。チューブリンタンパク質は *in vitro* において特定の濃度で自律的かつ確率的に重合と脱重合を繰り返し、これは微小管の動的不安定性と呼ばれている (Horio and Hotani, 1986, Mitchison and Kirschner, 1984, Walker et al., 1988)。

細胞内において、間期細胞質中の微小管プラス端は伸長、短縮、停止（ポーズ）を確率的に繰り返す (Rogers et al., 2002、Shelden and Wadsworth, 1993)。伸長／ポーズから短縮への転換をカタストロフ、短縮から伸長／ポーズへの転換をレスキューと呼ぶ (図 1A) (カタストロフおよびレスキューの定義は研究者により異なる場合があり、本研究では Li et al., 2011 および Li et al., 2012 の定義に従った)。微小管の構成要素である α/β -チューブリンダイマーは α/β それぞれに GTP (guanosine triphosphate) 結合部位および GTPase 活性を持つ。このうち、 β -チューブリンの GTP 結合部位は未重合の状態では表面に露出しており、GDP (guanosine diphosphate) に加水分解後、溶液中の GTP と再結合することでヌクレオチドの結合状態がサイクルする。 α/β -チューブリンは重合して微小管に組み込まれると GTPase 活性が上昇し、短時間で GDP 結合型になる。これにより重合して間もない先端部分にのみ GTP 結合型チューブリンが存在するが、これは GTP キャップと呼ばれ、伸長中の微小管先端の特徴的な構造になっている。伸長中はこの GTP キャップが微小管を安定化しているが、加水分解や、脱重合により GTP キャップが失われることで、カタストロフが引き起こされると考えられている (図 1B) (Bayley, 1990、Howard and Hyman, 2009、Kueh and Mitchison, 2009、Menendez et al., 1998、Nogales, 1999、Nogales et al., 1998)。また、この GTP キャップを認識して伸長中の微小管先端に局在するタンパク質も存在する (Drechsel and Kirschner, 1994、Hayashi and Ikura, 2003、Maurer et al., 2011、Maurer et al., 2012、Slep and Vale, 2007、Vandecandelaere et al., 1999、Zanic et al., 2009)。

微小管動態の *in vitro* 再構成

複数のタンパク質が細胞内の微小管動態を制御しており、これらのタンパク質を発現抑制すると微小管動態が変わり、結果として繊毛や分裂期紡錘体のような微小管を構成要素とする高次構造の長さの変化を引き起こす (Akhmanova and Steinmetz, 2008、Goshima and Scholey, 2010、Howard and Hyman, 2007、Hu et al., 2015)。

全てではないが、多くのこれらのタンパク質は *in vitro* において独立に微小管動態を調節する。特に、プラス端には多くの微小管制御タンパク質が集積し、様々な動態制御がなされている (図2A) (Akhmanova and Steinmetz, 2008、Howard and Hyman, 2007)。XMAP215は5つのTOG (Tumor Overexpressed Gene) ドメインを介してチューブリンダイマーに結合し、連続的にチューブリンを微小管先

端に付加することができる (図2B) (Brouhard et al., 2008、Kerssemakers et al., 2006)。モータータンパク質kinesin-13は微小管上を歩行するkinesinスーパーファミリーの1つであるが、長距離歩行はせず、XMAP215とは対照的に微小管の脱重合を促進する (図2C) (Desai et al., 1999、Moore and Wordeman, 2004、Rogers et al., 2004)。EB (end-binding) タンパク質は伸長中の微小管プラス端に集積し、カルボキシル末端領域を介してSxIPやEEY/Eといったアミノ酸配列を認識し、様々な積み荷となるモータータンパク質等を微小管先端へ局在させている (図2D) (Akhmanova and Steinmetz, 2008、Dragestein et al., 2008、Honnappa et al., 2009、Honnappa et al., 2006、Slep, 2010、Weisbrich et al., 2007)。最近の研究により、EBタンパク質は、アミノ末端領域のCHドメイン (calponin homology domain) で微小管のヌクレオチド状態による構造の違いを認識することで伸長中の微小管先端に結合していると考えられており、GTPキャップの領域の大きさや、微小管先端の構造変化など、微小管自体の動態や構造の研究にも重要な役割を果たしている (Drechsel and Kirschner, 1994、Hayashi and Ikura, 2003、Maurer et al., 2011、Maurer et al., 2012、Slep and Vale, 2007、Vandecandelaere et al., 1999、Zanic et al., 2009)。CLASP (CLIP (cytoplasmic linker protein) associated protein) はTOG様ドメインと言われるXMAP215のTOGドメインに類似しているが少し構造の異なるドメインを持ち、活性も異なることが知られている。また、分裂酵母ホモログCls1pでは微小管のレスキュー頻度を増加させ、カタストロフ頻度を減少させるという報告がされている (図2E) (Al-Bassam et al., 2010、Leano et al., 2013)。ただし、他のCLASPホモログについては詳細な生化学的活性が解析されていない。また近年、Sentin (ショウジョウバエ) やSLAIN1/2 (ヒト、マウス)といった、これらの因子を複合体としてまとめるハブのような機能を持った因子も発見されている (図1F) (Li et al., 2011、Li et al., 2012、van der Vaart et al., 2011)。

2つ、あるいはそれ以上の因子をチューブリンと混合した場合には、動的な微小管の振る舞いはより良く再現されている (Kinoshita et al., 2001、Li et al., 2012、Zanic et al., 2013)。しかし、伸張、短縮、ポーズの3つの状態全てを含む細胞内の微小管動態の*in vitro*での再構成にはこれまで成功していない。また、これまで同定された微小管動態を制御するタンパク質だけで本当に細胞内の微小管動態が再現されるのかといった疑問については答えを得られていなかった。

さらに、微小管は細胞周期や細胞内の場所など、時空間的に制御されている (Akhmanova et al., 2001、Belmont et al., 1990、Kumar et al., 2009、Rusan et al., 2001、

Trodden and Rogers, 2015)。細胞表層付近や細胞運動においては、膜との結合に関わる因子あるいは微小管制御因子の翻訳後修飾により細胞質中とは異なる制御を受ける (Akhmanova et al., 2001、Kumar et al., 2009、Trodden and Rogers, 2015)。分裂期への移行に際しては、星状体微小管の伸長速度とカタストロフ頻度が上昇し、レスキューとポーズが抑制されて微小管はより動的になることが以前より知られていた (図3) (Belmont et al., 1990、Rusan et al., 2001)。また、細胞周期を制御し、分裂期を誘導する活性型Cdk1 (Cyclin – dependent kinase) を間期のカエル卵抽出液に加えると間期から分裂期に移行する際に観察されるような微小管動態の転換が引き起こされることが示されている (Verde et al., 1990)。しかしながら、こうした微小管動態の時空間的な制御の分子機構は不明であった。

ショウジョウバエ S2 細胞の有用性と主要な微小管動態調節因子

ショウジョウバエ S2 細胞は微小管プラス端動態の再構成を目指すのに有望なモデルシステムである。複数のグループの先行研究により、蛍光標識による生細胞観察によって間期および分裂期の微小管動態パラメータが得られている (Brittle and Ohkura, 2005、Li et al., 2011、Rogers et al., 2002、Sousa et al., 2007、Trodden and Rogers, 2015)。

この細胞ラインを使った大スケールの機能的ゲノムスクリーニングを含む複数の機能解析研究を通して、微小管の動態制御に必要ないくつものタンパク質が同定された (Goshima et al., 2007、Hughes et al., 2008、Moutinho-Pereira et al., 2013)。例えば、保存された3つの微小管プラス端局在タンパク質である Msps (ショウジョウバエの XMAP215/ch-TOG オルソログ。以降、単純に XMAP215 あるいは XMAP215^{Msps} と表記する)、EB1 (EB タンパク質ファミリー)、および Sentin (哺乳類の SLAIN1/2 の機能的ホモログ) の発現抑制では、微小管による高次構造である分裂期紡錘体が短くなる表現型を示した (Goshima et al., 2007、Goshima et al., 2005)。その後の解析によってこれら3因子の発現抑制により、微小管伸長速度が減少し、ポーズが劇的に増加することで微小管の動的性質を減少させることが示された (Brittle and Ohkura, 2005、Li et al., 2011、Rogers et al., 2002)。

S2 細胞において、EB1、Sentin は伸長する微小管先端に局在する。Sentin はカルボキシル末端側に EB1 と結合する SxIP モチーフを有し、EB1 依存的に伸長中の微小管先端に局在する。また、内在性の EB1 および Sentin を発現抑制した細胞で、EB1 カルボカルボキシル末端の積荷タンパク質結合領域を Sentin に置換し

た融合タンパク質を発現させると、微小管動態や分裂期紡錘体の長さが回復することから、ショウジョウバエ S2 細胞の微小管動態については、Sentin が主要な EB1 結合因子であることが示唆されている (Li et al., 2011)。一方、XMAP215^{Msp} は伸長中の微小管先端および微小管側面に局在するが、Sentin の発現抑制により、微小管先端への局在が消失する (Li et al., 2011)。EB1、Sentin、および XMAP215^{Msp} の精製タンパク質を用いて *in vitro* においても解析がなされ、Sentin のアミノ酸末端領域 (231-440a.a) が XMAP215^{Msp} の伸長中微小管への局在に重要であることが示された (Li et al., 2012)。

微小管プラス端の重合動態についても、これらの因子の効果が *in vitro* で解析された。EB1 は分裂酵母および哺乳類ホモログ (Bieling et al., 2007、Komarova et al., 2009、Vitre et al., 2008) と同様に単体で微小管の伸長速度 (約 1.2 倍) とカタストロフ頻度 (約 1.5 倍) を上昇させた。XMAP215^{Msp} もツメガエルホモログ (Brouhard et al., 2008) と同様に伸長速度 (約 2 倍) を上昇させた。しかし、Sentin を加えるとさらに顕著に伸長速度とカタストロフ頻度が上昇した (EB1 と比べて伸長速度が約 1.3 倍、カタストロフ頻度が約 1.7 倍； EB1 と XMAP215^{Msp} の 2 因子と比較して、伸長速度が約 1.6 倍、カタストロフ頻度は条件により 1.6~5 倍程度)。チューブリンのみ、あるいはこれらのうち 1 つを加えて生み出された微小管に比べ、3 つ全てのタンパク質を加えた場合には顕著に速く伸長 (チューブリンのみと比較して 3.9 倍) し、より頻繁にカタストロフ (チューブリンのみと比較して、2 倍程度) が起こった。つまり、これら 3 因子は複合体を形成することで相乗的に微小管をより動的にした (図 2F) (Li et al., 2011)。

上記の結果はこれらの因子を細胞で発現抑制した場合の表現型と一致する (Brittle and Ohkura, 2005、Li et al., 2011、Li et al., 2012、Rogers et al., 2002)。しかし、*in vitro* 再構成系でこれらのタンパク質を様々な濃度や組み合わせで混合して *in vivo* の微小管動態にもっとも近づけた条件においても、ポーズ状態やレスキュー (短縮から伸長、あるいは短縮からポーズへの転換) は細胞内に比べ未だに極めて低頻度であった (Li et al., 2012)。

本研究について

私は、微小管の 3 状態の再構成ができていない原因として、*in vitro* での反応における構成因子の不足の可能性を考えた。本研究では、S2 細胞での RNAi 発現抑制で微小管動態および分裂期紡錘体の大きさに影響がでることから、不足して

いる構成因子の候補として kinesin-13 (ショウジョウバエホモログ Klp10A。以降、単純に kinesin-13、あるいは kinesin-13^{Klp10A} と表記する) と CLASP (ショウジョウバエでは Mast/Orbit。以降、単純に CLASP あるいは CLASP^{Mast/Orbit} と表記する) を検討した (Goshima et al., 2005、Mennella et al., 2005、Sousa et al., 2007)。実際、これらのタンパク質は他の生物種のオルソログでは *in vitro* で微小管動態を調節することが示されていた (図 2E) (Al-Bassam et al., 2010、Mennella et al., 2005)。加えて、近年に確立された手法 (Widlund et al., 2012) により S2 細胞からチューブリンタンパク質を精製することが可能となり、これまで用いられてきたブタ脳由来のチューブリンタンパク質を S2 細胞由来のチューブリンに置き換えた。*in vitro* での反応において、これらの 5 つの因子と S2 由来のチューブリンを混合することで、*in vivo* の微小管動態を定性的に、そして幾つかの点については定量的に再現することができた。さらに、分裂期キナーゼである Polo (哺乳類では Plk1、以降、Plk1^{Polo} と表記する) によるリン酸化が微小管動態を分裂期の様式に転換させる様子が観察された。

結果

CLASP^{Mast/Orbit} は微小管の伸長とカタストロフを抑制する

始めに、GTP アナログである GMPCPP を用いて安定な微小管 (微小管シード) を用い、シード先端から動的な微小管を伸長させる微小管プラス端重合実験 (Bieling et al., 2007) において S2 チューブリンの活性を同定した (図 4)。予想通り、ブタチューブリンの場合と同様に S2 チューブリンからなる微小管も伸長と短縮を繰り返したが、動態パラメータは異なっていた (図 5A、C、D)。S2 チューブリンはブタチューブリンに比べ、伸長が速く、カタストロフが少なかった。これにより、全体として伸長しやすい微小管を形成した。ただし、ブタチューブリンと S2 チューブリンでは精製スケールや手法が異なっており、本来の性質の違いを表しているかはまだ明らかではない。ただ、細胞モデルとして S2 細胞を用いており、比較する上で S2 チューブリンを用いる方が適切であると考え、以降の再構成実験では主にこの S2 由来のチューブリンを用いた。また、ブタチューブリンは脳から精製している。神経細胞の微小管は高度に安定化されており、チューブリンの翻訳後修飾も他の細胞種とは異なる。

全長 kinesin-13^{Klp10A} タンパク質は大腸菌 *E.coli* から精製した。これも他生物種の相同タンパク質の結果から予想通り (Mennella et al., 2005、Rogers et al., 2004)、シード微小管を両端から脱重合させる活性を示した (図 5E)。

GFP 融合型 CLASP タンパク質は分子量が大きく大腸菌では発現が難しかったため Sf21 昆虫細胞から精製した (図 5A)。その際に、ゲル濾過クロマトグラフィーによりこのタンパク質が凝集を形成していないことを確認した (図 5B)。S2 チューブリンおよび微小管シードと混合すると、CLASP タンパク質はシードおよび S2 チューブリンからなる動的な微小管に沿って局在し、微小管の伸長速度とカタストロフ頻度を劇的に減少させる様子が観察された (図 6A-C)。チューブリン結合に重要な TOG2 および TOG3 ドメイン内の 4 つのアミノ酸残基を置換した変異型 CLASP では上記の活性は観察されず、微小管への結合も減少した (Al-Bassam and Chang, 2011、Al-Bassam et al., 2010、Leano et al., 2013) (図 6A-C)。すなわち、観察された伸長とカタストロフの抑制活性は CLASP によるものであり、Sf21 細胞由来の混入タンパク質によるものではなかった。加えて、この結果から微小管重合速度とカタストロフにおける GFP-CLASP の効果にチ

チューブリンか微小管またはその両方への結合が必要であることが示された。

これまでの RNAi 実験から CLASP は微小管のポーズを誘導することが示唆されている (Sousa et al., 2007、Trognen and Rogers, 2015) が、精製された分裂酵母 CLASP^{Cls1} ではレスキュー (短縮から伸長への転換) 誘導活性を持つことが示されている (Al-Bassam et al., 2010)。しかしながら、CLASP のみをチューブリンと混合した実験では微小管はごく低速度で伸長し続け、ポーズを判定することはできなかった。また短縮が観察されず、ショウジョウバエ CLASP のレスキュー活性についても検討することはできなかった (図 6A)。

CLASP は EB1 結合の SxIP モチーフを有し、細胞内で伸長中の微小管先端に集積する (Honnappa et al., 2009、Sousa et al., 2007)。そこで、EB1 タンパク質を反応液に加え、CLASP の伸長するプラス端での振る舞いを再構成した (図 6D)。EB1 はそれ自身がわずかに微小管伸長速度とカタストロフ頻度を上昇させる (Li et al., 2012)。しかしながら、伸長速度に対する CLASP の効果に変化はなく、加えてカタストロフも EB1 の有無に関わらず観察されなかった (図 6E)。これらの結果は EB1 依存的なプラス端への集積が CLASP によるプラス端への 2 つの活性に必須ではない事を示唆している。ただし、この実験においても短縮は観察されなかったため、伸長速度以外のパラメータへの影響については検証できなかった。

5 因子による 3 状態を含む微小管動態の再構成

次に、S2 由来のチューブリンを用いた反応に全 5 つの因子 (EB1、XMAP215^{Msp}、Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、CLASP^{Mast/Orbit}) を混合した (図 5A)。興味深いことに、微小管が頻繁なレスキューとポーズ状態を伴って伸長・短縮のサイクルを繰り返す様子が観察された。CLASP の濃度を変化させると、微小管動態も顕著に変化し、カタストロフの減少とポーズの増加により安定化された (図 7、表 1)。この実験において、それぞれの動態パラメータの数値は対応する細胞内での値の範囲内にあり、全体としての確率的振る舞いは S2 細胞内の細胞間期の微小管動態を連想させた (図 8)。

in vitro と *in vivo* のダイナミクスの類似性を検証するために、反応液から kinesin-13^{Klp10A}、Sentin または、CLASP^{Mast/Orbit} を取り除き、*in vivo* の RNAi の結果と比較した。S2 細胞内では、kinesin-13^{Klp10A} ノックダウンはカタストロフ頻度を減少させる (Mennella et al., 2005)。Sentin ノックダウンは特にポーズ状態の割

合を増加させ、伸長速度、短縮速度、カタストロフ頻度を減少させることで、微小管の動的な性質を抑制する (Li et al., 2011)。S2 細胞での CLASP^{Mast/Orbit} ノックダウンは伸長速度と短縮速度を上昇させるが、ポーズ状態は減少させる (Sousa et al., 2007, Trogden and Rogers, 2015)。興味深いことに、kinesin-13^{Klp10A}、Sentin、CLASP^{Mast/Orbit}、をそれぞれ取り除いた *in vitro* 実験で、これらの *in vivo* の傾向がおおむね再現された。kinesin-13^{Klp10A} を取り除いた場合には、カタストロフが劇的に抑制され、観察領域がおびただしい数の微小管で埋め尽くされた (図 9A、413 分の間に 7 回しかカタストロフが観察されなかった)。CLASP を除去した場合、全 7 つのパラメータの変化は定性的に細胞での結果に一致した (図 7C-G の 0 nM CLASP が CLASP 除去の条件。図 10A-E で先行研究における細胞での結果と比較)。ただし、レスキューの減少の大きさについては、細胞内より顕著であった。同様に Sentin を除去した場合、7 つのうち 6 つのパラメータが *in vivo* と *in vitro* で同様の結果になった (図 9C-G、図 10F-J、表 2)。

微小管側面に結合した CLASP が短縮する微小管にポーズを誘導する

CLASP 非存在下ではポーズはほとんど観察されなかったため、CLASP の集積とポーズの誘導に相関がある可能性を予想し、これを検証した。CLASP は多くの場合、伸長する微小管先端に集積しているため、解析は短縮する微小管に絞って行った。まず、短縮する微小管側面に沿った GFP-CLASP のシグナルの分布を調べたところ、画像ピクセルのうち 24% が GFP の強いシグナルを含んでいた (図 11A 微小管数 n=21)。この結果は、ランダムにポーズが誘導される場合でも 24% の確率で GFP-CLASP の集積点で起こる可能性があることを示す。しかしながら、短縮からポーズへの遷移は 51% (n=51) で GFP-CLASP の集積点で確認された (図 11B、C の赤い部分)。さらに、GFP-CLASP の少ない点でポーズが誘導されていた 25 のイベントのうち、9 つのイベントでも、微小管は短縮中から既に強い GFP のシグナルを持っていた (図 11B、C の緑の部分)。故に、GFP-CLASP の集積とポーズの誘導には完全ではないものの、十分に相関があった。

ここで、微小管側面の CLASP が他の因子を局在化させているか調べるため、微小管シードと TagRFP-CLASP、GFP-Sentin を混合し、微小管上への局在を観察した。Sentin はそれ自体では微小管側面に局在しない (Li et al., 2012) が、CLASP と XMASP215^{MspS} を架橋しているというモデルが提案されている (Trogden and Rogers, 2015)。この考えに従うと、CLASP 依存的に Sentin および結合パートナ

一である XMAP215^{Msp} が微小管側面に局在しうることになり、CLASP と共に集積した Sentin や Sentin-XMAP215^{Msp} 複合体がポーズ状態に関与する可能性がある。TagRFP-CLASP 存在下でも GFP-Sentin の微小管側面局在が観察されなかったことから、Sentin および Sentin-XMAP215 複合体が事前に微小管側面に局在していることがポーズの誘導に必要ではない事が示唆された (図 12)。

ポーズについてと同様の解析を短縮から再伸長する場合についても行った (図 11B、D)。この場合、相関はポーズの場合に比べ低かったが、それでもランダムに起こる場合に比べて高い確率だった。33% のイベントが GFP シグナルが強い点で起こっていた [n = 63]。この時、シグナルが強いピクセルの割合は 15% だった [n = 31]。この結果は、CLASP の集積とレスキューイベントが完全に相関している分裂酵母 CLASP^{Clb1} の結果 (Al-Bassam et al., 2010) と異なり、少数の CLASP でも短縮から伸長へのレスキューイベントを引き起こしうる事を示している。ただ、この時に使用した顕微鏡の感度では弱い GFP-CLASP の集積を検出できなかった可能性は排除できていない。

以上の結果はショウジョウバエの CLASP が他の 4 因子の存在下で有力なポーズ/レスキュー誘導因子であることを示唆している。

Plk1 による微小管動的性質の亢進

微小管動態は分裂期の制御を受けることが知られている。分裂期になると、星状体微小管の伸長速度およびカタストロフ頻度が上昇する一方で、レスキュー頻度は低下する (Belmont et al., 1990、Rusan et al., 2001)。活性型 Cdk1 を間期のカエル卵抽出液に加えると間期-分裂期における微小管動態の転換が引き起こされることが示されている (Verde et al., 1990)。しかしながら、Cdk1 の下流にどのような分子機構があるのかは未だ明らかになっていない。

そこで、私は Cdk1 がこれまでに用いた 5 つの因子やチューブリン自体を直接、リン酸化することで微小管動態を制御しているのではないかという仮説を立てた。まず、リン酸化を確認するためにオートラジオグラフィ実験を行った結果、kinesin-13^{Klp10A} および XMAP215^{Msp} がリコンビナント Cdk1-cyclin B 複合体によりリン酸化されることが検出された (図 13A)。次に、5 つのタンパク質およびチューブリンを Cdk1-cyclin B 複合体と共に混合反応させ、微小管重合実験を行った。しかし、4 回の Cdk1 効果比較実験において微小管の動態パラメータに有意な、あるいは再現性のある変化は観察されなかった (図 13B-F、表 3)。上記の実験結

果から、完全には否定されていないものの、Cdk1による直接のリン酸化によりこれらのタンパク質の活性が調節されているという考えに疑問が持たれた。そのため、私は直接的にはCdk1ではなく他の因子が分裂期における微小管の動的性質の亢進に寄与している可能性を考えた。

Polo-like kinase 1 (Plk1) は分裂期への移行に際する複雑な制御系の因子の一つである (Lindqvist et al., 2009、Zitouni et al., 2014)。そこで、次に私はPlk1が微小管動態の変化の原因ではないかと考えた。興味深いことに、5つの因子およびチューブリンとリコンビナントPlk1^{Polo} (図5A) を混合反応させたところ、再現性良く微小管の動態パラメータに影響があった。伸長速度とカタストロフ頻度が上昇した一方、レスキューとポーズは減少し、微小管はより動的になった (図14B、C、表4)。そこで、タンパク質のリン酸化を調べるため、Phos-tag (リン酸化検出試薬) およびオートラジオグラフィにより解析を行った。Phos-tagはリン酸化タンパク質と相互作用し、SDS-PAGEにおいて移動度を減少させる (Kinoshita et al., 2006)。EB1、XMAP215^{MSPs}、S2細胞由来チューブリンについてはPhos-tagゲル解析でバンドシフトが観察されずリン酸化が検出できなかったが、kinesin-13^{Klp10A}、Sentinではバンドシフトが検出され、Plk1によりリン酸化されることが明らかとなった。また、CLASP^{Mast/Orbit}についてはATP-³²Pを用いたオートラジオグラフィにより解析し、Plk1によりリン酸化されることが示された (図14A)。

GFP-CLASP^{Mast/Orbit}を単独でチューブリンと混合したところ、Plk1存在下では微小管側面へのCLASP局在の減少が観察された (図14D、E)。微小管側面に結合したCLASPは頻繁にポーズを引き起こすことから、この結果はPlk1による微小管の動的性質の亢進と一致する (図14C)。野生型と同様の方法で精製したキナーゼ不活性型Plk1^{Polo}では効果が弱いことからこの効果は少なくとも部分的にはリン酸化依存的である (図14D、E)。

一方、活性型Plk1^{Polo}をCLASP以外の4つの因子およびチューブリンと混合反応させた時には、急速な微小管シードの脱重合が観察された (図14F、G)。この微小管シードの脱重合はPlk1^{Polo}によりkinesin-13^{Klp10}が活性化されたことを示唆している。すなわち、Plk1^{Polo}によるリン酸化はCLASP^{Mast/Orbit}とkinesin-13^{Klp10A}の活性に影響を与えていた。ただ、kinesin-13^{Klp10A}と同様にカタストロフ誘導活性があるSentin (Li et al., 2012) がPlk1^{Polo}の重要な基質であるかは今後、調べていく必要が残っている。

最後に、細胞内の微小管動態への $\text{Plk1}^{\text{Polo}}$ の関与を調べるために、 $\text{Plk1}^{\text{Polo}}$ 阻害剤 BI2536 の存在下／非存在下でのショウジョウバエ S2 細胞内の分裂期の星状体微小管の伸長速度を測定した (伸長する微小管にのみ局在する EB1-GFP を測定マーカーとして用いた)。S2 細胞は中心体異数性を持つため、それが星状体微小管の動態パラメータを変える可能性がある。そこで、分裂期スピンドルの二極性に重要な kinesin-5^{Klp61F} を RNAi により発現抑制することで誘導される単極性スピンドルの星状体微小管動態を測定した(図 15A)。興味深いことに、BI2536 処理により分裂期の EB1-GFP の輝点の移動速度が 40%低下し、間期と同等の速度になった (図 15B)。間期に同様の処理を行っても微小管の伸長速度に影響しないことから、この速度低下は BI2536 によるチューブリンへの非特異的な効果によるものとは考え難い。さらに、同じデータを用い、伸長時間を比較した。分裂期の S2 細胞においてポーズ状態は稀であるため、分裂期の星状体微小管での EB1-GFP シグナルの消失はほぼカタストロフによるものと考えられる。BI2536 存在下では EB1-GFP の追跡時間は 56%長くなり、間期の値に近くなったが、これは $\text{Plk1}^{\text{Polo}}$ が分裂期細胞内でカタストロフ頻度を上昇させていることを示唆している (図 15C)。

考察

本研究では先行研究より忠実な *in vitro* での細胞内の微小管動態の再現を目指した。この目的を達成するために、再構成系の材料を先行研究 (Li et al., 2012) のブタ脳由来のチューブリンおよび3つのショウジョウバエタンパク質から、S2細胞由来のチューブリンとリン酸化酵素を含む7つの精製タンパク質に拡張した。知る限りにおいて、本研究は最も複雑な微小管重合動態の再構成である。XMAP215^{MSPs}、EB1、Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、および CLASP^{Mast/Orbit} の全5つの因子の存在下では、伸長、短縮およびポーズ状態が偶発的に繰り返される、細胞内の基本的な微小管の振る舞いが再現された。これまでの細胞での機能欠損解析と今回の *in vitro* 実験から、これら5つのタンパク質がS2細胞質内の微小管動態の中核的な制御機構を構成していることが示唆された (図16左)。CLASP^{Mast/Orbit}、Sentin、kinesin-13^{Klp10A} 非存在下での微小管動態の変化はこのモデルを支持している。すなわち、*in vitro* での各因子の除去により微小管動態が無処理のS2細胞質中の動態からかけ離れ、RNAiによる各因子の発現抑制で観察される様子に近くなった。さらに、分裂期キナーゼ Plk1^{Polo} によるリン酸化で微小管はより動的になるが、これは間期から分裂期への転換の際に起こる変化を想起させる (図16右)。

CLASP はポーズを誘導する

酵母の CLASP^{Clsl} を用いた先行研究ではレスキュー誘導およびカタストロフ抑制活性が同定されているが、ポーズ誘導や伸長抑制活性は確認されていなかった (Al-Bassam et al., 2010)。本研究において特に興味深かったことは、他の4つの因子と共に CLASP^{Mast/Orbit} を加えた場合にポーズが観察されたことである。これは複数因子による再構成の有用性を示すと共に、微小管の重合・脱重合と CLASP^{Mast/Orbit} の活性の均衡がこのような状態を生み出していることを示唆している。このような活性は他の因子との物理的な相互作用によるものである可能性もある。例えば、最近の研究でS2細胞において XMAP215^{MSPs} が Sentin を介して CLASP^{Mast/Orbit} と相互作用していることが示されている (Trogden and Rogers, 2015)。また、間期のS2細胞では、RNAiによるEB1、Sentin、および XMAP215^{MSPs} の発現抑制でポーズの割合が増加するが、この表現型は今まで容易に説明できな

かった (Brittle and Ohkura, 2005、Li et al., 2011、Rogers et al., 2002)。本研究の *in vitro* の結果から考えると、この表現型は EB1、Sentin、あるいは XMAP215 を発現抑制した場合、CLASP^{Mast/Orbit} が微小管プラス端で支配的になり他の因子と共にポーズを誘導している、と解釈できるかもしれない。

Plk1 は微小管をより動的にする

本研究のもう一つの発見は Plk1^{Polo} によって微小管動態がより動的に変化したことである。Plk1^{Polo} の関与はカエル卵抽出液における Cdk 1 が微小管の動的性質の上昇を引き起こすという古典的な解析とは一見異なる (Verde et al., 1990)。しかし、近年 Cdk1 と Plk1 は複雑なシグナルネットワークを形成していることが明らかとなっており、Cdk1 を卵抽出液に加えることにより Plk1 キナーゼが活性化されているかもしれない。S2 細胞を用いた実験においては、*in vitro* のデータに一致して、前中期細胞を Plk1^{Polo} 阻害剤により処理することで、微小管動態が分裂期から間期の様式に戻る様子が観察された。また、*in vitro* でのキナーゼ実験で Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、および CLASP^{Mast/Orbit} が Plk1^{Polo} の基質である事が示された (図 14A)。電気泳動ゲルに複数バンドが検出されることは、複数のアミノ酸残基が Plk1^{Polo} によりリン酸化されうることを示している。しかし、本研究では Plk1^{Polo} による他のタンパク質のリン酸化が細胞内での微小管動態の変化に影響を与えている可能性を排除できていない。とはいえ、本研究で明らかになった Sentin、kinesin-13^{Klp10A}、および CLASP^{Mast/Orbit} のリン酸化について、*in vivo* においてリン酸化により微小管動態に影響を与える基質アミノ酸残基を特定することは今後の重要な研究対象になるだろう。

in vitro と *in vivo* の結果の比較

本研究でこれまでで最も *in vivo* に近い再構成に成功したと考えているが、未だ厳密な意味で S2 細胞内の微小管動態の再現に成功したわけではない。まず、細胞内では他の因子も微小管動態に寄与している可能性がある。RNAi による発現抑制では本研究で用いた 5 因子を除去した時ほど劇的な表現型を示さないものの、S2 細胞は今回用いた因子の他にも、D-TPX2 やさらなる 2 つの kinesin-13 ファミリータンパク質 (Klp59C と Klp59D) といった、*in vitro* で微小管動態を調節する能力のある因子を発現している。(Goshima, 2011、Goshima and Vale, 2003、Mennella et al., 2005)。

次に、本研究の微小管動態のデータは基本的に細胞質中のフリーな微小管に限られている。細胞の表層あるいは辺縁の微小管のような他のタイプの微小管には多くの場合、それぞれ異なる種類のタンパク質や細胞膜に関係する構造などが結合しており、異なる微小管動態を見せる。例えば、細胞表層付近においてはヒト CLASP の発現抑制によりレスキューと共にカタストロフが減少するが、これは本研究の *in vitro* で観察された結果と完全には一致しない (Mimori-Kiyosue et al., 2005)。これについては、GSK3 キナーゼが CLASP をリン酸化し、それにより辺縁部の微小管動態を調節することが知られている (Kumar et al., 2009, Trogden and Rogers, 2015)。また、分裂中期の動原体微小管には今回用いたタンパク質の他にも多くのタンパク質が結合するが、その状態の再現には至っていない。ただし、この点については本研究で試した特定の条件下で、部分的には動原体微小管動態の主要な特徴を再現できている可能性がある。細胞内では、CLASP^{Mast/Orbit} は分裂中期には動原体外表に集積しており、それが動原体微小管の重合に必須である (Maiato et al., 2005)。動原体微小管のような低速だが持続的な伸長は、高濃度の CLASP^{Mast/Orbit} と他の 4 因子を混合した条件で観察された (図 7、45 nM CLASP^{Mast/Orbit} の条件)。この結果は、動原体外表には今回用いた因子の他にも複数の微小管調節タンパク質が存在するけれど、CLASP^{Mast/Orbit} の集積が動原体微小管を特徴付ける主要なイベントであるように思わせる。

最後に、本研究の実験系と *in vivo* の条件の間には「環境」とタンパク質濃度の違いがある。本研究では標準的な粘性の低いバッファーを用いたが、これは、粘性が高く、多数の様々な分子を含んだ細胞質とは異なる。さらに、概算によると細胞内の CLASP^{Mast/Orbit} と kinesin-13^{Klp10A} は *in vitro* で用いた濃度より 45-80 倍も高く、現在のタンパク質精製法で到達できない濃度だった (図 17)。この相違に対する解釈の 1 つとして、細胞内のタンパク質は空間的あるいは翻訳後に制御され、実際に微小管に作用するものは限られているという可能性がある。あるいは、カタストロフにおいては CLASP^{Mast/Orbit} と kinesin-13^{Klp10A} は拮抗的な活性を持っており、この 2 つのタンパク質のそれぞれの絶対量というより存在比が重要なかもしれない。実際、CLASP^{Mast/Orbit} と kinesin-13^{Klp10A} の比は *in vitro* (1:6.7) と *in vivo* (1:3.7) の条件で同等だった。いずれにせよ、本研究の再構成は定性的なものにとどまり、*in vivo* の動態パラメータとの定量的な比較は未だ困難である。動態パラメータとタンパク質濃度を *in vivo* の値に近づけることは、今後の微小管動態の再構成において重要な課題であろう。また、他の複雑な細胞現象の再構

成においても同様の課題があるだろう (Shintomi et al., 2015)。

哺乳類の微小管動態の再構成に向けて

本研究で得られたデータはおおむね哺乳類細胞にも適用できる可能性がある。アミノ酸配列は保存されていないものの、Sentin と哺乳類の SLAIN2 は共に EB1 と XMAP215^{Msp} に結合し両者を架橋して相乗的に微小管伸長を加速するため、機能的ホモログと見られている (Li et al., 2011、van der Vaart et al., 2011)。さらに、Plk1 依存的な kinesin-13 の活性化は哺乳類でも *in vitro* で示されている (Jang et al., 2009、Zhang et al., 2011)。CLASP (1/2)、EB (1/2/3)、SLAIN (1/2)、kinesin-13 (Kif2a/Kif2b/MCAK) には複数のパラログ/ホモログ遺伝子が同定されていることから、哺乳類細胞ではショウジョウバエに比べてさらなる複雑性を持っているのかもしれない。実際、ヒトでは CLASP1 と CLASP2 があり、複数のアイソフォームを発現しているが、最近、CLASP2 の一つのアイソフォームは異なる活性も有していることが示された (Yu et al., 2016)。複雑性は予想されるものの、本研究で用いた 5 つのタンパク質の哺乳類ホモログを精製して *in vitro* で混合してみることは、哺乳類の微小管動態の再構成に向けて最初の試みとして有力であると考えられる。

材料と手法

プラスミド作製

全長 CLASP^{Mast/Orbit} はプライマー-CACCATGGCCTATCGGAAGCCCAGCGAC CTGG/TGACGACGATGCCGCGGAGGAGTTCTTGG を用いて PCR により増幅した。増幅した DNA は pENTR-D/TOPO ベクターにクローニングし、Not I / Asc I 制限酵素処理により切り出し、平滑末端処理をした後、pFastBac-His-mGFP ベクターにクローニングした。His-CLASP^{Mast/Orbit} は Gateway クローニングにより pDest10 ベクターにクローニングした。Kinesin-13^{Klp10A} はプライマー CACCATGGACATGATTACGGTGGGGCA / CTAACGCTTGCCATTCGGCGAA を用いて PCR により増幅した。増幅した DNA は pENTR-D/TOPO ベクターにクローニングした後、Gateway クローニングにより pDEST17 ベクターにクローニングした。Plk1^{Polo} はプライマー TTGCGGCCGCCACCATGGCCGCGAAGCCCGA GG/TTGGCGCGCCTTATGTGAACATCTTCTCCAGC を用いて PCR により増幅した。増幅した DNA は Not I / Asc I 制限酵素処理により切り出した後に pENTR-D/TOPO ベクターにクローニングした。その後、Gateway クローニングにより pDEST10 ベクターにクローニングした。

タンパク質精製とクロマトグラフィー

S2 細胞由来チューブリンは(Widlund et al., 2012)GST タグ融合 TOG1 ドメイン (*S. cerevisiae* Stu2, 1-306 a.a.) は大腸菌 *Escherichia coli* BL21 を 2L の Terrific Broth 培地で培養し、0.2 mM IPTG により 25°C で 18 時間培養し、発現誘導した (TOG1 ドメインのプラスミドは Per Widlund [MPI-Dresden] から頂いた)。回収した大腸菌は 120ml の 500U benzonase (Novagen) とプロテアーゼ阻害剤 (0.5 mM PMSF、ペプチドカクテル [1 µg/mL leupeptin, pepstatin, chymostatin, aprotinin]) を加えた 2×PBS (5.4 mM KCl, 3 mM KH₂PO₄, 16.2 mM Na₂HPO₄, 274 mM NaCl) に再懸濁し、超音波破碎装置 Advanced Digital Sonifier D450 (Branson) により破碎した。破碎抽出液は 5 ml GSTrap カラム (GE Healthcare) に 4°C で 1 時間、繰り返し通した。洗いの後、GST-TOG1 を 20 mM 還元型グルタチオンを含む 2×PBS (pH 8.0) により溶出し、PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) により 3.5 mL カップリングバッファー (100 mM NaHCO₃, 100 mM NaCl, pH 8.2) に置換した。バッファー

置換後、80 mM MgCl₂を加えた。GST-TOG1 を担体に架橋するため、GST-TOG1 タンパク質溶液を 1 ml HiTrap NHS-activated HP columns (GE Healthcare、1 mM HCl で事前に活性化済み) に室温、1.5 ml/min で 20 分間循環させた。このカラムは 50 % グリセロールを含む 1×PBS でバッファー置換し、-20 °C で保存した。700 ml 培養分の S2 細胞を 125U benzonase (Novagen) を加えた 7 mL MRB80 バッファー (80 mM K-PIPES [pH 6.8]、4 mM MgCl₂、1 mM EGTA) に再懸濁し、ダウンス型ホモジナイザーにより破砕した。破砕抽出液は 9400×g および 135000× で遠心分離し、上清を上述の 1 mL TOG1 カラムに通した。チューブリンは溶出バッファー (MRB80、0.5 M (NH₄)₂SO₄、10 μM GTP) により溶出し、PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) を用いて MRB80 にバッファー置換した。このタンパク質溶液を Amicon Ultra-4 MWCO 30K で 40 μM 以上に濃縮した。濃縮液は液体窒素により瞬間凍結し、-80°C で保存した。EB1 は以前のプロトコルに従って大腸菌 *E. coli* を用いて精製した (Li et al., 2011、Li et al., 2012)。GST-EB1 は大腸菌 BL21-AI において 0.2 % のアラビノースを加えて 25°C で 16 時間培養し、発現誘導した。回収した大腸菌はプロテアーゼ阻害剤 (0.5 mM PMSF と上述のペプチドカクテル) を加えた抽出バッファー (25 mM Tris-HCl、1 mM EGTA、150 mM NaCl、1 mM DTT) に再懸濁し、超音波破砕装置 Advanced Digital Sonifier D450 (Branson) より破砕した。抽出液をグルタチオン架橋セファロースビーズと 4°C で 1 時間混合した後、GST タグを HRV 3C プロテアーゼ (Thermo) により切断し、ゲル濾過クロマトグラフィー (バッファー : MRB80、100 mM KCl、1 mM DTT) によりさらに精製した。His-kinesin-13^{Klp10A} は EB1 と同様に大腸菌を用い、同様のバッファーに 1 mM ATP を加えて用い、標準的な Ni-NTA 精製を行った。His-Sentin、His-GFP-Sentin、および XMAP215^{MSPs}-HAHis は昆虫細胞 Sf21 を用い、基本的に以前の研究と同様に行った (Li et al., 2012)。エルレンマイヤーフラスコ中の Sf21 細胞 (1.5 × 10⁶/ml) をバキュロウイルスで処理し、27°C、120 rpm で 3 日間培養した。50ml 培養分の細胞を抽出バッファー (50 mM K-Hepes、100 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA、1 mM DTT、30 mM imidazole、1% Triton X-100、pH 7.6、プロテアーゼ阻害剤) で破砕した。抽出液を 0.5 ml のニッケルコートしたビーズと 4°C で 1 時間混合し、250 μL の溶出バッファー (抽出バッファーから 1% Triton X-100 を除き 200 mM イミダゾールを加えたもの) で複数回溶出した。その後、PD MiniTrap G-25 (GE Healthcare) を用いてバッファーを 1×MRB80 100 mM KCl 1 mM DTT に置換した。His-GFP-CLASP^{Mast/Orbit} (野生型および TOG 変異型

[W334E、K421A、W852E、K940A、これらは TOG2 および TOG3 ドメインの重要アミノ酸残基]、His-CLASP^{Mast/Orbit}、TagRFP-CLASP^{Mast/Orbit}、および His-Plk1^{Polo} (野生型およびキナーゼ不活性型 K54A) は Sentin と同様の方法で精製したが、CLASP の場合は抽出バッファーに 100 mM KCl と 0.1–0.2% Tween-20 を加えており、Plk1^{Polo} の場合には細胞回収の 1 時間前に 100 nM オカダ酸で処理した。精製した S2 チューブリン、EB1、kinesin-13^{Klp10A}、および Plk1^{Polo} は液体窒素により瞬間凍結し、-80°C で保存した (EB1 には 20% グリセロール、kinesin-13^{Klp10A} と Plk1^{Polo} には 20% スクロースを加えている) が、他のタンパク質については、精製後 48 時間以内に実験に使用した。リコンビナント Cdk1-cyclin B 複合体は New England Biolab から購入した。GFP-CLASP^{Mast/Orbit} のゲル濾過クロマトグラフィーには Superdex 200 increase 10/300 GL (ゲル濾過バッファー : 80 mM K-Pipes, pH 6.8, 100 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 1 mM DTT) を使用した。

in vitro 微小管重合実験

in vitro 微小管重合実験は基本的に (Bieling et al., 2010, Gell et al., 2010) を参考とした (Li et al., 2012) の方法に従った。フローチャンバー (22 mm [通路長] × 1 mm [通路幅] × 0.15 mm [深さ]) はカバースリップと洗浄したスライドガラスを 2 本の両面テープで接着して作製した。カバースリップは純水に界面活性剤 SCAT 20-X を加えたものに 3 日以上浸し、純水で洗浄後にメタノールで表面のゴミを燃やしてからシラン化処理を行った。シラン化カバースリップは抗ビオチン抗体 (1 × MRB80 中に 1–5%、Invitrogen) でコートし非特異的表面付着を Pluronic F127 (1 × MRB80 中に 1%、Invitrogen) でブロックした。ビオチン化チューブリンと抗ビオチン抗体の結合により、ビオチン化した微小管シード (50–100 μM チューブリン中に 10% ビオチン化ブタチューブリンと 10% Alexa568 標識ブタチューブリンを含み、1 mM GMPCPP により重合したもの) は特異的にカバースリップ表面に固定された。チャンバーを 1 × MRB80 で洗った後、未重合チューブリン (3.3% Alexa568 標識ブタチューブリンを含む) と、条件により、EB1 (400 nM)、Sentin (200 nM)、GFP-CLASP^{Mast/Orbit} (0–45 nM)、kinesin-13^{Klp10A} (100 nM、1 mM ATP も共に加える)、XMAP215^{Msp5}-HA (100 nM) を実験バッファー (1 × MRB80、75 mM KCl、1 mM GTP、0.5 mg/mL k-カゼイン、0.1% メチルセルロース)、および oxygen scavenger system (50 mM グルコース、400 μg/mL グルコースオキシダーゼ、200 μg/mL カタラーゼ、4 mM DTT) の混合液により微小管を重合させた。

サンプルチャンバーは蝋により封をした。本研究ではEB1、Sentin、XMAP215^{Msp}は特定の濃度でのみ使用したが、これは先行研究において3因子による効果が示された濃度に従った (Li et al., 2012)。Kinesin-13^{Klp10A}は濃度を上げすぎると微小管シードまで脱重合させてしまうため、観察可能な条件として100 nMで用いた。概算した細胞内のチューブリン濃度に合わせて (図15)、4因子および5因子の微小管調節因子を含む主要な再構成実験には15 μ M S2 チューブリンを用いた (図5と7)。しかし、S2由来チューブリンの収量がブタ脳チューブリンに比べ少ないため、幾らかの実験には10 μ M S2チューブリンを用いた (図4A-C and 12B、D)。試料をCdk1-cyclinBあるいはPlk1^{Polo}により処理する場合にはそれぞれ5 nM、100 nMのリコンビナントキナーゼタンパク質を2 mM ATPとともに反応液に加えた。実験の際には、試料の温度は27°Cに保ち、全反射蛍光顕微鏡 (Tiシステム (Nikon)、EMCCDカメラ (Roper のEvolve)、100 \times (1.49 NA) レンズ、488/561-nm 励起レーザー、顕微鏡制御はMicromanagerを使用) により3秒ごとに20分間撮影した。

データ解析

*in vitro*の微小管プラス端の動態パラメータはポーズを除き、(Li et al., 2012)の方法に従った。要約すると、観察領域のすべての微小管に対してプラス端の追跡可能な10本程度の微小管を無作為に選択し、カイモグラフを作成した。このカイモグラフ上で伸長/短縮の始点/終点を決定した。各状態の継続時間および微小管長変化を測定し、変化率を始点と終点の間の伸長/短縮速度として算出した。カタストロフ頻度は短縮イベントの数を伸長およびポーズ状態時間の総和で割って算出した。短縮から伸長/ポーズへの転換をレスキューとして、短縮状態時間に対するレスキューの頻度を算出した。微小管が5フレーム (15秒) 間、2ピクセル ($\sim 0.35 \mu\text{m}$) 伸長/短縮しなかった場合、この区間をポーズとして定義した。この定義は先行研究での*in vivo*のポーズを測定する際に用いたものと同様である (Li et al., 2011)。図4での解析では微小管が低速かつ継続的に伸長したためにポーズ状態の始点/終点を特定することができず、この状態をまとめて伸長状態とし、ポーズ状態を含めなかった。kinesin-13^{Klp10A}非存在下でのカタストロフ頻度は、微小管が観察領域を埋め尽くし、カイモグラフの作成が困難だったので、直接的に微小管プラス端を追跡して測定した。

データの表示

データの表示は (Li et al., 2012) に従った。要約すると、タンパク質の精製バッチの違いによるものか、実験日によって微小管の振る舞いに幾らかばらつきが観察された。このばらつきを調整するために、多くのグラフは同実験日の対照データに対するそれぞれの相対値で作成した。一方、それぞれの絶対値の平均についてはテーブルにまとめた。例えば、チューブリンのみの条件で、 a_1 、 a_2 、 a_3 ($\mu\text{m}/\text{min}$) という値を3回の独立の実験で得たとし、CLASP^{Mast/Orbit}を加えた条件で、 b_1 、 b_2 、 b_3 ($\mu\text{m}/\text{min}$) という値を得たとした時、図中での相対値は灰色で示したそれぞれ b_1/a_1 、 b_2/a_2 、 b_3/a_3 と、黒で示した平均値 $(b_1/a_1 + b_2/a_2 + b_3/a_3)/3$ となる。一方、テーブルでは、平均値 $(a_1+a_2+a_3)/3$ と $(b_1+b_2+b_3)/3$ をそれぞれ標準偏差を付けて示した。すべてのパラメータについて、3-4回の実験に対する独立両側スチューデントt検定によるp値をテーブルに示した。しかし、統計的有意差については、そもそも検定を適切行うためのデータ分布の正規性を検討するにはサンプル数が少なすぎ、議論できない。そのため取り扱いには注意が必要であるが、参考として表示する。伸長/短縮速度については、十分に大きい数の計測データが取得できたため、1回の実験それぞれについてMann-Whitney U検定によるp値を追加で示した。

細胞の培養と観察

EB1-GFP と mCherry-チューブリンを発現させた S2 細胞の培養と RNAi については先行研究に従った (Bettencourt-Dias and Goshima, 2009, Goshima et al., 2007)。細胞培養においてはシュナイダー培地 (Gibco) に 10% ウシ胎児血清と抗生物質を加えて用いた。観察の際は、細胞を 5 μL の 0.5 mg/mL concanavalin-A 溶液でコートしたガラスボトム 96 穴プレートに蒔き、24°C で 1 時間静置した。Klp61F RNAi の際には 5' UTR 領域を標的とした 2 重鎖 RNA (dsRNA) で 72 時間処理後、観察プレートに蒔いた。dsRNA 作製のための PCR プライマー配列は TATTTGCGCATTATTTTAAAATTG と CATATTGATCAATTGAAAC (Goshima and Vale, 2005) に T7 プロモーター配列 (TAATACGACTCACTATAGGG) を加えて用いた。*in vitro* 転写反応では、上記の PCR 産物を T7 RNA ポリメラーゼと 7.5 mM rNTPs を混合して、37°C で一晚 (~16 時間) 反応させた。dsRNA を完全にアニーリングさせるため、反応液はヒートブロックを用いて 95°C で 5 分間加熱した後、ブロックごと室温で徐々に冷ました。その後、24 穴プラスチックプレ

ートの S2 細胞を無血清培地に混合した 5 μg dsRNA で 50 分間処理した後、血清を加えて培養した。EB1-GFP の生細胞観察は 23-25°C でスピニングディスク型共焦点顕微鏡 (TE/Ti システム (Nikon)、EMCCD カメラ ImagEM (Hamamatsu)、100 \times 1.40 NA あるいは 100 \times 1.45 NA 対物レンズ、CSU-X1 共焦点ユニット (Yokogawa)、顕微鏡制御には Micromanager を使用) を用いて 3 秒ごとに撮影した。アクチン骨格が物理的に微小管伸長を阻害する可能性 (Li et al., 2011) を排除するため、細胞観察の前にアクチン阻害剤 latrunculin A 2.5 μM を加えた。Plk1^{Polo} 阻害実験の際には、細胞を溶媒である DMSO あるいは S2 細胞に効果的であることが示されている 1 μM BI 2536 で処理した (Januschke et al., 2013、Kachaner et al., 2014)。

Phos-tag SDS-PAGE、オートラジオグラフィー、イムノブロットィング

精製タンパク質の Plk1^{Polo} によるリン酸化は CLASP^{Mast/Orbit} を除いて Pho-tag SDS-PAGE を用いて検出した (Kinoshita et al., 2006)。phos-tag 分子はリン酸化された分子と相互作用し、SDS-PAGE において、移動度を小さくする。タンパク質のバンドの上方向へのシフトにより、リン酸化を検出する。反応液には 1mM ATP を加えた。EB1 には 8% アクリルアミドゲル、チューブリン、Sentin、kinesin-13^{Klp10A} には 5% ゲルを用いた。XMAP215^{Msp} の場合には、3% アクリルアミドとゲルの強度を補うための 0.5% アガロースを混合したものを用いた。アクリルアミドに結合した Phos-tag 分子は最終濃度 20 μM で用いた。原因は不明だが、GFP-CLASP^{Mast/Orbit} の場合にはゲルを調節しても明瞭なバンドを検出することはできなかった。そのため、CLASP^{Mast/Orbit} のリン酸化はオートラジオグラフィーにより検出した。113 nM Plk1^{Polo} (野生型あるいはキナーゼ不活性型)、と 1 μM His-CLASP^{Mast/Orbit} をリン酸化バッファー (MRB80/DTT、100 mM KCl、0.1 mM ATP (110 nM ATP-P³²を含む)、80 mM β -glycerophosphate) 中で混合し、24-25°C で 30 分間反応後、SDS-PAGE し、クマシー染色を行った。Cdk1 によるリン酸化はオートラジオグラフィーを用いて行ったリン酸化反応では、27 nM リコンビナント Cdk1-cyclin B を 2.1 μM EB1、1.6 μM チューブリン、1.7 μM Sentin、1.8 μM kinesin-13^{Klp10A}、1.2 μM CLASP^{Mast/Orbit}、2.2 μM XMAP215^{Msp} と混合した。S2 細胞抽出液のイムノブロットィングは以下の抗体、抗- α -チューブリン (DM1A; Sigma; 1:1000、マウス)、抗-CLASP^{Mast/Orbit} (1:300、ウサギ; Dr. Helder Maiato [University of Porto] より頂いた)、抗-EB1 (1:1000、ウサギ; Dr. Stephen Rogers

[University of North Carolina] より頂いた)、抗-Klp10A (1:300、ウサギ; Dr. David Sharp [Albert Einstein College of Medicine] から頂いた)、抗-Sentin (1:1000、ウサギ; (Li et al., 2011)で使用)、抗-XMAP215^{Msp} (1:500、ウサギ; Dr. Hiroyuki Ohkura [University of Edinburgh] から頂いた) を用いた。

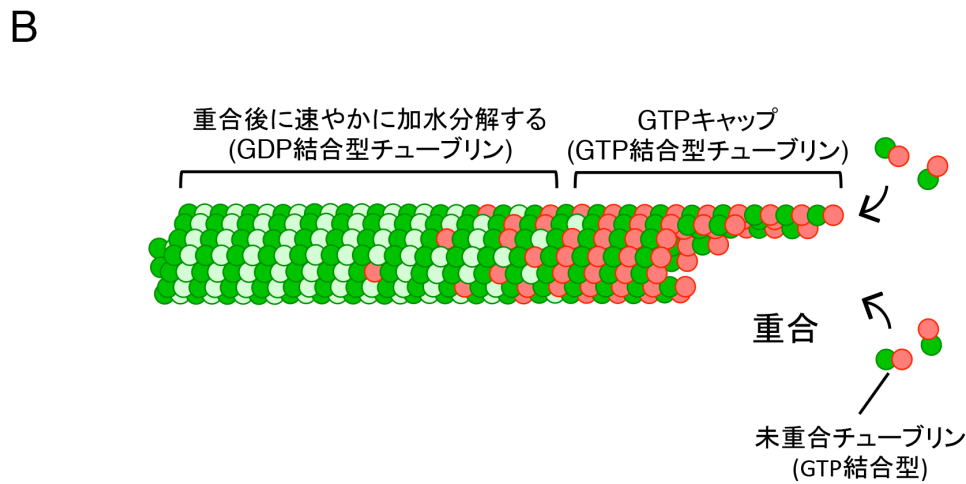
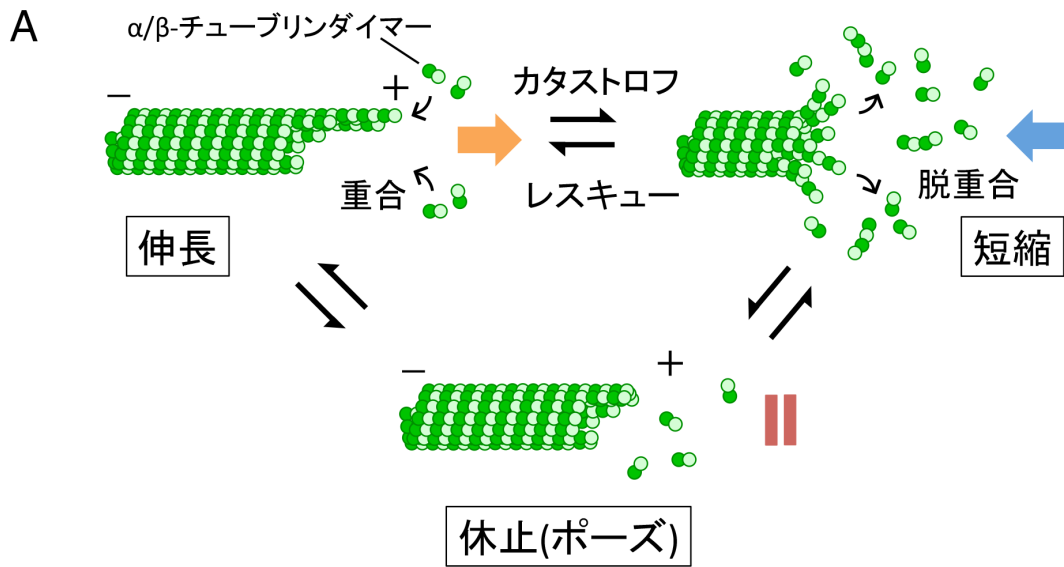


図 1. 微小管の重合動態

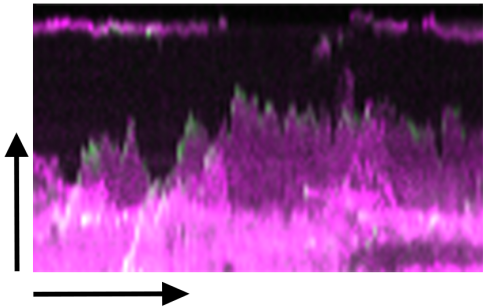
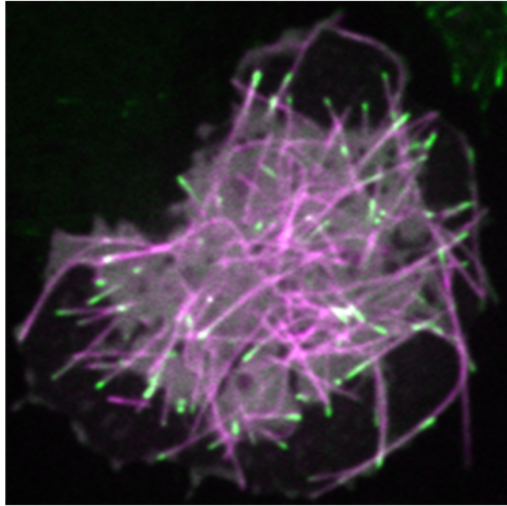
(A) 微小管は α/β -チューブリン二量体タンパク質を構成単位とし、13本のプロトフィラメントが環状につながった円筒状の構造である。微小管は α/β -チューブリン二量体が重合することで伸長し、脱重合することで短縮する。細胞内においては、顕著な伸長/短縮のないポーズ (休止) 状態も観察され、これら3つの状態を確率的に繰り返す。(B) 未重合チューブリンダイマー (濃緑: α -チューブリン、薄緑: β -チューブリン) は β -チューブリンが GTP 結合型となっている (赤: GTP 結合型 β -チューブリン)。微小管先端から重合した GTP 結合型チューブリンダイマーは GTPase 活性が亢進され、結合した GTP を GDP へ加水分解する。これにより重合する微小管先端にのみ GTP 結合型チューブリンダイマーで形成された領域が存在する。この領域を GTP キャップと呼ぶ。GTP キャップは微小管の先端を安定化する。GTP キャップが失われることでカタストロフが起こる。

図 2. 本研究で扱う 5 つの微小管調節因子

(A) 本研究で扱う 5 つの微小管調節タンパク質の主要なドメイン構造を示す。左側がアミノ末端、右側がカルボキシル末端である。

(B-F) 本研究で扱う 5 つの微小管調節因子の微小管動態への作用を示す。XMAP215 は 5 つのチューブリン結合ドメイン (TOG ドメイン) を持ち、チューブリンおよび微小管側面と結合し、チューブリンを局在化させることで重合を促進する。kinesin-13 はモータータンパク質である kinesin スーパーファミリーに属するタンパク質で、同様にチューブリンおよび微小管側面に結合するが、XMAP215 とは逆に脱重合を促進する。また、EB1 との結合モチーフを持つ。EB1 はアミノ末端 CH (calponin homology) ドメインで伸長中の微小管を認識して先端に集積する。カルボキシル末端領域では kinesin-13 や CLASP、Sentin の他にも多くのタンパク質と相互作用し、伸長中の微小管先端に局在化させる。Sentin は昆虫でのみ発見されているタンパク質で、EB1 および XMAP215^{MSPS} と結合しこれら 3 因子で相乗的に微小管の動的性質を亢進する。XMAP215^{MSPS} のどの部位が Sentin アミノ酸末端と結合するかは不明であり、図は便宜上のものである(図中※)。哺乳類における Slain1/2 の機能的ホモログであると考えられている。CLASP は XMAP215 と同様に TOG ドメインを持つタンパク質だが、その分子活性は異なることが知られている。また、分裂酵母ホモログ CLASP^{Clsl} においては短縮からの再伸長 (レスキュー) を誘導すると報告されているが、動物ホモログの活性は未知である。また、EB1 との結合モチーフを持つ。

間期



分裂期

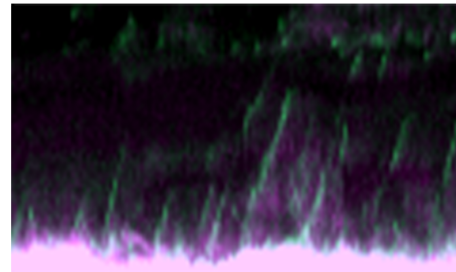
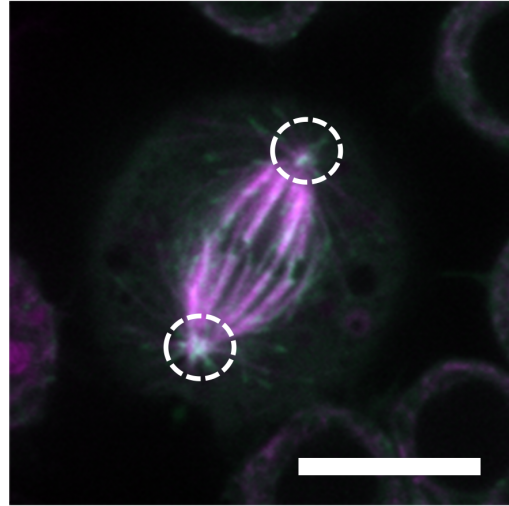


図 3. 間期から分裂期への微小管動態の転換

間期から分裂期へ移行すると、微小管は顕著に伸長／短縮し、より動的になることが知られている。間期微小管に比べて分裂期中心体 (点線円) から伸長する微小管は動的である。ショウジョウバエ S2 細胞において EB1-GFP (緑) / mCherry-チューブリン (マゼンタ) を発現し、微小管を可視化している。EB1-GFP は伸長中の微小管先端に局在する。細胞画像 (スケールバー : 10 μm)、カイモグラフ (縦矢印 : 5 μm 、横矢印 : 2 分)

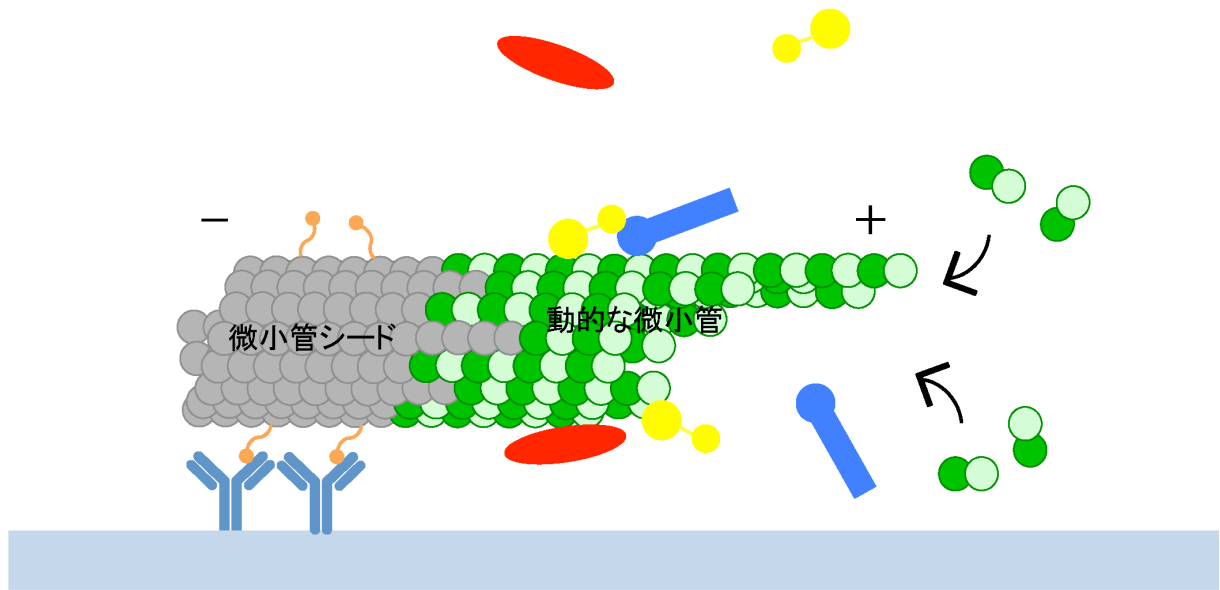


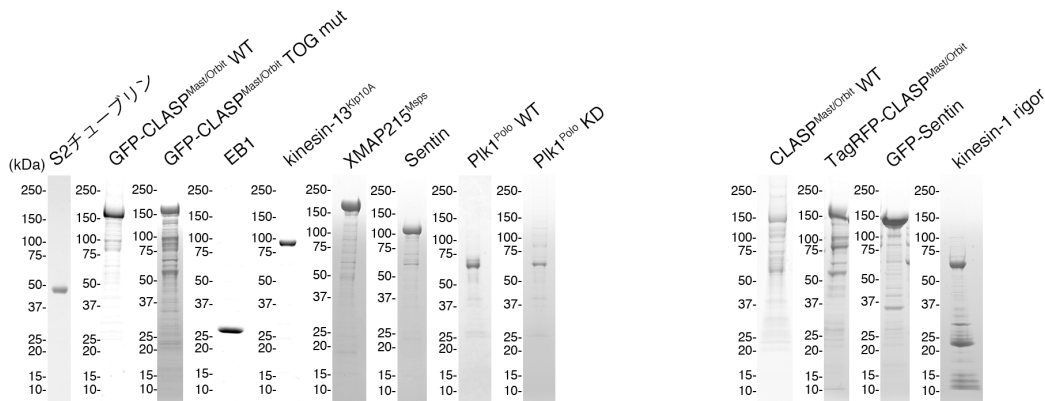
図 4. 本研究で用いた *in vitro* 微小管重合実験の模式図

GMPCPP (GTP アナログ) と共に重合させた安定化微小管 (微小管シード) をガラス表面に固定し、微小管シードから伸長する動的な微小管を全反射蛍光顕微鏡により観察する。緑：チューブリン、橙：ビオチン化、薄青：抗ビオチン抗体、赤／黄／青：リコンビナントタンパク質、灰：微小管シード

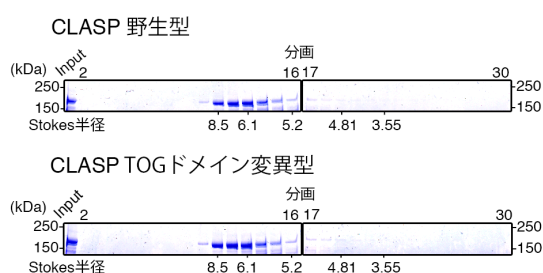
A

a. 微小管重合実験に用いたタンパク質

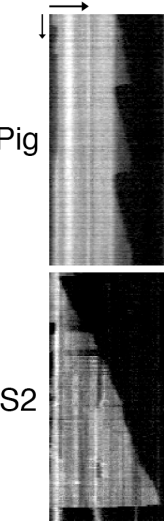
b. その他の実験に用いたタンパク質



B



C



D

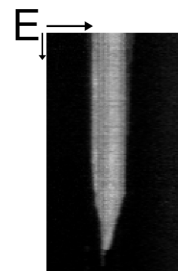
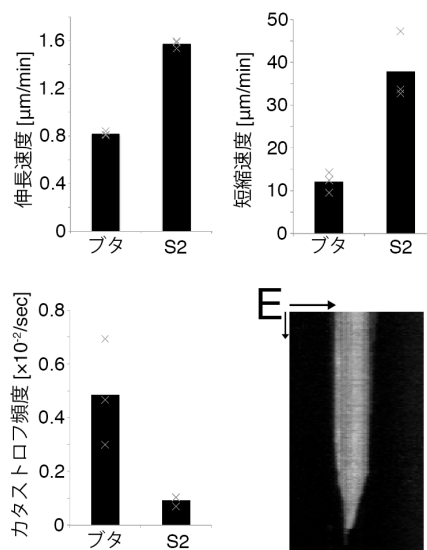


図 5. 本研究で用いたリコンビナントタンパク質とその活性、品質の確認

(A) 本研究で用いた精製後のリコンビナントタンパク質のクマシー染色像。(B) GFP-CLASP^{Mast/Orbit} (野生型と TOG ドメイン変異型) のゲル濾過クロマトグラフィー後サンプルのクマシー染色像。Stokes 半径を見積もるために分子サイズマーカー (thyroglobulin, ferritin, catalase, aldolase, BSA) を用いた。Input : His タグ精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーに用いたサンプル (C) ブタとあるいは S2 由来のチューブリンからなる微小管の重合/脱重合を示すカイモグラフ。横矢印 : 5 μm、縦矢印 : 1 分 (D) 15 μM ブタあるいは S2 由来チューブリン存在下の微小管重合の動態パラメータ。実験ごとの平均値を灰色の点で示し、全実験の平均値を黒の棒グラフで示す (実験数=3)。このグラフにおいては実測値を示す。ポーズとレスキューはこれらの条件ではほとんど観察されなかった。(E) kinesin-13^{Klp10A} が微小管シードを脱重合する様子を示すカイモグラフ。100 nM kinesin-13^{Klp10A} を GMPCPP 微小管シードおよび 10 μM taxol と混合した。横矢印 : 5 μm、縦矢印 : 1 分

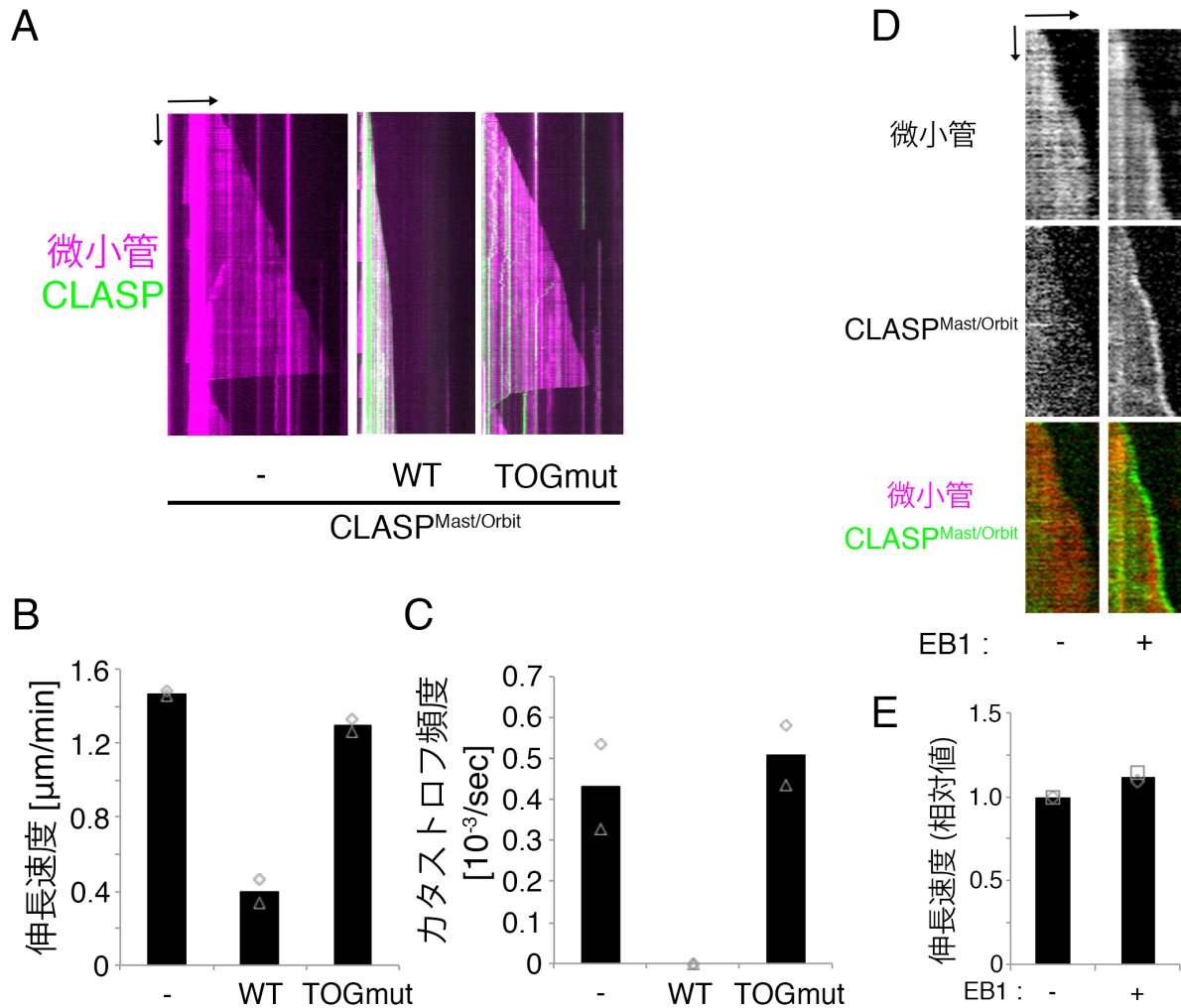


図 6. CLASP^{Mast/Orbit} は *in vitro* において伸長を遅くし、カタストロフを抑制する

(A) GFP-CLASP^{Mast/Orbit} (野生型 (WT) および TOG ドメイン変異型 (TOGmut)) と微小管 (10 μM S2 チューブリン) を混合した。CLASP は微小管側面に局在し、伸長速度を低下させ、カタストロフ頻度を減少させた。横矢印: 10 μm 、縦矢印: 2 分 (B、C) 45 nM CLASP^{Mast/Orbit} (野生型 (WT) および TOG ドメイン変異型 (TOGmut)) と 10 μM S2 チューブリン存在下での微小管伸長速度とカタストロフ頻度。実験ごとの平均値を灰色の点で示し、全実験の平均値を黒の棒グラフで示す (実験数=2)。このグラフにおいては実測値を示す (微小管数 = 15-22)。(D) GFP-CLASP^{Mast/Orbit} の EB1 依存的な微小管先端集積を示すカイモグラフ。400 nM EB1 と 100 nM CLASP^{Mast/Orbit} を 30 μM ブタチューブリンと混合した。横矢印: 5 μm 、縦矢印: 1 分 (E) EB1 存在下/非存在下の微小管伸長速度の比較 (実験数 = 2)。この条件ではカタストロフはほとんど完全に抑制された。

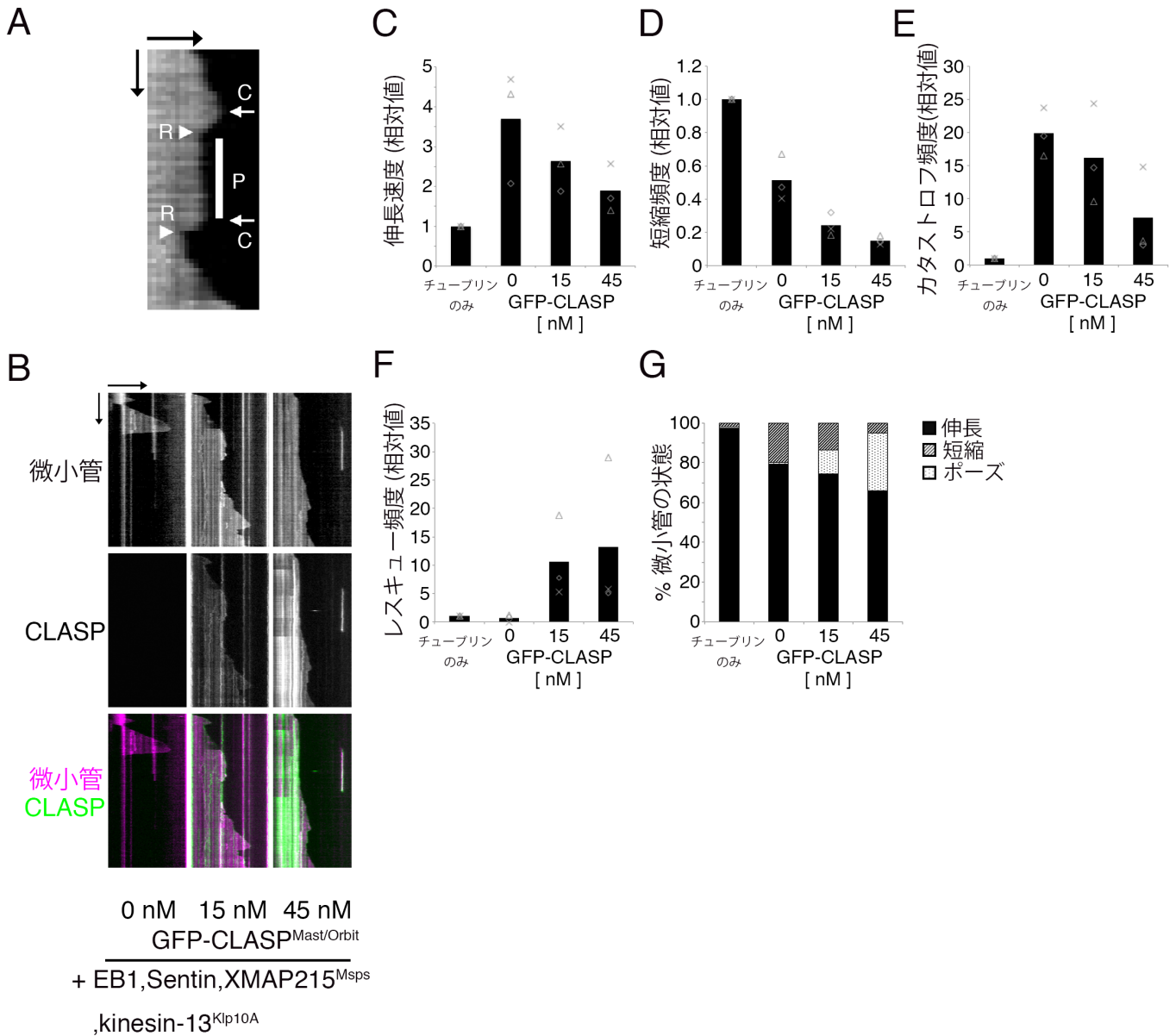


図 7.5 因子による動的微小管の再構成

(A) カイモグラフ中で判定したポーズ (P) の例。カタストロフ (C) とレスキュー (R) イベントも同様に示す。横矢印: 2 μ m、縦矢印: 30 秒。(B-G) 15 μ M S2 tubulin、XMAP215^{MspS}、EB1、Sentin、kinesin-13^{Klp10A} 存在下での 0-45 nM GFP-CLASP^{Mast/Orbit} それぞれのカイモグラフと微小管動態パラメータ。実験ごとの平均値を灰色の点で示し、全実験の平均値を黒の棒グラフで示す (実験数=3)。このグラフにおいては相対値を示す。実測値は表 1 に示す。横矢印: 10 μ m、縦矢印: 2 分

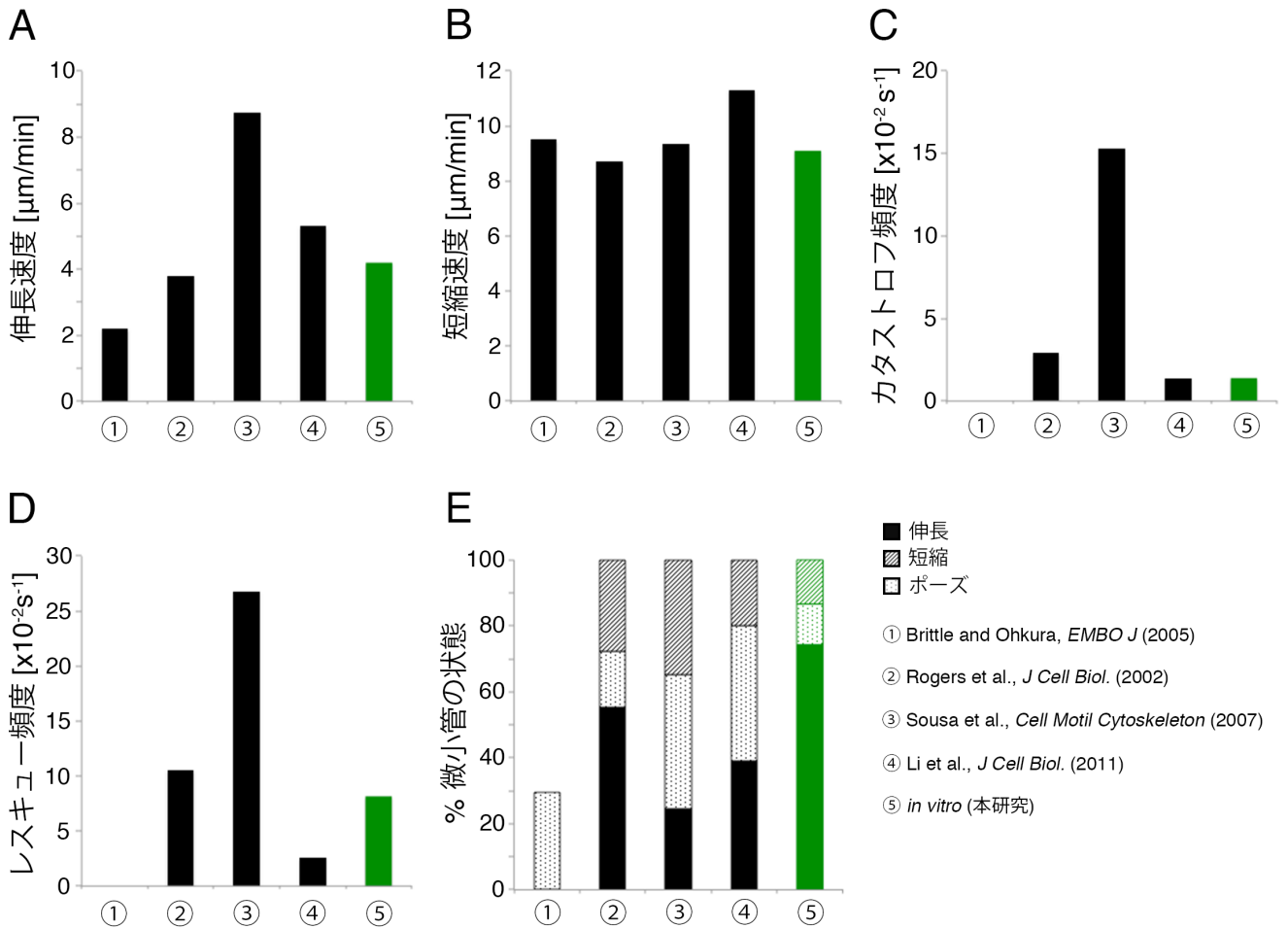


図 8. *in vitro* と *in vivo* の微小管動態パラメータの比較

4つの先行研究における間期 S2 細胞中の細胞質微小管および本研究の *in vitro* 実験の微小管動態パラメータ (*in vitro* データは図 5、15 nM CLASP^{Mast/Orbit} の条件)。

先行研究の *in vivo* データではイベント数を全解析時間で割ってカタストロフおよびレスキュー頻度を算出している。本研究ではイベント数を伸長/ポーズ時間 (カタストロフ) あるいは短縮時間 (レスキュー) で算出しているため、*in vivo* データもこの定義に合わせて再計算している。

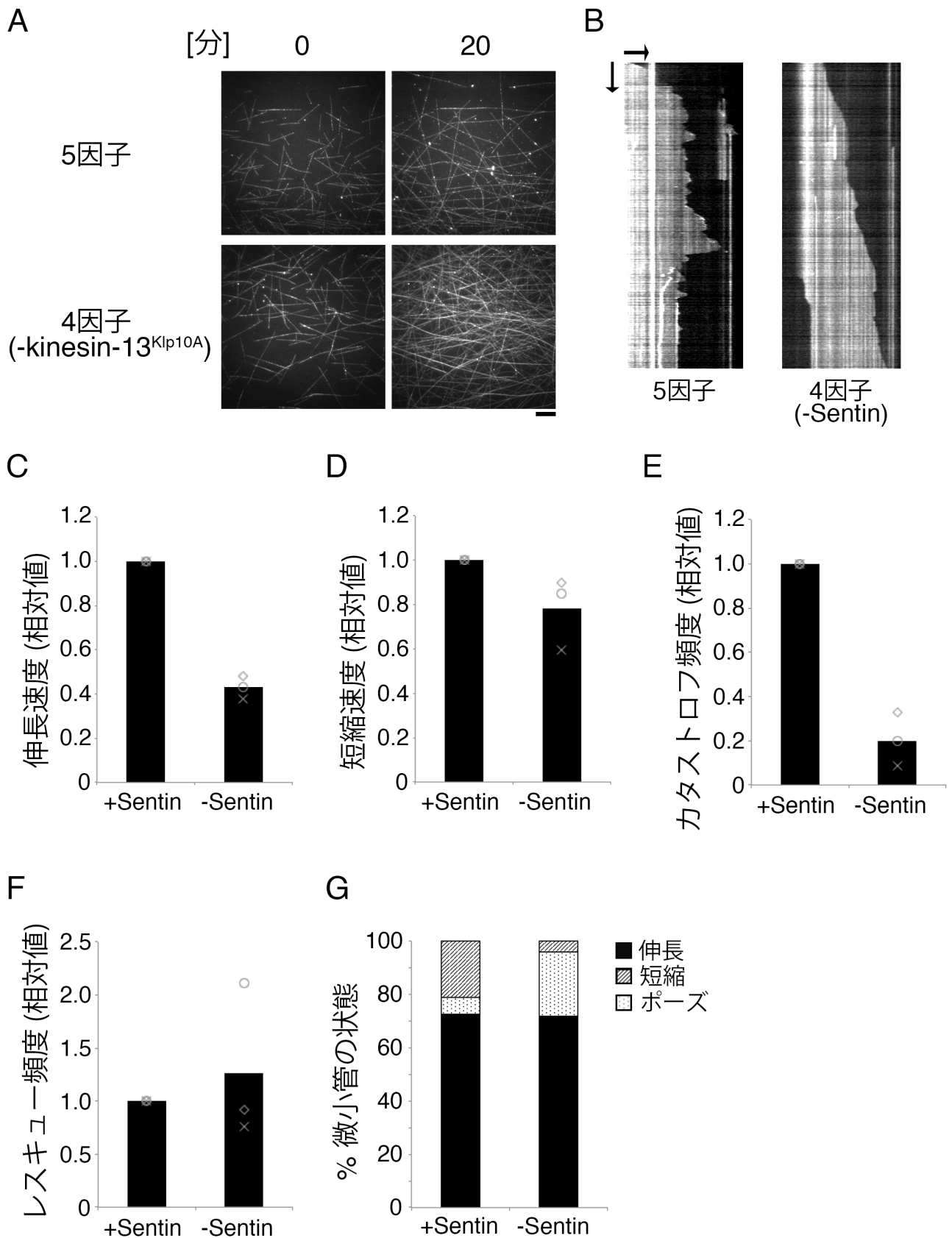


図 9. 微小管重合反応における Sentin、kinesin-13^{Klp10A} の除去の影響

(A) kinesin-13^{Klp10A} 非存在下ではカタストロフ頻度の減少により劇的に微小管が増加した。他の 4 因子 (EB1、XMAP215^{Msp}, Sentin、15 nM CLASP^{Mast/Orbit}) と 15 μ M S2 チューブリンを混合し、20 分観察した。スケールバー: 10 μ m。 (B-G) Sentin 存在下、非存在下における微小管重合動態。他の 4 因子 (EB1、XMAP215^{Msp}, kinesin-13^{Klp10A}、15 nM CLASP^{Mast/Orbit}) と 15 μ M S2 チューブリンを混合した (実験数=3)。このグラフにおいては相対値を示す。実測値は表 2 に示す。横矢印: 5 μ m、縦矢印: 2 分

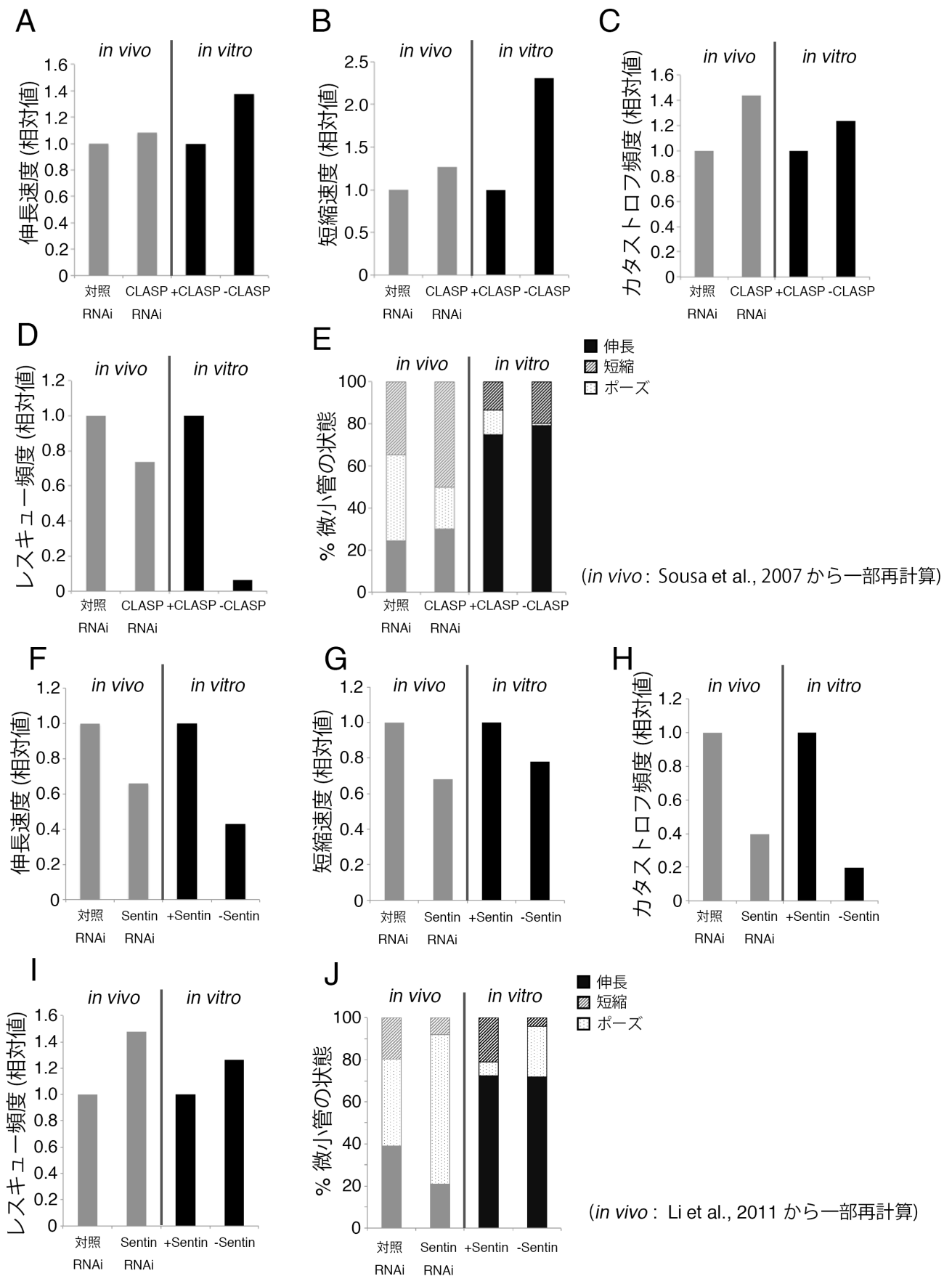


図 10. *in vitro* と *in vivo* での CLASP^{Mast/Orbit} と Sentin の微小管動態への影響の比較

(A-E) *in vivo* (未処理対照 vs. CLASP^{Mast/Orbit} RNAi (72 時間、(Sousa et al., 2007)) と *in vitro* (5 因子 vs. CLASP^{Mast/Orbit} を除いた 4 因子の条件) の動態パラメータの変化の比較。(F-J) *in vivo* (未処理対照 vs. Sentin RNAi、(Li et al., 2011)) と *in vitro* (5 因子 vs. Sentin を除いた 4 因子の条件) の動態パラメータの変化の比較。先行研究の *in vivo* データではイベント数を全解析時間で割ってカタストロフおよびレスキュー頻度を算出している。本研究ではイベント数を伸長/ポーズ時間 (カタストロフ) あるいは短縮時間 (レスキュー) で算出しているため、*in vivo* データもこの定義に合わせて再計算している。

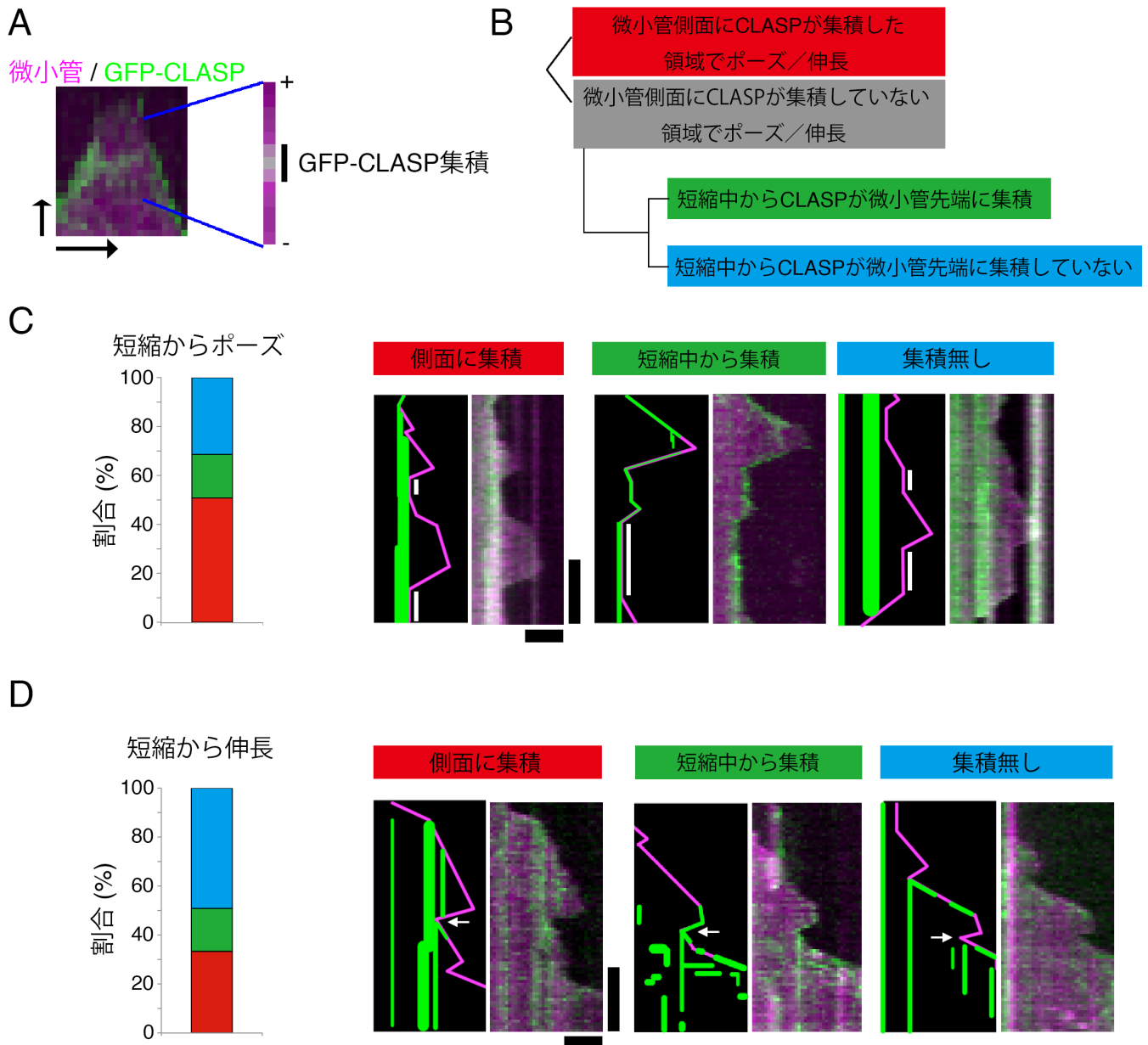


図 11. ポーズは CLASP^{Mast/Orbit} の集積点において高頻度で引き起こされた

(A) 微小管上の GFP-CLASP^{Mast/Orbit} の分布。短縮し始めた所の微小管に注目した。GFP-CLASP^{Mast/Orbit} が集積している領域を示した。横矢印：30 秒、縦矢印：1 μm (B-D) 短縮から伸長 (B; n = 51) /ポーズ (C; n = 63) への転換点における GFP-CLASP^{Mast/Orbit} の集積状態で場合分けを行った。また、カイモグラフと模式図を示す。実験データは図 5 (短縮から伸長) あるいは図 12 (短縮からポーズ) のものを用いた。ポーズ状態を白いバーで、再伸長時のレスキュー点を白い矢印で示す。横矢印：2 μm 、縦矢印：1 分

GFP-Sentin

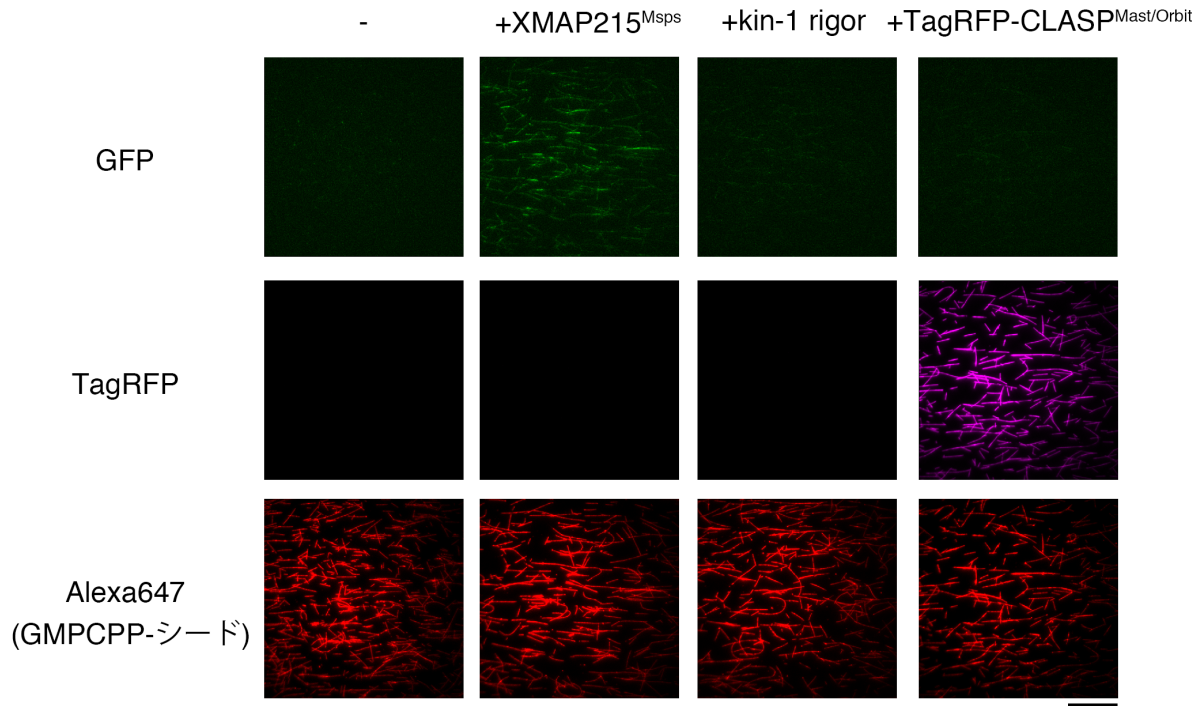


図 12. *in vitro* において CLASP^{Mast/Orbit} は Sentin を微小管側面に局在化させない
 TagRFP-CLASP^{Mast/Orbit} (45 nM) を GFP-Sentin (10 nM) および微小管シードと混合した。TagRFP-CLASP^{Mast/Orbit} は微小管側面に局在したが、GFP-Sentin の局在シグナルは観察されなかった。無関係な微小管結合タンパク質 (kinesin-1 rigor (非歩行、微小管結合) [560 a.a.] (Rice et al., 1999)) を陰性対照、Sentin に直接結合する XMAP215^{MspS} (Li et al., 2012) を陽性対照として用いた (それぞれ 100 nM)。スケールバー：20 μm

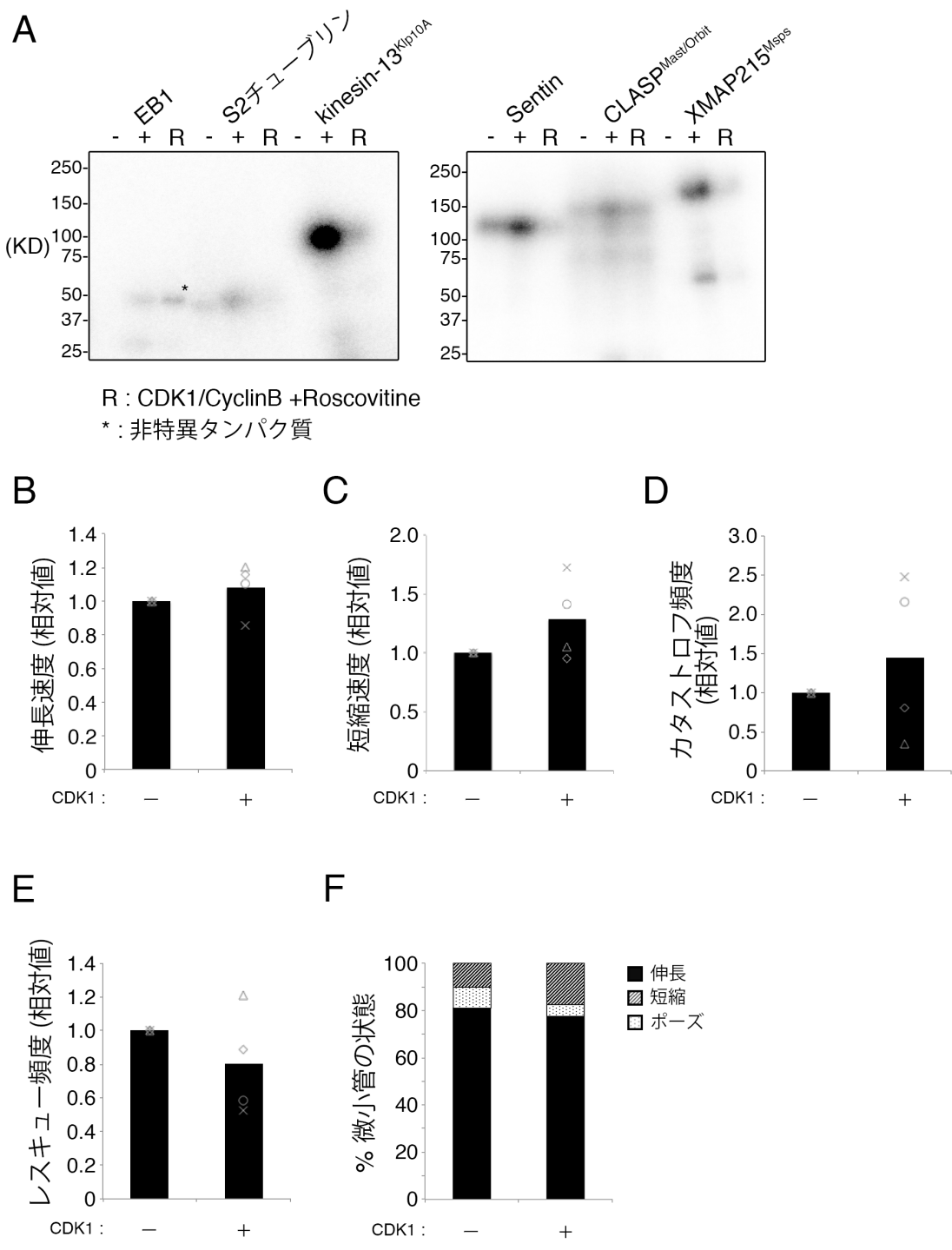


図 13. *in vitro* での微小管動態に対する Cdk1-cyclinB の影響

(A) オートラジオグラフィーにより Cdk1-cyclinB 複合体が XMAP215^{Msp5} と kinesin-13^{Klp10A} をリン酸化することが示された (バンドシグナルがそれぞれ 4.4 倍と 16 倍上昇)。アスタリスクは EB1 精製後の非特異タンパク質のリン酸化を示す (EB1 タンパク質の大きさは 30kDa、図 3 を参照)。(B-F) 5 因子による微小管動態再構成における Cdk1-cyclinB の影響。微小管動態のパラメータ。条件は 15 (×) あるいは 10 μM (その他) S2 チューブリン、XMAP215^{Msp5}、EB1、Sentin、15 nM CLASP^{Mast/Orbit}、kinesin-13^{Klp10A}、および 5 nM Cdk1-cyclinB (実験数 = 3 (-)/4 (+))。ここでは相対値とし、実測値は表 3 に示す。実験ごとの平均値を灰色の点で示し、全実験の平均値を黒の棒グラフで示す。‘Cdk1-’の 4 回全ての実験ではリコンビナント Cdk1 と 50 μM roscovitine (Cdk1 阻害剤) を共に加えた (roscovitine がこの濃度で Cdk1 のキナーゼ活性を阻害することは確認済み)。「Cdk+」条件のうち、2 回の実験 (×と△) では roscovitine の代わりに DMSO を加えた。他の 2 回の実験 (○と◇) ではタンパク質を Cdk1 と 15 分間混合反応させた後、roscovitine を加えた。本実験ではバッファー中のグリセロール濃度が高く、微小管が重合しやすかった (Cdk1 の保存バッファーに高濃度のグリセロールが含まれるため)。そのため、カタストロフは他の実験に比べ少なく、roscovitine 有無でのカタストロフ頻度の差の解釈には注意が必要である。

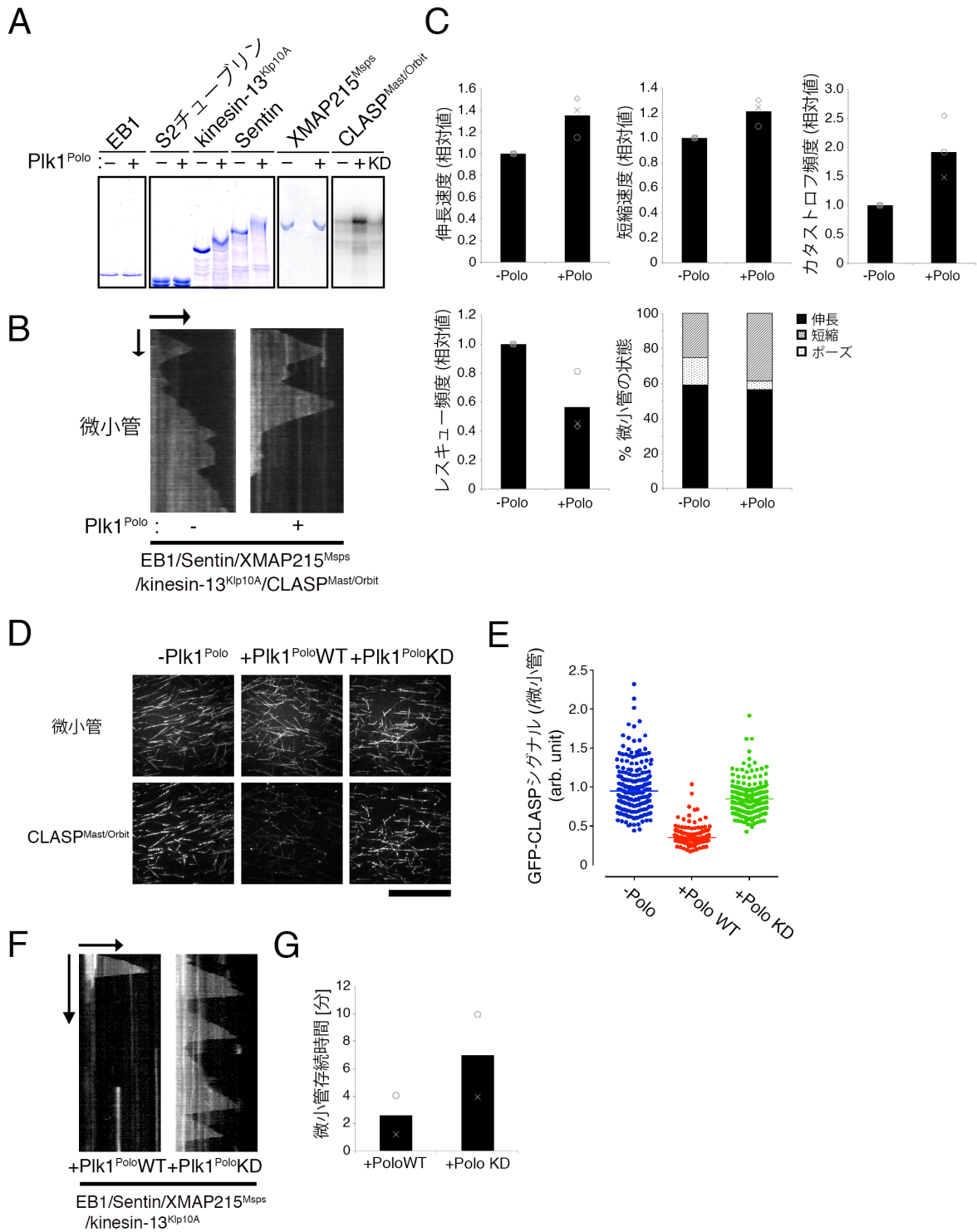


図 14. $PIK1^{Polo}$ によるリン酸化は *in vitro* での微小管の動的性質を亢進させる

(A) オートラジオグラフィーと Phos-tag ゲル電気泳動により、 $PIK1^{Polo}$ による $CLASP^{Mast/Orbit}$ 、 $kinesin-13^{Klp10A}$ 、 $Sentin$ のリン酸化が示された。Phos-tag ゲルのマーカーは分離ゲルの上端からの距離を示す。(B、C) 5つの微小管動態調節因子を $PIK1^{Polo}$ により処理することで微小管がより動的になることを示すカイモグラフと動態パラメータ (10 μM S2 チューブリン、45 nM $CLASP^{Mast/Orbit}$ 、および他の4因子は規定の濃度)。実験ごとの平均値を灰色の点で示し、全実験の平均値を黒の棒グラフで示す (実験数=3)。このグラフでは相対値を示す。実測値は表4に示す。横矢印: 5 μm、縦矢印: 1分 (D、E) 野生型 $PIK1^{Polo}$ (WT) と混合反応に $GFP-CLASP^{Mast/Orbit}$ (5 nM) の微小管側面への局在が顕著に減少し (100 nM $PIK1^{Polo}$ 、 $p < 0.0001$, Mann-Whitney U 検定)、キナーゼ不活性型変異 $PIK1^{Polo}$ (kinase-dead, KD) にはその効果は少なかった (測定数 = 227 [-Polo], 212 [+PoloWT], 214 [+PoloKD])。スケールバー: 50 μm (F、G) 野生型 $PIK1^{Polo}$ と混合反応することで $kinesin-13^{Klp10A}$ の微小管脱重合活性が更新された (実験数 = 2)。この反応には4因子 (EB1、 $XMAP215^{Msp}$ 、 $Sentin$ 、10 nM $kinesin-13^{Klp10A}$) と 15 μM S2 チューブリンを加えた。微小管シードの脱重合はカイモグラフによって評価した。観察開始時点で既にいくらか微小管シードが脱重合していたので、野生型 $PIK1^{Polo}$ のシード存続期間は過大評価の可能性がある。横矢印: 10 μm、縦矢印: 5分

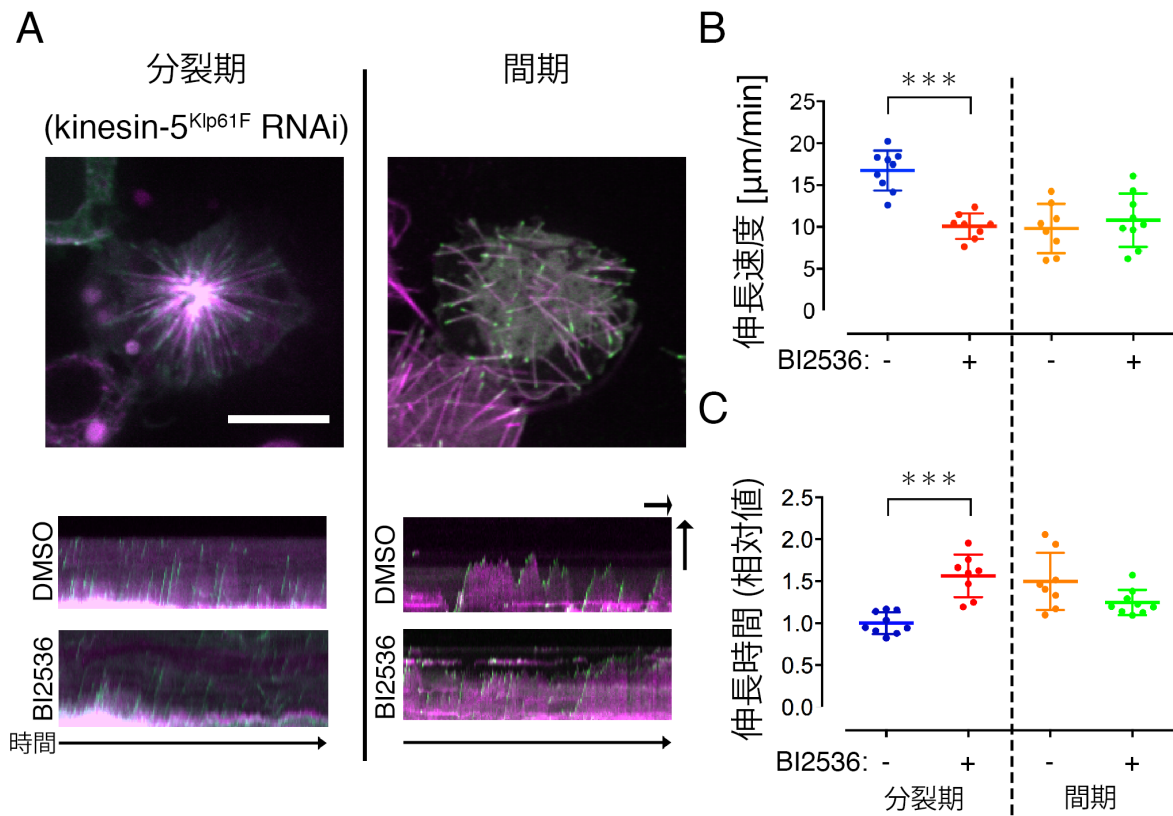


図 15. Plk1^{Polo} の阻害は *in vivo* の微小管の動的性質を減少させる

(A–C) 分裂期での Plk1^{Polo} の阻害は微小管伸長速度とカタストロフ頻度を減少させた。同様の変化は間期では観察されなかった。Klp61F (kinesin-5) RNAi による単極性紡錘体の条件下で分裂期星状体微小管を解析した (100–200 コメット/細胞、各条件で 8–9 細胞)。各点は 1 細胞の平均値を示す。アスタリスクは統計的有意差を示す ($p < 0.0001$ (Turkey's multiple comparisons test)、データ分布の正規性は D'Agostino-pearson omnibus normality test と Shapiro-Wilk normality test により確認)。エラーバーは標準偏差を示す。細胞画像スケールバー: 10 μm 、カイモグラフ横矢印: 1 分、縦矢印: 5 μm

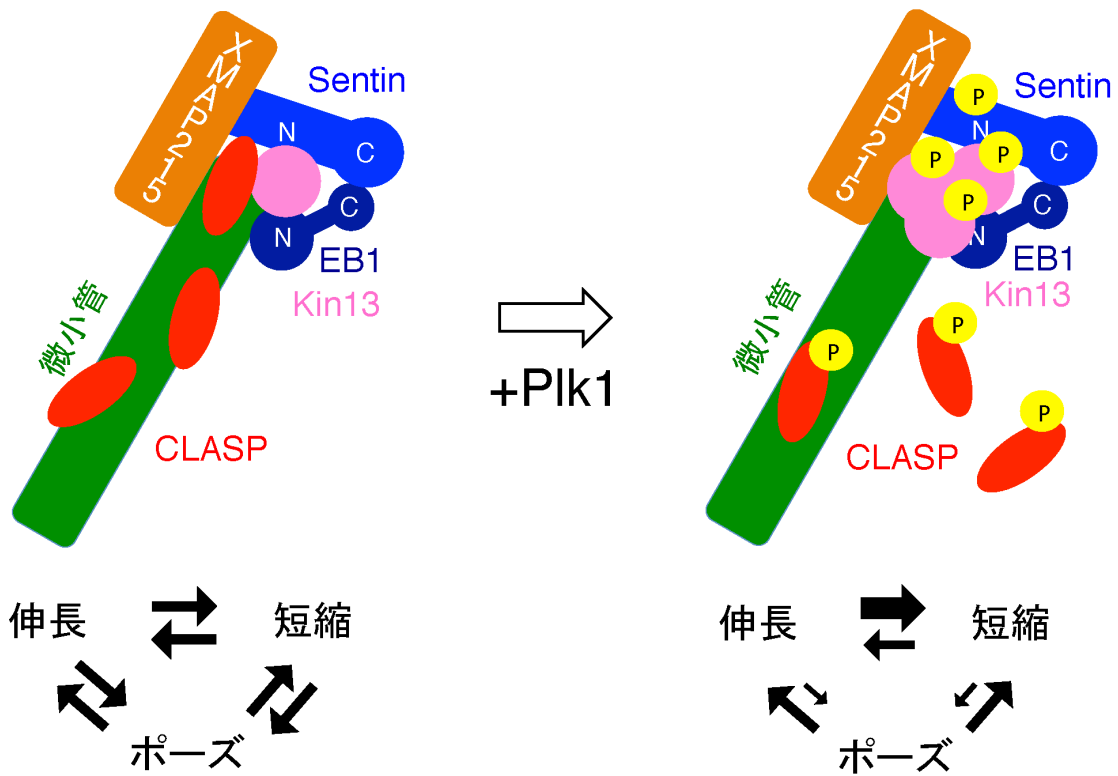


図 16. 本研究により再構成された微小管動態の模式図

本研究により制御を含む微小管重合動態の再構成が達成された。5 因とチューブリンを混合することで 3 状態のサイクルが観察された。ここに活性型 Plk1 キナーゼを加える (P:リン酸化) ことで微小管の動的性質が上昇し、ポーズがほとんど観察されなくなった。

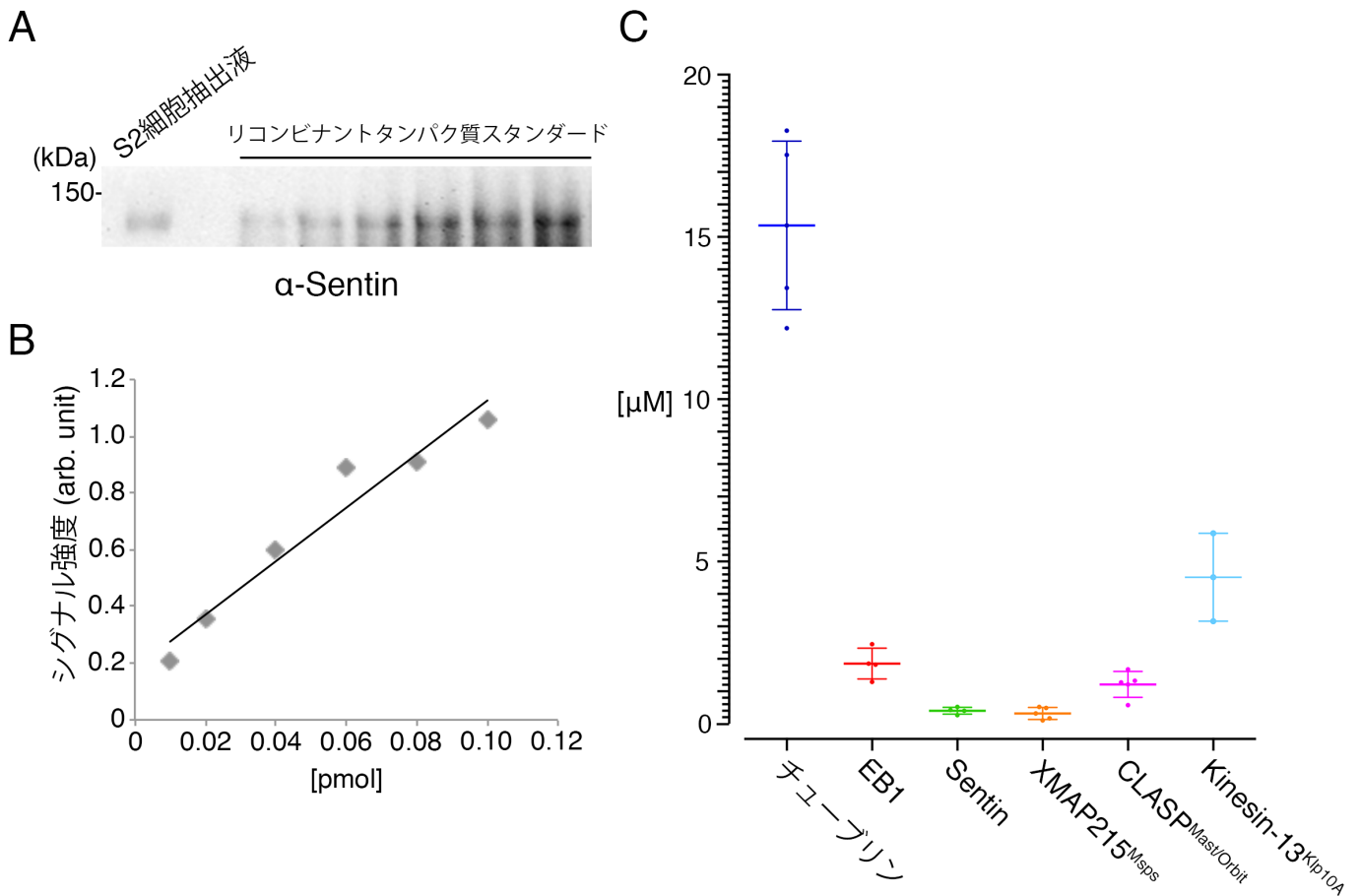


図 17. 細胞内のタンパク質濃度の推定

(A、B) 定量的イムノブロッティングの例。この場合には、 2×10^4 S2 細胞分の抽出液および 5-50 fmol のリコンビナント His-Sentin を電気泳動し、抗 Sentin ポリクローナル抗体を用いてイムノブロッティングを行った。それぞれのバンドから Sentin タンパクに由来するシグナル強度を測定し、表示した。(C) S2 細胞質のおおよその容量 (球形近似した核容量 [直径 7.5 μm] は同じく球形近似した S2 細胞容量 [直径 11.8 μm] から除いた) を用いて、細胞内のタンパク質濃度を概算した。実験は 2-3 回行い、1 実験で複数バンドのシグナル強度を測定した (グラフ中の点はそれぞれの測定値を示す)。その他、平均値と標準偏差も示す。測定数: 5 (チューブリン)、4 (EB1)、4 (Sentin)、5 (XMAP215^{Msp})、5 (CLASP^{Mast/Orbit})、3 (kinesin-13^{Klp10A})。

表

表 1.5 因子による *in vitro* 微小管動態再構成の動態パラメータ (グラフは図 5 を参照)

条件	CLASP 濃度	N	伸長速度	短縮速度	カタストロフ 頻度	レスキュー頻度
	(nM)		($\mu\text{m}/\text{min}$)	($\mu\text{m}/\text{min}$)	($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)	($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)
- (チューブリン のみ)	0	3	1.6 ± 0.1 (60)	37.9 ± 8.2 (30)	0.9 ± 0.2 (31)	10.5 ± 6.1 (6)
+EB1/Sentin/ Mmps/Klp10A/ CLASP	0 15 45	3 3 3	5.8 ± 2.2 (88) 4.2 ± 1.3 (260) 3.0 ± 1.0 (166)	19.0 ± 3.6 (86) 9.1 ± 2.5 (219) 5.6 ± 0.9 (88)	17.7 ± 2.0 (86) 13.9 ± 3.6 (217) 5.7 ± 3.9 (86)	5.3 ± 5.8 (7) 81.6 ± 11.2 (211) 86.1 ± 23.9 (87)
P 値			0.116 (n = 3)	0.003 (n = 3)	0.009 (n = 3)	0.005 (n = 3)
(CLASP 45 nM vs. 0 nM)			0.002 (実験1) < 10^{-4} (実験2) < 10^{-4} (実験 3)	< 10^{-4} (実験1) < 10^{-4} (実験2) < 10^{-4} (実験 3)		

平均値 \pm 標準偏差 (N、n:実験数、それ以外はイベント数)

表 2. ±Sentin での *in vitro* 微小管動態パラメータ(グラフは図 7 を参照)

条件	N	伸長速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)	短縮速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)	カタストロフ頻度 ($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)	レスキュー頻度 ($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)
+Sentin	3	4.7 ± 0.8 (283)	8.0 ± 1.7 (239)	24.0 ± 10.2 (227)	85.7 ± 32.9 (232)
-Sentin	3	2.0 ± 0.4 (179)	6.1 ± 1.5 (92)	4.4 ± 2.3 (85)	95.0 ± 26.1 (86)
P 値		0.006 (n = 3) 10^{-4} (実験1) 10^{-4} (実験2) 10^{-4} (実験 3)	0.227 (n = 3) 0.062 (実験1) 0.001 (実験2) 0.040 (実験 3)	0.032 (n = 3)	0.719 (n = 3)

平均値 ± 標準偏差 (N、n: 実験数、それ以外はイベント数)

表 3. \pm Cdk1 での *in vitro* 微小管動態パラメータ(グラフは図 11 を参照)

条件	N	伸長速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)	短縮速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)	カタストロフ頻度 ($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)	レスキュー頻度 ($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)
-Cdk1	3	4.7 \pm 2.0 (181)	4.9 \pm 0.7 (135)	9.7 \pm 4.6 (120)	74.8 \pm 18.4 (135)
+Cdk1	4	5.0 \pm 1.8 (251)	6.2 \pm 1.1 (184)	12.4 \pm 6.9 (161)	57.8 \pm 17.6 (184)
P 値		0.73 (n = 3, 4)	0.13 (n = 3, 4)	0.63 (n = 3, 4)	0.38 (n = 3, 4)
		<10 ⁻⁴ (実験1)	0.307 [#] (実験1)		
		0.085* (実験2)	0.007 (実験2)		
		0.011 (実験 3)	0.625 (実験 3)		
		0.102 (実験4)	0.001 (実験4)		

平均値 \pm 標準偏差 (N、n:実験数、それ以外はイベント数)

*この実験では Cdk1 処理により伸長速度が低下した。

#この実験では Cdk1 処理により短縮速度が低下した。

表 4. \pm Plk1^{Polo} での *in vitro* 微小管動態パラメータ(グラフは図 12 を参照)

条件	N	伸長速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)	短縮速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)	カタストロフ頻度 ($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)	レスキュー頻度 ($\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$)
-Polo	3	3.1 \pm 0.2 (314)	5.5 \pm 0.1 (289)	19.6 \pm 5.9 (241)	45.8 \pm 9.3 (290)
+Polo	3	4.2 \pm 0.5 (191)	6.7 \pm 0.6 (190)	36.0 \pm 8.0 (86)	27.1 \pm 15.5 (186)
P 値		0.032 (n = 3)	0.027 (n = 3)	0.046 (n = 3)	0.147 (n = 3)
		0.001 (実験1)	0.016 (実験1)		
		<10 ⁻⁴ (実験2)	0.002 (実験2)		
		0.093 (実験 3)	0.127 (実験 3)		

平均値 \pm 標準偏差 (N、n:実験数、それ以外はイベント数)

参考文献

- Akhmanova, A., C.C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B.M. Burgering, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, and N. Galjart. 2001. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*. 104:923-935.
- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:309-322.
- Al-Bassam, J., and F. Chang. 2011. Regulation of microtubule dynamics by TOG-domain proteins XMAP215/Dis1 and CLASP. *Trends Cell Biol*. 21:604-614.
- Al-Bassam, J., H. Kim, G. Brouhard, A. van Oijen, S.C. Harrison, and F. Chang. 2010. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev Cell*. 19:245-258.
- Bayley, P.M. 1990. What Makes Microtubules Dynamic. *Journal of cell science*. 95:329-334.
- Belmont, L.D., A.A. Hyman, K.E. Sawin, and T.J. Mitchison. 1990. Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell*. 62:579-589.
- 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.
- Bieling, P., L. Laan, H. Schek, E.L. Munteanu, L. Sandblad, M. Dogterom, D. Brunner, and T. Surrey. 2007. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature*. 450:1100-1105.
- Bieling, P., I.A. Telley, C. Hentrich, J. Piehler, and T. Surrey. 2010. Fluorescence microscopy assays on chemically functionalized surfaces for quantitative imaging of microtubule, motor, and +TIP dynamics. *Methods Cell Biol*. 95:555-580.
- Brittle, A.L., and H. Ohkura. 2005. Mini spindles, the XMAP215 homologue, suppresses pausing of interphase microtubules in Drosophila. *EMBO J*. 24:1387-1396.

- Brouhard, G.J., J.H. Stear, T.L. Noetzel, J. Al-Bassam, K. Kinoshita, S.C. Harrison, J. Howard, and A.A. Hyman. 2008. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell*. 132:79-88.
- Desai, A., S. Verma, T.J. Mitchison, and C.E. Walczak. 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*. 96:69-78.
- Dragestein, K.A., W.A. van Cappellen, J. van Haren, G.D. Tsibidis, A. Akhmanova, T.A. Knoch, F. Grosveld, and N. Galjart. 2008. Dynamic behavior of GFP-CLIP-170 reveals fast protein turnover on microtubule plus ends. *The Journal of cell biology*. 180:729-737.
- Drechsel, D.N., and M.W. Kirschner. 1994. The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Current biology : CB*. 4:1053-1061.
- Garner, E.C., C.S. Campbell, D.B. Weibel, and R.D. Mullins. 2007. Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science*. 315:1270-1274.
- Gell, C., V. Bormuth, G.J. Brouhard, D.N. Cohen, S. Diez, C.T. Friel, J. Helenius, B. Nitsche, H. Petzold, J. Ribbe, E. Schaffer, J.H. Stear, A. Trushko, V. Varga, P.O. Widlund, M. Zanic, and J. Howard. 2010. Microtubule dynamics reconstituted in vitro and imaged by single-molecule fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol*. 95:221-245.
- Goshima, G. 2011. Identification of a TPX2-like microtubule-associated protein in *Drosophila*. *PloS one*. 6:e28120.
- Goshima, G., and J.M. Scholey. 2010. Control of mitotic spindle length. *Annual review of cell and developmental biology*. 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. 2005. Length

- control of the metaphase spindle. *Current biology : CB*. 15:1979-1988.
- Hayashi, I., and M. Ikura. 2003. Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *The Journal of biological chemistry*. 278:36430-36434.
- Honnappa, S., S.M. Gouveia, A. Weisbrich, F.F. Damberger, N.S. Bhavesh, H. Jawhari, I. Grigoriev, F.J. van Rijssel, R.M. Buey, A. Lawera, I. Jelesarov, F.K. Winkler, K. Wuthrich, A. Akhmanova, and M.O. Steinmetz. 2009. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell*. 138:366-376.
- Honnappa, S., O. Okhrimenko, R. Jaussi, H. Jawhari, I. Jelesarov, F.K. Winkler, and M.O. Steinmetz. 2006. Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Mol Cell*. 23:663-671.
- Horio, T., and H. Hotani. 1986. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature*. 321:605-607.
- Howard, J., and A.A. Hyman. 2007. Microtubule polymerases and depolymerases. *Current opinion in cell biology*. 19:31-35.
- Howard, J., and A.A. Hyman. 2009. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:569-574.
- Hu, Z., Y. Liang, D. Meng, L. Wang, and J. Pan. 2015. Microtubule-depolymerizing kinesins in the regulation of assembly, disassembly, and length of cilia and flagella. *Int Rev Cell Mol Biol*. 317:241-265.
- Hughes, J.R., A.M. Meireles, K.H. Fisher, A. Garcia, P.R. Antrobus, A. Wainman, N. Zitzmann, C. Deane, H. Ohkura, and J.G. Wakefield. 2008. A microtubule interactome: complexes with roles in cell cycle and mitosis. *PLoS biology*. 6:e98.
- Jang, C.Y., J.A. Coppinger, A. Seki, J.R. Yates, 3rd, and G. Fang. 2009. Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. *J Cell Sci*. 122:1334-1341.
- Januschke, J., J. Reina, S. Llamazares, T. Bertran, F. Rossi, J. Roig, and C. Gonzalez. 2013. Centrobin controls mother-daughter centriole asymmetry in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol*. 15:241-248.
- Kachaner, D., X. Pinson, K.B. El Kadhi, K. Normandin, L. Talje, H. Lavoie, G. Lepine, S. Carreno, B.H. Kwok, G.R. Hickson, and V. Archambault. 2014. Interdomain allosteric regulation of Polo kinase by Aurora B and Map205 is required for

- cytokinesis. *J Cell Biol.* 207:201-211.
- Kerssemakers, J.W., E.L. Munteanu, L. Laan, T.L. Noetzel, M.E. Janson, and M. Dogterom. 2006. Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature.* 442:709-712.
- Kinoshita, E., E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, and T. Koike. 2006. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics.* 5:749-757.
- Kinoshita, K., I. Arnal, A. Desai, D.N. Drechsel, and A.A. Hyman. 2001. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science.* 294:1340-1343.
- Komarova, Y., C.O. De Groot, I. Grigoriev, S.M. Gouveia, E.L. Munteanu, J.M. Schober, S. Honnappa, R.M. Buey, C.C. Hoogenraad, M. Dogterom, G.G. Borisy, M.O. Steinmetz, and A. Akhmanova. 2009. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *The Journal of cell biology.* 184:691-706.
- Kueh, H.Y., and T.J. Mitchison. 2009. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science.* 325:960-963.
- Kumar, P., K.S. Lyle, S. Gierke, A. Matov, G. Danuser, and T. Wittmann. 2009. GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *The Journal of cell biology.* 184:895-908.
- Leano, J.B., S.L. Rogers, and K.C. Slep. 2013. A cryptic TOG domain with a distinct architecture underlies CLASP-dependent bipolar spindle formation. *Structure.* 21:939-950.
- Li, W., T. Miki, T. Watanabe, M. Kakeno, I. Sugiyama, K. Kaibuchi, and G. Goshima. 2011. EB1 promotes microtubule dynamics by recruiting Sentin in *Drosophila* cells. *The Journal of cell biology.* 193:973-983.
- Li, W., T. Moriwaki, T. Tani, T. Watanabe, K. Kaibuchi, and G. Goshima. 2012. Reconstitution of dynamic microtubules with *Drosophila* XMAP215, EB1, and Sentin. *The Journal of cell biology.* 199:849-862.
- Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R.H. Medema. 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of cell biology.* 185:193-202.
- Loisel, T.P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M.F. Carrier. 1999. Reconstitution of

- actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*. 401:613-616.
- Maiato, H., A. Khodjakov, and C.L. Rieder. 2005. *Drosophila* CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres. *Nat Cell Biol*. 7:42-47.
- Maurer, S.P., P. Bieling, J. Cope, A. Hoenger, and T. Surrey. 2011. GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:3988-3993.
- Maurer, S.P., F.J. Fourniol, G. Bohner, C.A. Moores, and T. Surrey. 2012. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell*. 149:371-382.
- Menendez, M., G. Rivas, J.F. Diaz, and J.M. Andreu. 1998. Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site. *The Journal of biological chemistry*. 273:167-176.
- Mennella, V., G.C. Rogers, S.L. Rogers, D.W. Buster, R.D. Vale, and D.J. Sharp. 2005. Functionally distinct kinesin-13 family members cooperate to regulate microtubule dynamics during interphase. *Nat Cell Biol*. 7:235-245.
- Mimori-Kiyosue, Y., I. Grigoriev, G. Lansbergen, H. Sasaki, C. Matsui, F. Severin, N. Galjart, F. Grosveld, I. Vorobjev, S. Tsukita, and A. Akhmanova. 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol*. 168:141-153.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-242.
- Moore, A., and L. Wordeman. 2004. C-terminus of mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) inhibits its lattice-stimulated ATPase activity. *Biochem J*. 383:227-235.
- Moutinho-Pereira, S., N. Stuurman, O. Afonso, M. Hornsvelde, 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.
- Nogales, E. 1999. A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci*. 56:133-142.

- Nogales, E., S.G. Wolf, and K.H. Downing. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 391:199-203.
- 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, 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. *J Cell Biol*. 158:873-884.
- Rusan, N.M., C.J. Fagerstrom, A.M. Yvon, and P. Wadsworth. 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell*. 12:971-980.
- Shelden, E., and P. Wadsworth. 1993. Observation and quantification of individual microtubule behavior in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific. *J Cell Biol*. 120:935-945.
- Shintomi, K., T.S. Takahashi, and T. Hirano. 2015. Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. *Nature cell biology*. 17:1014-1023.
- Slep, K.C. 2010. Structural and mechanistic insights into microtubule end-binding proteins. *Current opinion in cell biology*. 22:88-95.
- Slep, K.C., and R.D. Vale. 2007. Structural basis of microtubule plus end tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol Cell*. 27:976-991.
- Sousa, A., R. Reis, P. Sampaio, and C.E. Sunkel. 2007. The Drosophila CLASP homologue, Mast/Orbit regulates the dynamic behaviour of interphase microtubules by promoting the pause state. *Cell Motil Cytoskeleton*. 64:605-620.
- Trogden, K.P., and S.L. Rogers. 2015. TOG proteins are spatially regulated by Rac-GSK3beta to control interphase microtubule dynamics. *PLoS One*. 10:e0138966.
- van der Vaart, B., C. Manatschal, I. Grigoriev, V. Olieric, S.M. Gouveia, S. Bjelic, J. Demmers, I. Vorobjev, C.C. Hoogenraad, M.O. Steinmetz, and A. Akhmanova. 2011. SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J Cell Biol*. 193:1083-1099.
- Vandecandelaere, A., M. Brune, M.R. Webb, S.R. Martin, and P.M. Bayley. 1999. Phosphate release during microtubule assembly: what stabilizes growing

- microtubules? *Biochemistry*. 38:8179-8188.
- Verde, F., J.C. Labbe, M. Doree, and E. Karsenti. 1990. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*. 343:233-238.
- Vitre, B., F.M. Coquelle, C. Heichette, C. Garnier, D. Chretien, and I. Arnal. 2008. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nature cell biology*. 10:415-421.
- Walker, R.A., E.T. O'Brien, N.K. Pryer, M.F. Soboeiro, W.A. Voter, H.P. Erickson, and E.D. Salmon. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol*. 107:1437-1448.
- Weisbrich, A., S. Honnappa, R. Jaussi, O. Okhrimenko, D. Frey, I. Jelesarov, A. Akhmanova, and M.O. Steinmetz. 2007. Structure-function relationship of CAP-Gly domains. *Nat Struct Mol Biol*. 14:959-967.
- Widlund, P.O., M. Podolski, S. Reber, J. Alper, M. Storch, A.A. Hyman, J. Howard, and D.N. Drechsel. 2012. One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Mol Biol Cell*. 23:4393-4401.
- Yeeles, J.T., T.D. Deegan, A. Janska, A. Early, and J.F. Diffley. 2015. Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature*. 519:431-435.
- Yu, N., L. Signorile, S. Basu, S. Ottema, J.H. Lebbink, K. Leslie, I. Smal, D. Dekkers, J. Demmers, and N. Galjart. 2016. Isolation of functional tubulin dimers and of tubulin-associated proteins from mammalian cells. *Curr Biol*. 26:1728-1736.
- Zanic, M., J.H. Stear, A.A. Hyman, and J. Howard. 2009. EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice. *PLoS one*. 4:e7585.
- Zanic, M., P.O. Widlund, A.A. Hyman, and J. Howard. 2013. Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels. *Nature cell biology*. 15:688-693.
- Zhang, L., H. Shao, Y. Huang, F. Yan, Y. Chu, H. Hou, M. Zhu, C. Fu, F. Aikhionbare, G. Fang, X. Ding, and X. Yao. 2011. PLK1 phosphorylates mitotic centromere-associated kinesin and promotes its depolymerase activity. *J Biol Chem*. 286:3033-3046.
- Zitouni, S., C. Nabais, S.C. Jana, A. Guerrero, and M. Bettencourt-Dias. 2014. Polo-like

kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15:433-452.

謝辞

6年間、研究について進め方や実験方法などの指導をしていただいた五島剛太教授に感謝します。研究を進める上で、考え方から現実的な問題の解決法まで、的確に助言を頂きました。日々、研究の指針を与えてくださり、丁寧に指導していただきました。心より感謝いたします。

清光智美博士には、日々、議論や助言を頂き、研究姿勢に刺激をいただきました。また、本論文の作成に際して多くの助言を頂き、改訂を指導していただきました。心より感謝します。上原亮太博士には、隣の机だったこともあり、実験などの疑問や議論や雑談に至るまで、日々、指導と刺激をいただきました。心より感謝します。釜崎とも子博士には、研究の議論や生活の上での助言などをいただきました。また、日々、集中して解析を進める姿に刺激をいただきました。心より感謝します。西山朋子准教授には、リン酸化実験を指導していただきました。また、日々の議論で多くの知識をいただきました。心より感謝します。幸節健博士には、日々の議論や雑談で、植物の基本的な話を聞く機会をいただき、進化的な視点等、視野を広げていただきました。心より感謝します。渡邊定則博士には、日々の議論や実験方法など多くの知識と助言をいただきました。心より感謝します。

李文静博士には、私が研究室に入ってから *in vitro* の実験を中心に実験の進め方を指導していただきました。本研究は氏の研究を発展させたものであり、心より感謝いたします。

三木智博博士には、日々の議論では鋭い助言をいただき、また、雑談、生活上の相談など、とてもお世話になりました。声を掛けやすい雰囲気を作ってください、困ったことや相談がある際には真っ先に頼りにさせていただいておりました。心より感謝いたします。中岡由貴博士には、机が隣で、日々の議論から雑談まで、とてもお世話になりました。研究室に入った当初には DNA 実験の方法などを丁寧に教えていただきました。PC 画面をじっと見つめて解析している姿には刺激を受けました。心より感謝いたします。藤岡竜太さんには、プログラムという手法に刺激を受け、視野を広げることができました。心より感謝します。伊藤亜実さんには、日々の実験や議論から雑談まで、とてもお世話になりました。日々の研究姿勢にはいつも刺激を受けていました。心より感謝します。江塚智哉さん、山田萌恵さん、内藤晴子さん、林久登さん、有賀孝輔さん、

加藤優花さん、Elsa Amelia Tungadi さん、Leong Shu Yao さんには、日々の熱意ある研究姿勢や研究成果に刺激を受けました。また、雑談にも付き合ってください、ありがとうございました。心より感謝します。

稲葉理絵さんには、実験器具の洗浄や共通試薬の作製など実験の補助や事務的な手続きなど、研究生活においてあらゆる面でサポートしていただきました。本当にありがとうございました。心より感謝します。仁科桃子さんには、実験のサポートおよび、一部の DNA プラスミドの作製をしていただきました。心より感謝します。前佛恭子さんには、実験器具の洗浄、共通試薬の作製などの実験の補助をしてしていただきました。心より感謝します。

最後に、常に支えてくださった家族と友人に感謝いたします。

2017 年 2 月 森脇 崇史