

主論文

キネシン-8 の機能解析を通じた動原体微小管の
動態制御機構の解明

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

江塚 智哉

目次

要旨.....	1
序論.....	3
結果.....	18
考察.....	25
材料と方法.....	30
動画説明.....	35
図.....	37
参考文献.....	65
謝辞.....	93

要旨

姉妹染色体を娘細胞に均等に分配することは生命にとって必須の過程である。この過程において、分裂期スピンドルおよび動原体は中心的な役割を果たす。動原体はセントロメアと呼ばれる特殊なクロマチン上に構築される巨大な複合体であり、スピンドル微小管と染色体が相互作用するための足場となり、微小管より生じた力を、染色体を動かす力へと変換する。染色体をスピンドル赤道面に並べるためには、微小管が動原体と先端で結合した後、その動態が安定化される必要がある。これまでに多くの動原体構成因子が同定されており、その構造および機能が詳細に解析されてきた。一方で動原体と相互作用する微小管(動原体微小管)の動態がどのように制御されているかに関しては不明な点が多い。

キネシン-8 は生物種を通して保存されたモータータンパク質であり、分裂期スピンドル上をプラス端に向けて歩行し、動原体微小管先端に強く局在する。キネシン-8 を欠損させると、長く歪んだスピンドルを生じ、染色体整列異常を引き起こす。これらの局在、表現型からキネシン-8 が動原体微小管動態を制御していることが示唆されるものの、その詳細なメカニズムに関してはあまりよく分かっていない。その理由は相反するものも含めた様々な生化学的活性が報告されているためである。例えば、ヒトキネシン-8, KIF18A においては微小管脱重合を促進するという報告と、伸縮を抑制して微小管を安定化するという報告があり、論争がある。

本研究ではキイロシヨウジョウバエのキネシン-8, Klp67A の生化学および細胞生物学的な解析を通して、動原体微小管の動態制御機構を明らかにすることを目的とした。まず Klp67A を精製し、全反射顕微鏡を用いて一分子解析を行ったところ、Klp67A は他種のキネシン-8 と同様に、浮遊のチューブリンとの結合能を有し、微小管プラス端方向に歩行し、先端で蓄積する様子が観察された。次に Klp67A が微小管動態に与える影響を調べたところ、Klp67A は、伸長から短縮への転換「カタストロフ」の頻度を増化して、微小管の長さを制限すると同時に、短縮速度を抑制し、微小管の伸縮が見かけ上停止した「ポーズ」および、短縮から伸長への転換「レスキュー」の頻度を増加した。このことから Klp67A は微小管の不安定化と安定化、両方の機能を有していることが明らかとなった。

またキイロシヨウジョウバエ S2 細胞において、Klp67A を機能阻害してライ

ブで詳細に追跡したところ、異常に長いスピンドルを生じ、微小管は先端で動原体と結合できるものの、その結合状態を維持できずに、高頻度で染色体整列に失敗する様子が観察された。このことから Klp67A は分裂期前中期において、安定な動原体-微小管結合に必要なことが示された。この動原体-微小管結合の不安定化の表現型は、微小管重合阻害剤であるコルセミドを加えて、スピンドル微小管を短くしてもレスキューされなかった。一方で動原体における微小管安定化因子として知られる CLASP を過剰発現したところ、Klp67A 欠損による動原体-微小管結合の不安定性がレスキューされた。これらのことから、Klp67A の微小管動態を安定化する機能が動原体-微小管結合の安定化に決定的な役割をしていることが示唆された。

序論

微小管

微小管は α -チューブリンと β -チューブリンのヘテロ二量体で構成される直径 25 nm の筒状の空洞構造を持った重合体であり、細胞内では分裂期スピンドルや鞭毛や繊毛の軸糸を形成し、細胞内輸送におけるモータータンパク質の足場として働く¹。微小管は極性を持って伸長し、伸長速度が速い端がプラス (+) 端、その反対側の端がマイナス (-) 端と定義されており、 β -チューブリンがプラス端側を、 α -チューブリンがマイナス端側に配置して重合する²。 α/β チューブリンはそれぞれ GTP と結合する。 α -チューブリンは N-site (nonexchangeable) と呼ばれる領域に常に GTP を結合している³。一方で β -チューブリンは GTP 加水分解活性を有しており、E-site (exchangeable) と呼ばれる領域で GTP, もしくは GDP を結合する。 β -チューブリンのヌクレオチド結合状態によってそれぞれのチューブリン二量体は GDP-チューブリン、GTP-チューブリンと呼ばれる。GTP-チューブリン二量体が微小管のフィラメント構造内に取り込まれると、E-site で GTP の加水分解が誘導され、リン酸基を放出して最終的に GDP 結合型 β -チューブリンとなる⁴。結果的に重合した微小管のほとんどは GDP-チューブリンとして存在するが、GTP-チューブリンの重合と GTP を加水分解してリン酸を放出するまでの間には時間的なズレが存在するため⁵、新しく微小管に付加された GTP-チューブリンが加水分解されない状態で存在する。これを GTP キャップと呼ぶ。GTP キャップは微小管を安定化し微小管の伸長を促進する。一方で GTP キャップが失われると微小管は伸長から急速な短縮 (脱重合) に転換する。伸長から短縮への転換をカタストロフ (catastrophe), 短縮から伸長への転換をレスキュー (rescue), また見かけ上、伸長も短縮も起こっていないように見える状態をポーズ (pause) とよぶ。このように微小管が、確率論的に伸長と短縮を繰り返す性質を動的不安定性 (dynamic instability) と呼ぶ (図 1)⁶⁻⁸。

電子顕微鏡により、微小管の先端構造は動態に依存し、様々な構造を取ることが示されてきた。伸長中の微小管は、シート状の構造を取る一方で^{9 10 11}、短縮する微小管は、皮を剥いたときにできるような、外向きに大きく曲げた先端構造を取る様子が観察されてきた^{9 11}。また平滑末端構造も観察されており、伸長と短縮の中間体の存在が示唆されている¹²。しかし最近の電子線トモグラフィの解析から、in vitro および、6 種の異なる生物種の細胞において、伸長中の

微小管も短縮中の微小管も同様に湾曲した構造を持っていることが示されており、シミュレーションから伸長微小管と脱重合微小管の間でプロトフィラメントと微小管側面との結合能力が異なることで、伸縮の切り替えを行い、伸長微小管先端はブラウン運動により振動し、直線化されることが示唆されている¹³。

微小管動態の制御

細胞内の微小管動態は *in vitro* でチューブリン単独で重合させたときの動態と大きく異なる。ひとつの要因は細胞内では微小管動態が様々な微小管結合タンパク質 (Microtubule Associated Proteins, MAPs) によって制御されていることによる。微小管伸長速度や短縮速度を変える、もしくはカタストロフ頻度やレスキュー頻度を変える等動態に与える影響は様々である^{14 15}。

特にプラス端動態を制御する因子は、非常に多くの因子が同定されている。微小管伸長速度を促進する代表的な MAPs として、XMAP215 が挙げられる。XMAP215 はチューブリン二量体と結合し、微小管プラス端にチューブリンを局在化させることで微小管の重合速度を劇的に上げる¹⁶。また end-binding タンパク質 (EBs) は、伸長中の微小管の先端から少し離れた GTP 加水分解直後に相当するチューブリンに強く結合して、チューブリン二量体構造を緊密化し、^{17 18 19}カタストロフを誘導するとともに、伸長速度をゆるやかに上げる^{20 21 22}。このような重合速度を速める因子が協同的に働くことで、*in vitro* 再構成実験でも細胞内レベルの重合速度まで上げることが示されている^{22,23}。

微小管脱重合を誘導する因子としてキネシン-13 およびキネシン-8 が挙げられる。キネシン-13 は歩行活性を持たず、微小管上を拡散により動くことで、微小管先端に到達し、ATP 加水分解により、微小管先端の湾曲した構造を誘導、もしくは安定化することで、脱重合を引き起こす²⁴⁻²⁸。一方でキネシン-8 は ATP 依存的な歩行活性を持ち、出芽酵母キネシン-8、Kip3 は微小管の先端に到達して微小管を脱重合する活性を有する^{29 30}。またキネシン-13 同様に微小管先端の湾曲構造を安定化することが示唆されている³¹。ただし、キネシン-8 に関しては他にも様々な活性が報告されており、キネシン-8 の項を参照されたい。

微小管のレスキューを促進しカタストロフを抑制する代表的な因子として CLASP (cytoplasmic linker protein (CLIP)-associated proteins) が挙げられる^{32-34 35 36}。*In vitro* 再構成実験からポーズする領域においてショウジョウバエの CLASP が

³³、レスキューする領域において分裂酵母 CLASP が集積することが知られている³²。ヒト CLASP では、物理的に湾曲させることにより損傷を与えた微小管のカタストロフを抑制する³⁶。またショウジョウバエの CLASP では4種類の MAPs を混合すると、今までの *in vitro* 実験でほとんど観察されなかったポーズ、レスキューを高頻度で含む細胞内に近い動的な観察されるようになる³³。

微小管マイナス端に結合して動態を制御する因子に関する知見は、プラス端動態制御因子と比較して少ない^{37 38}。この理由のひとつは、マイナス端はプラス端と比較して静的な性質を持つため、試験管内反応で顕著な動態の変化を検出するのが困難なことにある。また細胞内では、微小管が混み入り、プラス端が非常に動的なため、マイナス端の動態を同定することを困難にしている。マイナス端に結合するタンパク質の例として γ -TuRC (γ -tubulin ring complex)と哺乳細胞における CAMSAP およびそのホモログである無脊椎動物の Patronin が挙げられる。 γ -TuRC は γ -チューブリンおよび GCP (gamma-tubulin complex protein)ファミリータンパク質の複数のサブユニットによって構成される巨大な複合体である。 γ -チューブリンおよび GCP2, GCP3 で構成される複合体を γ -TuSC (γ -tubulin small complex), さらにその外側に構成される GCP サブユニットを含めた複合体を γ -TuRC と呼ぶ。 γ -TuRC は微小管の重合の核として機能し、微小管マイナス端をキャップして安定化し、微小管生成を誘導する主要な因子である^{39 40}。しかしながら全ての微小管生成場所に γ -TuRC が存在するわけではなく、 γ -TuRC を除いた細胞でも微小管生成が観察されることから γ -TuRC 非依存的な未知の微小管生成機構が存在することが示唆されている⁴¹⁻⁴³。また近年、マイナス端に結合し、安定化する因子として CAMSAP⁴⁴ / Patronin⁴⁵ が同定された。CAMSAP は微小管のマイナス端伸長を抑制するため、細胞内でマイナス端が伸長しない主要な要因であると考えられる⁴⁶。CAMSAP/Patronin はキネシン-13 のマイナス端脱重合活性を抑制して、分裂期後期のスピンドル微小管伸長およびスピンドル極での脱重合抑制に重要な役割を果たしている^{45,47}。

伸長中の微小管は、物理障壁と接触して、先端に押す力が働くとカタストロフが誘導される⁴⁸。また実際に細胞内でも細胞表層に微小管プラス端が到達するとカタストロフが高頻度で観察され、微小管伸長速度が抑制される⁴⁹⁻⁵¹。このとき、伸長先端が浮遊のチューブリンにアクセスできないため、GTP キャップが失われる、もしくはチューブリン二量体の構造が緊密化することにより、GTP

加水分解が引き起こされる、というメカニズムが考えられている^{48,56}。一方で、染色体分離の際、動原体は脱重合する微小管に結合したまま追尾する。この際、微小管先端に引っ張る力が働く。精製した出芽酵母の動原体をマイクロビーズに結合させ、光ピンセットを使って脱重合する微小管先端に張力を加えると、カタストロフが抑制され、レスキューが促進することが示されている⁵²。また重合する微小管に対して張力をかけると微小管伸長速度が増大する⁵²。微小管伸長の促進は XMAP215 を結合させたビーズを用いて張力を加えた場合にも観察される⁵³。またダイニンを障壁やビーズに結合させた場合も、脱重合する微小管と相互作用してカタストロフを抑制する^{54,55}。これらのメカニズムについては不明であるが、微小管先端のチューブリンプロトフィラメントが張力によって、曲がった構造から伸展した構造になりやすいため、GTP 加水分解が抑制され、重合に傾くというモデルが考えられている^{56,57}。

in vitro 実験により、微小管は長い間伸長を続けるほど、微小管構造が損傷しやすくなり、カタストロフが起こりやすくなることが示されている^{58,59}。この過程は "aging" と呼ばれる。また近年、微小管を機械的に曲げる、もしくはレーザーにより微小管側面からチューブリンを失わせると、損失した領域に代わりに新たな GTP チューブリンを流入することで微小管の修復が起こる様子が観察された。これを微小管の自己修復 (self-repair) と呼ぶ。このようにして修復を受けた場所が新たな GTP キャップとして働き、レスキューが高頻度で起こることが示された^{60,61}。また最近、微小管切断酵素である Spastin と Katanin が微小管側面のチューブリンを積極的に取り除き、新たな GTP チューブリンを取り入れることでレスキューを引き起こすことを可能にしていることが示された⁶²。このようにして細胞内では微小管構造を積極的に更新することで、複雑に動態を制御しているのかもしれない。

分裂期スピンドル

分裂期スピンドルは、微小管と微小管結合タンパク質により構成される巨大な自己集合体であり、染色体整列、分離に必須の役割を果たす⁶³。

分裂期スピンドルを形成するためには、微小管を生成して増幅すること、生成した微小管を反平行の二極性構造にすること、動原体が微小管と結合し、動原体微小管束を形成すること、スピンドル微小管全体をまとめるために、スピンドル極をまとめることなど、様々な過程を必要とする⁶⁴。これらの過程を経て、

構成された動物細胞の分裂期スピンドルは、その特徴から 3 種類の微小管に分けられる (図 2)。1 つ目は、動原体に結合する 平均 10-20 本程度の束⁶⁵⁻⁶⁷を構成する微小管で動原体微小管 (kinetochore microtubule もしくは k-fiber) と呼ばれ、他の微小管と比較して安定で、染色体を移動させるのに直接的に寄与する。2 つ目は極間微小管と呼ばれ、動原体とは直接結合せずに、スピンドルの両極から伸び、互いにプラス端を向けあった反平行の微小管を形成する。極間微小管はスピンドルの二極性の構造の形成、維持に必須の役割をする。3 つ目は星状体微小管 (astral microtubule)、もしくは中心体微小管 (centrosomal microtubule) と呼ばれ、中心体から細胞の表層に向けて伸長して、スピンドルの全体の配向と位置を制御する。

スピンドル微小管の生成

1. 中心体からの微小管生成

分裂期において、中心体では中心体周辺物質 (pericentriolar material: PCM) を介して、微小管重合核因子である γ -チューブリン複合体 (γ -TuRC) が集積し活性化されることで、微小管形成中心 (microtubule organizing center; MTOC) として働く⁶⁸ (図 3A)。動物細胞では中心体が主要な微小管生成機構と考えられてきた^{69,70}。実際に線虫 *C. elegans* において中心体タンパク質を欠損させると、スピンドル微小管形成が著しく阻害され、分裂に失敗する^{71,72}。しかし、植物細胞の分裂や卵母細胞の減数分裂では中心体が存在しない。またキイロショウジョウバエでは中心体を除いた体細胞でも、機能的なスピンドルが形成され、雄性不妊になるものの成虫にまで発生が進む^{73,74}。このことは細胞種によっては、中心体が必須でないことを示している。

2. 染色体近傍からの微小管生成

中心体に依存しない微小管生成機構は、中心体を持たないアフリカツメガエルの卵に、核を注入したときに、微小管生成が促進されることから発見された⁷⁵。また、アフリカツメガエル卵抽出液にクロマチンで覆われたビーズを入れたときにも同様の微小管生成が観察される^{76,77}。後にこの染色体からの微小管生成は染色体からの Ran-GTP 濃度勾配によって促進されることが明らかとなった⁷⁸⁻⁸⁰。核膜崩壊後、染色体近傍では染色体に局在する RCC1 タンパク質により Ran タンパク質が GDP 結合型から GTP 結合型に変換される。Ran-GTP は Importin に

結合し、Importin に結合した不活性型のスピンドル形成因子 (spindle assembly factors; SAFs)を活性化型にすることで、スピンドル形成と安定化を促進する⁸¹ (図 3B)。

染色体近傍からの微小管生成には γ -TuRC が必要であり^{82 83}、アフリカツメガエルの減数分裂期における卵抽出液においては、SAFs の一種である Tpx2 と後述のオーグミンによって微小管依存的な枝分かれ式の微小管生成を活性化する⁸⁴。一方でキイロショウジョウバエ S2 細胞では、中心体からの微小管生成の有無に関わらず、RCC1 を機能阻害しても機能的なスピンドルが形成されることから⁸⁵、染色体からの微小管生成の重要性は細胞種によって異なるようである。

また Ran-GTP 濃度勾配に加えて、セントロメア内側に局在する CPC (chromosomal passenger complex)を介した微小管生成も知られているが、詳しいメカニズムに関してはよく分かっていない^{86,87}。

3. オーグミンによるスピンドル内部からの微小管生成

オーグミン (Augmin)と呼ばれる 8つのサブユニット (Aug1-Aug8) で構成される複合体は、スピンドル内部の微小管に結合し、 γ -TuRC を局在化させることで、新たなスピンドル微小管を増幅する (図 3C)^{88 89}。ショウジョウバエ培養細胞においてオーグミン単独の機能阻害を行っても、長いながらも機能的なスピンドルが形成される。しかし、オーグミンと同時に中心体からの微小管生成を阻害すると、 γ -チューブリン機能阻害と同等の、重篤なスピンドル形成異常を示す。このことから、中心体からだけでなく、スピンドル内部からの微小管生成も同様に、スピンドル形成に重要であると考えられる⁸⁸。

動原体と結合した微小管は安定化されるため⁹⁰、長時間脱重合せずに存在し続ける。オーグミンは、この生成してから長時間経った微小管に優先的に結合する⁹¹。またオーグミンは既存の微小管に対して平行方向に微小管生成を促進する機能を持つ^{84,92}。したがって一度動原体-微小管結合が形成されると、この初期の動原体-微小管を鋳型として、オーグミンが平行方向の微小管生成を繰り返し行うため、束化した動原体微小管の形成につながる (図 4)⁹¹。

反平行の二極性構造の形成

染色体を正しく均等に分離するために、分裂期に生成された微小管は、プラ

ス端が染色体側を向き、マイナス端がスピンドル極側を向いた対称の二極性構造を作り、維持しなければならない。この過程に必須なのは四量体モータータンパク質であるキネシン-5 である⁹³。キネシン-5 は反平行の二本の微小管を架橋し、プラス端への歩行活性を用いて両微小管に対し外向きの力を生じさせる^{94,95}。これによりマイナス端どうしを遠ざけ、二極性構造ができる (図 5)。実際に細胞内でキネシン-5 の機能阻害をすると、多くの細胞種でスピンドルを二極に分けることができず、単極のスピンドル表現型を示す⁹⁶⁻¹⁰¹。

しかしヒト培養細胞ではキネシン-5 を阻害した細胞でも、微小管架橋活性を持つキネシン 12/KIF15 により、二極性のスピンドルが形成されることが示されている¹⁰²。また多くの細胞種で、キネシン-5 阻害による単極性スピンドルの表現型は、マイナス端方向に歩くキネシン-14 やダイニンを同時に阻害することによりレスキューされることが示されてきた¹⁰³⁻¹¹²。これはキネシン-5 の微小管どうしを外向きに遠ざける力と、キネシン-14 やダイニンの微小管どうしを内向きに収束させる力が拮抗的に働いているためだと考えられている。分裂酵母ではキネシン-5 とキネシン-14 を両欠損させたとき、微小管重合の際に生じるスピンドル両極から外向きの力と、反平行微小管を架橋する Ase1/PRC1 により、二極性のスピンドルを形成する^{113,114}。これらのことから、細胞はキネシン-5 以外にも様々な二極性スピンドル形成機構を内在的に有していると考えられる。

スピンドル極の収束

二極性構造を作ると同時に、スピンドルはマイナス端で収束してひし形の構造を作る (図 5)。まず染色体近傍やオーグミンによりスピンドル内部で生成された微小管はキネシン-5 に加えて、ダイニン、キネシン-14 のマイナス端歩行モータータンパク質によってマイナス端をスピンドル極に向けて輸送されることで、中心体とともに γ -TuRC を集積する¹¹⁵⁻¹¹⁶。スピンドル極ではキネシン-14, ダイニン, NuMA, Asp/ASPM, CDK5RAP2 などのタンパク質によりマイナス端が束化されることで、全ての染色体を同時に動かすひとつの集合体となるため、正確な染色体分配を保障することにつながる¹¹⁷⁻¹²²。このようにして形成されたスピンドルでは、プラス端からチューブリンが流入し、マイナス端では脱重合が続くという一定の流れが形成されて、微小管の長さが一定に保たれる¹²³。このチューブリンの流れを極方向のフラックス (poleward flux) と呼ぶ (図 6)。

染色体輸送に関わるモータータンパク質

核膜崩壊後、凝縮した染色体をスピンドル中央に輸送して並べることは、ゲノム情報を均等に分ける上で必須の過程となる。染色体整列に関わる因子はこれまでに 100 以上同定されてきた¹²⁴。この中で重要なものとして、染色体と動原体で働くモータータンパク質が挙げられる。

染色体上にはキネシン-4 やキネシン-10 ファミリーに属するクロモキネシン (Chromokinesin) と呼ばれるキネシンが存在する。これらのキネシンはクロマチンに結合して、染色体と微小管を架橋すると同時に、微小管プラス端方向へ歩行することで、染色体にスピンドル極から押し出す力を与える^{125,126}。

一方で動原体には、キネシン-7 ファミリーに属する Cenp-E および、マイナス端モーターのダイニンが局在する。これらのモータータンパク質は、スピンドル内における翻訳後修飾を目印として、スピンドルの異なる場所で機能している。まず、星状体微小管のチューブリンは高度にチロシン化されており、より動的である^{127,128}。ダイニンはこのチロシン化チューブリンで構成された微小管に優先的に結合してマイナス端方向に歩行する¹²⁹。したがって星状体微小管付近の染色体は動原体のダイニンによってスピンドル極方向に優先的に輸送される¹³⁰。一方でスピンドルの内側の動原体微小管や極間微小管は脱チロシン化されており^{127,128}、Cenp-E はこの脱チロシン化されたチューブリンで構成された微小管に優先的に結合して歩行する¹³¹。したがって Cenp-E は、スピンドル極からスピンドル中央方向に向けて、染色体を輸送する力を生じる。

スピンドル極近傍の染色体ではダイニンによる極方向への輸送能力がクロモキネシンを上回ることで、クロモキネシンによる表層方向へ向けたランダムな染色体輸送を抑制している¹³⁰。ダイニンによってスピンドル極に輸送された染色体は Cenp-E およびクロモキネシンによってスピンドル赤道面に輸送される。このようにしてダイニン、クロモキネシン、Cenp-E が協働することで、スピンドル中央に向けて染色体が輸送されることで、二極性の動原体結合を促進する (図 7)。

動原体と微小管の相互作用

動原体はセントロメアと呼ばれる特殊なクロマチン構造の上に形成される巨大なタンパク質複合体であり、分裂期において微小管と染色体を結合するための足場となり、染色体整列、分離に必須の役割を果たす¹³²⁻¹³⁴。

動原体と微小管の相互作用において中心的な役割を果たすのは、動原体外表の Knl1, Mis12 複合体, Ndc80 複合体により構成される KMN ネットワークと呼ばれる構造体である (図 8)。Ndc80 複合体は、Ndc80/Hec1, Nuf2, Spc25, Spc24 の 4 量体で構成される複合体で、Ndc80/Hec1 および Nuf2 のカルポニンホモロジー (calponin-homology; CH) ドメインを介して微小管を結合する¹³⁵⁻¹³⁹。一般に「動原体と微小管が結合する」とはこの Ndc80 複合体と微小管が相互作用することを指す。一方で Knl1 はスピンドル形成チェックポイントタンパク質を集積する足場として働き、Mis12, Dsn1, Nsl1, Nnf1 で構成される Mis12 複合体は動原体内部と外側を繋ぎ止めるハブとして働く。

動原体と微小管の結合様式

染色体を正しく分離するためには、動原体は微小管の先端で相互作用し (end-on 結合)、スピンドル両極からの二極性の結合 (amphitelic 結合) が形成される必要がある。しかしながら、核膜崩壊後、微小管が染色体と相互作用するとき、必ずしもこのような正しい結合が行われるわけではない^{130,140,141}。例えば染色体どうしが込み入った場所では微小管と動原体は相互作用できない^{141,142}。また片側の動原体だけと結合する monotelic 結合、スピンドル極の一方から姉妹動原体両方に結合する syntelic 結合、二極性の結合が形成されるものの、姉妹動原体の一方がスピンドル両極からの微小管と結合する merotelic 結合、さらには動原体が側面で結合する lateral 結合等が考えられ、いずれの場合も均等な染色体分配の失敗につながるため、最終的に amphitelic 結合に修正される必要がある (図 9)¹⁴³。

スピンドル形成チェックポイント (Spindle assembly checkpoint: SAC)

動原体では、動原体-微小管の結合状態を監視し、正しい結合が確立されるまで、分裂期の進行を止める機構が存在する。この機構をスピンドル形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint: SAC) と呼ぶ (図 10)^{144, 145}。スピンドル形成チェックポイントの作動体は、MCC (mitotic check complex) と呼ばれるタンパク質複合体で Cdc20, Mad2, BubR1, Bub3 により構成される。MCC は動原体が微小管と正しく結合していないとき、E3 ユビキチンリガーゼである APC/C (anaphase promoting complex/ cyclosome) に結合して、その活性を抑制する。すべ

での動原体-微小管結合が正しく行われると、MCC は APC/C から解離し APC/C が活性化され、サイクリン B とセキュリンを含む様々な分裂期タンパク質がユビキチン化される。ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームにより分解される。これらの分解により、CDK1 の不活性化とともにセパラゼを活性化し、姉妹染色分体接着を解除して、分裂期後期に進行させる。

MCC 形成の触媒装置としての動原体

微小管結合が正しく確立されていない動原体は MCC を新生する触媒装置として働く。MCC の形成には、Mad2 の開いた構造 (open form Mad2: O-Mad2) から閉じた構造 (closed form Mad2: C-Mad2) への変換が律速段階となる^{146 147}。Mad2 は細胞質中では O-Mad2 として単独で存在する。一方で MCC 中の Cdc20 と結合した場合や動原体の Mad1 と結合した場合、C-Mad2 として存在する。Mad1:C-Mad2 複合体は MCM とは独立した複合体で、動原体上で細胞質中の O-Mad2 を C-Mad2 へと変換することで Cdc20 との結合反応を触媒し、C-Mad2:Cdc20 複合体を形成する。C-Mad2:Cdc20 複合体はただちに BubR1, Bub3 と結合して MCC を形成する^{148 149,150}。この Mad1:Mad2 複合体を鋳型として新たな MCC を形成するモデルを Mad2 テンプレートモデルと呼ぶ (図 11)。

動原体上への SAC タンパク質の集積は、複雑なカスケード反応によって制御されている^{144 145} (図 12)。まず Mps1 が Knl1 の MELT モチーフと呼ばれる領域をリン酸化する。リン酸化された領域を Bub3 が認識して、Bub1:Bub3 複合体がリクルートされる。次に Mps1 は Bub1 をリン酸化する。リン酸化された Bub1 は Mad1:C-Mad2 複合体をリクルートする。Mad1:C-Mad2 複合体は Mps1 によりリン酸化されることで、活性化し O-Mad2 をリクルートする。一方で Bub1:Bub3 複合体は Cdc20 をリクルートすることで、MCC 形成の律速段階である C-Mad2:Cdc20 複合体の形成が促進され、BubR1:Bub3 複合体と反応して MCC 形成につながる。

RZZ 複合体とスピンドル形成チェックポイントの不活性化

微小管結合していない動原体の最外表では、繊維状コロナ (fibrous corona) と呼ばれる三日月状の伸展した構造が電子顕微鏡で観察される^{151,152}。繊維状コロナには様々な動原体タンパク質が含まれ、微小管と動原体の結合を修正および促

進すると考えられている¹⁵³⁻¹⁵⁵。繊維状コロナの形成には RZZ 複合体 (Rod, Zwilch, ZW10 complex)が必須の役割を果たす^{156,157}。また RZZ 複合体は Mad1:Mad2 複合体を動原体上に係留する機能を有する¹⁵⁸。

微小管先端が動原体と結合すると、Mad1:Mad2 複合体は RZZ 複合体および Spindly を介して、ダイニン、ダイナクチンにより動原体からスピンドル極方向に向かって輸送されて取り除かれる¹⁵⁹⁻¹⁶⁶。このようにして微小管が動原体と正しく結合すると、動原体において MCC 形成のための触媒装置である Mad1:Mad2 が失われるため、スピンドル形成チェックポイントの不活性化へとつながる (図 13)。

動原体-微小管結合の抑制

動原体と微小管の結合を正しく行うために、Ndc80 の微小管結合状態は様々な制御を受けて変化する。例えば、Ndc80 は Aurora B キナーゼや Aurora A キナーゼによりリン酸化される¹⁶⁷⁻¹⁷¹。Aurora キナーゼを介したリン酸化は Ndc80 の微小管結合能を下げるため、誤った動原体-微小管結合を修正することが可能となる^{135,172}。また Ndc80 のリン酸化は PP1 と PP2A-B56 という動原体に局在する 2 つのホスファターゼによって打ち消されることで、動原体-微小管結合が安定化される(図 14)¹⁷³⁻¹⁷⁵。

Aurora B はセントロメアの内側に局在し、動原体外表に向けた濃度勾配が形成される。誤った結合状態のときは動原体に張力がかからず、基質である Ndc80 がセントロメア側に位置するようになるので、Aurora B が高濃度となり、リン酸化されやすくなる。一方で微小管先端が動原体と相互作用すると、ホスファターゼにより Ndc80 が脱リン酸化されるとともに、動原体外表を向けて位置するようになるようになり、Aurora B の影響を受けなくなるので Ndc80 と微小管の結合が安定化される^{176,177}。ただし、リン酸化状態の切り替わりが先に起こることで、動原体構造が変化して微小管との結合が安定化されるのか、逆に動原体と微小管の相互作用によって動原体構造が変化し、その結果リン酸化状態が変化して安定化されるのかについては論争がある^{172,178-181}。

また Aurora A はスピンドル極で働き、極側で生じやすい syntelic 結合や monotelic 結合を不安定化して、動原体-微小管結合を抑制することで誤った結合を修正する^{130 171 168}。またスピンドル極で動原体-微小管結合が不安定化された染色体は、Cenp-E とクロモキネシンによって、スピンドル中央に輸送される

ことで、安定な二極性結合に切り替わる¹⁷¹。

また Aurora キナーゼの他に、Mps1 や RZZ 複合体による負の制御機構も知られている (図 15)。Mps1 と RZZ 複合体の構成因子である Rod は Ndc80 に直接結合して、Ndc80 と微小管の結合を競合的に阻害する¹⁸²⁻¹⁸⁴。これにより分裂期初期の誤った動原体-微小管結合を防いでいると考えられている。一方で Ndc80 との競合阻害を解除して、微小管と Ndc80 の結合に切り替えるメカニズムに関してはよく分かっていない。

動原体—微小管結合の安定化

微小管-動原体結合に決定的な役割を果たすのは Ndc80 複合体であるが、動的な微小管と安定に結合を維持するためには、Ndc80 複合体が複数で働く必要があると考えられている。例えば *in vitro* において、Ndc80 複合体は単独では伸縮する微小管に対して結合を維持して追尾できない¹⁸⁵。しかし、Ndc80 複合体を人工的に多量体化すると、動的な微小管先端に結合したまま追尾を続けることが可能となる¹⁸⁶⁻¹⁸⁸。実際にヒト細胞では動原体微小管 1 本につき約 14 の Ndc80 複合体が結合すると実験的に予測されている¹⁸⁹。

また Ndc80 複合体に加えて、菌類では Dam1 複合体、哺乳細胞では Ska 複合体が補助的に働くことで、Ndc80 複合体-微小管の相互作用を安定化している (図 16)^{190-185,191-193}。しかしながら Dam1, Ska 複合体と相同なタンパク質はキイロショウジョウバエにおいて見出すことができないため、生物種によってはこれらの補助因子は必須ではないのかもしれない。またこれらの因子に加えて、動原体ではモータータンパク質を含めた様々な微小管結合タンパク質が、Ndc80 複合体による微小管結合を安定化している可能性も考えられる¹³⁴。

さらに動原体上での制御に加えて、動原体微小管の動態そのものも制御されている。例えば CLASP は動原体上で微小管重合を続けるのに決定的な役割をしている¹⁹⁴⁻¹⁹⁶。CLASP を欠損させた細胞では、一度形成したスピンドルが収縮し、最終的にスピンドルが崩壊する¹⁹⁶。もうひとつの重要な動原体微小管動態の制御因子としてキネシン-8 が挙げられる。

キネシン-8

キネシン-8 は生物種を通して保存されたモータータンパク質である。そのアミノ末端にモータードメインを有し、コイルドコイルドメインを介してテイル

ドメインをカルボキシル末端としている。これまでに出芽酵母の Kip3¹⁹⁷⁻²⁰⁰、分裂酵母の Klp5/Klp6²⁰¹⁻²⁰³、キイロショウジョウバエの Klp67A²⁰⁴⁻²⁰⁸、哺乳類の KIF18A²⁰⁹⁻²¹⁰、KIF18B²¹¹⁻²¹³、KIF19A²¹⁴ など様々な生物種において機能解析が行われてきた。

このうち哺乳細胞の KIF18A とその他の生物種のキネシン-8 は、動原体微小管プラス端上に強く局在し、スピンドルの長さ制御と染色体整列に機能していることが示されてきた。一方で KIF18A と異なり、KIF18B は主に星状体で微小管の動態制御を²¹¹⁻²¹²、KIF19A は繊毛の長さ制御を行っていることが明らかとなっている²¹⁴。これらのことから哺乳細胞の分裂期の動原体微小管の動態制御において、他生物種と機能的に相同なキネシン-8 は KIF18A であると考えられる。

キネシン-8 は発生や疾患において重要な役割を果たしている。例えば KIF18A のノックアウトマウスは精巣が十分に発達せず、雄性不妊となる²¹⁵。また KIF18A モータードメインにおける一アミノ酸置換変異体マウスでは、胚発生においてアポトーシスを起こし、雌雄ともに不妊となる²¹⁶。キイロショウジョウバエでは、Klp67A 発現量低下型の変異体において雄性不妊を生じる²⁰⁵。KIF19A のノックアウトマウスでは、水頭症および雌性不妊を引き起こす²¹⁴。またがん細胞において KIF18A や KIF18B は過剰発現していることから、がん疾患の関連性が示唆されている²¹⁷⁻²¹⁹。

ヒト培養細胞において KIF18A RNAi を行うと、長く歪んだスピンドルを生じ、染色体が激しく揺れ動き、スピンドル赤道面への染色体整列が完遂できなくなる²⁰⁹⁻²¹⁰。キイロショウジョウバエ S2 細胞において Klp67A RNAi を行うと、異常に長く歪んだスピンドルを生じ、染色体がスピンドル全体に散在する²⁰⁴⁻²⁰⁸。同様に出芽酵母 Kip3 を欠損させると、スピンドル上に動原体が集合せずに散在する表現型が観察される²²⁰。また分裂酵母 Klp5/Klp6 を欠損させると、前中期を通してスピンドルの長さが激しく変わり、微小管により動原体が異常な方向に押し出される様子が観察される²⁰³。このように今まで研究されてきたいずれの生物種でもキネシン-8 の機能を欠損させると染色体整列異常を生じる。

キネシン-8の局在および表現型は保存されている一方で、微小管に対する生化学的活性は様々な報告があり一貫性がない。生化学的活性が最もよく解析されているのは出芽酵母の Kip3 である。Kip3 はプラス端に向かって、長距離歩行し、先端に蓄積して安定な非加水分解型の GTP 微小管 (GMPCPP 微小管) を微小管の長さ依存的に脱重合するとともに、動的な微小管に対してカタストロフ頻度を上昇させる^{29,30,59}。また Kip3 のカルボキシル末端テイルドメインは微小管およびチューブリン二量体と直接結合して、微小管どうしを反平行に滑動するのに必須の役割を果たす^{221,222}。しかし微小管脱重合活性は分裂酵母の Klp5/Klp6 においては検出されず、微小管生成の促進活性が報告されている²²³。ヒト KIF18A は Kip3 と同様に、微小管プラス端方向に歩行して先端に留まるとともに^{209,224}、カルボキシル末端テイルドメインを介して微小管およびチューブリンに結合することが示されてきた²²⁵⁻²²⁷。しかし微小管に動態に対する影響は相反する報告がされている。一方の研究グループは、安定化した微小管を脱重合したことから脱重合活性を有すると結論づけている。これに対しもう一方の研究グループでは、安定化した微小管に対する脱重合活性は見出されず、代わりに微小管伸長と短縮両方を抑制するという報告をしている^{224,225}。前者の活性のほうが Kip3 と一致するが、後者の活性は KIF18A 機能阻害における染色体振動の表現型をよりよく説明していると思われる。

キイロショウジョウバエ S2 細胞

本研究で主に用いた S2 細胞は、キイロショウジョウバエ後期胚から単離された培養細胞であり²²⁸、分裂期の細胞を観察するのにいくつかの利点を有する。1 つ目は S2 細胞を用いた全ゲノム RNAi スクリーニングにより、スピンドル形成に関わる遺伝子が網羅的に明らかにされており、そのうちの多くの遺伝子が哺乳細胞においても保存されており、表現型にも相同性が認められる点である^{204,229}。2 つ目の利点は、室温で長期間培養可能で、二重鎖 RNA を培地に添加するのみで、90 %以上の効率で遺伝子ノックダウンを行うことができる点である²³⁰⁻²³²。3 つ目の利点は遺伝子重複が少ないため、表現型の解析を容易に行うことができる点である。例えばヒト細胞では分裂期には KIF18A と KIF18B の 2 つのキネシン-8 が働いていることが知られているが、S2 細胞では Klp67A の一種類のみが働いている²⁰⁴。4 つ目の利点は、高解像度でのスピンドル形成および染色体整列の観察が可能な点である。S2 細胞は通常の培養条件では直径約 10

μm の球状であるが、培養プレートの底面をレクチンの一種である Concanavalin A でコーティングすることで、細胞を直径約 $20 \mu\text{m}$ まで伸展させ扁平化することができる²³³。これにより、単一焦点面で、スピンドルおよび染色体の動態を、ライブイメージングにより詳細に追跡できるようになる。また蛍光観察における動原体微小管の 1 本 1 本がヒト培養細胞と比較して、明確に可視化できる点で、動原体-微小管の相互作用を解析するのに適している。

本研究ではキイロショウジョウバエの唯一のキネシン-8, Klp67A に着目して研究した。Klp67A は保存された微小管へのプラス端の歩行活性に加えて、微小管の安定化活性と不安定化活性の両方を有することを単一の実験系で再現した。S2 細胞を用いた機能解析により、これら 2 つの活性を用いて、Klp67A はスピンドル微小管の長さ制御だけでなく、動原体-微小管の相互作用を安定化するのにも重要な役割を果たしていることを示した。

結果

キネシン-8^{Klp67A} は *in vitro* においてプラス端に向かって歩行し、チューブリンと直接結合する

分裂期に機能するキネシン-8 において、共通する生化学活性は、微小管プラス端方向へ長距離歩行活性^{29,30,213,225,226,234} および、非モーター領域におけるチューブリン結合活性である。そこでキイロショウジョウバエキネシン-8 である Klp67A の全長タンパク質の生化学的活性を同定することを試みた。まず GFP-6His タグをカルボキシル末端に付加した Klp67A 組み換えタンパク質を大腸菌で発現させて精製した (図 17 A)。Klp67A-GFP を GMPCPP 微小管と混ぜ、全反射顕微鏡を用いて 1 分子レベルで観察したところ、Klp67A-GFP は微小管先端に向かって $25 \pm 0.7 \mu\text{m}/\text{min}$ (\pm standard error: SEM; 図 18. A,B) の速度で歩行した (動画 1)。この際 GFP シグナルは、観察と同時にすぐに一方の微小管先端に蓄積したため、どの程度の GFP シグナルが先端に到達するのか同定するのが困難だった (データには示さない)。そこで、高強度のレーザーで先端の GFP シグナルを蛍光退色させた後に、レーザー強度を弱め、退色していない GFP シグナルを観察した (図 18 A)。その結果 33 シグナル中 32 シグナルが微小管先端に到達して、とどまる様子が観察された。これらのことから Klp67A-GFP は微小管先端に向かって歩行し、一定時間先端で結合を続ける活性を有することが示された。この振る舞いは Kip3 や KIF18A, KIF18B と一致する^{235 225,226 213}。次に Klp67A-GFP の歩行方向を決定するために、歩行方向が既知のキネシン-1 モーターを用いた。微小管先端に Klp67A-GFP を先端に蓄積させた後、ガラス面に結合させたキネシン-1 モーターにより、この微小管を滑動させた (図 18 C)。その結果 GFP シグナルは滑動する微小管の終端に蓄積していた (図 18 D)。このことは他のキネシン-8 同様に、Klp67A が微小管プラス端に向かって歩行するモーターであることを示している。

次に Klp67A が Kip3²³⁶ や KIF18A²²⁷ 同様に、チューブリンに直接結合するかを調べるために、組み換え Klp67A-GFP タンパク質にチューブリンを加えてショ糖密度勾配遠心を行った。その結果、Klp67A-GFP はチューブリンと共に、より大きな複合体として分画されることが確認された (図 19 A)。このことは、

Klp67A はチューブリンと直接結合することを示している。さらに Klp67A とチューブリン結合する領域を同定するために、全反射顕微鏡でチューブリンリクルートメントアッセイを行った (図 19 B)。このアッセイでは GMPCPP 微小管上に蛍光タグをした Klp67A (全長もしくは部分欠失断片)を結合させた後、微小管上に浮遊の蛍光ラベルしたチューブリンがリクルートされてくるかどうかを確かめた。まず全長 Klp67A は、ショ糖勾配遠心の結果と同様に、微小管上にチューブリンをリクルートすることを確認した (図 19 C-D)。カルボキシル末端の一部を欠失させた「Tail-less」コンストラクト (1-612 アミノ酸)は細胞内で、Klp67A 欠損によるスピンドルの長さおよび染色体整列異常の表現型をレスキューできることが知られている²⁰⁸。この Tail-less コンストラクトも、全長より効率は低いものの、チューブリンを微小管上にリクルートする活性を有していた (図 19 C-D)。一方で非モーター領域を全て除いた「Motor-alone」コンストラクト (1-359 アミノ酸)は細胞内で微小管脱重合活性を有するものの²³⁷、Klp67A 欠損の表現型をレスキューできない²⁰⁸。この Motor-alone コンストラクトも GMPCPP 微小管上に結合したが、チューブリンは微小管上にほとんどリクルートされなかった (図 19 C-D)。これらの結果から Klp67A は非モーター領域を介してチューブリンを結合していることが示された。また Klp67A のチューブリンとの結合が、細胞内での機能に重要であることが示唆される。

キネシン-8^{Klp67A} は *in vitro* において動的な微小管の不安定化と安定化を同時に行う

次に Klp67A が伸縮する微小管に与える影響を *in vitro* で調べた (図 20 A)。最初に Klp67A 5, 10, 20, 50 nM をチューブリン 10 μ M とともに GMPCPP シード微小管に加えた。その結果、20 nM もしくは 50 nM の条件では微小管シードからのチューブリン重合はほとんど観察されなくなった (図 20 B)。また Klp67A を高濃度にすると、シード微小管どうしが Klp67A により束化されると同時に、微小管をガラス上で過剰に滑動させる様子が観察されたため、微小管動態の評価が困難となった (データには示さない)。したがってこれ以降の実験では 5 nM もしくは 10 nM で微小管動態の評価を行った。

まず、Klp67A と GMPCPP 微小管単独と混ぜたときの微小管脱重合活性の有無を評価した。その結果、出芽酵母 Kip3 や Mayr ら²⁰⁹ や Locke ら²³⁸ によるヒ

ト KIF18A の報告、もしくはキイロシヨウシヨウジョウバエの脱重合キネシンとして知られるキネシン-13, Klp10A^{239, 33} (ポジティブコントロールとして用いた; 図 21 A 下)とは異なり、Klp67A の明確な脱重合活性は見出されなかった (図 21 A 中央)。ただし Klp67A が濃度 10 nM では検出されない弱い脱重合活性を有しているという可能性は排除できなかつた。

次に Klp67A 5 nM、もしくは 10 nM 存在下における微小管動態のパラメーターを定量した (図 20 C-G)。まず、スピンドル微小管が長くなる表現型と一致するように、Klp67A は微小管のカタストロフ頻度を増加させた (図 20 F)。興味深いことに、この実験条件下では同時に、微小管のレスキュー頻度を増加させるとともに短縮速度を低下させ、結果的にポーズ時間の割合が増加した (図 20 E, G, H)。したがって、ヒトキネシン-8, KIF18A において報告されていた、微小管の安定化活性^{224, 225} と不安定化活性^{209, 238} を単一実験条件下で同時に検出した。また伸長速度はわずかながら有意に上昇した (図 20 D)。この結果はヒト KIF18B の報告と一致する²¹³。

さらに微小管プラス端での Klp67A-GFP の量と微小管の伸長もしくは短縮速度の相関を解析した (図 20 I, J, 図 21 B)。まず伸長するプラス端より、短縮するプラス端のほうが、わずかながらに GFP 蛍光強度が高い傾向を示した (図 21 B)。また微小管プラス端での GFP の蛍光強度を説明変数、微小管の伸縮速度を応答変数として、プロットしたところ、興味深いことに GFP 蛍光強度と短縮速度の間に負の相関を検出した ($P < 2 \times 10^{-16}$, ガンマ回帰、尤度比検定; 図 20 J)。一方で伸長速度との間には明確な相関は検出されなかった。 ($P = 0.99$, 図 20 I)。この結果は Klp67A がプラス端に蓄積して微小管カタストロフを誘導すると同時に、急激な速度で微小管が短縮するのを抑制する、というモデルと一致する。一方で Klp67A が、どのようにして微小管重合速度を増加しているかというメカニズムに関しては不明である。

キネシン-8^{Klp67A} 欠損は動原体-微小管結合の不安定化を生じる

次にスピンドルにおける Klp67A の機能を探索するために、S2 細胞における RNAi 表現型をライブ観察した。そこで染色体と微小管に加えて、GFP-Rod を蛍光観察した。Rod は RZZ 複合体の構成因子で、分裂期に絶えず動原体上にリクルートされ、微小管非結合状態の動原体、もしくは微小管側面で結合した動原

体上に蓄積する。動原体と微小管が先端で結合すると、Rod は微小管に沿ってスピンドル極方向に輸送される^{240,241} (図 13)。したがって GFP-Rod は、動原体と微小管先端結合した瞬間に、微小管に沿った極方向に向かう「流れ」として観察される一方で、結合後も動原体上に残留したシグナルが観察されるため、動原体-微小管の結合状態と同時に、動原体の動態を追跡するためのマーカーとなる (図 22 A)。まず、個々の染色体と GFP-Rod の動態を詳細に評価するために、キネシン-5, Klp61F をノックダウンすることで単極性のスピンドルを誘導した。また微小管マーカーとして蛍光色素、SiR-tubulin を使用した。Klp61F 単独をノックダウンしたコントロール細胞では、多くの動原体は、GFP-Rod シグナルが減少して、姉妹動原体ともに微小管結合をした syntelic 結合を示した (図 22 B, 動画 2)。Syntelic 結合をした動原体はライブ観察を通して静的でその位置をほとんど変えなかった。観察開始時に Monotelic 結合を示した染色体では、一方の動原体は微小管と相互作用して弱い GFP-Rod シグナルが観察される一方で、もう一方の動原体上で強い GFP-Rod シグナルが観察される (図 22 C, 上, 12 s)。このような動原体は、観察中に新たに形成された動原体微小管に沿って、GFP-Rod が流れていく様子から、syntelic 結合に切り替わることが分かる (図 22 C, 上, 153 s)。一度形成された syntelic 結合は安定でその結合状態を変えることはほとんどなかった (図 22 D コントロール)。

Klp61F と Klp67A を同時にノックダウンした細胞では、単極性で長く歪んだスピンドルが観察された (図 22 B 下)。また動原体の動態は劇的にコントロール細胞とは異なっていた (動画 2)。いくつかの動原体では明らかに動的で、monotelic 結合が多く観察された。またほとんどの動原体は GFP-Rod の流れにより示されるように、微小管先端と結合する様子が観察されたが (図 22 C, 171–174 s)、その結合は一時的であった。微小管が動原体から解離する頻度を測定したところ、Klp67A 欠損条件下において解離頻度は有意に上昇した (図 22 D, Klp67A RNAi)。一方で動原体が微小管先端で結合する頻度はコントロールと同程度であった (図 22 4 F)。興味深いことに、Klp67A 欠損細胞では多くの場合、動原体-微小管が解離した後、スピンドル極から遠位側に位置する動原体が、微小管に捕捉されて、スピンドル極側に向く「染色体の反転 (chromosome flipping)」が観察された (図 22 C, 下, 89–153 s)。

観察された表現型が SiR-tubulin によるアーティファクトでないことを確認するために、SiR-tubulin の代替として、EB1-SNAP を安定に発現する細胞を樹立し

た後、蛍光色素、SiR-SNAP を加えて観察した (図 23 A)。また微小管マーカーなしの細胞でも同様に観察した (図 23 C)。Klp67A を欠損した細胞では染色体の反転はコントロールと比較して 19 倍の頻度で観察されたことから (図 23 B, n = 15, 27)、Klp67A は単極性のスピンドルにおいて動原体-微小管相互作用を安定化する機能を有することが確認された。

次に二極性のスピンドルにおいて GFP-Rod の動態を追跡した (図 24 A, B, 動画 3)。Klp67A を欠損させると、以前報告されていた表現型と同様に、異常に長く歪んだスピンドルおよび染色体整列異常が観察された。二極性のスピンドルにおいては微小管どうしが込み入っているため、ほとんどの動原体は追跡するのが困難であったものの、スピンドル中央領域に整列する前の極周辺領域の動原体に関しては、単極性のスピンドルと同様に追跡可能だった。コントロール細胞では極周辺に位置する染色体には GFP-Rod シグナルが強く局在した (図 24A, 矢印)。スピンドル長軸方向に沿った GFP-Rod シグナル形状の伸展に示されるように、この姉妹動原体が微小管に捕捉されると (図 24 A, 54 s- 63 s)、増幅した動原体微小管上に GFP-Rod シグナルが移行するとともに、動原体上のシグナル強度が減少した (図 24A, 93-180 s)。このようにして二極性の先端結合 (amphitelic 結合) が形成され、染色体は最終的にスピンドルの赤道面に移動した (図 24A, 375 s)。一方で Klp67A を欠損させると、図 24 B に示すように、コントロールとは異なる染色体動態を示した。スピンドル極周辺の染色体で、GFP-Rod が微小管に沿ってスピンドル極方向に輸送されることが示すように、amphitelic 結合を形成するものの (図 24 B, 114 s)、この結合状態は 198 s で崩壊し、染色体が反転した (図 24 B, 198-285 s)。このような微小管-動原体の解離頻度の定量を行い、Klp67A ノックダウン細胞で有意に上昇することを確認した (図 24 C)。

以上の結果から、キネシン-8 欠損により動原体-微小管結合は不安定になると結論付けた。

微小管不安定化を誘導してもキネシン-8 欠損の表現型をレスキューできない

動原体-微小管結合の不安定化はキネシン-8 欠損に伴う、異常に長いスピンドルにより引き起こされる可能性が考えられる。この仮説を検証するため、キネシン-5^{Klp61F} と同時にオーグミンのサブユニットである Dgt6 をノックダウンした。

オーグミンの機能阻害は、スピンドル内部での微小管生成が減少するため、長いスピンドル微小管を生じる²⁴²。Klp61F/Dgt6 ノックダウン細胞では Klp67A 欠損と同様に monotelic 結合を多く生じたが (図 25 A, 動画 4)、微小管-動原体結合はより安定で染色体の反転はほとんど観察されなかった(図 26, E, Dgt6 RNAi)。

さらに、カタストロフ頻度の減少による長いスピンドル表現型が、動原体-微小管結合を不安定化しているという可能性を排除するため、Klp67A RNAi を行うと同時に微小管重合阻害剤であるコルセミド (colcemid) を低濃度で培地に添加して、細胞内のカタストロフを上昇させた。コルセミドで処理した Klp67A 欠損細胞ではスピンドルの長さはコントロールと同程度になったものの (図 25 C)、染色体整列異常 (図 25 B) と分裂期に要する時間は回復しなかった (図 25 D)。これらの結果は、微小管の長さ制御のみでは、Klp67A 欠損における動原体-微小管結合の不安定化を説明できないことを示唆している。

Aurora B キナーゼ阻害剤、もしくは CLASP^{Mast/Orbit} の過剰発現はキネシン-8^{Klp67A} 欠損による動原体-微小管結合の不安定化をレスキューする

哺乳細胞において、Aurora B キナーゼの阻害は、動原体-微小管の過度な安定化をもたらす。この理由のひとつは、動原体外表の構成因子である Ndc80 が脱リン酸化されるためである。Ndc80 は微小管との結合に決定的な役割を果たし、Aurora キナーゼによりリン酸化されることで微小管との結合親和性が減少する^{134,167,169,172}。そこでショウジョウバエにおける Aurora B 阻害剤、Binucleine 2²⁴³ を Klp67A/Klp61F を欠損させた S2 細胞に加えて、その動原体-微小管結合をライブで観察した。Binucleine 2 を加えると、GFP-Rod が極方向に向かってすぐに動原体から取り除かれることが示すように、ほとんどの動原体は安定な syntelic 結合をした(図 26 A, B 動画 5)。この結果は、Klp67A を欠損した細胞でも、Aurora B の活性が低下した条件では、動原体が微小管と安定に結合する能力を有していることを示している。したがって、Klp67A 欠損条件下でも、脱リン酸化型 Ndc80 複合体の微小管結合能力が保持されていると考えられる。

Klp67A を欠損すると、動原体微小管の短縮に伴う、極方向への強い染色体の動きが観察される (動画 2)。そこで Klp67A の微小管の短縮速度の低下と、レスキューとポーズ頻度を上昇する「安定化」の活性が、動原体-微小管の相互作用に決定的な役割を果たしている、という仮説を立てた。この仮説が正しければ、

他の手法により、強制的に微小管の安定化を誘導することで、微小管-動原体結合の不安定化の表現型を部分的にレスキューできると考えられる。そこで微小管動態安定化因子である CLASP (Mast もしくは Orbit と呼ばれる)を過剰発現した条件で、Klp67A/Klp61F RNAi 細胞における染色体動態を観察した (図 26 C, D)。この実験では、CLASP 過剰発現を確認するために、GFP タグを付加した GFP-CLASP を利用したため、GFP-Rod による動原体-微小管の相互作用を追跡できなかった。そこで代替として染色体の反転頻度を定量した。その結果、反転頻度は GFP-CLASP の過剰発現細胞で顕著に減少することが確認された。したがって Klp67A の微小管安定化活性が動原体-微小管結合を安定化するのに重要な役割を果たす、という仮説を支持する結果を得た (図 26 C-E)。最後に二極性スピンドルにおいて、GFP-CLASP 過剰発現を誘導して、Klp67A 欠損の長いスピンドルと、染色体整列異常がレスキューされるか検証した。しかし、Klp67A 欠損にともなう染色体整列異常とスピンドルの長さ異常、分裂期に要する時間は回復しなかった (図 27 A-C)。したがって CLASP による表現型抑制は動原体-微小管結合に限定されると考えられる。

考察

キネシン-8^{Klp67A}の生化学活性

Klp67A は、微小管プラス端方向への歩行活性に加えて、カタストロフ誘導とレスキュー、ポーズ上昇活性を有していた。この複数の活性の組み合わせは、同じアッセイ系で同定されてきた、他の5つのショウジョウバエの微小管プラス端動態制御タンパク質とは異なる^{23,33}。

歩行活性とカタストロフ誘導は Klp67A のモータードメインのアミノ酸配列から推測される。実際に細胞内で Klp67A の歩行活性を持たない変異体 (rigor mutant) を発現させても、表現型をレスキューすることができずに、動原体微小管先端への蓄積が消失する²⁰⁸。また Klp67A のモータードメインを発現させると、微小管の脱重合が誘導される^{208,237}。本研究では *in vitro* において Klp67A は重合中の微小管より、脱重合中の微小管にわずかに強く局在した。重合する微小管先端は GTP 型微小管、脱重合する微小管は GDP 型微小管となる。したがって、Klp67A は GDP 型の微小管により強く結合することが示唆される。先行研究では出芽酵母 Kip3 のモータードメインが、GMPCPP 微小管 (擬似的な GTP 型微小管) より、タキソール微小管 (疑似的な GDP 型微小管) や湾曲した微小管領域に強く結合することが示されている²⁴⁴。この研究では Kip3 が微小管先端の湾曲構造を安定化することで、脱重合を誘導するというモデルが提唱されている。Klp67A モーターも同様の機構によりカタストロフを誘導しているのかについては興味深い。

一方で微小管の安定化活性であるレスキュー頻度の上昇、ポーズ頻度の上昇、短縮速度の減少、伸長速度の上昇はどのようにして誘導されるのだろうか。本研究では、非モータードメインが浮遊のチューブリンを微小管上にリクルートするのに必須であることを示した。また短縮速度の減少に関しては Klp67A の先端蓄積との相関が確認された。これらのドメインは Klp67A を動原体上への局在および、分裂期の染色体整列においても必須であるため²⁰⁸、Klp67A のチューブリン結合が動原体動態制御に必須の役割を果たしていることが示唆される。In vitro 実験により、他生物種のキネシン-8 の非モータードメインが微小管プラス端先端の蓄積に必須であり^{213,221,225,226}、出芽酵母 Kip3 の非モータードメインは安定化したタキソール微小管の脱重合を抑制することが示されている²²¹。した

がって Klp67A は非モータードメインを介したチューブリン結合とプラス端での係留により、局所的なチューブリン濃度を高めて微小管を安定化していることが予想される。これによりモータードメインによるカタストロフ誘導活性と拮抗的に働き、微小管短縮速度を減少させ、伸長方向に誘導しているのかもしれない。これは Stu2/XMAP215 が、先端のチューブリンの湾曲した構造を認識して結合し、先端の局所的なチューブリン濃度を上げることで微小管重合を促進しているというモデルを想起させる²⁴⁵。ただし、in vitro において微小管のレスキューはチューブリン濃度にほとんど依存しないことから⁸、レスキュー誘導活性に関しては単なる局所濃度調節のみでは説明できないのかもしれない。ひとつの仮説として短縮速度減少に伴い、GTP キャップを再び得る確率が増加するというモデルが考えられる。Klp67A はレスキュー頻度の上昇と、短縮速度の減少を誘導した。これら 2 つの活性は Tpx2^{246,247}, Tau^{248,249}, CLASP³² でも見出されている。Tpx2 および CLASP は微小管の湾曲構造を認識する^{36,250}。Tau はチューブリンダイマー間とチューブリンダイマー内両方に結合することで微小管の安定化を促進することが示されている²⁵¹。微小管の先端構造は伸長、短縮状態両方で湾曲した構造を取り、重合にはブラウン運動によるプロトフィラメントの屈曲性の変化が重要であることが示唆されている¹³。このようにレスキュー頻度の上昇には、微小管プロトフィラメントの特定の構造を安定化し、熱力学的な平衡を変化させることが必要なのかもしれない。また最近、CLASP においてはレスキュー頻度の上昇は必ずしも短縮速度の減少が伴うわけではないことが示されている^{34,35,36}。Klp67A のレスキュー頻度上昇と短縮速度の減少は独立なのかどうかについては不明である。また in vitro において、モータータンパク質が微小管上を歩行することで、微小管構造に損傷を与え、その領域へ新たな GTP チューブリン流入することが示されている²⁵²。このような微小管の自己修復は微小管レスキューにつながる⁶¹。Klp67A のレスキュー誘導活性が、自己修復メカニズムに関わっているどうかは興味深い。

KIF18A が脱重合を誘導するのか、それとも微小管伸縮を抑制するのかに関しては議論がある^{209,224,238}。しかしこれらの研究は異なる実験条件で行われたものであり、実際の細胞内では KIF18A は Klp67A と類似した両方の活性が機能しているのかもしれない。また出芽酵母の Kip3 は複数の研究により、微小管脱重合活性を有することが認められている^{29,30}。一方で Kip3 は細胞内において、脱重合活性だけでなく、チューブリン結合領域を用いて、レスキューとポーズを促

進することが知られている^{29,236}。以上のことから Klp67A の *in vitro* 再構成により見出された活性は、進化的に保存されたものなのかもしれない。

キネシン-8^{Klp67A}による動原体微小管動態の制御

過去の RNAi、もしくは変異体を用いた研究から、Klp67A のスピンドルの長さを抑制する機能が示されてきた^{204,206,237,253-256}。この機能は本研究でも確認され、主にカタストロフ誘導活性に依存していると考えられる。しかしコルセミド処理実験は、カタストロフ頻度の減少により微小管が長くなることが、染色体整列異常を引き起こす原因ではないことを示している。

分裂期中期の動原体微小管はプラス端では常に重合を続けている¹²³。Klp67A は *in vitro* においてカタストロフを強く誘導したにも関わらず、どのようにして動原体微小管伸長を行っているのだろうか。動原体外表では Klp67A 以外にも様々な微小管結合タンパク質が局在している¹³⁴。代表的な例として微小管安定化因子である CLASP が挙げられる。キイロショウジョウバエの S2 細胞において、CLASP を機能阻害した場合には、一度形成されたスピンドルがやがて収縮して崩壊してしまう¹⁹⁶。また *in vitro* 実験において CLASP を加えると微小管のカタストロフは全く観察されなくなる³³。また EB1 によるカタストロフ誘導も完全に抑制する³³。このように実際の細胞内では CLASP が微小管重合を続けるのに必須の役割を果たし、Klp67A により誘導されるカタストロフは完全に抑制されるため、この活性はスピンドル全体の長さを短くすることに限定されることが考えられる。もしくは非動原体微小管の細胞内の分布を、制御している可能性も考えられる。実際にキイロショウジョウバエ胚において Klp67A の機能阻害を行うと、遠位側のスピンドル半分に過剰に微小管が侵入してしまうことが知られている²⁵⁷。

微小管はどのようにして動原体から解離するのだろうか。Klp67A 欠損細胞においてレスキュー・ポーズ誘導因子である CLASP を過剰発現すると、微小管の解離頻度が減少した。この結果は、微小管が速い速度で脱重合を続けた場合に、動原体が微小管から解離しやすくなることを示唆している。一方で *in vitro* で Ndc80 複合体を多量体化した場合、脱重合する微小管に結合を続けて追尾することが可能であることが示されている¹⁸⁶⁻¹⁸⁸。しかし実際の細胞内では、Aurora B キナーゼが Ndc80 による微小管結合を阻害するため、これらの報告は本研究

の結果と相反しないと考えられる。実際に Aurora B を阻害した場合には Klp67A 欠損細胞でも安定な動原体-微小管結合をただちに形成することが確認された。

本研究の結果から、キネシン-8 が、スピンドル微小管の長さを制限することに加えて、動原体微小管動態を安定化することで、動原体-微小管結合が安定化されるという新たな制御機構が提案される (図 28 A)。

キイロショウジョウバエとヒトキネシン-8 の機能比較

これまでにヒト培養細胞において KIF18A を欠損させると、微小管動態が異常に動的になり、激しい染色体振動が観察されることが報告されていた²⁵⁸。この表現型は *in vitro* における微小管伸長、短縮抑制活性と一致する²²⁴。しかし、これらの報告では、動原体-微小管結合の不安定化は報告されていなかった。

KIF18A のカルボキシル末端にはホスファターゼ、PP1 の結合モチーフが存在する²⁵⁹。最近の研究で、PP1 が KIF18A により動原体上に局在化することで、Ndc80/Hec1 を脱リン酸化し、動原体と微小管の相互作用が安定化することが示されている²⁶⁰。しかし同時に PP1 非依存的な染色体整列制御機構も存在することが示されている²⁶⁰。Klp67A においては、KIF18A に存在する PP1 結合モチーフ配列を見出すことができないものの、Klp67A が PP1 を介した動原体-微小管結合安定化のメカニズムに関わっているかどうかは興味深い。また、もうひとつの最近の研究では、KIF18A 欠損細胞において、動原体上に張力がかからずに、動原体上にチェックポイントタンパク質である Mad1 のシグナルが高頻度で観察されている²⁶¹。それにもかかわらず、Mad1 シグナルが検出される動原体にも、シグナルが検出されない動原体同様に、動原体-微小管結合が形成されていることを免疫染色により示されている²⁶¹。このことは、KIF18A は動原体の微小管結合に直接寄与しているわけではないことを示している。この結果はキイロショウジョウバエ Klp67A 欠損細胞においても、動原体-微小管結合が形成されるという結果と一致する。一方で KIF18A 欠損細胞においては、Klp67A 欠損において観察される、一度形成された動原体-微小管結合が明確に解離する表現型は観察されていない。これは哺乳細胞では、キイロショウジョウバエで保存されていない Ska 複合体や SKAP/Astrin 複合体などの Ndc80 の微小管結合を補助的に安定化するタンパク質が存在するからなのかもしれない^{262 185}。それにも関わらず、KIF18A 欠損により、動原体上の張力が減少して、チェックポイントが活性

化することから²⁶¹、KIF18Aによる動原体-微小管動態制御が分裂期を進行させるためには必須であると考えられる。KIF18Aは発生や発がんに関連していることが知られている²¹⁵⁻²¹⁸。また最近の研究からKIF18Aをノックアウトしたヒト網膜色素上皮細胞やKIF18Aの変異体マウスで、染色体分離に失敗し微小核を生じることが示されている²⁶³。微小核は腫瘍細胞における染色体不安定性(chromosome instability)のマーカースとされ、chromothripsisと呼ばれる、染色体内で大規模な構造の再編成を引き起こす原因になる^{264,265}。それにもかかわらずKIF18A変異体マウスでは腫瘍抵抗性を示すようになる^{217,266,267}。KIF18Aを通じた染色体整列メカニズムがこれらの現象にどのように関わっているのかについては興味深い。

材料と方法

RNAi と細胞培養方法

S2 細胞培養およびRNAiは文献^{229,119,230}に従って行った。Schneider's *Drosophila* 培地 (Gibco)中にウシ胎児血清 10%を加えて、細胞を培養した。細胞ラインの樹立には、プラスミドDNAをトランスフェクション試薬 TranIT-Insect reagent (タカラ)を用いて細胞内に導入した後、ハイグロマイシン、もしくはピューロマイシンにより薬剤選択した。本研究で使用されたプラスミドを表1に示す。RNAiに使用する二重鎖RNAは文献^{237 229}に従った。RNAi実験では、培地中に二重鎖RNAを投与して3-4日間細胞を培養した後、Concanavalin -Aをコーティングしたガラス底ディッシュに移して顕微鏡観察を行った。

表 1. 本研究で用いたプラスミド

Name	Insert	Vector	Note
pED128	Klp67A[full-length]-GFP-6His	pET23	
pED182	Klp67A[1-612a.a.]-GFP-6His	pET23	
pED183	Klp67A[1-359a.a.]-GFP-6His	pET23	
pGG952	6His-Klp10A	pDEST17	Moriwaki and Goshima (2016)
pED158	sfGFP-Rod	pAc	
pGFP-CLASP	GFP-Mast/Orbit	pMT	Goshima et al. (2007)
pGG482	H2B-mCherry	pAc	
pED309	EB1-SNAP	pAc	
pCoHygromycin	HygR	Copia	

顕微鏡観察

S2細胞の微小管は15 nM SiR-tubulin (Cytoskeleton)で染色した。EB1-SNAPの可視化には15 nM、もしくは30 nM SNAP-Cell 647-SiR (NEB)を用いた。S2細胞のライブイメージングには、スピニング共焦点顕微鏡 (ニコン Ti; 100× 1.45 NA もしくは 60× 1.40 NA レンズ; EM-CCD カメラ ImageEM [浜松ホトニクス]; CSU-X1 [横河電機])を用いた。コルセミド処理実験では、細胞を60 ng/mL コルセミドで処理した後、2時間培養した後、顕微鏡撮影を2分毎に行った。過剰発

現実験では、100 μ M CuSO₄ を添加した培地で、12 時間以上培養して GFP-CLASP 発現誘導を行った後に、顕微鏡観察した

In vitro 再構成実験のイメージングには、全反射顕微鏡 (ニコン Ti; 100 \times 1.49 NA レンズ; EM-CCD カメラ Evolve [Roper]). を用いた。488, 561 もしくは 640 nm のレーザーを励起光として用いた。

顕微鏡は Micromanager により制御し、Fiji/ImageJ を用いて画像処理を行った。

タンパク質精製

Klp67A-GFP-6His タンパク質の精製には、まず Klp67A-GFP-6His 発現コンストラクトを大腸菌コンピテントセル、SoluBL21 に形質転換し、L-rich 培地 500 mL, 37 $^{\circ}$ C で OD₆₀₀ = 0.5 ~1.0 まで培養した後、0.5 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して発現誘導を行い、18 $^{\circ}$ C、20 時間、200 rpm で培養、細胞を回収、液体窒素で凍結保存した。回収した細胞の半分を 30 mL 破碎 バッファー (50 mM MOPS-NaOH [pH = 7.2], 250 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM ATP, ペプチド混合物 [1 μ g/ml leupeptin, pepstatin, chymostatin, aprotinin]) に再懸濁し、ホモジェナイザー(450DA; Branson)により超音波破碎を行った。破碎液を 9,400 \times g, 25 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心した後、上清を Ni-NTA ビーズ 500 μ L と混合し、60 分から 90 分間、4 $^{\circ}$ C で反応させた。反応後の Ni-NTA ビーズ を 50 mL 洗浄 バッファー (破碎 バッファーおよび 20 mM imidazole および 0.2 % Tween) で洗浄した後、溶出 バッファー (MRB80 [80 mM PIPES-KOH (pH = 6.8), 1 mM EGTA, 4 mM MgCl₂] および 100 mM KCl, 250 mM imidazole, 2 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM ATP) で 200 μ L \times 5 回、目的タンパク質を溶出した。2.2 mL, 11 \times 35 mm 超遠心チューブ (Beckman Coulter) 中に 2.5- 40 g/mL のショ糖密度勾配を作ったバッファー (MRB80, 100 mM KCl, 0.1 mM ATP およびショ糖) を 2 mL 準備し、このバッファーの上に 200 μ L の溶出タンパク質を積み重ね TLS-55 ローター (Beckman Coulter) 200,000 \times g, 4 時間、4 $^{\circ}$ C で遠心後、16 個のフラクションに分けた。SDS-PAGE により目的タンパク質が含まれるフラクションを確認し、液体窒素で凍結後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

Klp67A (1-612 アミノ酸)-GFP-6His と Klp67A (1-359 アミノ酸)-GFP-6His の精製は、全長 Klp67A-GFP-6His と同様の手法で精製した。ただし、ショ糖勾配遠心勾配遠心のステップを除き、イミダゾール溶出後、代わりに PD MiniTrap G-25

(GE ヘルスケア)により MRB80 , 100 mM KCl, 20 % ショ糖, 0.1 mM ATP, 1 mM DTT に脱塩・置換した。溶液は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

6His-Klp10A は文献³³に従い、Ni-NTA ビーズを用いて精製した。

S2 細胞由来のチューブリンは、文献^{33,268}の手法に従い、GST-TOG1 (TOG1: 出芽酵母 Stu2 の 1-306 アミノ酸)を担体に共有結合したカラムを用いて、S2 細胞から直接精製した。

Klp67A-チューブリン複合体のショ糖密度勾配遠心

精製した Klp67A-GFP-6His ~2 μ M を Tube-O-DIALYZE, Micro, 8K MWCO (タカラ)で 4 °C で 6 時間透析することにより MRB80, 75 mM KCl, 5 % sucrose, 0.1 mM ATP, 1 mM DTT で構成されるバッファーに置換した。透析した Klp67A にブタチューブリン、ATP, GTP をそれぞれ終濃度 4 μ M, 1 mM, 1mM になるように混ぜて、10 分間室温で反応させた。混合溶液をショ糖密度勾配バッファー (MRB80, 75 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM DTT, sucrose) に積み重ね、5-30 %ショ糖密度勾配を 2.2-ml, 11- \times 35-mm チューブ中に作成した。TLS-55 ローターで 214,000 g, 5.5 時間, 4°C で遠心後、16 フラクシオンに分け、ピークとなるフラクシオンを SDS-PAGE, Sypro-Ruby (Thermo Fisher Scientific) 染色により確認した。

In vitro 微小管動態再構成実験

In vitro 微小管動態再構成実験は基本的に文献^{23,33}に従って行った。スライドガラスに1~2 mm の隙間を開けて2本の両面テープを貼り、この上にシラン化したカバースリップを被せることでフローチャンバーとした。フローチャンバーに5% 抗ビオチン抗体 (Invitrogen)を流し、カバースリップのシラン基と反応させ、ガラス面に抗体を共有結合させた。MRB80 でフローチャンバーを洗浄後、1% Pluronic F127 (Invitrogen)を流しブロッキング反応を行った。MRB80 で洗浄後 0.5 mg/mL κ -casein を含む GMPCPP シード微小管 (80 μ M ブタチューブリン、10 μ M の Alexa Fluor 647 ラベルブタチューブリン、10 μ M ビオチン化ブタチューブリンおよび 1 mM GMPCPP)を 1 μ M に希釈して流して、ガラス面の抗ビオチン抗体と架橋反応を行った。MRB80 で洗浄後、動態アッセイバッファー (MRB80, 75 mM KCl, 1 mM GTP, 1mM ATP, 0.5 mg/mL κ -casein, 0.1% methylcellulose, 活性酸素除去試薬 [50 mM glucose, 40 μ g/mL glucose-oxidase, 200 μ g/mL Catalase, 4 mM DTT], 5.5% sucrose)に 10 μ M チューブリン(80% S2 チューブリン、20% Alexa Fluor 568 ラベルブタチューブリン)と Klp67A-GFP-6His を混合した溶液をチャンバーに 10 μ L 流し、ロウでシールして微小管重合反応を開始した。作成したサンプルをすぐに全反射顕微鏡にセットして3秒ごと15分間イメージングを行った。観察中は空調により、 \sim 25 $^{\circ}$ C に保った。微小管脱重合アッセイは反応溶液にチューブリンを含まない点を除き、同様の手法で行った。

微小管滑動アッセイは基本的に文献²⁶⁹に従って行った。まずフローチャンバーを1 \times MRB80 で洗浄した後、精製したキネシン-1^{KIF5B} モーター、K560-6His を流してガラス面に結合させた。1 \times MRB80 でチャンバーを洗浄した後、滑動アッセイバッファー(1 \times MRB80, 75 mM KCl, 1 μ M GMPCPP 微小管 [Alexa Fluor 647 ラベル微小管を 10%含む], 1 mM ATP, 0.5 mg/ml κ -casein, 0.1% methylcellulose, 活性酸素除去試薬, 5% sucrose)を 4 nM Klp67A-GFP-6His とともに流して反応を開始した。

キネシンの1分子運動アッセイでは、まず微小管脱重合アッセイと同様の方法でサンプルを作成した後、微小管先端の過剰量の GFP 蛍光を退色させるために、20 mW で3分間、488 nm レーザーを照射した。その後レーザー出力を40%に落とすことで、微小管上の GFP 蛍光の動態を観察した。Klp67A-GFP-6His の濃度は 50-200 pM に調節した。

データ解析

動原体-微小管結合の不安定性は、動原体が微小管から解離する回数 (monotelic 結合から非結合,もしくは側面結合状態に遷移する場合か, syntelic 結合から monotelic 結合に遷移する場合)をカウントすることにより決定した。微小管-動原体結合頻度は、monotelic 結合の微小管において、GFP-Rod シグナルの明確な極方向への輸送の回数をカウントすることで決定した。

微小管プラス端の動態の解析はカイモグラフを作成することにより行った。動態パラメーターの定義は文献³³に従った:微小管伸長もしくはポーズから、短縮へ切り替わる点をカタストロフと定義した。カタストロフ頻度は、カタストロフのイベント回数を伸長時間とポーズ時間の合計値で割った値と定義した。短縮からポーズ、もしくは伸長に移り変わる点をレスキューと定義した。レスキュー頻度はレスキューイベントの回数を短縮時間で割った値と定義した。微小管が5秒以上(15フレーム)の間、0.32(2ピクセル) μm より大きく、伸長も短縮もしない状態をポーズと定義した。

GMPCPP 微小管上のチューブリン蛍光強度は、撮影開始から5分後画像上において、Fiji/ImageJのラインツールを用いて測定した。得た値は微小管上のKlp67A-GFPの蛍光強度で割った。

微小管プラス端におけるKlp67A-GFPの蛍光強度と動態速度の定量には、まずカイモグラフの微小管プラス端上にFijiのsegmented lineツールを用いてROIを設定した。なお、撮影焦点面から外れたサンプルは解析から除外した。各セグメントのxy座標を取得し、速度を計算した。またセグメント間に含まれる各ピクセルについて、微小管軸に沿った5ピクセル(0.8 μm)中の最大強度をそれぞれ取得し、セグメント間の蛍光強度の平均値を算出した。この値からバックグラウンド蛍光値を引き、これをGFP蛍光強度としてx軸に速度をy軸にプロットした。なお速度が0以上の値を伸長、負の値を短縮とした。次に蛍光強度を説明変数、動態の速度を応答変数としてガンマ分布することを想定し、一般線形回帰を行った。リンク関数には逆数関数を用いた。なお応答変数を正の値とするため、速度0を 1×10^{-9} で近似した。算出されたモデルの予測値を近似曲線として95% Wald信頼区間とともに描画した。 χ^2 分布を使った尤度比検定によりP値を算出した。画像からの値取得はFiji上でJythonスクリプトを作成して行い、取得した値の統計処理、データの可視化にはRもしくはPrismを用いた。

動画説明

動画 1. キネシン-8^{Klp67A} のプラス端への歩行と蓄積

全反射顕微鏡で Klp67A を 1 秒ごとに撮影した。最初に、高強度のレーザーにより、微小管先端に蓄積した Klp67A-GFP シグナルを蛍光退色させた後、レーザー強度を落として、先端に歩行する Klp67A-GFP を観察した。動画はレーザー強度を落とした後の像を示している。マゼンタ, GMPCPP 微小管, 緑, Klp67A-GFP, バー 5 μm .

動画 2. 単極性スピンドルにおける動原体-微小管結合の安定性

Klp61F RNAi、もしくは Klp61F/Klp67A RNAi 処理細胞において GFP-Rod (緑), H2B-mCherry (青), SiR-tubulin (マゼンタ) をスピニング共焦点顕微鏡で 3 秒ごとに撮影した。バー, 5 μm .

動画 3. 二極性スピンドルにおける動原体-微小管結合の安定性

コントロール RNAi、もしくは Klp67A RNAi 処理細胞において GFP-Rod (緑), H2B-mCherry (青), SiR-tubulin (マゼンタ) をスピニング共焦点顕微鏡で 3 秒ごとに撮影した。バー, 5 μm .

動画 4. オーグミン^{Dgt6} 欠損における動原体-微小管結合の安定性

Klp61F/Dgt6 RNAi 処理細胞において GFP-Rod (緑), H2B-mCherry (青), SiR-tubulin (マゼンタ) をスピニング共焦点顕微鏡で 3 秒ごとに撮影した。バー, 5 μm . コントロール, Klp61F/Klp67A RNAi 条件 (動画 2) と比較参照。

動画 5. キネシン-8^{Klp67A} 欠損細胞において、Aurora B キナーゼの阻害を行うと単極性スピンドルにおいて安定な syntelic 結合が形成される

Klp61F/Klp67A RNAi 処理細胞において 20 μM の Binucleine -2 もしくは DMSO (コントロール) で処理した後、GFP-Rod (緑), H2B-mCherry (青), SiR-tubulin (マゼンタ) をスピニング共焦点顕微鏡で 3 秒ごとに撮影した。バー, 5 μm .

動画 6. CLASP^{Mast/Orbit} 過剰発現によりキネシン-8^{Klp67A} 動原体-微小管結合の安定性が回復する。

GFP-CLASP を過剰発現する Klp61F/Klp67A RNAi 処理細胞において GFP-CLASP/GFP-Rod (緑), H2B-mCherry (青), SiR-tubulin (マゼンタ) をスピニング共焦点顕微鏡で 3 秒ごとに撮影した。バー, 5 μm .

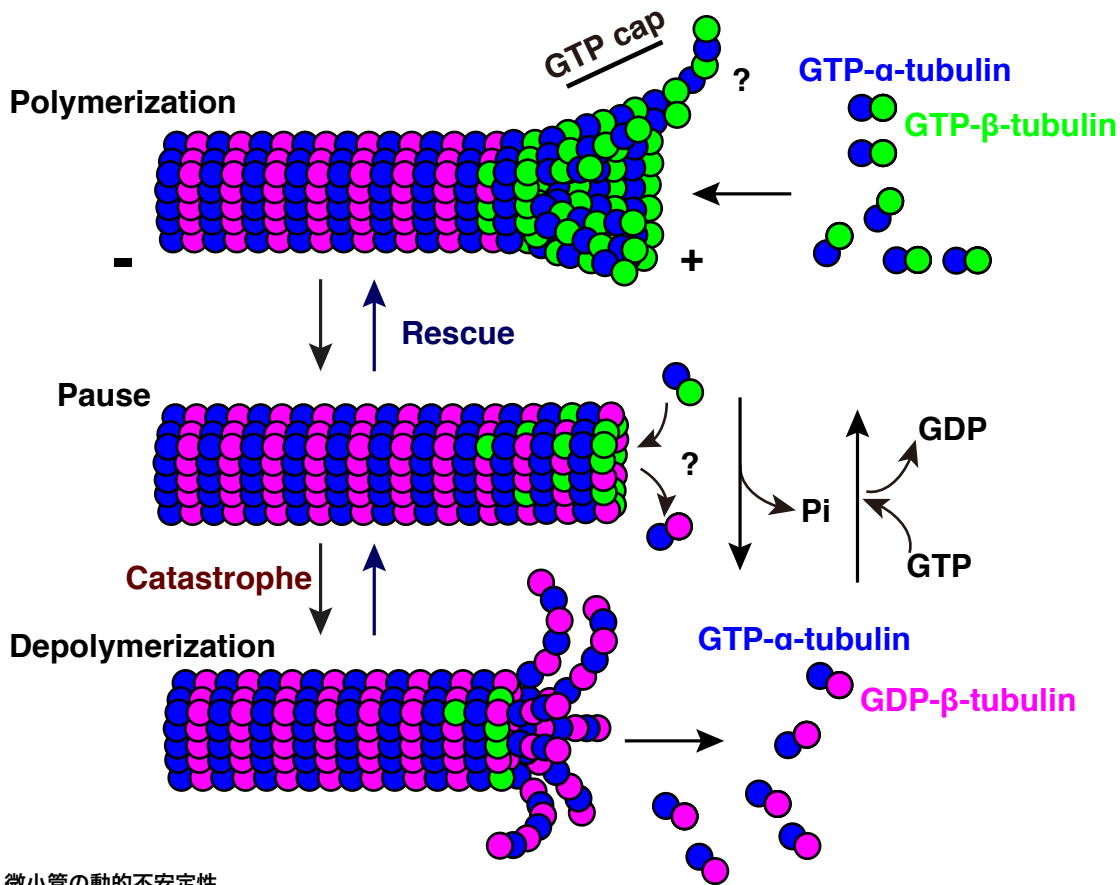


図 1 微小管の動的不安定性

微小管は α -チューブリン、 β -チューブリンのヘテロ二量体が重合した筒状の構造体であり、細胞内では絶えず重合と脱重合のサイクルが繰り返されている。重合と脱重合の切り替えは、 β -チューブリンに結合したGTPの加水分解により引き起こされる。 α -チューブリンは恒常的にGTP結合している(GTP- α -チューブリン、青)。一方で β -チューブリンはGTP結合型(GTP- β -チューブリン、緑)とGDP結合型(GDP- β -チューブリン、マゼンタ)の二種類のコンフォメーションが存在する。 β -チューブリンのヌクレオチド結合状態により、それぞれのヘテロ二量体はGTPチューブリンおよびGDP-チューブリンと呼ばれる。GTPチューブリンが微小管繊維に取り込まれるとGTPの加水分解が誘導されるが、GTP-チューブリンの流入速度が十分に速ければ、GDPに加水分解されずにGTPチューブリンとして残る。これをGTPキャップと呼ぶ。GTPキャップが存在する微小管は伸長(重合)を続けるが、GTPキャップが失われた微小管は短縮(脱重合)に切り替わる。これをカタストロフと呼ぶ。一方で短縮から伸長に切り替わることをレスキューと呼ぶ。微小管内に点在するGTPチューブリンはレスキューを誘導すると考えられている。見かけ上、伸長も短縮もしない微小管の状態をポーズと呼ぶ。伸長中の微小管はシート状の構造、もしくは湾曲した構造を取り、短縮中の微小管は皮を剥いたような構造を取っている。また図では便宜的に伸長と短縮の間mediateとして示唆されてる平滑末端構造をポーズとして描いているが実際にはポーズ状態における先端構造は分かっていない。

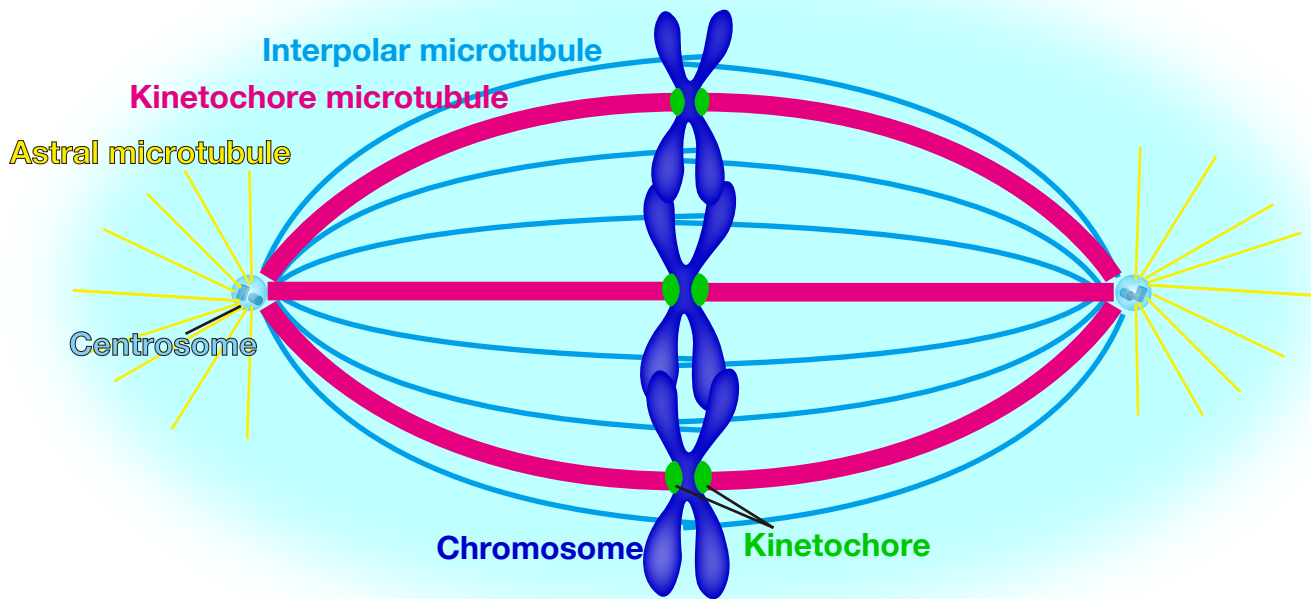
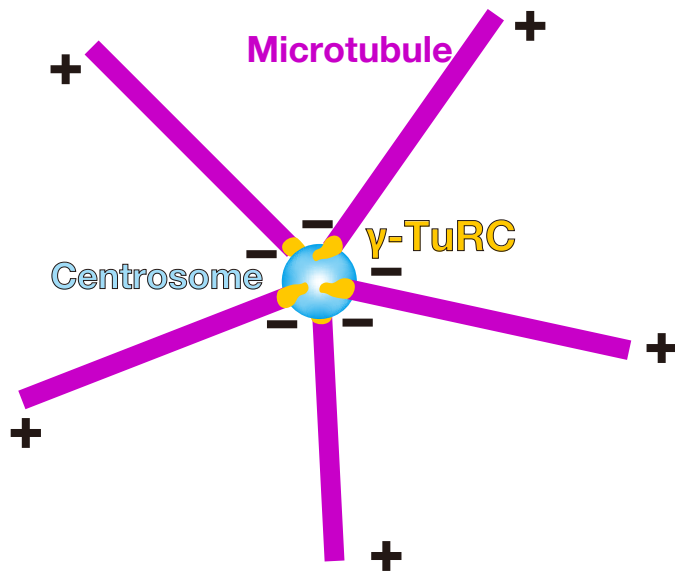


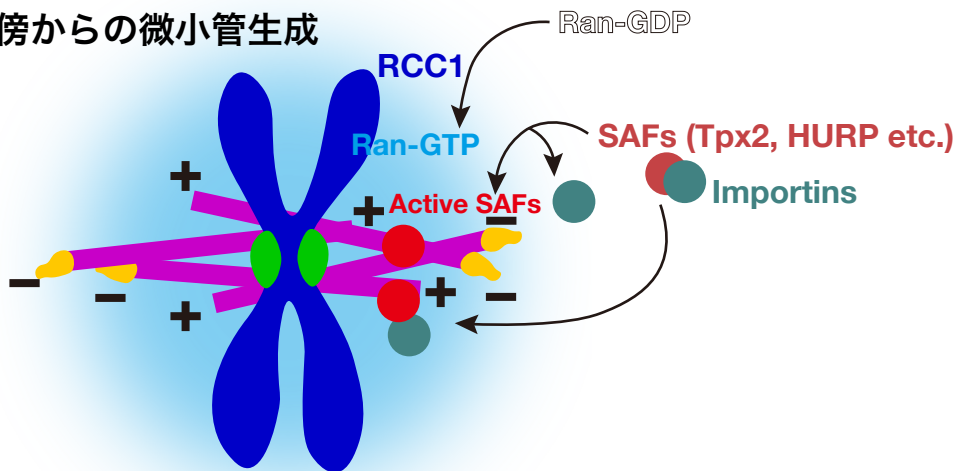
図 2. 動物細胞の分裂期スピンドル

動物細胞における典型的な中期分裂期スピンドルの模式図。1. 動原体と直接接続する動原体微小管 (kinetochore microtubule), 2. 動原体と相互作用せずにプラス端どうしで向き合う極間微小管 (interpolar microtubule), 3. 中心体から遠心方向に伸びる星状体微小管 (astral microtubule) で構成される。

A. 中心体からの微小管生成



B. 染色体近傍からの微小管生成



C. スピンドル内部からの微小管生成

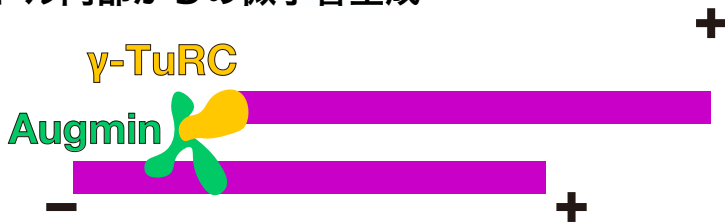


図 3. 分裂期における 3 種類の微小管生成方法

動物細胞における分裂期微小管生成の模式図。(A) 中心体からの微小管生成。分裂期への進行とともに中心体周辺には様々なタンパク質が集積する この構造体を PCM (pericentriolar material) と呼ぶ。PCM は γ -TuRC を中心体にリクルートし、微小管生成を活性化する。(B) Ran-GTP に依存した染色体近傍からの微小管生成。染色体上の RCC1 により Ran-GDP から Ran-GTP に変換される。Ran-GTP は、Importin との結合により不活性化されたスピンドル形成因子 (spindle assembly factors : SAFs) を活性化し、微小管生成が促進する。(C) オーグミンを介したスピンドル微小管からの微小管生成。オーグミンは γ -TuRC をスピンドル微小管上に局在化し、新たな微小管を既存の微小管と平行方向に生成する。いずれの微小管生成方法も微小管重合核因子として知られる。 γ -TuRC に大きく依存して起こる。

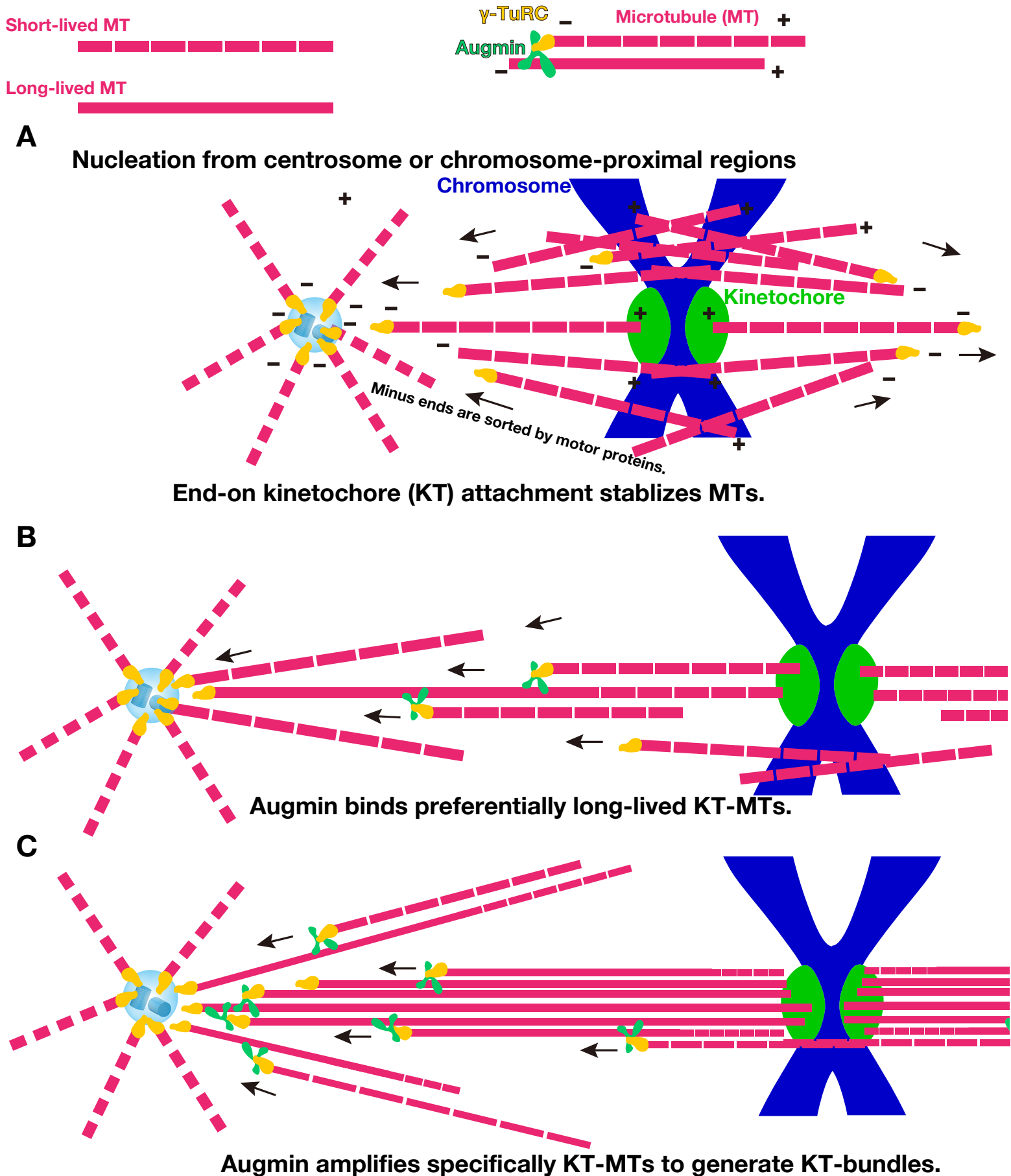


図 4. オグミンを介した動原体微小管束の形成

(A) 核膜崩壊後、中心体および染色体近傍で生成された微小管は動原体と相互作用するとともに、モータータンパク質によってプラス端を染色体側に向けて、両極に輸送される。(B) 動原体と相互作用した微小管は安定化されて脱重合されにくくなる。オグミンはこの長寿命の微小管に優先的に結合して、既存の微小管と平行方向に新たな微小管を生成する。(C) オグミンにより生成された微小管も動原体まで到達することで安定化するため、さらなるオグミンによる微小管生成が促進される。このような正のフィードバックメカニズムによって動原体微小管束が形成される。

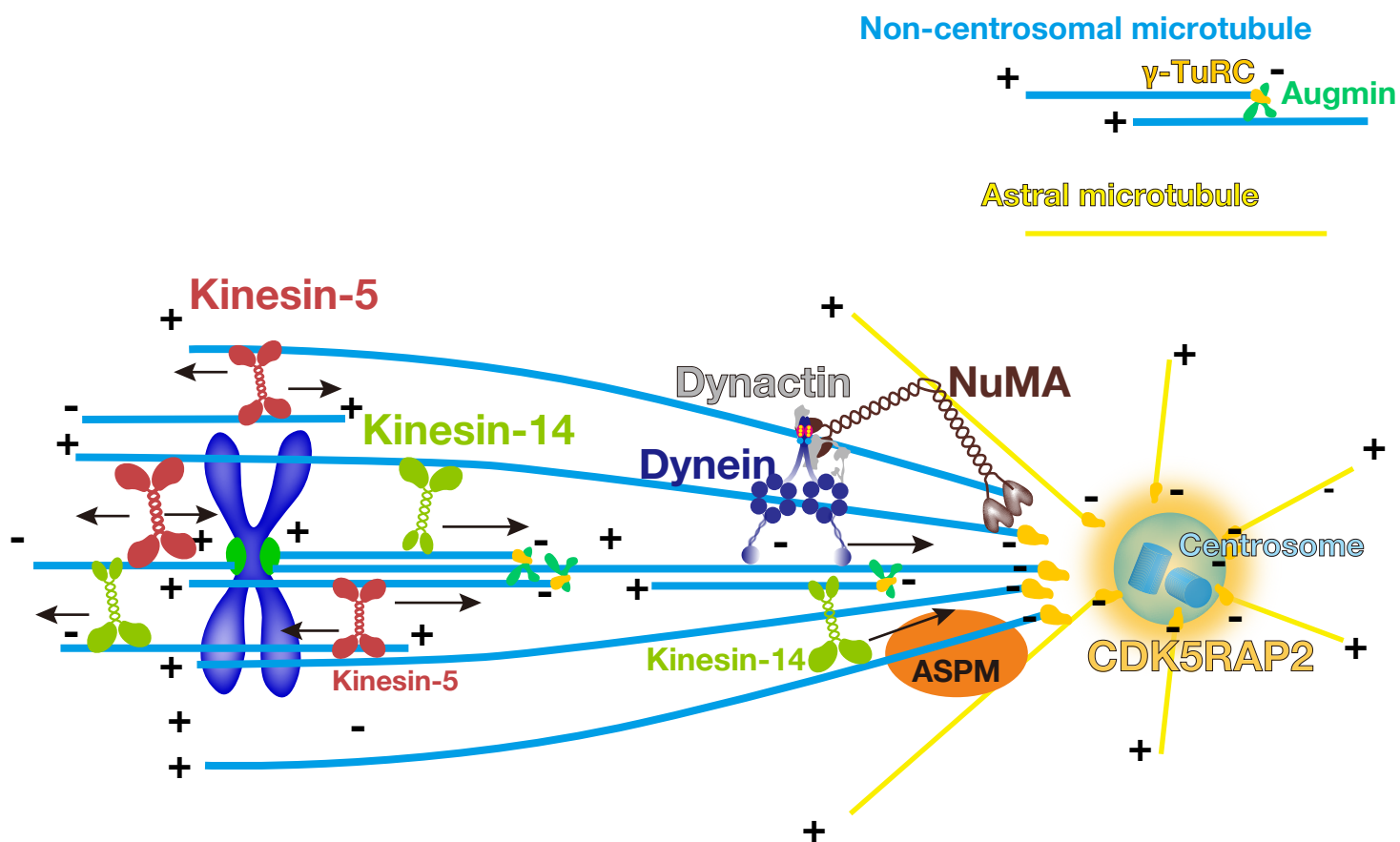


図 5. 二極性構造の形成とマイナス端での収束

分裂期に増幅した微小管は、4量体モーターのキネシン-5が外向きの力を生じることで、プラス端を互いに向け合った反平行の二極性構造を作る。中心体非依存的に生成した微小管は、キネシン-5とマイナス端歩行活性を持つダイニンやキネシン-14とともにマイナス端を染色体から遠ざけるようにして輸送する。マイナス端どうしはキネシン-14, ダイニン:ダイナクチン:NuMA (DDN) 複合体、ASPM, 中心体タンパク質であるCDK5RAP2など様々なタンパク質が協働することで、束化してスピンドル極を形成する。

Poleward flux

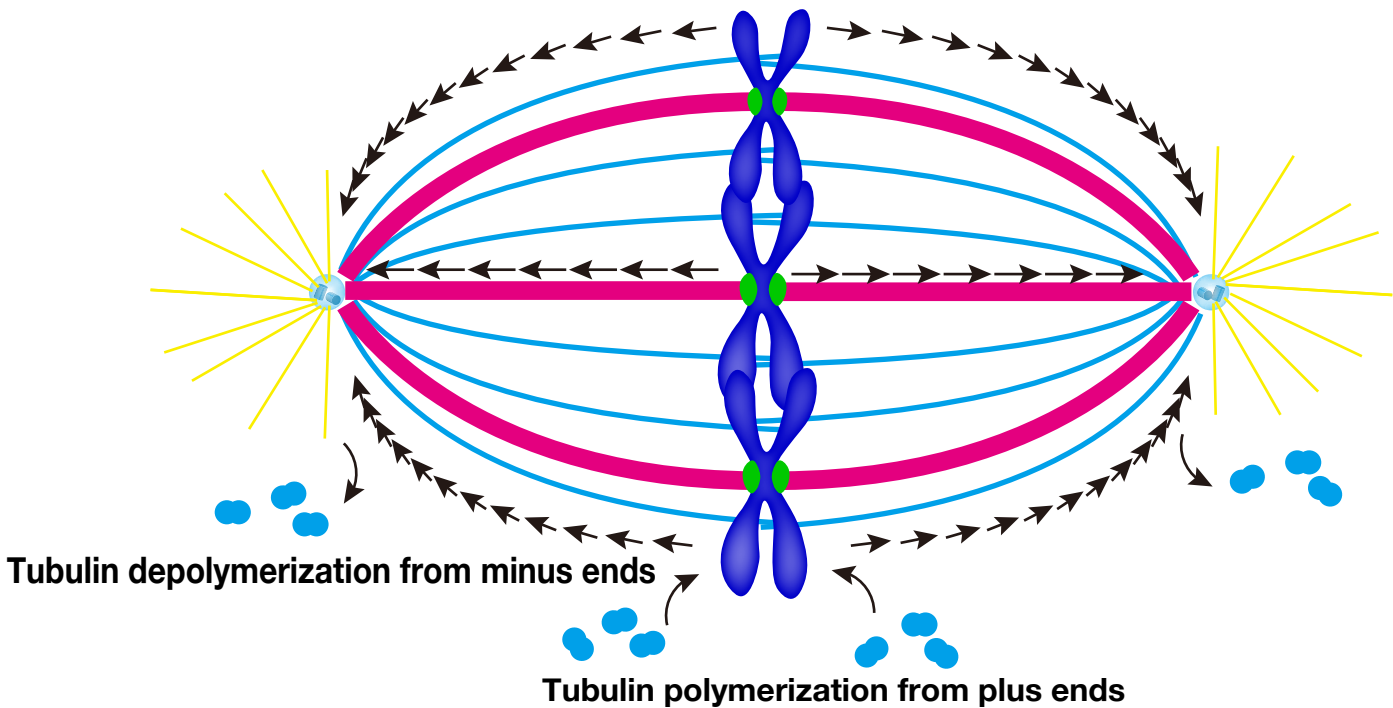


図6 スピンドル微小管の極方向への流れ (poleward flux)

中期スピンドルにおいて、微小管はマイナス端が集積するスピンドル極で脱重合し、プラス端が集積する染色体側で新たなチューブリンが流入することで、ゆっくりとした極方向への流れができる。例えばキイロショウジョウバエ S2 細胞では約 $1 \mu\text{m}/\text{min}$ の速度で極方向への流れが起こる [270]。極方向への流れには様々な微小管結合タンパク質が関わっているが [271]、特にプラス端での重合は CLASP [196]、マイナス端での脱重合は Kinein-13 が決定的な役割を果たすことで [272]、スピンドルの長さを維持していると考えられている。

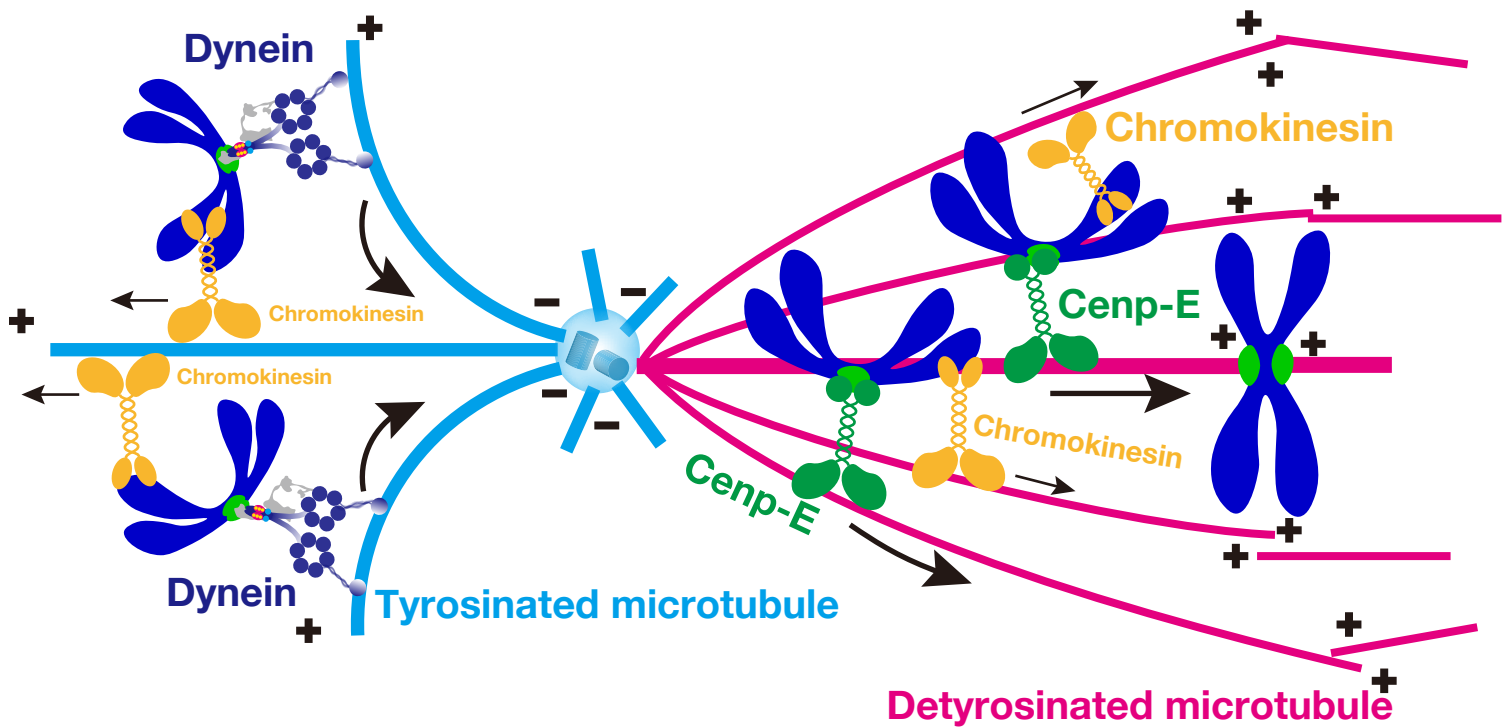


図 7. 染色体輸送に関わるモータータンパク質

染色体上ではキネシン -4, キネシン -10 ファミリーに属するクロモキネシンが働くことで染色体はスピンドル極から押し出される。スピンドル極周辺の微小管は動的であり、チロシン化されている。ダイニンモーターはこのチロシン化された微小管を好んで結合する。スピンドル極周辺では、動原体のダイニンがクロモキネシンより優勢的に働くことで染色体がスピンドル極方向に輸送される。一方でスピンドル内部の安定化した微小管は脱チロシン化されている。Cenp-E キネシンは脱チロシン化した微小管を好んで結合する。したがって、一度ダイニンにより極方向に輸送された染色体は、動原体の Cenp-E とクロモキネシンを協働させることで、スピンドル中央方向に向けて輸送されるため、染色体整列を完遂することが可能になる。

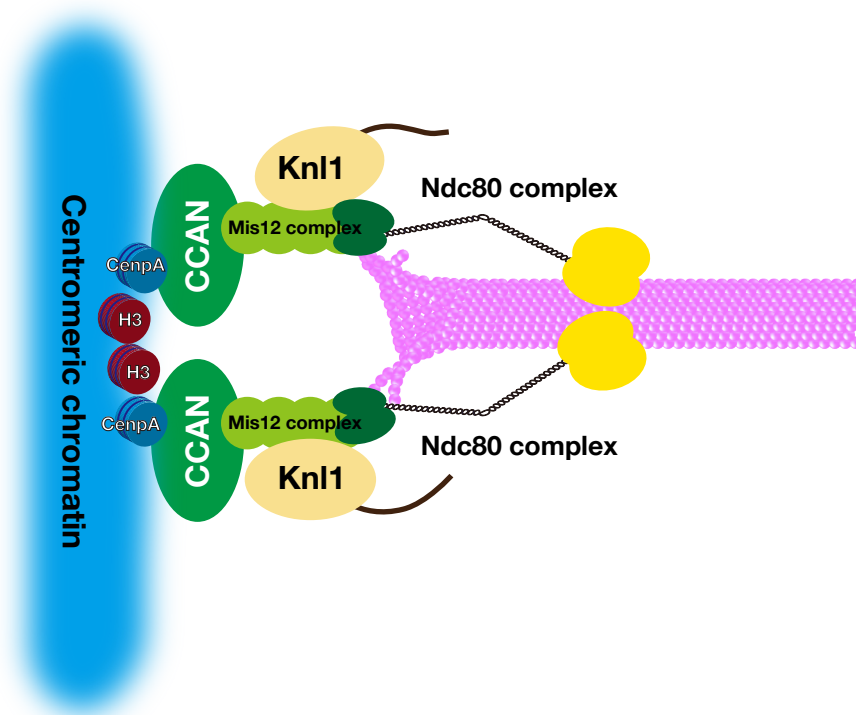
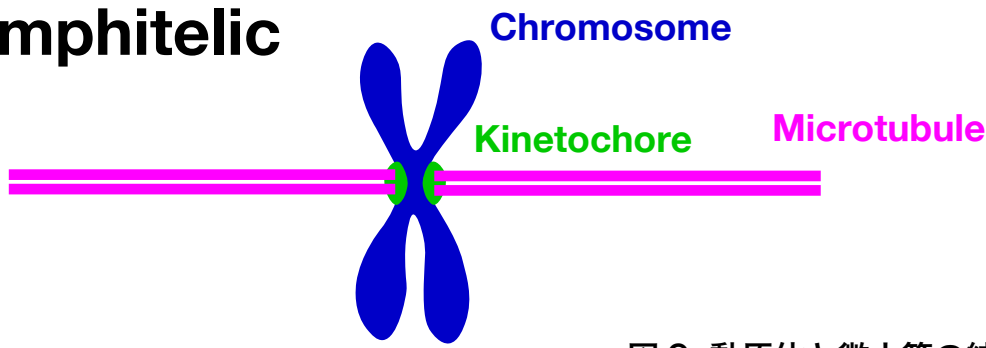


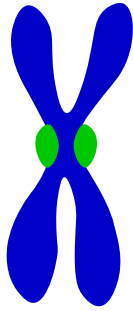
図 8. 動原体

動原体を構成する主要なタンパク質，タンパク質複合体。Knl1、Mis12 複合体、Ndc80 複合体 (KMN ネットワーク) は、動原体外表で微小管との相互作用を仲介する。微小管と直接相互作用するのは Ndc80/Hec1 の CH ドメインである。Knl1 は様々なチェックポイントタンパク質を集積する足場となる。動原体内側の CCAN (constitutive centromere-associated network) はヒストン H3 バリエントである Cenp-A を含むセントロメアクロマチンに接続される。Mis12 複合体は CCAN と接続し、Knl1, Ndc80 複合体を動原体上に係留する。

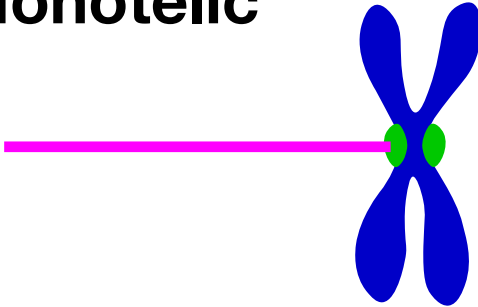
Amphitelic



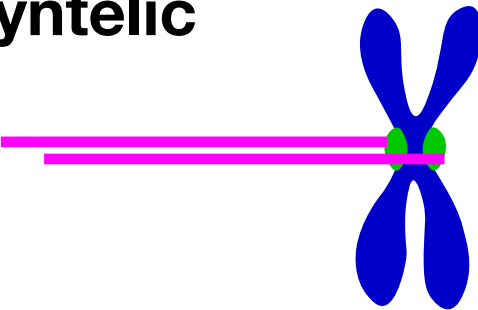
Unattached



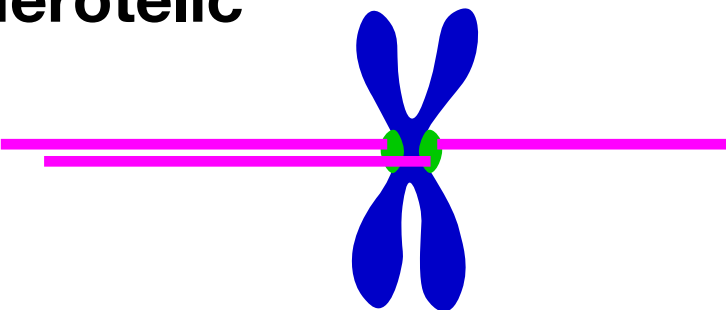
Monotelic



Syntelic



Merotelic



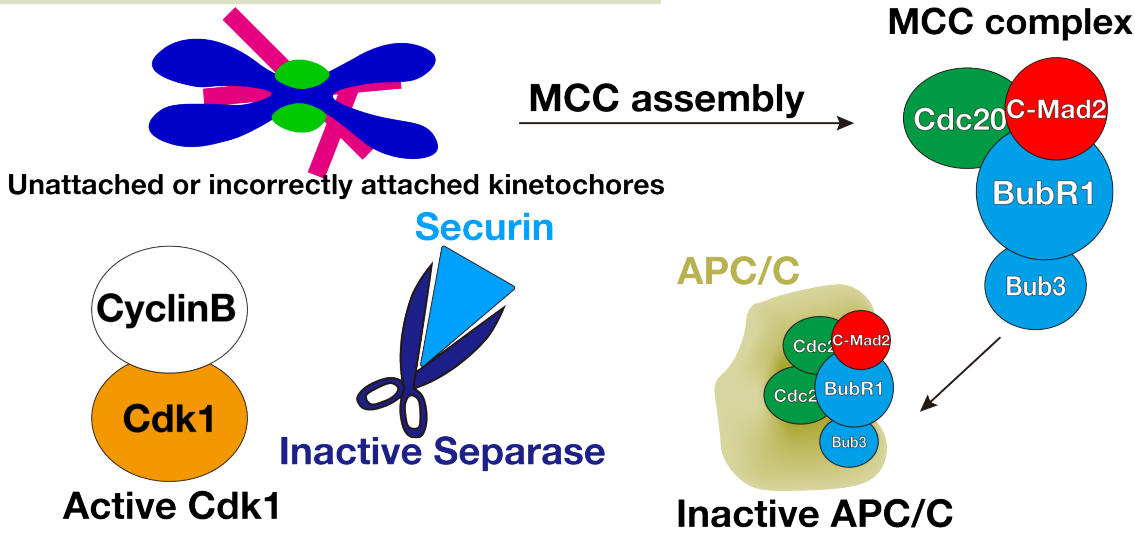
Lateral



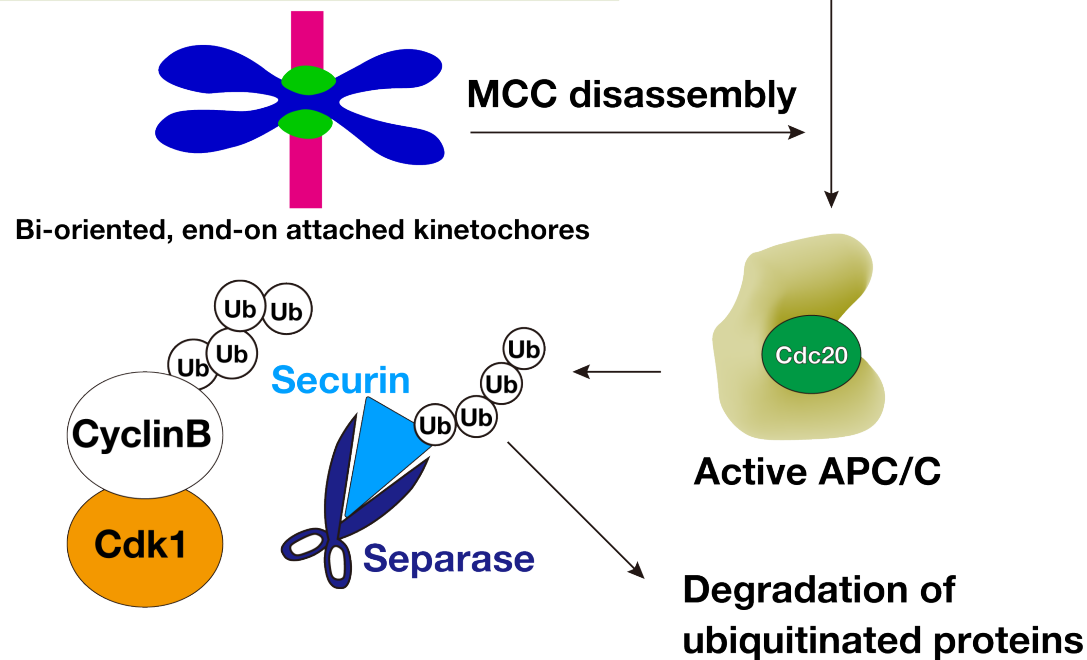
図 9. 動原体と微小管の結合様式

1. 二極性の均等な先端結合である amphitelic 結合, 2. 核膜崩壊直後などで見られる非結合状態 (unattached), 3. 動原体片側のみ微小管と結合する monotelic 結合, 4. スピンドル極一方からの微小管が両動原体と先端結合する syntelic 結合, 5. 二極性の先端結合が形成されるものの、片側の動原体がスピンドル両極からの微小管と先端結合する merotelic 結合, 6. 微小管先端ではなく、微小管側面と動原体が結合する lateral 結合。染色体分離を正しく行うためには、全ての染色体が amphitelic 結合に修正されなければならない

1. Prometaphase; SAC on



2. Metaphase; SAC on → SAC off



3. Anaphase; SAC off

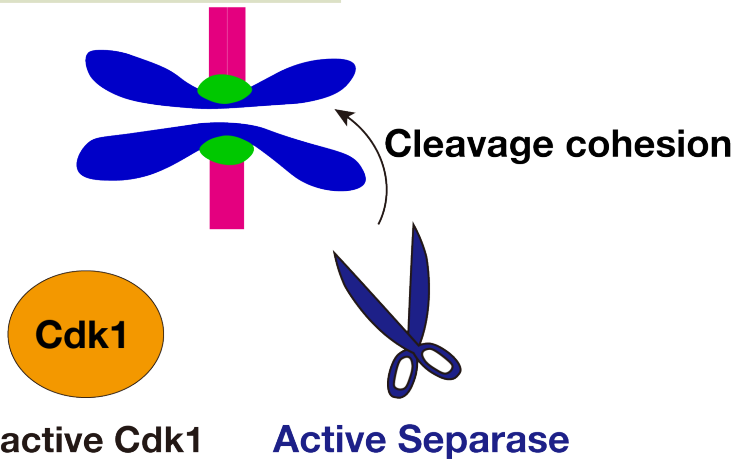


図 10. スピンドル形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint: SAC)

核膜崩壊後、微小管と正しく結合が確立されていない動原体上では MCC (mitotic check complex) が新生される。MCC は E3 ユビキチンリガーゼである APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) に結合してその活性を抑制する。微小管が動原体と先端で相互作用すると、MCC 新生が停止し、APC/C から解離する。MCC が解離した APC/C は、活性化型の APC/C:Cdc20 複合体となり、Cyclin-B, Securin を含む様々な標的基質をユビキチン化する。ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームで分解される。Cyclin-B, Secirin の分解は Cdk1 の不活性化および、Separase の活性化へとつながる。これにより姉妹染色分体の接着を解除し、細胞は分裂期後期へと進行する。

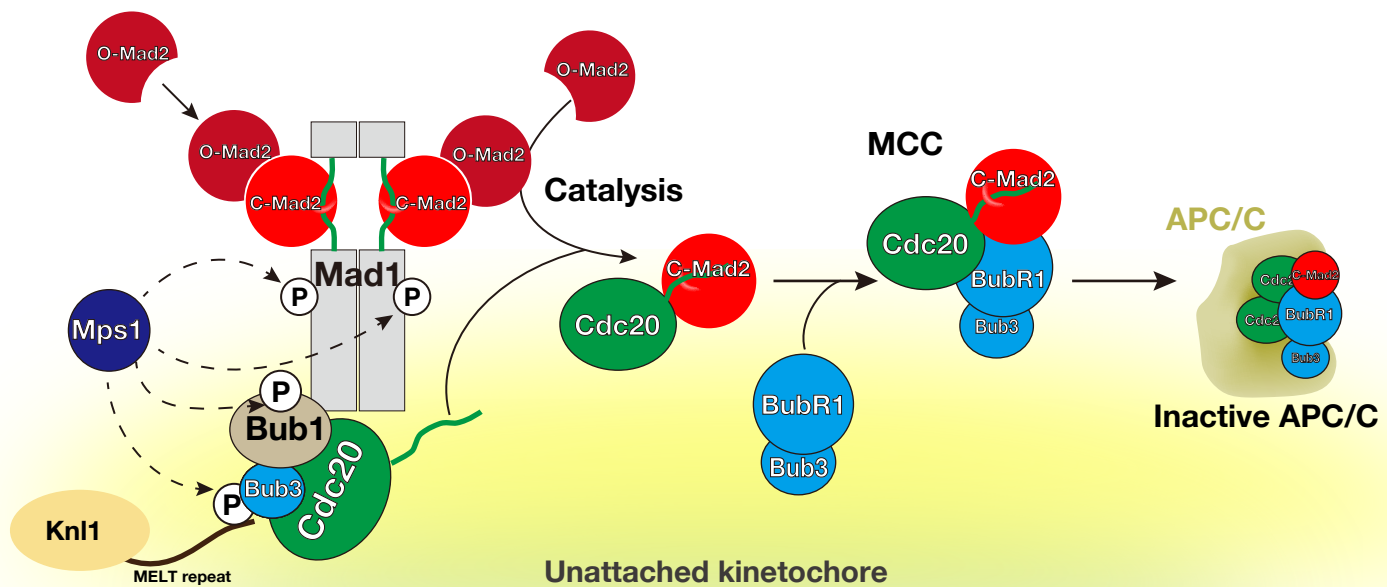


図 11. Mad2 テンプレートモデル

MCC 形成における律速段階は、O-Mad2 から C-Mad2 へと構造変化し、C-Mad2:Cdc20 複合体を形成することである。Mad1:C-Mad2 複合体はこの反応の活性化エネルギーを下げるための触媒装置として働く。細胞質中の O-Mad2 は Mad1:C-Mad2 に結合することで活性化エネルギーが下がる。この中間遷移体が Bub1:Bub3 複合体によりリクルートされた Cdc20 と反応することで C-Mad2:Cdc20 複合体が新生される。C-Mad2:Cdc20 はただちに BubR1:Bub3 複合体と結合することで MCC が形成される。MCC は APC/C に結合してその活性を阻害する。Mps1 キナーゼは、動原体上で MCC 形成反応の一連のカスケードを生み出す鍵タンパク質として働く。

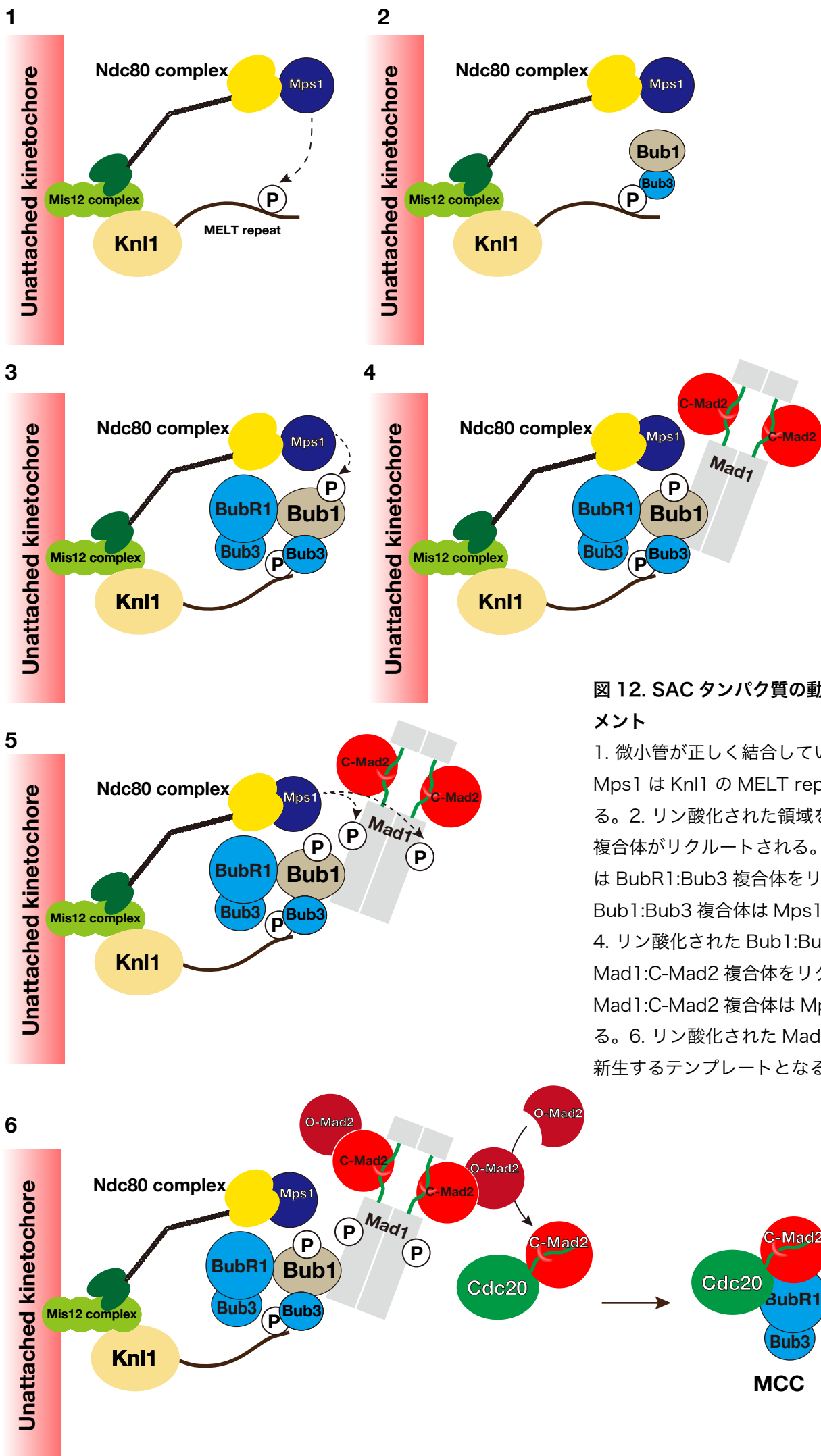
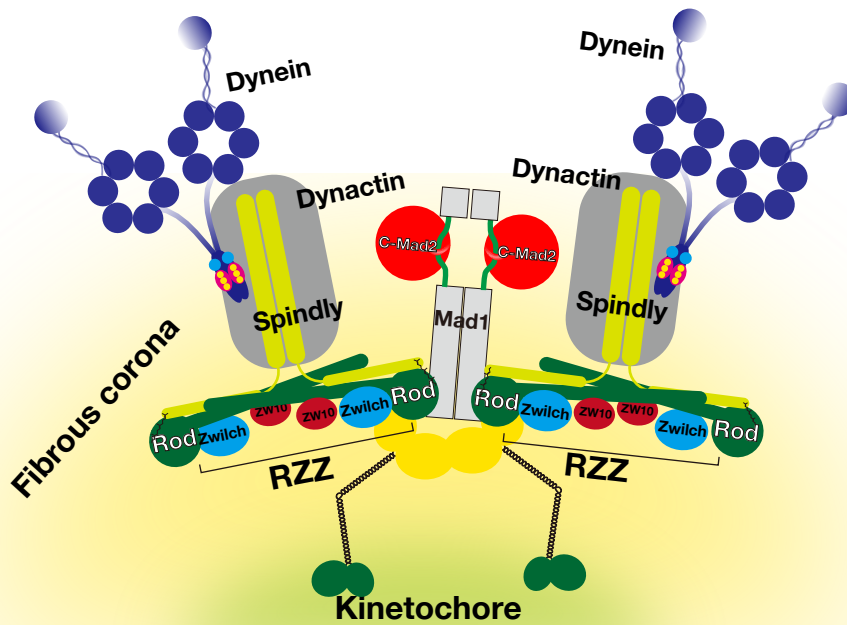


図 12. SAC タンパク質の動原体上へのリクルートメント

1. 微小管が正しく結合していない動原体において、Mps1 は Kn1 の MELT repeat 配列をリン酸化する。2. リン酸化された領域を認識して Bub1:Bub3 複合体がリクルートされる。3. Bub1:Bub3 複合体は BubR1:Bub3 複合体をリクルートする。また Bub1:Bub3 複合体は Mps1 によりリン酸化される。4. リン酸化された Bub1:Bub3 複合体は Mad1:C-Mad2 複合体をリクルートする。5. Mad1:C-Mad2 複合体は Mps1 によりリン酸化される。6. リン酸化された Mad1:C-Mad2 は MCC を新生するテンプレートとなる。

Unattached kinetochore



End-on attached kinetochore

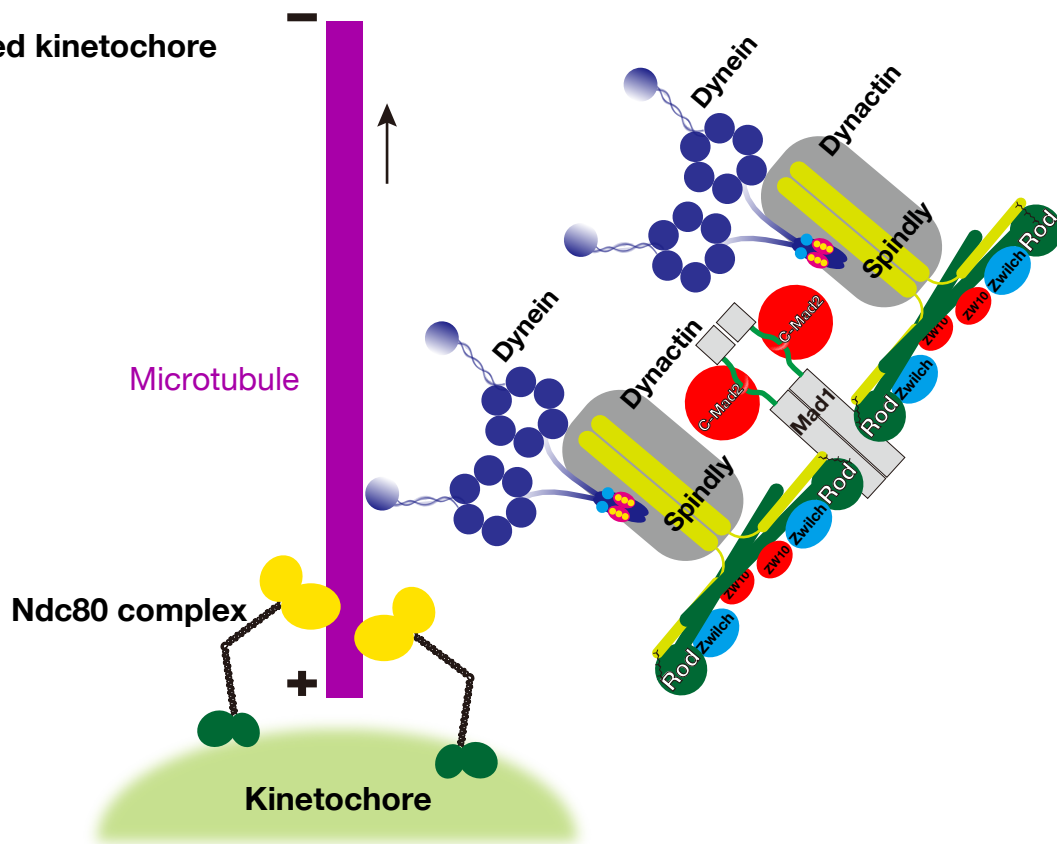
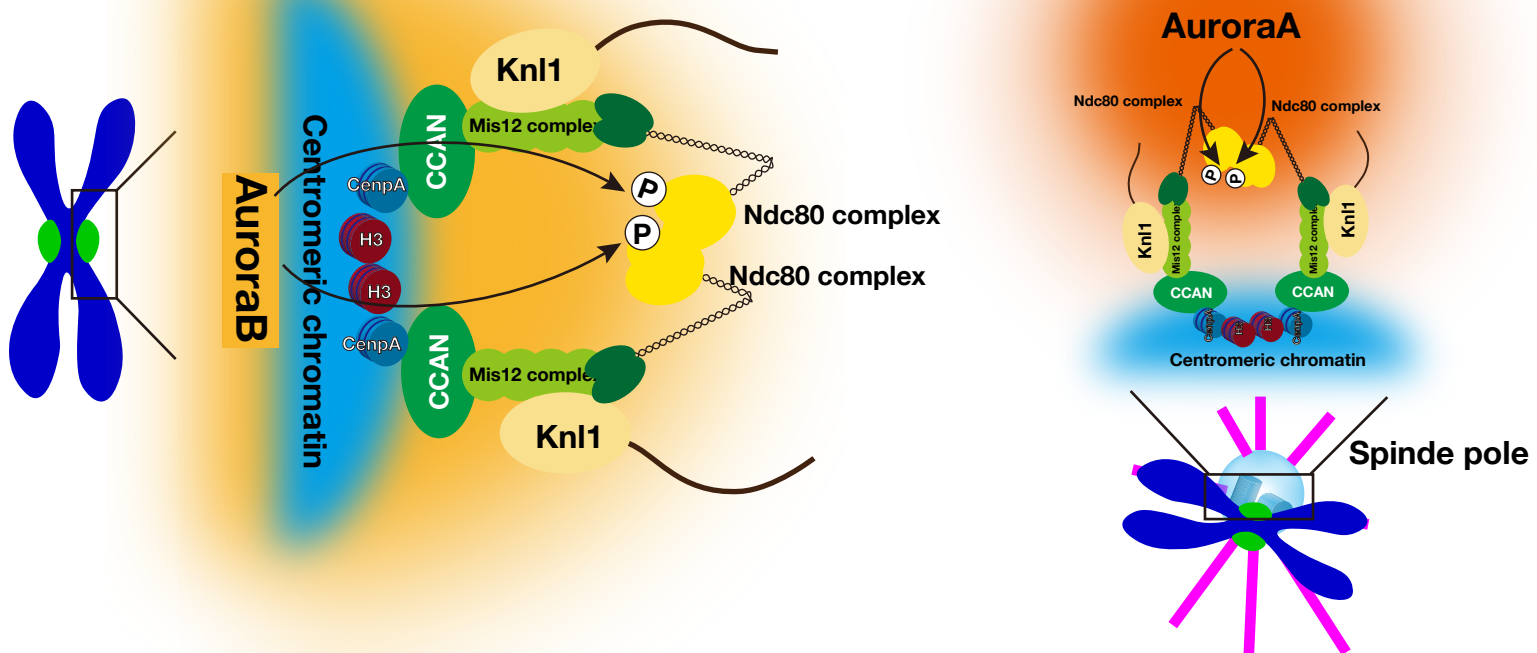


図 13. RZZ (ROD-Zwilch-ZW10) とスピンドル形成チェックポイントの不活性化

微小管先端結合前の動原体では、繊維状コロナ (fibrous corona) と呼ばれる、不明瞭な繊維状構造が電子顕微鏡で観察される。繊維状コロナにはモータータンパク質やチェックポイントタンパク質を含めた様々なタンパク質が含まれており、微小管-動原体の結合および修正を促進すると考えられている。RZZ 複合体は多量体化することで、繊維状コロナ形成に必須の役割を果たし、Mad1:Mad2 複合体を動原体上に繋ぎ止める。微小管先端が動原体と結合すると、Mad1:Mad2 複合体は、RZZ 複合体:Spindly:ダイニン:ダイナクチンによりスピンドル極に向かって輸送されることで、動原体から取り除かれる。

Unattached or incorrectly attached kinetochores



End-on attached kinetochores

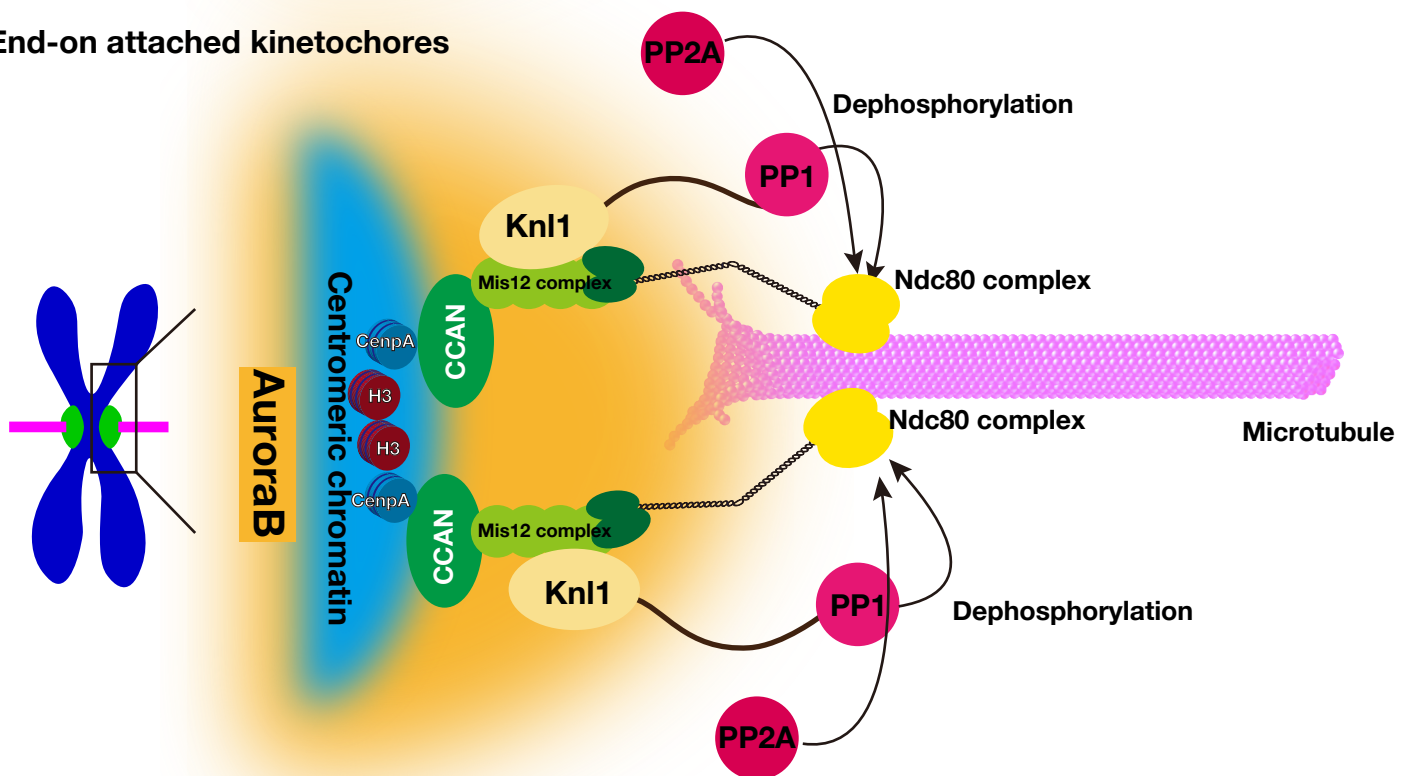


図 14. Aurora キナーゼによる Ndc80 複合体 - 微小管結合の制御

微小管先端結合前の動原体では、セントロメア内側からの Aurora B キナーゼ、もしくはスピンドル極からの Aurora A キナーゼにより、Ndc80/Hec1 がリン酸化されて微小管結合が抑制される。これによって誤った動原体 - 微小管結合を修正することが可能になる。微小管先端と相互作用した動原体では、動原体で働くホスファターゼである PP1, PP2A により、Aurora キナーゼによるリン酸化が解除され、Aurora B キナーゼのシグナルから遠ざかった位置に Ndc80/Hec1 が配置される。脱リン酸化した Ndc80/Hec1 では安定な動原体 - 微小管結合が形成される。またスピンドル極の染色体は、モータータンパク質により Aurora A キナーゼから遠ざけられることで、微小管 - 動原体結合が安定化される (図 7 参照)。

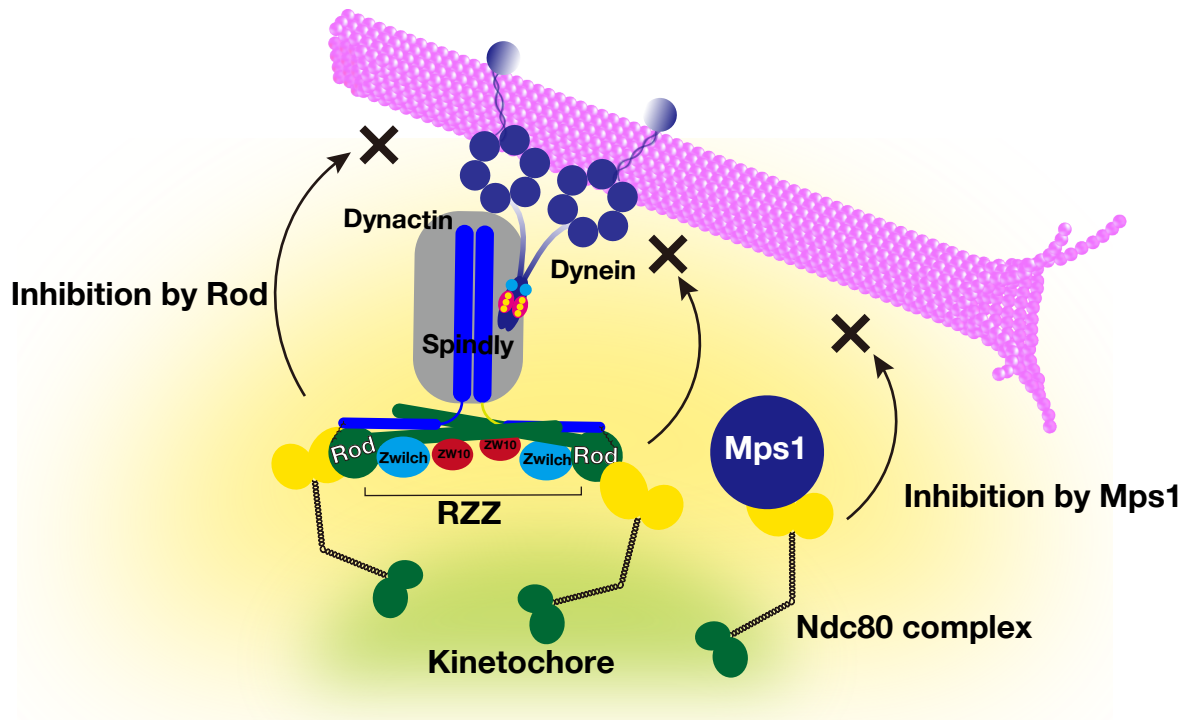


図 15. Mps1 と Rod による Ndc80/Hec1 の微小管結合抑制

Mps1 と RZZ 複合体の構成因子である Rod は Ndc80/Hec1 に直接結合して微小管との相互作用を抑制する。

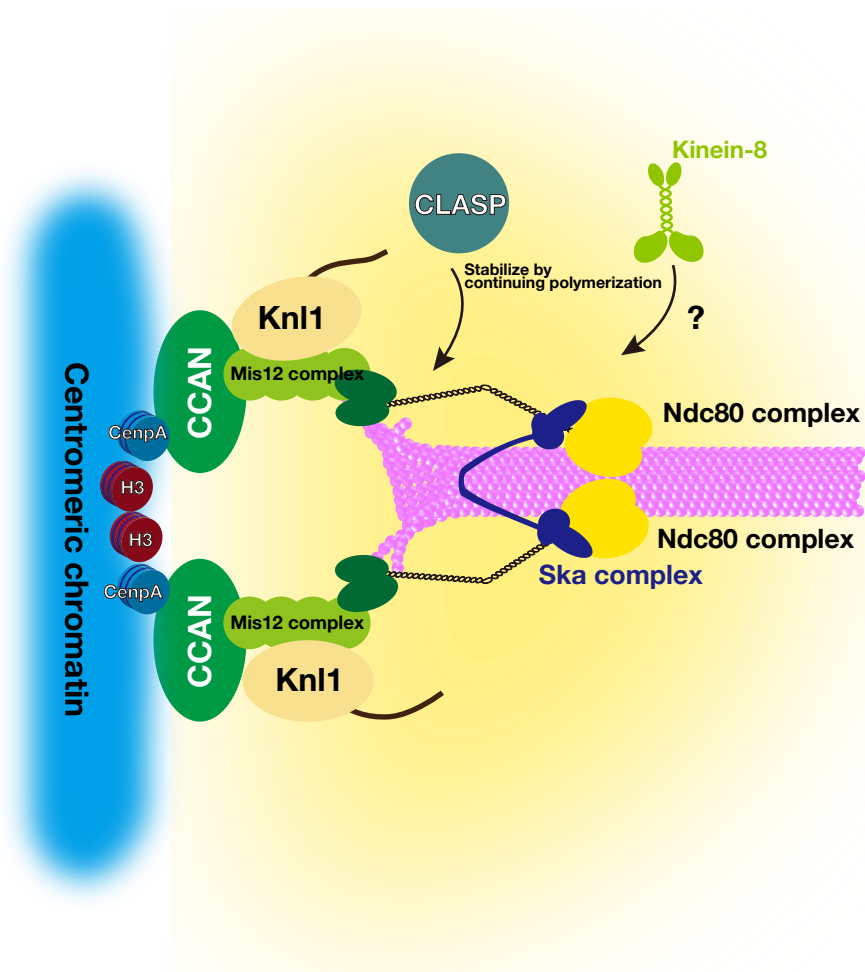


図 16. 微小管 - 動原体結合の安定化

哺乳細胞では Ska 複合体，菌類では Dam1 が留め金のようにして働くことで、Ndc80 複合体 - 微小管結合を補助的に安定化する。また CLASP は動原体微小管の重合を維持するのに必須の役割を果たすことで、動原体 - 微小管結合を安定に保つ。一方でキネシン -8 に関しては、動原体微小管を安定化する機能が予測されるものの、実際の活性、機能に関してはよく分かっていない。

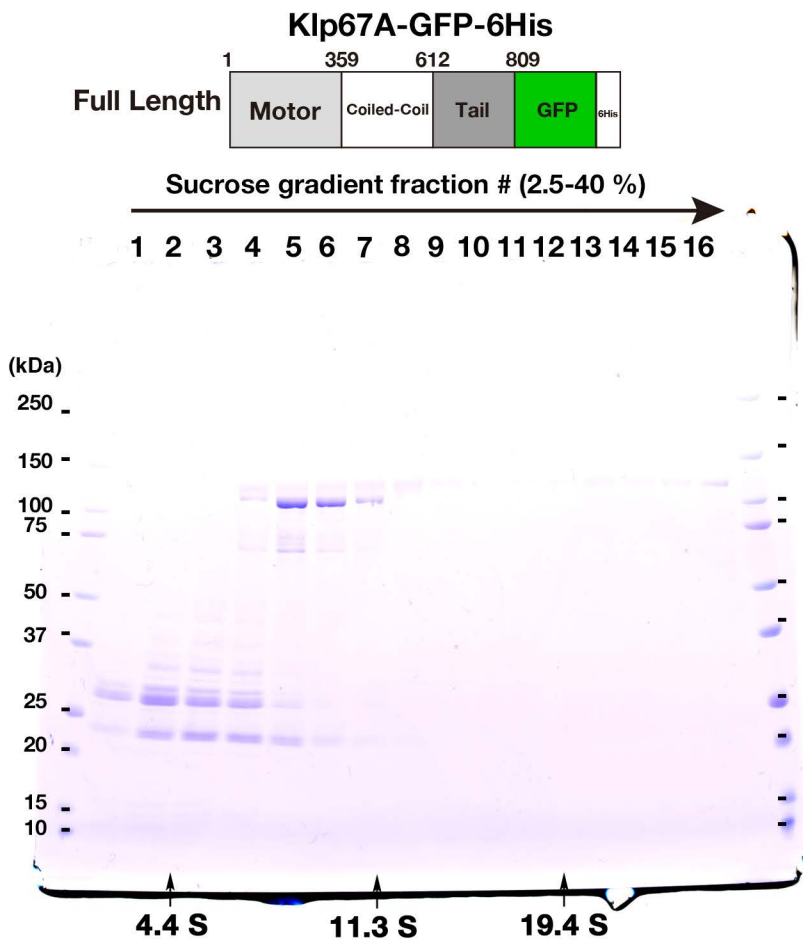
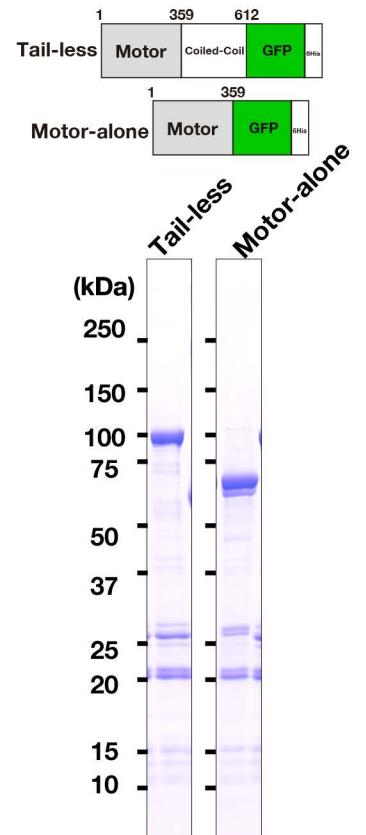
A**B**

図17. キネシン-8^{Klp67A}-GFPの精製

(A) ショ糖密度勾配遠心した後のKlp67A (全長)-GFP-6Hisのクマシー染色像。BSA, Catalase, Thyroglobulinをマーカーとして用いた (矢印)。分画6をin vitro再構成実験に用いた。(B) Ni-NTAアガロースにより精製したKlp67A(部分欠失断片)-GFP-6Hisのクマシー染色像。

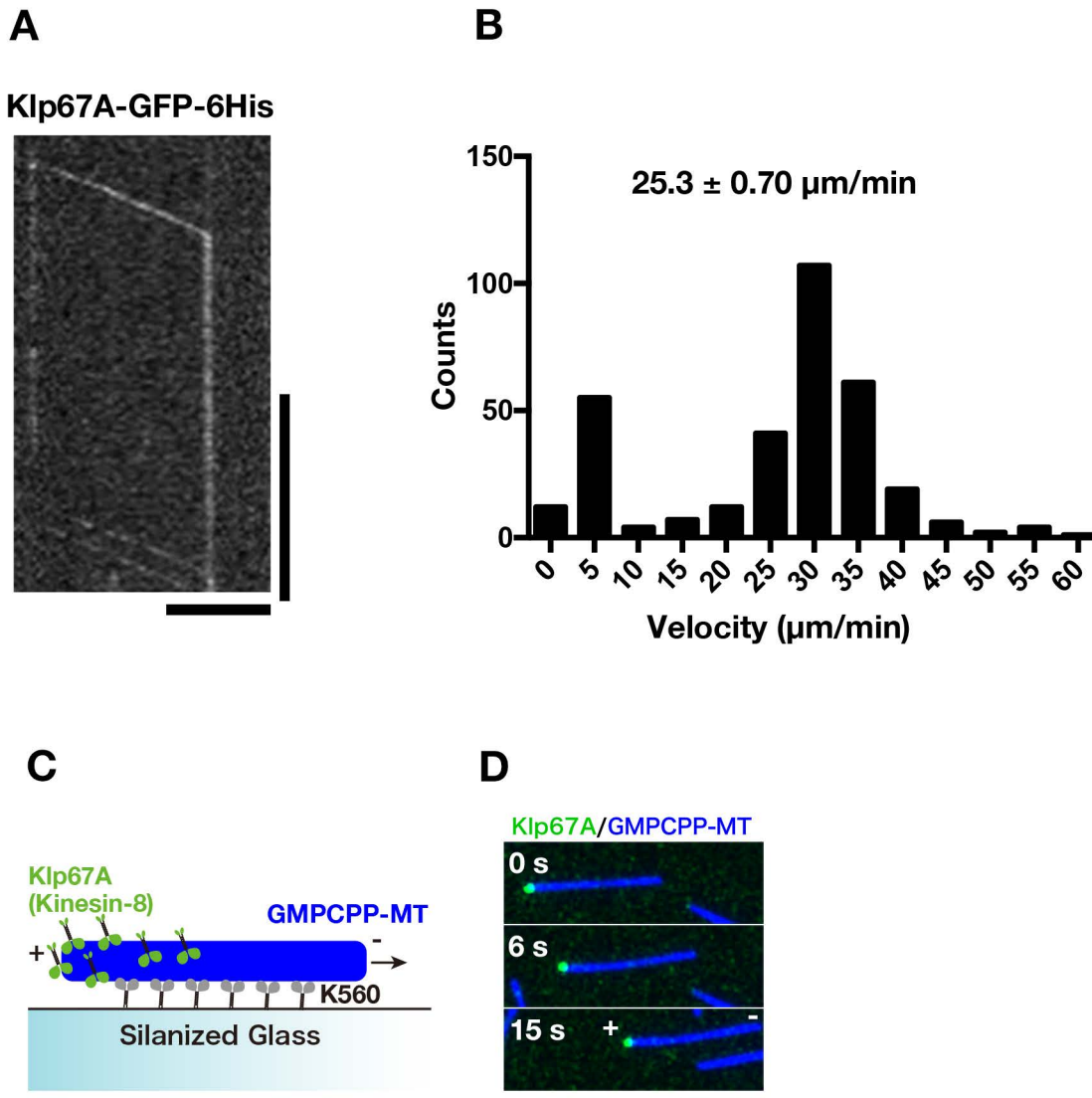


図18. キネシン-8^{Klp67A} は微小管プラス端への歩行活性を有する

(A) Klp67A-GFP (100 pM) が歩行活性を示し、微小管先端で蓄積することを示すカイモグラフ。最初に、高強度のレーザーにより、微小管先端に蓄積したKlp67A-GFPシグナルを蛍光退色させた後、レーザー強度を落として、先端に歩行するKlp67A-GFPを観察した。水平バー、5 μm; 垂直バー、20 s。(B) Klp67Aの歩行速度のヒストグラム (n = 331) 微小管上で動かないGFPシグナルは含めていない。(C, D) プラス端へ歩行するキネシン-1モーター、K560 (非蛍光)によりGMPCPP微小管 (青)をガラス面で滑動させた。右向き方向への滑動したことから、微小管左端がプラス端に相当する。Klp67A-GFP (緑, 4 nM) はプラス端側に蓄積した。

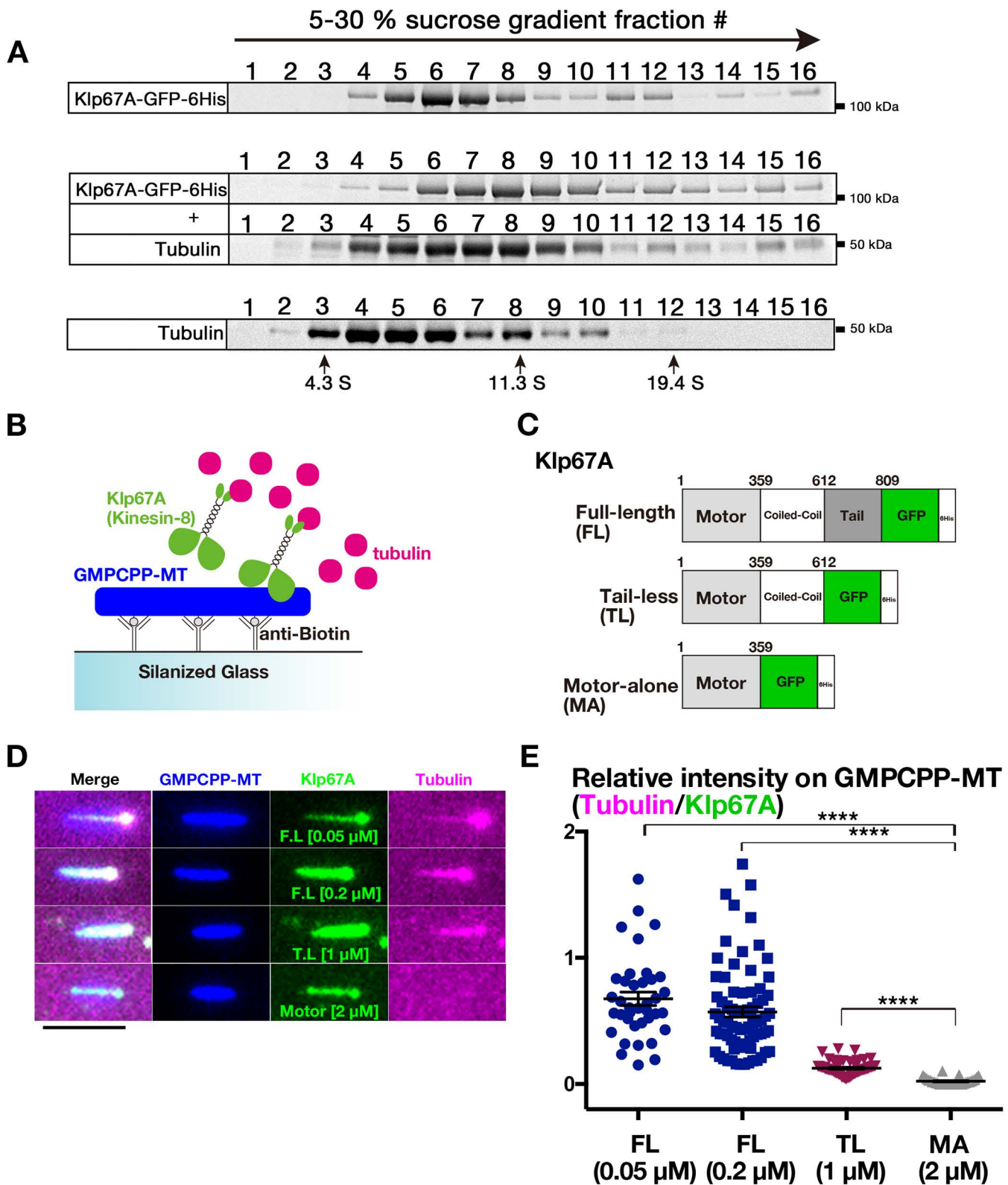


図19. キネシン-8^{Klp67A}はチューブリンと直接結合する

(A) Klp67A-GFP とチューブリンはショ糖勾配遠心によって共分画された。それぞれの分画についてSDS-PAGEした後Sypro Ruby染色を行った。(B-D) Klp67A-GFPによるチューブリンの微小管上への局在化。GMPCPP微小管 (MT) (青)上に結合したKlp67A (緑; 全長, tail-less [1-612アミノ酸], motor-alone [1-359])により、チューブリン (マゼンタ; 10 μM)が微小管上に局在化されるかを検証した。(E) Klp67A-GFPに対するチューブリン蛍光強度の相対比の定量。それぞれの点は単一の微小管から取得した値を示す。エラーバーはSEMを示す。FLとMA: $P = 3.8 \times 10^{-14}$ TL とMA: $P = 3.8 \times 10^{-10}$, Games-Howell test. $n = 38$ (50 nM; 全長), 77 (200 nM; 全長), 33 (motor alone), 58 (tail-less)。

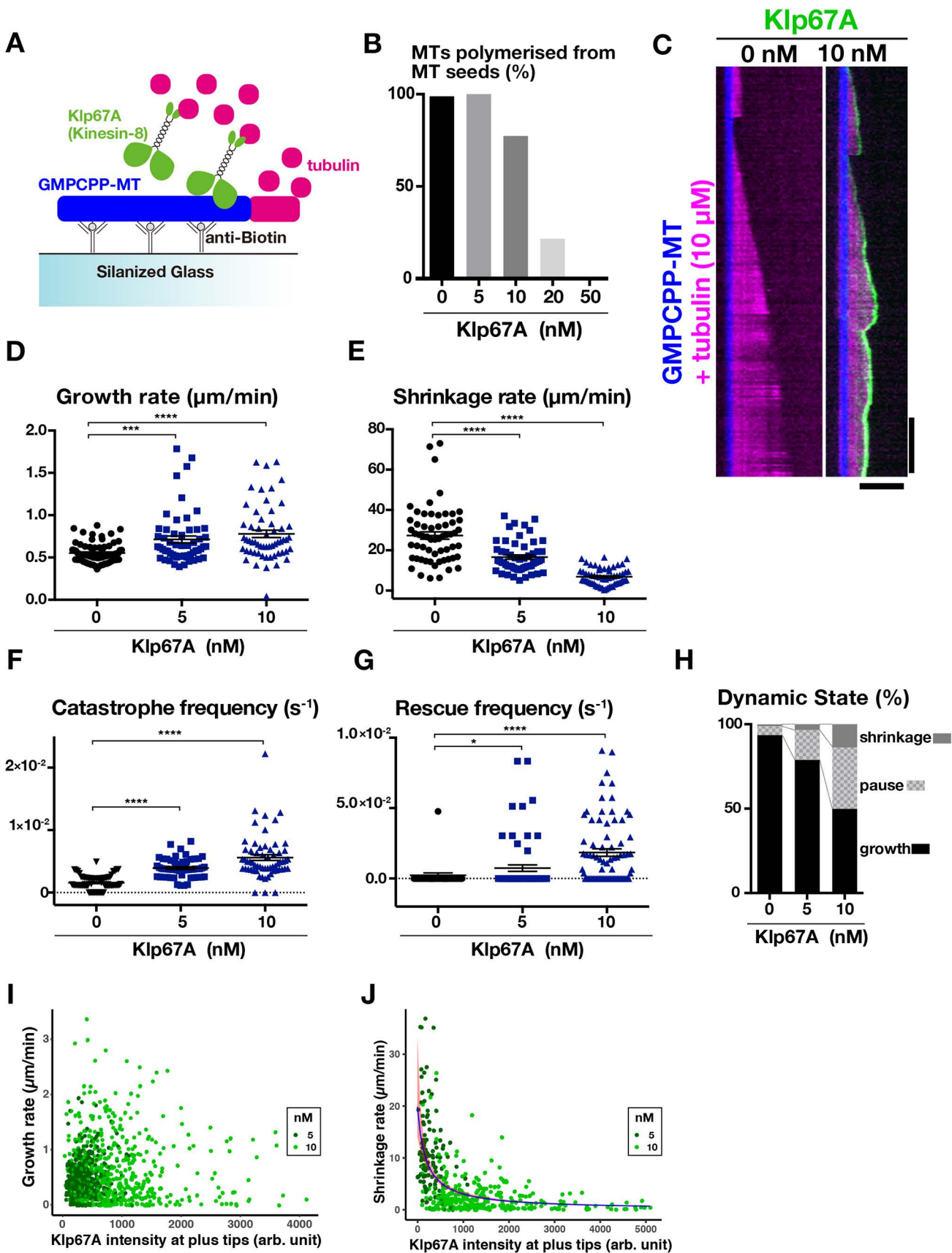


図20. *In vitro* におけるキネシン-8^{Klp67A} による微小管プラス端動態制御

(A) *In vitro*における微小管動態再構成実験の模式図。(B) Klp67Aはシード微小管からの重合を抑制する ($n = 84, 74, 84, 74, 94$; 右から左)。(C) 微小管動態を示すカイモグラフ。GMPCPPにより安定化した微小管 (青)から動的な微小管 (マゼンタ)が伸縮する様子を、Klp67A-GFP (0 or 10 nM) と同時に撮影した。水平バー、5 μ m; 垂直バー、120 s。(D-H) 微小管動態のパラメーター。二回の実験結果をプールして示している。各点は単一の微小管の動態パラメーターを表している。エラーバーはSEMを示す。 $n = 41 + 33$ (0 nM), $25 + 31$ (5 nM), $20 + 41$ (10 nM)。*, $P < 0.03$; ***, $P < 0.002$; ****, $P < 0.0001$ Games-Howell test (D-F) もしくは Steel Dwass test (G)。(I, J) Klp67Aの微小管プラス端における局在量と微小管伸長 (I; $n = 397$ [5 nM], 494 [10 nM]) もしくは短縮 (J; $n = 116$ [5 nM], 293 [10 nM])速度の相関。短縮速度との間には負の相関が検出された(ガンマ回帰, $P < 2 \times 10^{-16}$, 尤度比検定)

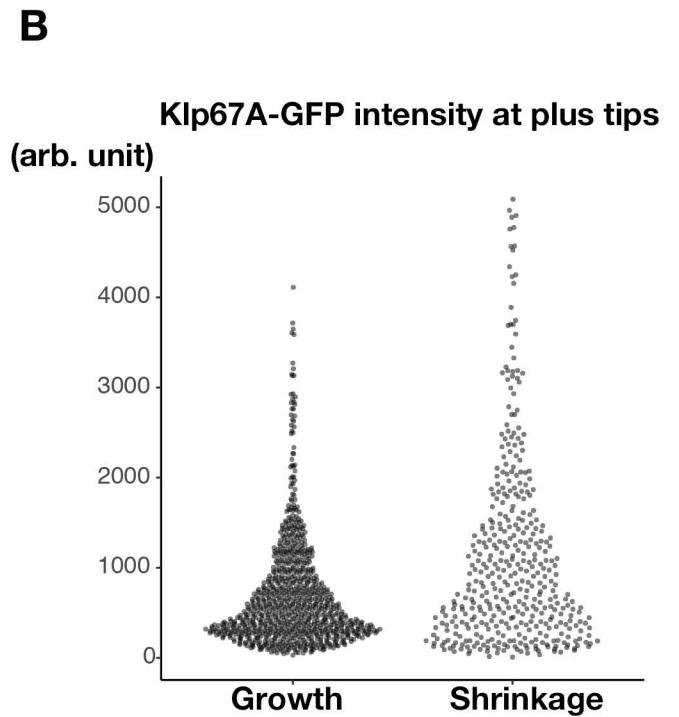
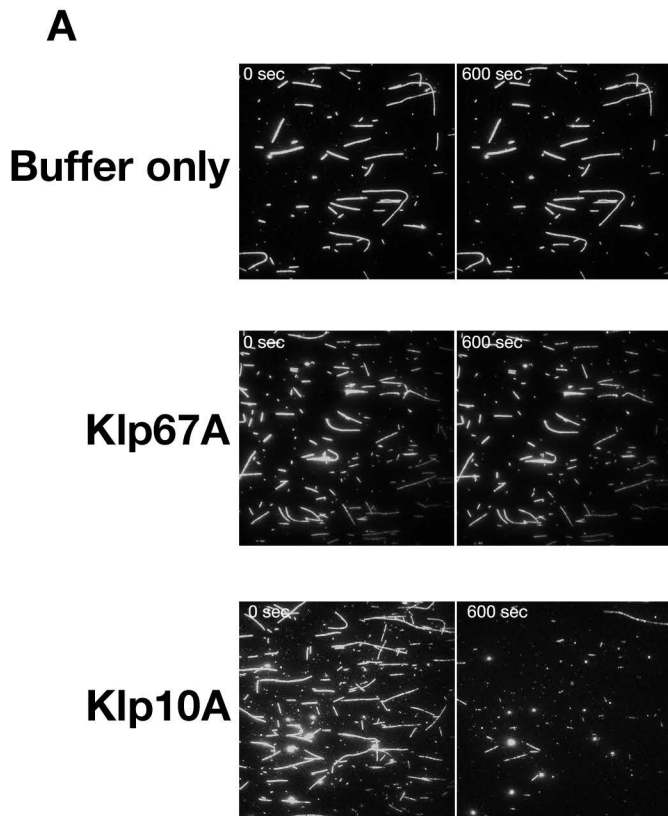


図21. In vitroにおけるキネシン-8^{Klp67A}による微小管動態制御

(A) Klp67A (10 nM)においてGMPCPP微小管の明確な脱重合活性は見出すことはできない。GMPCPPにより安定化した微小管をKlp67A (10 nM)、もしくはポジティブコントロールのキネシン-13, Klp10Aと混ぜて反応させた。バー, 5 μm 。 (B) 伸長 ($n = 891$)、もしくは短縮 ($n = 409$)微小管先端におけるKlp67A-GFPの蛍光強度。Klp67A-GFPの蛍光強度は、短縮微小管において有意に大きくなった ($p < 0.001$, Brunner-Munzel test)。

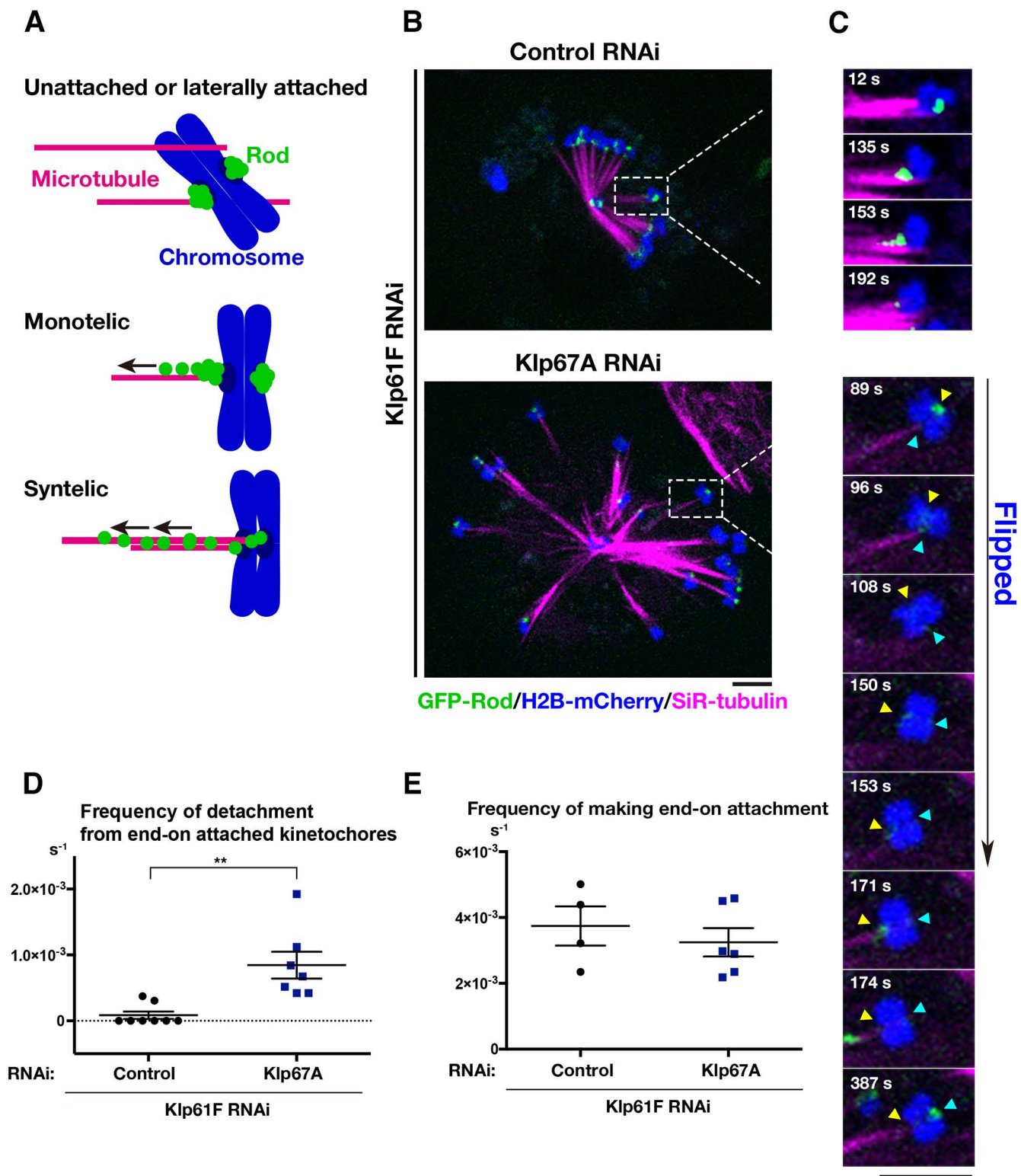
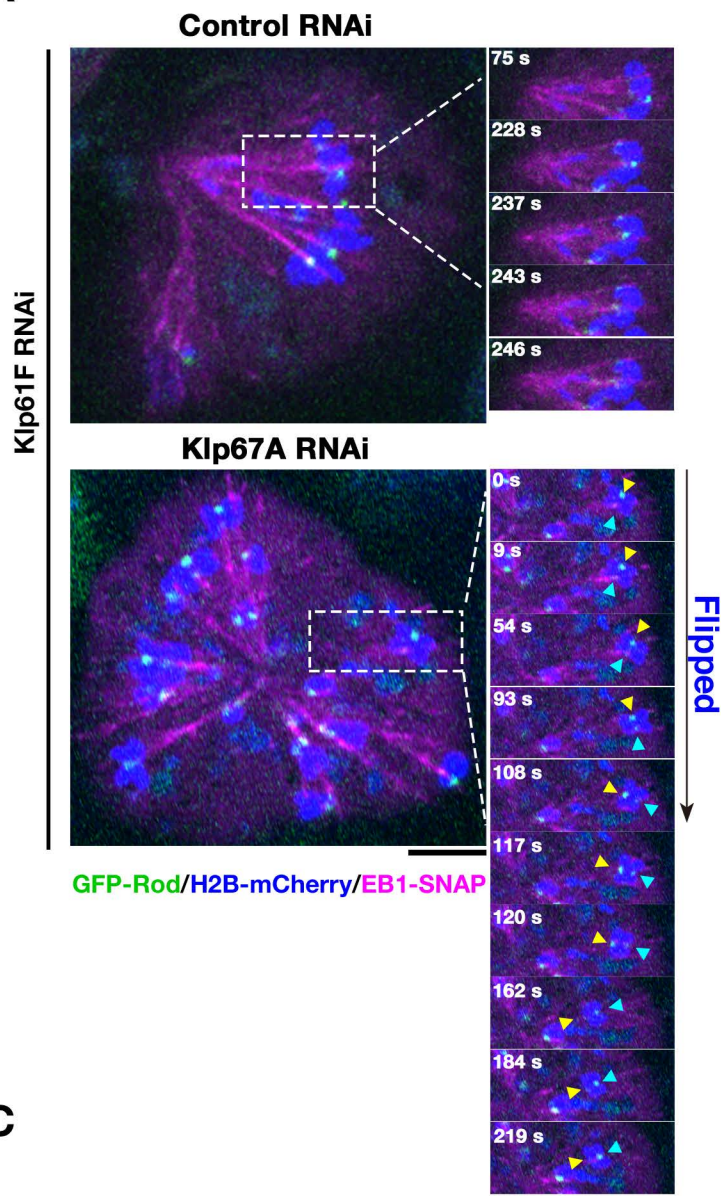


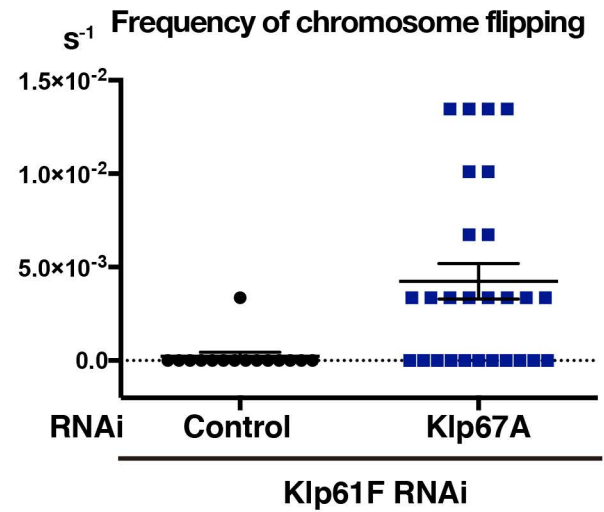
図22. キネシン-8^{Klp67A}は単極性スピンドルにおいて安定な動原体-微小管結合に必要である

(A) GFP-Rodと微小管の動原体への結合状態を表す模式図。(B) Klp61F RNAi (上)もしくはKlp61F/Klp67A二重 RNAi (下)により単極性のスピンドルを誘導した。緑, GFP-Rod, 青, 染色体 (H2B-mCherry), マゼンタ, 微小管 (SiR-tubulin)。コントロール細胞におけるmonoteliからsyntelic結合への遷移。動原体微小管に沿った極方向のGFP-Rodの流れ観察された後 (135-153 s)、動原体上のGFPシグナルが減少する (192 s)。Klp67Aを欠損させた細胞では、動原体-微小管結合の解離に伴う染色体の反転が観察される (89-171 s; 姉妹動原体をそれぞれ黄色とシアンの矢尻で示している)。(D) 動原体-微小管結合の解離頻度 (解離回数/s/染色体)の定量。Klp67A欠損細胞において有意に増加した (**, $P < 0.009$; Welch's t test)。実験は4回行い、このうちの2回分のサンプルを定量した。それぞれの点は細胞における平均の頻度を示す。合計8細胞、86染色体をコントロール細胞で、8細胞、56染色体をKlp67A RNAi処理細胞で定量した。(E) 動原体が微小管先端と結合した頻度 (結合回数/s/染色体)。明確なGFP-Rodの極方向の流れが観察されたときを結合イベントとして測定した。それぞれの点は細胞あたりの平均値を示している。合計 4細胞, 18染色体からの値 (コントロール), 6細胞, 18染色体からの値 (Klp67A RNAi)。エラーバーはSEMを示す。バー, 5 μm 。

A



B



C

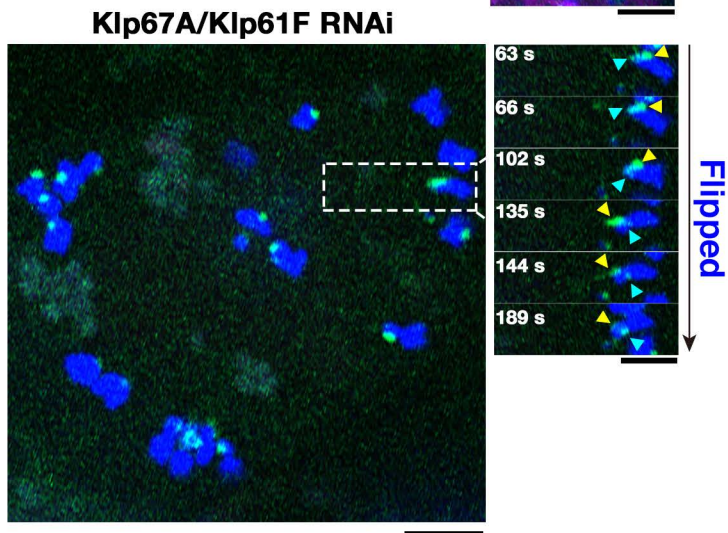


図23. 動原体-微小管結合の不安定化はSiR-tubulin染色によるアーティファクトではない

(A) 微小管動態をEB1-SNAPにより可視化した細胞。(C) 微小管マーカナーなしの細胞。(B) 染色体反転の頻度の定量。それぞれの点は細胞あたりの反転回数/sを示している。エラーバーはSEMを表す。15細胞 (コントロール; Klp61F RNAi), 27細胞 (Klp61F RNAi/Klp67A RNAi)解析した。バー, 5 μm 。SiR-tubulin染色したときに観察される表現型は、SiR-tubulinなしの条件でも再現された

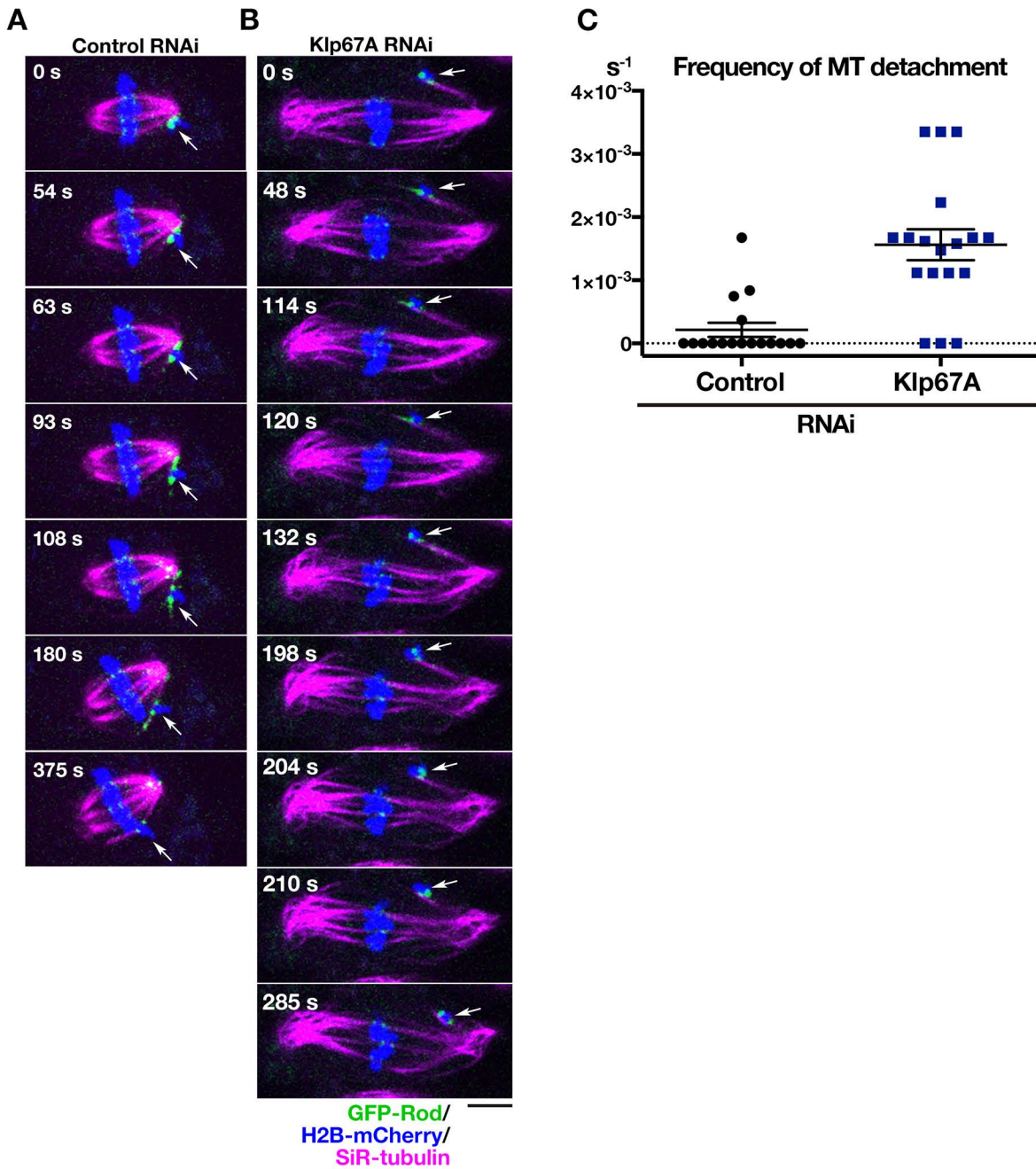


図24. キネシン-8^{Klp67A}は二極性スピンドルにおける安定な動原体-微小管結合に必要である
 (A, B) Klp67A RNAi、もしくはコントロール RNAi処理をした分裂期S2細胞のライブイメージング。微小管 (マゼンタ; SiR-tubulin), 染色体(青; H2B-mCherry), GFP-Rod (緑)。矢印で示した動原体-微小管結合後の染色体の動態は劇的に異なる。バー, 5 μ m. (C) 動原体-微小管の解離頻度をグラフに可視化した。それぞれの点は細胞あたりの 解離回数/sを示す ($P < 0.001$; Welch's t test)。RNAi実験は3回行い、そのうち2回分のデータを定量して示した。エラーバーはSEMを示す。

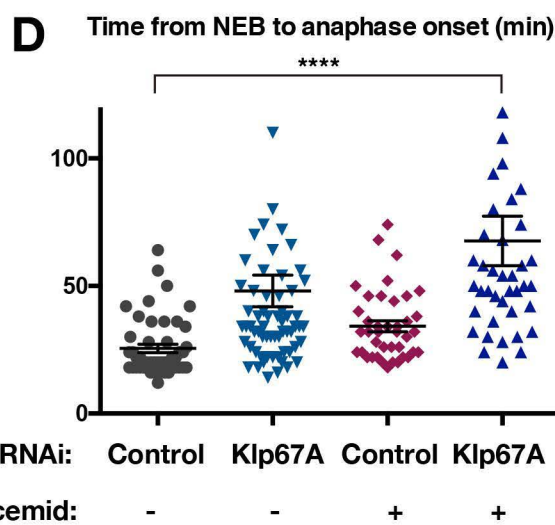
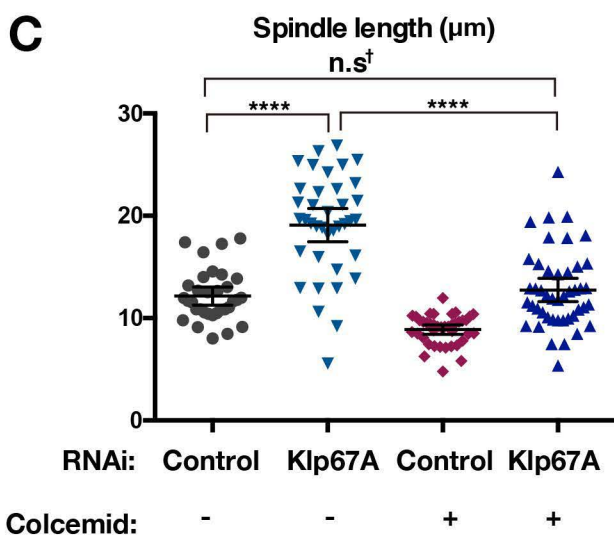
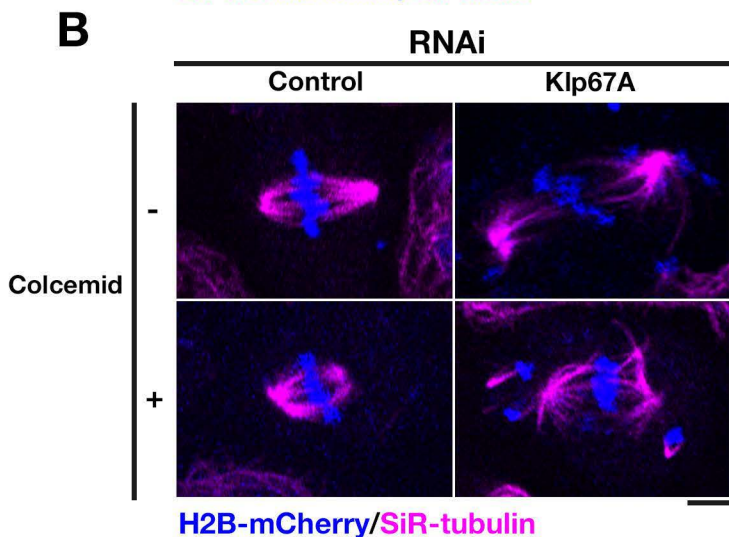
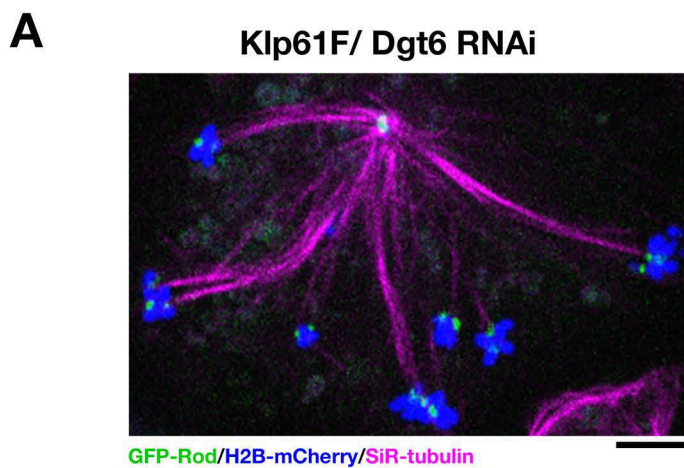


図25. 微小管の長さを人為的に変えてもキネシン-8^{Klp67A} 欠損による染色体整列異常はレスキューされない (A) オーグミン, Dgt6とKlp61Fに誘導された長い単極性のスピンドル。緑, GFP-Rod, 青, 染色体 (H2B-mCherry), マゼンタ, 微小管 (SiR-tubulin)。染色体反転の頻度の顕著な上昇は観察されなかった (動画 4と図25 E参照)。 (B-D) コルセמיד処理 (60 ng/mL)によりスピンドル微小管をコントロールと同程度 (C, +: 差の平均 = 0.59, 95 % 差の信頼区間 = [-1.28, 2.46])に短くしても、Klp67A RNAi処理細胞の染色体整列異常は回復しなかった。 (B) コルセמידを処理したスピンドル像 (青, 染色体 [H2B-mCherry], マゼンタ, 微小管 [SiR-tubulin])。バー, 5 μm 。 (C) 核膜崩壊後 16 分後スピンドルの長さを測定した (****: $p < 0.001$ [Games-Howell test], $n = 33, 38, 45, 40$ [右から左]) (D) 分裂期に要した時間 (****: $p < 0.001$ [Games-Howell test], $n = 3, 46, 66, 40, 41$ [右から左])。エラーバーはSEMを示す。実験は2回行い、そのうちの1回のデータを定量した。 (D) グラフ, Klp67A RNAi処理細胞において、2つの外れ値を除いて示している。ただし定量値には含まれている。

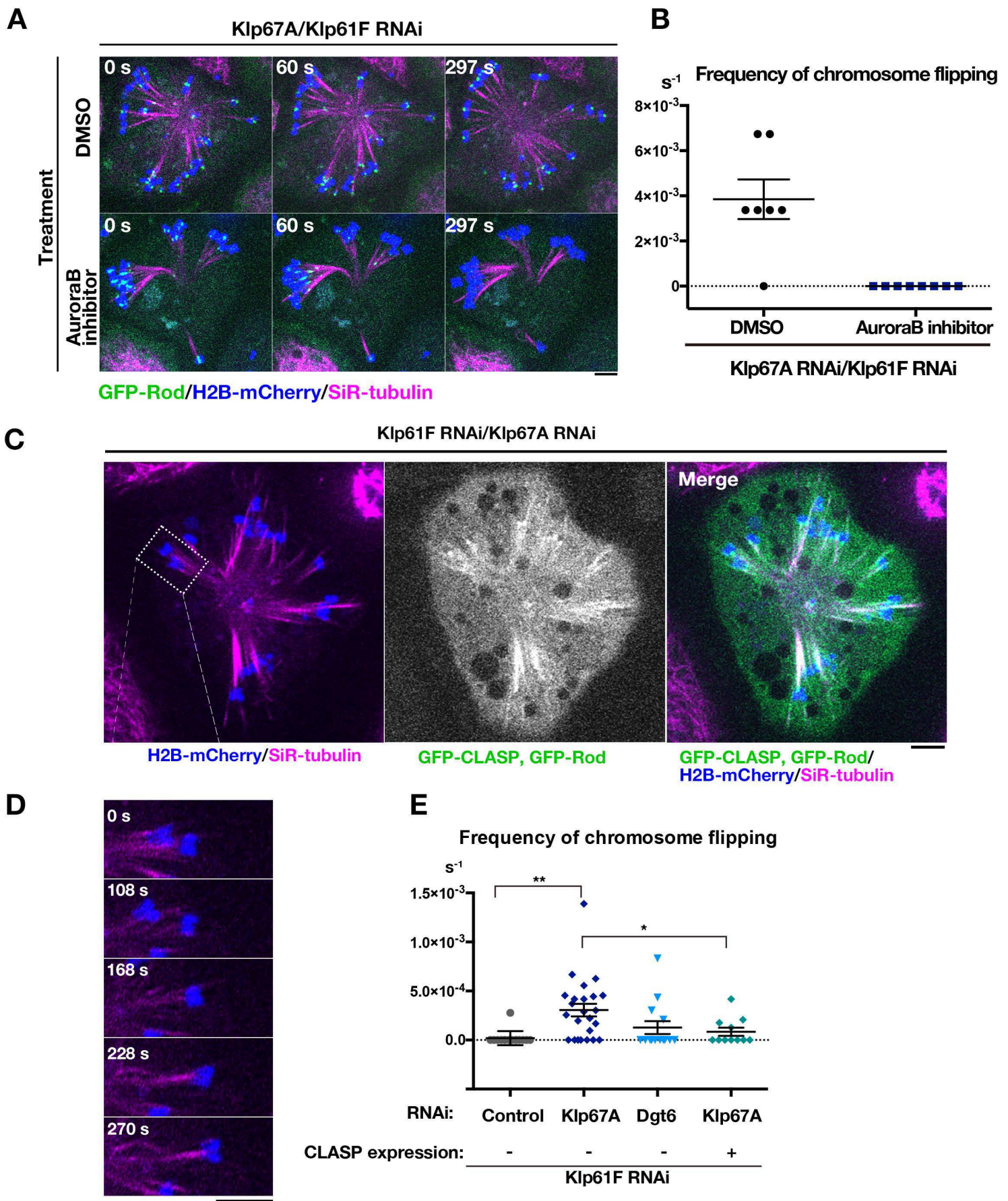
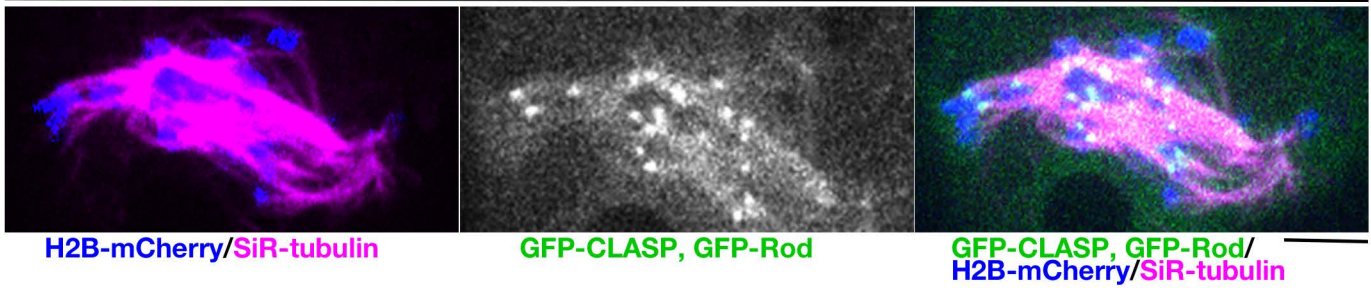


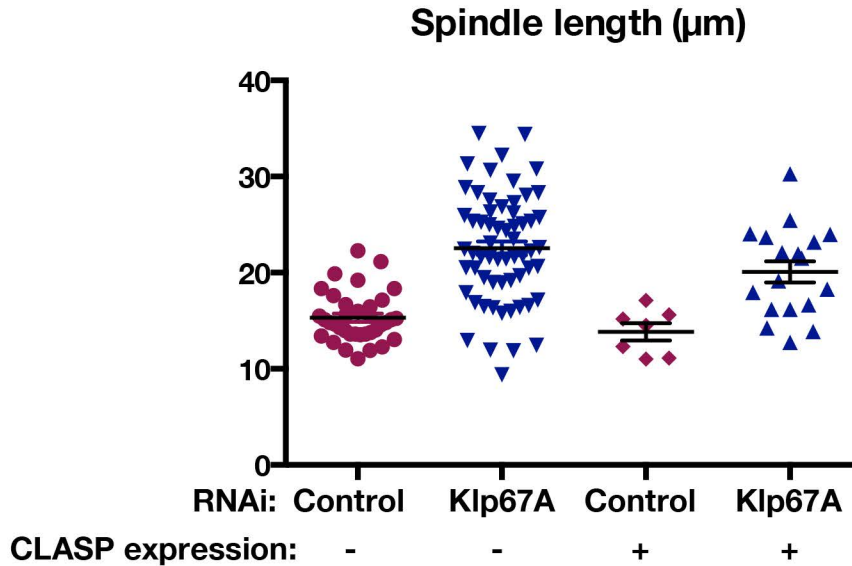
図26. 不安定化した動原体-微小管結合はAuroa Bキナーゼの阻害、もしくはCLASP^{Mast/Orbit}過剰発現により回復する (A) Klp61F/ Klp67A RNAiにより単極性のスピンドルを誘導すると同時に、動原体-微小管結合を不安定化した後、20 μ M Binucleine-2を処理することにより、Aurora B キナーゼ活性を阻害した。コントロールとしてBinucleine-2の溶媒であるDMSOを処理した。バー、5 μ m. (B) 染色体反転の頻度をグラフに可視化した ($n = 7$ [DMSO], 8 cells [Binucleine-2])。それぞれの点は細胞あたりの頻度を示している。エラーバーはSEMを示す。(C) Klp61F/ Klp67A RNAi 後、GFP-CLASPを過剰発現した細胞。(D) (C)における染色体動態を例示した。GFP-CLASPの過剰発現により染色体動態は静的になった。(E) 染色体反転の頻度 (反転回数/s/染色体)。それぞれの点は1細胞における平均頻度を示している。エラーバーはSEMを示す。GFP-CLASPを過剰発現した細胞では染色体反転頻度が有意に上昇した (*, $P < 0.034$; **, $P < 0.0013$; Games-Howell test)。実験は二回以上行い、定量した値をプールして示した。合計15細胞, 168染色体 (コントロール), 24 細胞, 364染色体 (Klp67A RNAi), 13 細胞, 128 染色体 (Dgt6 RNAi), 11 細胞, 128 染色体 (Klp67A RNAi, GFP-CLASP^{Mast/Orbit} 過剰発現) を解析した。バーは5 μ mを示す。

A

Klp67A RNAi



B



C

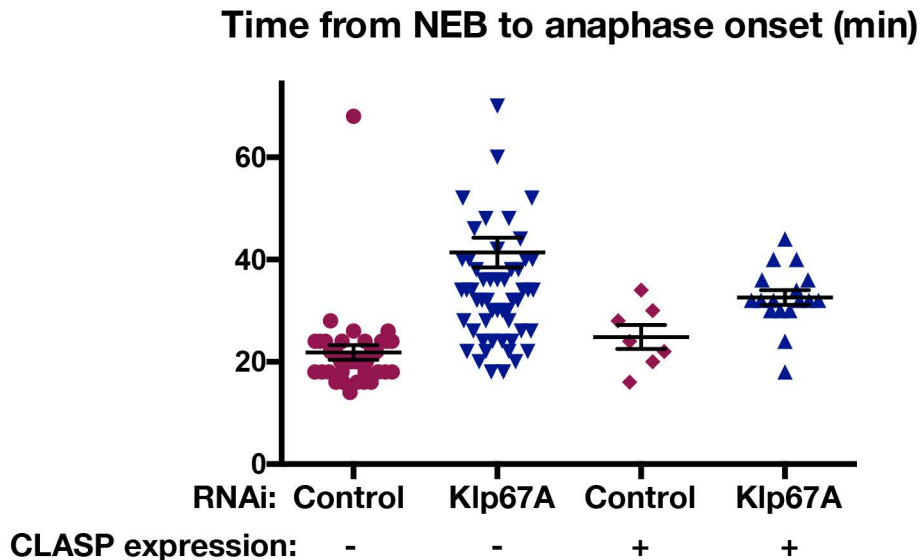
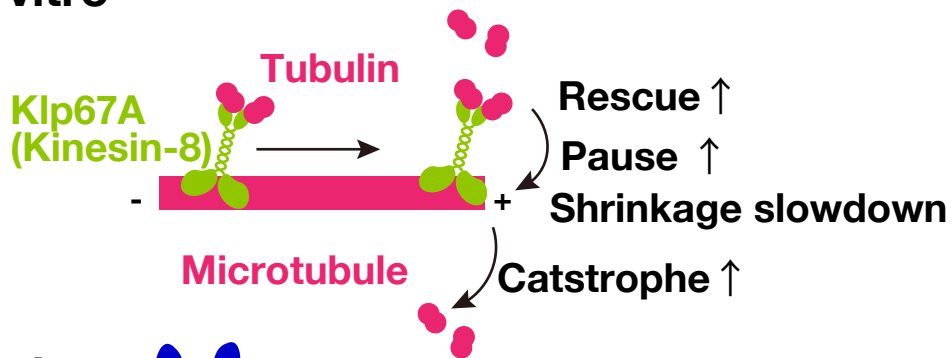


図27. $\text{CLASP}^{\text{Mast/Orbit}}$ 過剰発現は、キネシン-8^{Kl67A}欠損により引き起こされた染色体整列異常をレスキューできない

(A) Klp67A RNAi処理後のGFP-CLASP過剰発現細胞。緑, GFP-CLASP/GFP-Rod, 青, 染色体 (H2B-mCherry), マゼンタ, 微小管 (SiR-tubulin) バー, 5 μm .

(B, C) 分裂期中期のスピンドルの長さや分裂期遅延はGFP-CLASP過剰発現でレスキューされなかった。エラーバーはSEMを示す。

A In vitro



B In vivo

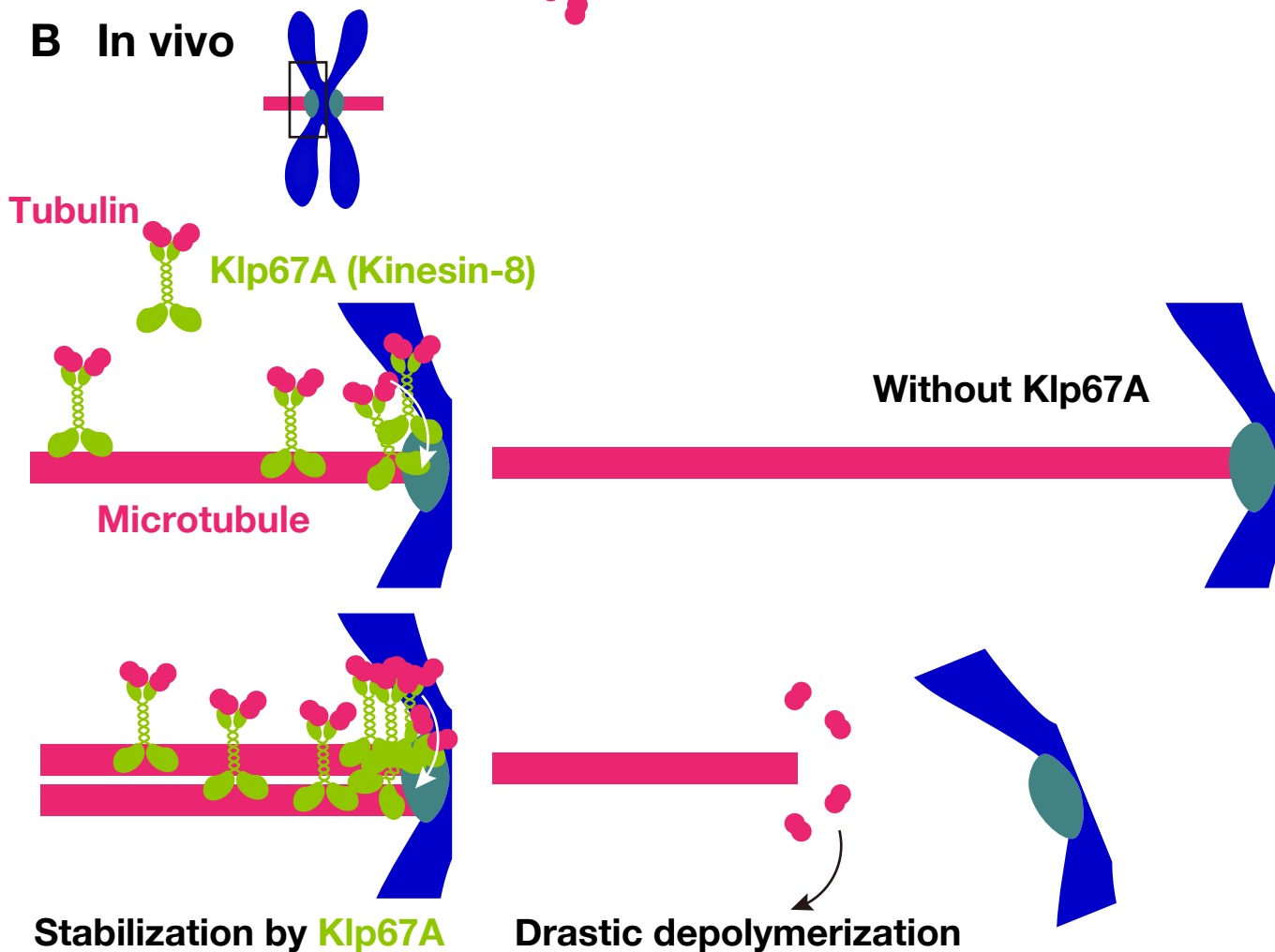


図 28. 本研究のまとめ

(A) In vitroにおいて、Klp67Aはチューブリンと結合して微小管プラス端方向に歩行して留まり、カタストロフを誘導すると同時に、短縮速度を減少して、ポーズとレスキューを誘導する。

(B) 細胞内においてKlp67Aは、スピンドル微小管の長さを制限すると同時に、CLASPと協働して、動原体微小管の急速な脱重合を防ぐことで、動原体-微小管結合を安定化する。

参考文献

- 1 Desai, A. & Mitchison, T. J. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 83-117, doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.83 (1997).
- 2 Mitchison, T. J. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **261**, 1044-1047 (1993).
- 3 Menendez, M., Rivas, G., Diaz, J. F. & Andreu, J. M. Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site. *J Biol Chem* **273**, 167-176 (1998).
- 4 Hesse, J., Thierauf, M. & Ponstingl, H. Tubulin sequence region beta 155-174 is involved in binding exchangeable guanosine triphosphate. *J Biol Chem* **262**, 15472-15475 (1987).
- 5 Carlier, M. F. & Pantaloni, D. Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* **20**, 1918-1924 (1981).
- 6 Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242 (1984).
- 7 Horio, T. & Hotani, H. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* **321**, 605-607, doi:10.1038/321605a0 (1986).
- 8 Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P. & Salmon, E. D. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* **107**, 1437-1448 (1988).
- 9 Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. & Milligan, R. A. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol* **114**, 977-991 (1991).
- 10 Guesdon, A., Bazile, F., Buey, R. M., Mohan, R., Monier, S., Garcia, R. R., . . . Chretien, D. EB1 interacts with outwardly curved and straight regions of the microtubule lattice. *Nat Cell Biol* **18**, 1102-1108, doi:10.1038/ncb3412 (2016).
- 11 Chretien, D., Fuller, S. D. & Karsenti, E. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol* **129**, 1311-1328 (1995).

- 12 Arnal, I., Karsenti, E. & Hyman, A. A. Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of cell biology* **149**, 767-774 (2000).
- 13 McIntosh, J. R., O'Toole, E., Morgan, G., Austin, J., Ulyanov, E., Ataulakhanov, F. & Gudimchuk, N. Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments. *J Cell Biol* **217**, 2691-2708, doi:10.1083/jcb.201802138 (2018).
- 14 Howard, J. & Hyman, A. A. Microtubule polymerases and depolymerases. *Current opinion in cell biology* **19**, 31-35, doi:10.1016/j.ceb.2006.12.009 (2007).
- 15 Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 711, doi:10.1038/nrm4084 (2015).
- 16 Brouhard, G. J., Stear, J. H., Noetzel, T. L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S. C., . . . Hyman, A. A. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**, 79-88, doi:10.1016/j.cell.2007.11.043 (2008).
- 17 Maurer, S. P., Bieling, P., Cope, J., Hoenger, A. & Surrey, T. GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3988-3993, doi:10.1073/pnas.1014758108 (2011).
- 18 Zanic, M., Stear, J. H., Hyman, A. A. & Howard, J. EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice. *PLoS One* **4**, e7585, doi:10.1371/journal.pone.0007585 (2009).
- 19 Maurer, S. P., Cade, N. I., Bohner, G., Gustafsson, N., Boutant, E. & Surrey, T. EB1 Accelerates Two Conformational Transitions Important for Microtubule Maturation and Dynamics. *Curr. Biol.* **24**, 372-384, doi:10.1016/j.cub.2013.12.042 (2014).
- 20 Komarova, Y., De Groot, C. O., Grigoriev, I., Gouveia, S. M., Munteanu, E. L., Schober, J. M., . . . Akhmanova, A. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol* **184**, 691-706, doi:10.1083/jcb.200807179 (2009).
- 21 Li, W., Miki, T., Watanabe, T., Kakeno, M., Sugiyama, I., Kaibuchi, K. & Goshima, G. EB1 promotes microtubule dynamics by recruiting Sentin in

- Drosophila cells. *J Cell Biol* **193**, 973-983, doi:10.1083/jcb.201101108 (2011).
- 22 Zanic, M., Widlund, P. O., Hyman, A. A. & Howard, J. Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels. *Nat. Cell Biol.* **15**, 688-+, doi:10.1038/ncb2744 (2013).
- 23 Li, W. J., Moriwaki, T., Tani, T., Watanabe, T., Kaibuchi, K. & Goshima, G. Reconstitution of dynamic microtubules with Drosophila XMAP215, EB1, and Sentin. *J. Cell Biol.* **199**, 849-862, doi:10.1083/jcb.201206101 (2012).
- 24 Walczak, C. E., Verma, S. & Mitchison, T. J. XCTK2: A kinesin-related protein that promotes mitotic spindle assembly in *Xenopus laevis* egg extracts. *J. Cell Biol.* **136**, 859-870, doi:DOI 10.1083/jcb.136.4.859 (1997).
- 25 Hunter, A. W., Caplow, M., Coy, D. L., Hancock, W. O., Diez, S., Wordeman, L. & Howard, J. The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol Cell* **11**, 445-457, doi:Doi 10.1016/S1097-2765(03)00049-2 (2003).
- 26 Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J. & Walczak, C. E. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* **96**, 69-78, doi:Doi 10.1016/S0092-8674(00)80960-5 (1999).
- 27 Friel, C. T. & Howard, J. The kinesin-13 MCAK has an unconventional ATPase cycle adapted for microtubule depolymerization. *Embo J* **30**, 3928-3939, doi:10.1038/emboj.2011.290 (2011).
- 28 Asenjo, A. B., Chatterjee, C., Tan, D. Y., DePaoli, V., Rice, W. J., Diaz-Avalos, R., . . . Sosa, H. Structural Model for Tubulin Recognition and Deformation by Kinesin-13 Microtubule Depolymerases. *Cell Rep* **3**, 759-768, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.030 (2013).
- 29 Gupta, M. L., Carvalho, P., Roof, D. M. & Pellman, D. Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* **8**, 913-U933, doi:10.1038/ncb1457 (2006).
- 30 Varga, V., Helenius, J., Tanaka, K., Hyman, A. A., Tanaka, T. U. & Howard, J. Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner. *Nat. Cell Biol.* **8**, 957-U960, doi:10.1038/ncb1462 (2006).
- 31 Peters, C., Brejc, K., Belmont, L., Bodey, A. J., Lee, Y., Yu, M., . . . Moores, C. A. Insight into the molecular mechanism of the multitasking kinesin-8 motor.

- Embo J* **29**, 3437-3447, doi:10.1038/emboj.2010.220 (2010).
- 32 Al-Bassam, J., Kim, H., Brouhard, G., van Oijen, A., Harrison, S. C. & Chang, F. CLASP Promotes Microtubule Rescue by Recruiting Tubulin Dimers to the Microtubule. *Dev. Cell* **19**, 245-258, doi:10.1016/j.devcel.2010.07.016 (2010).
- 33 Moriwaki, T. & Goshima, G. Five factors can reconstitute all three phases of microtubule polymerization dynamics. *J. Cell Biol.* **215**, 357-368, doi:10.1083/jcb.201604118 (2016).
- 34 Majumdar, S., Kim, T., Chen, Z., Munyoki, S., Tso, S. C., Brautigam, C. A. & Rice, L. M. An isolated CLASP TOG domain suppresses microtubule catastrophe and promotes rescue. *Mol Biol Cell* **29**, 1359-1375, doi:10.1091/mbc.E17-12-0748 (2018).
- 35 Lawrence, E. J., Arpag, G., Norris, S. R. & Zanic, M. Human CLASP2 specifically regulates microtubule catastrophe and rescue. *Mol Biol Cell* **29**, 1168-1177, doi:10.1091/mbc.E18-01-0016 (2018).
- 36 Aher, A., Kok, M., Sharma, A., Rai, A., Olieric, N., Rodriguez-Garcia, R., . . . Akhmanova, A. CLASP Suppresses Microtubule Catastrophes through a Single TOG Domain. *Dev. Cell* **46**, 40-+, doi:10.1016/j.devcel.2018.05.032 (2018).
- 37 Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 711-726, doi:10.1038/nrm4084 (2015).
- 38 Martin, M. & Akhmanova, A. Coming into Focus: Mechanisms of Microtubule Minus-End Organization. *Trends Cell Biol.* **28**, 574-588, doi:10.1016/j.tcb.2018.02.011 (2018).
- 39 Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L. & Agard, D. A. Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 709-721, doi:10.1038/nrm3209 (2011).
- 40 Sulimenko, V., Hajkova, Z., Klebanovych, A. & Draber, P. Regulation of microtubule nucleation mediated by gamma-tubulin complexes. *Protoplasma* **254**, 1187-1199, doi:10.1007/s00709-016-1070-z (2017).
- 41 Rogers, G. C., Rusan, N. M., Peifer, M. & Rogers, S. L. A multicomponent assembly pathway contributes to the formation of acentrosomal microtubule arrays in interphase *Drosophila* cells. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3163-3178, doi:10.1091/mbc.E07-10-1069 (2008).

- 42 Motegi, F., Velarde, N. V., Piano, F. & Sugimoto, A. Two phases of astral microtubule activity during cytokinesis in *C-elegans* embryos. *Dev. Cell* **10**, 509-520, doi:10.1016/j.devcel.2006.03.001 (2006).
- 43 Nakaoka, Y., Kimura, A., Tani, T. & Goshima, G. Cytoplasmic Nucleation and Atypical Branching Nucleation Generate Endoplasmic Microtubules in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **27**, 228-242, doi:10.1105/tpc.114.134817 (2015).
- 44 Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T. & Takeichi, M. Anchorage of Microtubule Minus Ends to Adherens Junctions Regulates Epithelial Cell-Cell Contacts. *Cell* **135**, 948-959, doi:10.1016/j.cell.2008.09.040 (2008).
- 45 Goodwin, S. S. & Vale, R. D. Patronin Regulates the Microtubule Network by Protecting Microtubule Minus Ends. *Cell* **143**, 263-274, doi:10.1016/j.cell.2010.09.022 (2010).
- 46 Jiang, K., Hua, S. S., Mohan, R., Grigoriev, I., Yau, K. W., Liu, Q. Y., . . . Akhmanova, A. Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. *Dev. Cell* **28**, 295-309, doi:10.1016/j.devcel.2014.01.001 (2014).
- 47 Wang, H. F., Brust-Mascher, I., Civelekoglu-Scholey, G. & Scholey, J. M. Patronin mediates a switch from kinesin-13-dependent poleward flux to anaphase B spindle elongation. *J. Cell Biol.* **203**, 35-46, doi:10.1083/jcb.201306001 (2013).
- 48 Janson, M. E., de Dood, M. E. & Dogterom, M. Dynamic instability of microtubules is regulated by force. *J. Cell Biol.* **161**, 1029-1034, doi:10.1083/jcb.200301147 (2003).
- 49 Drummond, D. R. & Cross, R. A. Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Biol.* **10**, 766-775, doi:10.1016/S0960-9822(00)00570-4 (2000).
- 50 Komarova, Y. A., Vorobjev, I. A. & Borisy, G. G. Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *J. Cell Sci.* **115**, 3527-3539 (2002).
- 51 Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. & Chang, F. A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J. Cell Biol.* **153**, 397-411, doi:10.1083/jcb.153.2.397 (2001).

- 52 Akiyoshi, B., Sarangapani, K. K., Powers, A. F., Nelson, C. R., Reichow, S. L., Arellano-Santoyo, H., . . . Biggins, S. Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* **468**, 576-U255, doi:10.1038/nature09594 (2010).
- 53 Trushko, A., Schaffer, E. & Howard, J. The growth speed of microtubules with XMAP215-coated beads coupled to their ends is increased by tensile force. *P Natl Acad Sci USA* **110**, 14670-14675, doi:10.1073/pnas.1218053110 (2013).
- 54 Laan, L., Pavin, N., Husson, J., Romet-Lemonne, G., van Duijn, M., Lopez, M. P., . . . Dogterom, M. Cortical Dynein Controls Microtubule Dynamics to Generate Pulling Forces that Position Microtubule Asters. *Cell* **148**, 502-514, doi:10.1016/j.cell.2012.01.007 (2012).
- 55 Hendricks, A. G., Lazarus, J. E., Perlson, E., Gardner, M. K., Odde, D. J., Goldman, Y. E. & Holzbaur, E. L. F. Dynein Tethers and Stabilizes Dynamic Microtubule Plus Ends. *Curr. Biol.* **22**, 632-637, doi:10.1016/j.cub.2012.02.023 (2012).
- 56 Driver, J. W., Geyer, E. A., Bailey, M. E., Rice, L. M. & Asbury, C. L. Direct measurement of conformational strain energy in protofilaments curling outward from disassembling microtubule tips. *Elife* **6**, doi:ARTN e28433 10.7554/eLife.28433 (2017).
- 57 Brouhard, G. J. & Rice, L. M. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**, 451-463, doi:10.1038/s41580-018-0009-y (2018).
- 58 Coombes, C. E., Yamamoto, A., Kenzie, M. R., Odde, D. J. & Gardner, M. K. Evolving Tip Structures Can Explain Age-Dependent Microtubule Catastrophe. *Curr. Biol.* **23**, 1342-1348, doi:10.1016/j.cub.2013.05.059 (2013).
- 59 Gardner, M. K., Zanic, M., Gell, C., Bormuth, V. & Howard, J. Depolymerizing Kinesins Kip3 and MCAK Shape Cellular Microtubule Architecture by Differential Control of Catastrophe. *Cell* **147**, 1092-1103, doi:10.1016/j.cell.2011.10.037 (2011).
- 60 Schaedel, L., John, K., Gaillard, J., Nachury, M. V., Blanchoin, L. & Thery, M. Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat Mater* **14**, 1156-+, doi:10.1038/Nmat4396 (2015).
- 61 Aumeier, C., Schaedel, L., Gaillard, J., John, K., Blanchoin, L. & Thery, M.

- Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat. Cell Biol.* **18**, 1054-1064, doi:10.1038/ncb3406 (2016).
- 62 Vemu, A., Szczesna, E., Zehr, E. A., Spector, J. O., Grigorieff, N., Deaconescu, A. M. & Roll-Mecak, A. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. *Science* **361**, 768+, doi:10.1126/science.aau1504 (2018).
- 63 Pavin, N. & Tolic, I. M. Self-Organization and Forces in the Mitotic Spindle. *1936-122x* **45**, 279-298, doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010934 (2016).
- 64 Kapoor, T. Metaphase Spindle Assembly. *Biology* **6**, 8 (2017).
- 65 Maiato, H., Hergert, P. J., Moutinho-Pereira, S., Dong, Y. M., Vandenbeldt, K. J., Rieder, C. L. & McEwen, B. F. The ultrastructure of the kinetochore and kinetochore fiber in *Drosophila* somatic cells. *Chromosoma* **115**, 469-480, doi:10.1007/s00412-006-0076-2 (2006).
- 66 Wendell, K. L., Wilson, L. & Jordan, M. A. Mitotic Block in HeLa-Cells by Vinblastine - Ultrastructural-Changes in Kinetochore-Microtubule Attachment and in Centrosomes. *J. Cell Sci.* **104**, 261-274 (1993).
- 67 Strunov, A., Boldyreva, L. V., Andreyeva, E. N., Pavlova, G. A., Popova, J. V., Razuvaeva, A. V., . . . Kiseleva, E. Ultrastructural analysis of mitotic *Drosophila* S2 cells identifies distinctive microtubule and intracellular membrane behaviors. *Bmc Biol* **16**, doi:ARTN 68 10.1186/s12915-018-0528-1 (2018).
- 68 Conduit, P. T., Wainman, A. & Raff, J. W. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 611-624, doi:10.1038/nrm4062 (2015).
- 69 Kirschner, M. & Mitchison, T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**, 329-342 (1986).
- 70 Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M. & Bornens, M. gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J Cell Sci* **109 (Pt 4)**, 875-887 (1996).
- 71 Kemp, C. A., Kopish, K. R., Zipperlen, P., Ahringer, J. & O'Connell, K. F. Centrosome maturation and duplication in *C. elegans* require the coiled-coil protein SPD-2. *Dev Cell* **6**, 511-523 (2004).
- 72 Hamill, D. R., Severson, A. F., Carter, J. C. & Bowerman, B. Centrosome

- maturation and mitotic spindle assembly in *C. elegans* require SPD-5, a protein with multiple coiled-coil domains. *Dev Cell* **3**, 673-684 (2002).
- 73 Khodjakov, A., Cole, R. W., Oakley, B. R. & Rieder, C. L. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol* **10**, 59-67 (2000).
- 74 Megraw, T. L., Kao, L. R. & Kaufman, T. C. Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr. Biol.* **11**, 116-120, doi:DOI 10.1016/S0960-9822(01)00017-3 (2001).
- 75 Karsenti, E., Newport, J., Hubble, R. & Kirschner, M. Interconversion of Metaphase and Interphase Microtubule Arrays, as Studied by the Injection of Centrosomes and Nuclei into *Xenopus* Eggs. *J. Cell Biol.* **98**, 1730-1745, doi:DOI 10.1083/jcb.98.5.1730 (1984).
- 76 Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. & Karsenti, E. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* **382**, 420-425, doi:DOI 10.1038/382420a0 (1996).
- 77 Karsenti, E. & Vernos, I. Cell cycle - The mitotic spindle: A self-made machine. *Science* **294**, 543-547, doi:DOI 10.1126/science.1063488 (2001).
- 78 Carazo-Salas, R. E., Guarguaglini, G., Gruss, O. J., Segref, A., Karsenti, E. & Mattaj, I. W. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* **400**, 178-181 (1999).
- 79 Ohba, T., Nakamura, M., Nishitani, H. & Nishimoto, T. Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science* **284**, 1356-1358, doi:DOI 10.1126/science.284.5418.1356 (1999).
- 80 Wilde, A. & Zheng, Y. X. Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* **284**, 1359-1362, doi:DOI 10.1126/science.284.5418.1359 (1999).
- 81 Kalab, P. & Heald, R. The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *J Cell Sci* **121**, 1577-1586, doi:10.1242/jcs.005959 (2008).
- 82 Groen, A. C., Maresca, T. J., Gatlin, J. C., Salmon, E. D. & Mitchison, T. J. Functional overlap of microtubule assembly factors in chromatin-promoted spindle assembly. *Mol Biol Cell* **20**, 2766-2773, doi:10.1091/mbc.E09-01-0043 (2009).

- 83 Luders, J., Patel, U. K. & Stearns, T. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol* **8**, 137-147, doi:10.1038/ncb1349 (2006).
- 84 Petry, S., Groen, Aaron C., Ishihara, K., Mitchison, Timothy J. & Vale, Ronald D. Branching Microtubule Nucleation in Xenopus Egg Extracts Mediated by Augmin and TPX2. *Cell* **152**, 768-777, doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.044 (2013).
- 85 Moutinho-Pereira, S., Stuurman, N., Afonso, O., Hornsveld, M., Aguiar, P., Goshima, G., . . . Maiato, H. Genes involved in centrosome-independent mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. *P Natl Acad Sci USA* **110**, 19808-19813, doi:10.1073/pnas.1320013110 (2013).
- 86 Sampath, S. C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A. & Funabiki, H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* **118**, 187-202, doi:DOI 10.1016/j.cell.2004.06.026 (2004).
- 87 Maresca, T. J., Groen, A. C., Gatlin, J. C., Ohi, R., Mitchison, T. J. & Salmon, E. D. Spindle assembly in the absence of a RanGTP gradient requires localized CPC activity. *Curr Biol* **19**, 1210-1215, doi:10.1016/j.cub.2009.05.061 (2009).
- 88 Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N. & Vale, R. D. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol* **181**, 421-429, doi:10.1083/jcb.200711053 (2008).
- 89 Uehara, R., Nozawa, R. S., Tomioka, A., Petry, S., Vale, R. D., Obuse, C. & Goshima, G. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6998-7003, doi:10.1073/pnas.0901587106 (2009).
- 90 Salmon, E. D. & Begg, D. A. Functional Implications of Cold-Stable Microtubules in Kinetochore Fibers of Insect Spermatocytes during Anaphase. *J. Cell Biol.* **85**, 853-865, doi:DOI 10.1083/jcb.85.3.853 (1980).
- 91 David, A. F., Roudot, P., Legant, W. R., Betzig, E., Danuser, G. & Gerlich, D. W. Augmin-mediated amplification of long-lived spindle microtubules directs plus-ends to kinetochores. *bioRxiv*, 501445, doi:10.1101/501445 (2018).
- 92 Kamasaki, T., O'Toole, E., Kita, S., Osumi, M., Usukura, J., McIntosh, J. R. & Goshima, G. Augmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in

- the spindle. *J Cell Biol* **202**, 25-33, doi:10.1083/jcb.201304031 (2013).
- 93 Mann, B. J. & Wadsworth, P. Kinesin-5 Regulation and Function in Mitosis. *Trends Cell Biol* **29**, 66-79, doi:10.1016/j.tcb.2018.08.004 (2019).
- 94 Kapitein, L. C., Peterman, E. J. G., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M. & Schmidt, C. F. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **435**, 114-118, doi:10.1038/nature03503 (2005).
- 95 Kashina, A. S., Baskin, R. J., Cole, D. G., Wedaman, K. P., Saxton, W. M. & Scholey, J. M. A bipolar kinesin. *Nature* **379**, 270-272, doi:DOI 10.1038/379270a0 (1996).
- 96 Hagan, I. & Yanagida, M. Novel Potential Mitotic Motor Protein Encoded by the Fission Yeast Cut7+ Gene. *Nature* **347**, 563-566, doi:DOI 10.1038/347563a0 (1990).
- 97 Hoyt, M. A., He, L., Loo, K. K. & Saunders, W. S. Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *J Cell Biol* **118**, 109-120 (1992).
- 98 Roof, D. M., Meluh, P. B. & Rose, M. D. Kinesin-Related Proteins Required for Assembly of the Mitotic Spindle. *J. Cell Biol.* **118**, 95-108, doi:DOI 10.1083/jcb.118.1.95 (1992).
- 99 Heck, M. M. S., Pereira, A., Pesavento, P., Yannoni, Y., Spradling, A. C. & Goldstein, L. S. B. The Kinesin-Like Protein Klp61f Is Essential for Mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **123**, 665-679, doi:DOI 10.1083/jcb.123.3.665 (1993).
- 100 Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L. & Mitchison, T. J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **286**, 971-974, doi:DOI 10.1126/science.286.5441.971 (1999).
- 101 Enos, A. P. & Morris, N. R. Mutation of a Gene That Encodes a Kinesin-Like Protein Blocks Nuclear Division in *Aspergillus-Nidulans*. *Cell* **60**, 1019-1027, doi:Doi 10.1016/0092-8674(90)90350-N (1990).
- 102 Sturgill, E. G., Norris, S. R., Guo, Y. & Ohi, R. Kinesin-5 inhibitor resistance is driven by kinesin-12. *J. Cell Biol.* **213**, 213-227, doi:10.1083/jcb.201507036 (2016).
- 103 Saunders, W., Lengyel, V. & Hoyt, M. A. Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between different types of

- kinesin-related motors. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1025-1033 (1997).
- 104 She, Z. Y. & Yang, W. X. Molecular mechanisms of kinesin-14 motors in spindle assembly and chromosome segregation. *J. Cell Sci.* **130**, 2097-2110, doi:10.1242/jcs.200261 (2017).
- 105 Ferenz, N. P., Paul, R., Fagerstrom, C., Mogilner, A. & Wadsworth, P. Dynein Antagonizes Eg5 by Crosslinking and Sliding Antiparallel Microtubules. *Curr. Biol.* **19**, 1833-1838, doi:10.1016/j.cub.2009.09.025 (2009).
- 106 Mountain, V., Simerly, C., Howard, L., Ando, A., Schatten, G. & Compton, D. A. The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **147**, 351-365, doi:DOI 10.1083/jcb.147.2.351 (1999).
- 107 Tanenbaum, M. E., Macurek, L., Galjart, N. & Medema, R. H. Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *Embo J* **27**, 3235-3245, doi:10.1038/emboj.2008.242 (2008).
- 108 van Heesbeen, R. G., Tanenbaum, M. E. & Medema, R. H. Balanced Activity of Three Mitotic Motors Is Required for Bipolar Spindle Assembly and Chromosome Segregation. *Mol. Biol. Cell* **25** (2014).
- 109 Mitchison, T. J., Maddox, P., Gaetz, J., Groen, A., Shirasu, M., Desai, A., . . . Kapoor, T. M. Roles of polymerization dynamics, opposed motors, and a tensile element in governing the length of *Xenopus* extract meiotic spindles. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3064-3076, doi:DOI 10.1091/mbc.E05-02-0174 (2005).
- 110 Sharp, D. J., Yu, K. R., Sisson, J. C., Sullivan, W. & Scholey, J. M. Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol* **1**, 51-54, doi:10.1038/9025 (1999).
- 111 Salemi, J. D., McGilvray, P. T. & Maresca, T. J. Development of a *Drosophila* cell-based error correction assay. *Front Oncol* **3**, 187, doi:10.3389/fonc.2013.00187 (2013).
- 112 Tao, L., Mogilner, A., Civelekoglu-Scholey, G., Wollman, R., Evans, J., Stahlberg, H. & Scholey, J. M. A homotetrameric kinesin-5, KLP61F, bundles microtubules and antagonizes Ncd in motility assays. *Curr. Biol.* **16**, 2293-2302, doi:10.1016/j.cub.2006.09.064 (2006).
- 113 Rincon, S. A., Lamson, A., Blackwell, R., Syrovatkina, V., Fraiser, V., Paoletti, A., . . . Tran, P. T. Kinesin-5-independent mitotic spindle assembly requires the

- antiparallel microtubule crosslinker Ase1 in fission yeast. *2041-1723* **8**, doi:ARTN 15286
10.1038/ncomms15286 (2017).
- 114 Yukawa, M., Kawakami, T., Okazaki, M., Kume, K., Tang, N. H. & Toda, T. A microtubule polymerase cooperates with the kinesin-6 motor and a microtubule cross-linker to promote bipolar spindle assembly in the absence of kinesin-5 and kinesin-14 in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3647-3659, doi:10.1091/mbc.E17-08-0497 (2017).
- 115 Bruges, J., Nuzzo, V., Mazur, E. & Needleman, D. J. Nucleation and Transport Organize Microtubules in Metaphase Spindles. *Cell* **149**, 554-564, doi:10.1016/j.cell.2012.03.027 (2012).
- 116 Lecland, N. & Luders, J. The dynamics of microtubule minus ends in the human mitotic spindle. *Nat Cell Biol* **16**, 770-778, doi:10.1038/ncb2996 (2014).
- 117 Hentrich, C. & Surrey, T. Microtubule organization by the antagonistic mitotic motors kinesin-5 and kinesin-14. *J. Cell Biol.* **189**, 465-480, doi:10.1083/jcb.200910125 (2010).
- 118 Tan, R., Foster, P. J., Needleman, D. J. & McKenney, R. J. Cooperative Accumulation of Dynein-Dynactin at Microtubule Minus-Ends Drives Microtubule Network Reorganization. *Dev. Cell* **44**, 233-+, doi:10.1016/j.devcel.2017.12.023 (2018).
- 119 Ito, A. & Goshima, G. Microcephaly protein Asp focuses the minus ends of spindle microtubules at the pole and within the spindle. *J. Cell Biol.* **211**, 999-1009, doi:10.1083/jcb.201507001 (2015).
- 120 Tungadi, E. A., Ito, A., Kiyomitsu, T. & Goshima, G. Human microcephaly ASPM protein is a spindle pole-focusing factor that functions redundantly with CDK5RAP2. *J. Cell Sci.* **130**, 3676-3684, doi:10.1242/jcs.203703 (2017).
- 121 Chavali, P. L., Chandrasekaran, G., Barr, A. R., Tatrai, P., Taylor, C., Papachristou, E. K., . . . Gergely, F. A CEP215-HSET complex links centrosomes with spindle poles and drives centrosome clustering in cancer. *2041-1723* **7**, doi:ARTN 11005
10.1038/ncomms11005 (2016).
- 122 Hueschen, C. L., Kenny, S. J., Xu, K. & Dumont, S. NuMA recruits dynein activity to microtubule minus-ends at mitosis. *Elife* **6**, doi:ARTN e29328

10.7554/eLife.29328 (2017).

- 123 Rogers, G. C., Rogers, S. L. & Sharp, D. J. Spindle microtubules in flux. *J. Cell Sci.* **118**, 1105-1116, doi:10.1242/jcs.02284 (2005).
- 124 Maiato, H., Gomes, A. M., Sousa, F. & Barisic, M. Mechanisms of Chromosome Congression during Mitosis. *Biology (Basel)* **6**, doi:10.3390/biology6010013 (2017).
- 125 Wang, S. Z. & Adler, R. Chromokinesin: a DNA-binding, kinesin-like nuclear protein. *J Cell Biol* **128**, 761-768 (1995).
- 126 Vanneste, D., Ferreira, V. & Vernos, I. Chromokinesins: localization-dependent functions and regulation during cell division. *Biochem Soc Trans* **39**, 1154-1160, doi:10.1042/BST0391154 (2011).
- 127 Gundersen, G. G., Kalnoski, M. H. & Bulinski, J. C. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* **38**, 779-789 (1984).
- 128 Gundersen, G. G. & Bulinski, J. C. Distribution of tyrosinated and nontyrosinated alpha-tubulin during mitosis. *J Cell Biol* **102**, 1118-1126 (1986).
- 129 McKenney, R. J., Huynh, W., Vale, R. D. & Sirajuddin, M. Tyrosination of alpha-tubulin controls the initiation of processive dynein-dynactin motility. *Embo J* **35**, 1175-1185, doi:10.15252/embj.201593071 (2016).
- 130 Barisic, M., Aguiar, P., Geley, S. & Maiato, H. Kinetochore motors drive congression of peripheral polar chromosomes by overcoming random arm-ejection forces. *Nat. Cell Biol.* **16**, 1249-U1259, doi:10.1038/ncb3060 (2014).
- 131 Barisic, M., Silva e Sousa, R., Tripathy, S. K., Magiera, M. M., Zaytsev, A. V., Pereira, A. L., . . . Maiato, H. Mitosis. Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science* **348**, 799-803, doi:10.1126/science.aaa5175 (2015).
- 132 Cheeseman, I. M. & Desai, A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 33-46, doi:10.1038/nrm2310 (2008).
- 133 Cheeseman, I. M. The Kinetochore. *Csh Perspect Biol* **6**, doi:ARTN a015826 10.1101/cshperspect.a015826 (2014).
- 134 Musacchio, A. & Desai, A. A Molecular View of Kinetochore Assembly and

- Function. *Biology (Basel)* **6**, doi:10.3390/biology6010005 (2017).
- 135 Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M. & Desai, A. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* **127**, 983-997, doi:10.1016/j.cell.2006.09.039 (2006).
- 136 Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., . . . Musacchio, A. Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* **133**, 427-439, doi:10.1016/j.cell.2008.03.020 (2008).
- 137 Wei, R. R., Al-Bassam, J. & Harrison, S. C. The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 54-59, doi:10.1038/nsmb1186 (2007).
- 138 DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. & Salmon, E. D. Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* **127**, 969-982, doi:10.1016/j.cell.2006.09.047 (2006).
- 139 Varma, D. & Salmon, E. D. The KMN protein network - chief conductors of the kinetochore orchestra. *J. Cell Sci.* **125**, 5927-5936, doi:10.1242/jcs.093724 (2012).
- 140 Kapoor, T. M., Lampson, M. A., Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E. D., . . . Khodjakov, A. Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* **311**, 388-391, doi:10.1126/science.1122142 (2006).
- 141 Magidson, V., O'Connell, C. B., Loncarek, J., Paul, R., Mogilner, A. & Khodjakov, A. The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell* **146**, 555-567, doi:10.1016/j.cell.2011.07.012 (2011).
- 142 Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Muller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., . . . Gerlich, D. W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* **535**, 308-+, doi:10.1038/nature18610 (2016).
- 143 Thompson, S. L. & Compton, D. A. Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *P Natl Acad Sci USA* **108**, 17974-17978, doi:10.1073/pnas.1109720108 (2011).
- 144 London, N. & Biggins, S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 736-747, doi:10.1038/nrm3888 (2014).

- 145 Musacchio, A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr Biol* **25**, R1002-1018, doi:10.1016/j.cub.2015.08.051 (2015).
- 146 Luo, X. & Yu, H. Protein metamorphosis: the two-state behavior of Mad2. *Structure* **16**, 1616-1625, doi:10.1016/j.str.2008.10.002 (2008).
- 147 Skinner, J. J., Wood, S., Shorter, J., Englander, S. W. & Black, B. E. The Mad2 partial unfolding model: regulating mitosis through Mad2 conformational switching. *J. Cell Biol.* **183**, 761-768, doi:10.1083/jcb.200808122 (2008).
- 148 Kulukian, A., Han, J. S. & Cleveland, D. W. Unattached Kinetochores Catalyze Production of an Anaphase Inhibitor that Requires a Mad2 Template to Prime Cdc20 for BubR1 Binding. *Dev. Cell* **16**, 105-117, doi:10.1016/j.devcel.2008.11.005 (2009).
- 149 De Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., . . . Musacchio, A. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* **15**, 214-225, doi:DOI 10.1016/j.cub.2005.01.038 (2005).
- 150 Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 379-393, doi:10.1038/nrm2163 (2007).
- 151 Jokelainen, P. T. The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. *Journal of Ultrastructure Research* **19**, 19-44, doi:https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80058-3 (1967).
- 152 Cassimeris, L., Rieder, C. L., Rupp, G. & Salmon, E. D. Stability of microtubule attachment to metaphase kinetochores in PtK1 cells. *J Cell Sci* **96 (Pt 1)**, 9-15 (1990).
- 153 Magidson, V., Paul, R., Yang, N., Ault, J. G., O'Connell, C. B., Tikhonenko, I., . . . Khodjakov, A. Adaptive changes in the kinetochore architecture facilitate proper spindle assembly. *Nat Cell Biol* **17**, 1134-1144, doi:10.1038/ncb3223 (2015).
- 154 Hoffman, D. B., Pearson, C. G., Yen, T. J., Howell, B. J. & Salmon, E. D. Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1995-2009, doi:DOI 10.1091/mbc.12.7.1995 (2001).

- 155 Wynne, D. J. & Funabiki, H. Kinetochore function is controlled by a phospho-dependent coexpansion of inner and outer components. *J. Cell Biol.* **210**, 899-916, doi:10.1083/jcb.201506020 (2015).
- 156 Sacristan, C., Ahmad, M. U. D., Keller, J., Fermie, J., Groenewold, V., Tromer, E., . . . Kops, G. J. P. L. Dynamic kinetochore size regulation promotes microtubule capture and chromosome biorientation in mitosis. *Nat. Cell Biol.* **20**, 800+, doi:10.1038/s41556-018-0130-3 (2018).
- 157 Pereira, C., Reis, R. M., Gama, J. B., Celestino, R., Cheerambathur, D. K., Carvalho, A. X. & Gassmann, R. Self-Assembly of the RZZ Complex into Filaments Drives Kinetochore Expansion in the Absence of Microtubule Attachment. *Curr. Biol.* **28**, 3408+, doi:10.1016/j.cub.2018.08.056 (2018).
- 158 Rodriguez-Rodriguez, J. A., Lewis, C., McKinley, K. L., Sikirzhyski, V., Corona, J., Maciejowski, J., . . . Jallepalli, P. V. Distinct Roles of RZZ and Bub1-KNL1 in Mitotic Checkpoint Signaling and Kinetochore Expansion. *Curr. Biol.* **28**, 3422+, doi:10.1016/j.cub.2018.10.006 (2018).
- 159 Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaerou, F., Karess, R. & Hays, T. Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1001-1007, doi:DOI 10.1038/ncb1101-1001 (2001).
- 160 Howell, B. J., McEwen, B. E., Canman, J. C., Hoffman, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L. & Salmon, E. D. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* **155**, 1159-1172, doi:DOI 10.1083/jcb.200105093 (2001).
- 161 Barisic, M., Sohm, B., Mikolcevic, P., Wandke, C., Rauch, V., Ringer, T., . . . Geley, S. Spindly/CCDC99 Is Required for Efficient Chromosome Congression and Mitotic Checkpoint Regulation. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1968-1981, doi:10.1091/mbc.E09-04-0356 (2010).
- 162 Griffis, E. R., Stuurman, N. & Vale, R. D. Spindly, a novel protein essential for silencing the spindle assembly checkpoint, recruits dynein to the kinetochore. *J. Cell Biol.* **177**, 1005-1015, doi:DOI 10.1083/jcb.200702062 (2007).
- 163 Gassmann, R., Holland, A. J., Varma, D., Wan, X. H., Civril, F., Cleveland, D. W., . . . Desai, A. Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Gene Dev* **24**, 957-971,

- doi:10.1101/gad.1886810 (2010).
- 164 Chan, Y. W., Fava, L. L., Uldschmid, A., Schmitz, M. H. A., Gerlich, D. W., Nigg, E. A. & Santamaria, A. Mitotic control of kinetochore-associated dynein and spindle orientation by human Spindly. *J. Cell Biol.* **185**, 859-874, doi:10.1083/jcb.200812167 (2009).
- 165 Mosalaganti, S., Keller, J., Altenfeld, A., Winzker, M., Rombaut, P., Saur, M., . . . Musacchio, A. Structure of the RZZ complex and molecular basis of its interaction with Spindly. *J. Cell Biol.* **216**, 961-981, doi:10.1083/jcb.201611060 (2017).
- 166 Gama, J. B., Pereira, C., Simoes, P. A., Celestino, R., Reis, R. M., Barbosa, D. J., . . . Gassmann, R. Molecular mechanism of dynein recruitment to kinetochores by the Rod-Zw10-Zwilch complex and Spindly. *J. Cell Biol.* **216**, 943-960, doi:10.1083/jcb.201610108 (2017).
- 167 Cheeseman, L. M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E. M., Kang, J. S., Yates, J. R., . . . Barnes, G. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the aurora kinase Ipl1p. *Cell* **111**, 163-172, doi:Doi 10.1016/S0092-8674(02)00973-X (2002).
- 168 Chmatal, L., Yang, K., Schultz, R. M. & Lampson, M. A. Spatial Regulation of Kinetochore Microtubule Attachments by Destabilization at Spindle Poles in Meiosis I. *Curr. Biol.* **25**, 1835-1841, doi:10.1016/j.cub.2015.05.013 (2015).
- 169 DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A. & Salmon, E. D. Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* **127**, 969-982, doi:10.1016/j.cell.2006.09.047 (2006).
- 170 Shrestha, R. L., Conti, D., Tamura, N., Braun, D., Ramalingam, R. A., Cieslinski, K., . . . Draviam, V. M. Aurora-B kinase pathway controls the lateral to end-on conversion of kinetochore-microtubule attachments in human cells. *Nat Commun* **8**, 150, doi:10.1038/s41467-017-00209-z (2017).
- 171 Ye, A. A., Deretic, J., Hoel, C. M., Hinman, A. W., Cimini, D., Welburn, J. P. & Maresca, T. J. Aurora A Kinase Contributes to a Pole-Based Error Correction Pathway. *Curr Biol* **25**, 1842-1851, doi:10.1016/j.cub.2015.06.021 (2015).
- 172 Lampson, M. A. & Grishchuk, E. L. Mechanisms to Avoid and Correct Erroneous Kinetochore-Microtubule Attachments. *Biology (Basel)* **6**, doi:10.3390/biology6010001 (2017).

- 173 Liu, D., Vleugel, M., Backer, C. B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I. M. & Lampson, M. A. Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J. Cell Biol.* **188**, 809-820, doi:10.1083/jcb.201001006 (2010).
- 174 Posch, M., Khoudoli, G. A., Swift, S., King, E. M., DeLuca, J. G. & Swedlow, J. R. Sds22 regulates aurora B activity and microtubule-kinetochore interactions at mitosis. *J. Cell Biol.* **191**, 61-74, doi:10.1083/jcb.200912046 (2010).
- 175 Schleicher, K., Porter, M., Ten Have, S., Sundaramoorthy, R., Porter, I. M. & Swedlow, J. R. The Ndc80 complex targets Bod1 to human mitotic kinetochores. *Open Biol* **7**, doi:10.1098/rsob.170099 (2017).
- 176 Lampson, M. A. & Cheeseman, I. M. Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol.* **21**, 133-140, doi:10.1016/j.tcb.2010.10.007 (2011).
- 177 Foley, E. A. & Kapoor, T. M. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 25-37, doi:10.1038/nrm3494 (2013).
- 178 Liu, D., Vader, G., Vromans, M. J. M., Lampson, M. A. & Lens, S. M. A. Sensing Chromosome Bi-Orientation by Spatial Separation of Aurora B Kinase from Kinetochore Substrates. *Science* **323**, 1350-1353, doi:10.1126/science.1167000 (2009).
- 179 Welburn, J. P. I., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., Lampson, M. A., Fukagawa, T. & Cheeseman, I. M. Aurora B Phosphorylates Spatially Distinct Targets to Differentially Regulate the Kinetochore-Microtubule Interface. *Mol Cell* **38**, 383-392, doi:10.1016/j.molcel.2010.02.034 (2010).
- 180 Yue, Z. J., Carvalho, A., Xu, Z. J., Yuan, X. M., Cardinale, S., Ribeiro, S., . . . Earnshaw, W. C. Deconstructing Survivin: comprehensive genetic analysis of Survivin function by conditional knockout in a vertebrate cell line. *J. Cell Biol.* **183**, 279-296, doi:10.1083/jcb.200806118 (2008).
- 181 de Regt, A. K., Asbury, C. L. & Biggins, S. Tension on kinetochore substrates is insufficient to prevent Aurora-triggered detachment. *bioRxiv*, 415992, doi:10.1101/415992 (2018).
- 182 Ji, Z. J., Gao, H. S. & Yu, H. T. Kinetochore attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* **348**, 1260-1264,

- doi:10.1126/science.aaa4029 (2015).
- 183 Hiruma, Y., Sacristan, C., Pachis, S. T., Adamopoulos, A., Kuijt, T., Ubbink, M., . . . Kops, G. J. P. L. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science* **348**, 1264-1267, doi:10.1126/science.aaa4055 (2015).
- 184 Cheerambathur, D. K., Gassmann, R., Cook, B., Oegema, K. & Desai, A. Crosstalk Between Microtubule Attachment Complexes Ensures Accurate Chromosome Segregation. *Science* **342**, 1239-1242, doi:10.1126/science.1246232 (2013).
- 185 Schmidt, J. C., Arthanari, H., Boeszoermenyi, A., Dashkevich, N. M., Wilson-Kubalek, E. M., Monnier, N., . . . Cheeseman, I. M. The Kinetochores-Bound Skl1 Complex Tracks Depolymerizing Microtubules and Binds to Curved Protofilaments. *Dev. Cell* **23**, 968-980, doi:10.1016/j.devcel.2012.09.012 (2012).
- 186 McIntosh, J. R., Grishchuk, E. L., Morhew, M. K., Efremov, A. K., Zhudenkova, K., Volkov, V. A., . . . Ataulakhov, F. I. Fibrils Connect Microtubule Tips with Kinetochores: A Mechanism to Couple Tubulin Dynamics to Chromosome Motion. *Cell* **135**, 322-333, doi:10.1016/j.cell.2008.08.038 (2008).
- 187 Powers, A. F., Franck, A. D., Gestaut, D. R., Cooper, J., Gracyzk, B., Wei, R. R., . . . Asbury, C. L. The Ndc80 Kinetochores Complex Forms Load-Bearing Attachments to Dynamic Microtubule Tips via Biased Diffusion. *Cell* **136**, 865-875, doi:10.1016/j.cell.2008.12.045 (2009).
- 188 Volkov, V. A., in't Veldt, P. J. H., Dogterom, M. & Musacchio, A. Multivalency of NDC80 in the outer kinetochores is essential to track shortening microtubules and generate forces. *Elife* **7**, doi:ARTN e36764 10.7554/eLife.36764 (2018).
- 189 Suzuki, A., Badger, B. L. & Salmon, E. D. A quantitative description of Ndc80 complex linkage to human kinetochores. *2041-1723* **6**, doi:ARTN 8161 10.1038/ncomms9161 (2015).
- 190 Lampert, F., Hornung, P. & Westermann, S. The Dam1 complex confers microtubule plus end-tracking activity to the Ndc80 kinetochores complex. *J. Cell Biol.* **189**, 641-649, doi:10.1083/jcb.200912021 (2010).
- 191 Helgeson, L. A., Zelter, A., Riffle, M., MacCoss, M. J., Asbury, C. L. & Davis,

- T. N. Human Ska complex and Ndc80 complex interact to form a load-bearing assembly that strengthens kinetochore-microtubule attachments. *P Natl Acad Sci USA* **115**, 2740-2745, doi:10.1073/pnas.1718553115 (2018).
- 192 Cheerambathur, D. K., Prevo, B., Hattersley, N., Lewellyn, L., Corbett, K. D., Oegema, K. & Desai, A. Dephosphorylation of the Ndc80 Tail Stabilizes Kinetochore-Microtubule Attachments via the Ska Complex. *Dev. Cell* **41**, 424-+, doi:10.1016/j.devcel.2017.04.013 (2017).
- 193 Monda, J. K., Whitney, I. P., Tarasovetc, E. V., Wilson-Kubalek, E., Milligan, R. A., Grishchuk, E. L. & Cheeseman, I. M. Microtubule Tip Tracking by the Spindle and Kinetochore Protein Ska1 Requires Diverse Tubulin-Interacting Surfaces. *Curr Biol* **27**, 3666-3675 e3666, doi:10.1016/j.cub.2017.10.018 (2017).
- 194 Maiato, H., Fairley, E. A. L., Rieder, C. L., Swedlow, J. R., Sunkel, C. E. & Earnshaw, W. C. Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics. *Cell* **113**, 891-904, doi:Doi 10.1016/S0092-8674(03)00465-3 (2003).
- 195 Maiato, H., Khodjakov, A. & Rieder, C. L. MAST/Orbit, the single Drosophila orthologue of human CLASPs, is required for microtubule subunit incorporation into fluxing kinetochore fibers. *Mol. Biol. Cell* **15**, 381a-381a (2004).
- 196 Maiato, H., Khodjakov, A. & Rieder, C. L. Drosophila CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres. *Nat. Cell Biol.* **7**, 42-+, doi:10.1038/ncb1207 (2005).
- 197 Cottingham, F. R. & Hoyt, M. A. Mitotic spindle positioning in *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *J. Cell Biol.* **138**, 1041-1053, doi:DOI 10.1083/jcb.138.5.1041 (1997).
- 198 Tytell, J. D. & Sorger, P. K. Analysis of kinesin motor function at budding yeast kinetochores. *J. Cell Biol.* **172**, 861-874, doi:DOI 10.1083/jcb.200509101 (2006).
- 199 Wargacki, M. M., Tay, J. C., Muller, E. G., Asbury, C. L. & Davis, T. N. Kip3, the yeast kinesin-8, is required for clustering of kinetochores at metaphase. *Cell Cycle* **9**, 2581-2588, doi:10.4161/cc.9.13.12076 (2010).
- 200 Straight, A. F., Sedat, J. W. & Murray, A. W. Time-lapse microscopy reveals unique roles for kinesins during anaphase in budding yeast. *J Cell Biol* **143**,

- 687-694 (1998).
- 201 Garcia, M. A., Koonruga, N. & Toda, T. Spindle-kinetochore attachment requires the combined action of Kin I-like Klp5/6 and Alp14/Dis1-MAPs in fission yeast. *Embo J* **21**, 6015-6024 (2002).
- 202 West, R. R., Malmstrom, T. & McIntosh, J. R. Kinesins klp5(+) and klp6(+) are required for normal chromosome movement in mitosis. *J. Cell Sci.* **115**, 931-940 (2002).
- 203 Gergely, Z. R., Crapo, A., Hough, L. E., McIntosh, J. R. & Betterton, M. D. Kinesin-8 effects on mitotic microtubule dynamics contribute to spindle function in fission yeast. *Mol Biol Cell* **27**, 3490-3514, doi:10.1091/mbc.E15-07-0505 (2016).
- 204 Goshima, G. & Vale, R. D. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the Drosophila S2 cell line. *J. Cell Biol.* **162**, 1003-1016, doi:10.1083/jcb.200303022 (2003).
- 205 Gandhi, R., Bonaccorsi, S., Wentworth, D., Doxsey, S., Gatti, M. & Pereira, A. The Drosophila kinesin-like protein KLP67A is essential for mitotic and male meiotic spindle assembly. *Mol. Biol. Cell* **15**, 121-131, doi:10.1091/mbc.E03-05-0342 (2004).
- 206 Savoian, M. S., Gatt, M. K., Riparbelli, M. G., Callaini, G. & Glover, D. M. Drosophila Klp67A is required for proper chromosome congression and segregation during meiosis I. *J. Cell Sci.* **117**, 3669-3677, doi:10.1242/jcs.01213 (2004).
- 207 Goshima, G. & Vale, R. D. Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in Drosophila S2 cells. *Mol Biol Cell* **16**, 3896-3907, doi:10.1091/mbc.e05-02-0118 (2005).
- 208 Savoian, M. S. & Glover, D. M. Drosophila Klp67A binds prophase kinetochores to subsequently regulate congression and spindle length. *J. Cell Sci.* **123**, 767-776, doi:10.1242/jcs.055905 (2010).
- 209 Mayr, M., Hummer, S., Bormann, J. & Mayer, T. The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Febs J* **274**, 294-294 (2007).
- 210 Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C. & Wordeman, L. The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic

- chromosome alignment. *Dev Cell* **14**, 252-262, doi:10.1016/j.devcel.2007.11.014 (2008).
- 211 Stout, J. R., Yount, A. L., Powers, J. A., Leblanc, C., Ems-McClung, S. C. & Walczak, C. E. Kif18B interacts with EB1 and controls astral microtubule length during mitosis. *Mol Biol Cell* **22**, 3070-3080, doi:10.1091/mbc.E11-04-0363 (2011).
- 212 Tanenbaum, M. E., Macurek, L., van der Vaart, B., Galli, M., Akhmanova, A. & Medema, R. H. A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr Biol* **21**, 1356-1365, doi:10.1016/j.cub.2011.07.017 (2011).
- 213 McHugh, T., Gluszek, A. A. & Welburn, J. P. I. Microtubule end tethering of a processive kinesin-8 motor Kif18b is required for spindle positioning. *J Cell Biol* **217**, 2403-2416, doi:10.1083/jcb.201705209 (2018).
- 214 Niwa, S., Nakajima, K., Miki, H., Minato, Y., Wang, D. D. & Hirokawa, N. KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. *Dev. Cell* **23**, 1167-1175, doi:10.1016/j.devcel.2012.10.016 (2012).
- 215 Liu, X. S., Zhao, X. D., Wang, X., Yao, Y. X., Zhang, L. L., Shu, R. Z., . . . Wang, Z. G. Germinal Cell Aplasia in Kif18a Mutant Male Mice Due to Impaired Chromosome Congression and Dysregulated BubR1 and CENP-E. *Genes Cancer* **1**, 26-39, doi:10.1177/1947601909358184 (2010).
- 216 Czechanski, A., Kim, H., Byers, C., Greenstein, I., Stumpff, J. & Reinholdt, L. G. Kif18a is specifically required for mitotic progression during germ line development. *Dev Biol* **402**, 253-262, doi:10.1016/j.ydbio.2015.03.011 (2015).
- 217 Zhang, C. P., Zhu, C. J., Chen, H. Y., Li, L. W., Guo, L. P., Jiang, W. & Lu, S. H. Kif18A is involved in human breast carcinogenesis. *Carcinogenesis* **31**, 1676-1684, doi:10.1093/carcin/bgq134 (2010).
- 218 Hitti, E., Bakheet, T., Al-Souhibani, N., Moghrabi, W., Al-Yahya, S., Al-Ghamdi, M., . . . Khabar, K. S. A. Systematic Analysis of AU-Rich Element Expression in Cancer Reveals Common Functional Clusters Regulated by Key RNA-Binding Proteins. *Cancer Res.* **76**, 4068-4080, doi:10.1158/0008-5472.Can-15-3110 (2016).
- 219 Itzel, T., Scholz, P., Maass, T., Krupp, M., Marquardt, J. U., Strand, S., . . . Teufel, A. Translating bioinformatics in oncology: guilt-by-profiling analysis

- and identification of KIF18B and CDCA3 as novel driver genes in carcinogenesis. *Bioinformatics* **31**, 216-224, doi:10.1093/bioinformatics/btu586 (2015).
- 220 Wargacki, M. M., Tay, J. C., Muller, E. G., Asbury, C. L. & Davis, T. N. Kip3, the yeast kinesin-8, is required for clustering of kinetochores at metaphase. *Cell Cycle* **9**, 2581-2588, doi:10.4161/cc.9.13.12076 (2010).
- 221 Su, X., Qiu, W., Gupta, M. L., Jr., Pereira-Leal, J. B., Reck-Peterson, S. L. & Pellman, D. Mechanisms underlying the dual-mode regulation of microtubule dynamics by Kip3/kinesin-8. *Mol Cell* **43**, 751-763, doi:10.1016/j.molcel.2011.06.027 (2011).
- 222 Su, X. L., Arellano-Santoyo, H., Portran, D., Gaillard, J., Vantard, M., They, M. & Pellman, D. Microtubule-sliding activity of a kinesin-8 promotes spindle assembly and spindle-length control. *Nat. Cell Biol.* **15**, 948-U400, doi:10.1038/ncb2801 (2013).
- 223 Erent, M., Drummond, D. R. & Cross, R. A. S. pombe Kinesins-8 Promote Both Nucleation and Catastrophe of Microtubules. *Plos One* **7**, doi:ARTN e30738 10.1371/journal.pone.0030738 (2012).
- 224 Du, Y. Q., English, C. A. & Ohi, R. The Kinesin-8 Kif18A Dampens Microtubule Plus-End Dynamics. *Curr. Biol.* **20**, 374-380, doi:10.1016/j.cub.2009.12.049 (2010).
- 225 Stumpff, J., Du, Y. Q., English, C. A., Maliga, Z., Wagenbach, M., Asbury, C. L., . . . Ohi, R. A Tethering Mechanism Controls the Processivity and Kinetochores-Microtubule Plus-End Enrichment of the Kinesin-8 Kif18A. *Mol Cell* **43**, 764-775, doi:10.1016/j.molcel.2011.07.022 (2011).
- 226 Mayr, M. I., Storch, M., Howard, J. & Mayer, T. U. A non-motor microtubule binding site is essential for the high processivity and mitotic function of kinesin-8 Kif18A. *PLoS One* **6**, e27471, doi:10.1371/journal.pone.0027471 (2011).
- 227 Weaver, L. N., Ems-McClung, S. C., Stout, J. R., LeBlanc, C., Shaw, S. L., Gardner, M. K. & Walczak, C. E. Kif18A Uses a Microtubule Binding Site in the Tail for Plus-End Localization and Spindle Length Regulation. *Curr. Biol.* **21**, 1500-1506, doi:10.1016/j.cub.2011.08.005 (2011).
- 228 Schneider, I. Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of

- Drosophila-Melanogaster. *J Embryol Exp Morph* **27**, 353-+ (1972).
- 229 Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S. S., Zhang, N., Scholey, J. M., Vale, R. D. & Stuurman, N. Genes required for mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. *Science* **316**, 417-421, doi:10.1126/science.1141314 (2007).
- 230 Bettencourt-Dias, M. & Goshima, G. RNAi in Drosophila S2 Cells as a Tool for Studying Cell Cycle Progression. *Mitosis: Methods and Protocols* **545**, 39-62, doi:10.1007/978-1-60327-993-2_3 (2009).
- 231 Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A. & Dixon, J. E. Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *P Natl Acad Sci USA* **97**, 6499-6503, doi:DOI 10.1073/pnas.110149597 (2000).
- 232 Rogers, S. L. & Rogers, G. C. Culture of Drosophila S2 cells and their use for RNAi-mediated loss-of-function studies and immunofluorescence microscopy. *Nat Protoc* **3**, 606-611, doi:10.1038/nprot.2008.18 (2008).
- 233 Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J. & Vale, R. D. Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **158**, 873-884, doi:10.1083/jcb.200202032 (2002).
- 234 Mockel, M. M., Heim, A., Tischer, T. & Mayer, T. U. Xenopus laevis Kif18A is a highly processive kinesin required for meiotic spindle integrity. *2046-6390* **6**, 463-470, doi:10.1242/bio.023952 (2017).
- 235 Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S. & Howard, J. Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell* **138**, 1174-1183, doi:10.1016/j.cell.2009.07.032 (2009).
- 236 Su, X. L., Qiu, W. H., Gupta, M. L., Pereira-Leal, J. B., Reck-Peterson, S. L. & Pellman, D. Mechanisms Underlying the Dual-Mode Regulation of Microtubule Dynamics by Kip3/Kinesin-8. *Mol Cell* **43**, 751-763, doi:10.1016/j.molcel.2011.06.027 (2011).
- 237 Goshima, G. & Vale, R. D. Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in Drosophila S2 cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3896-3907, doi:10.1091/mbc.E05-02-0118 (2005).
- 238 Locke, J., Joseph, A. P., Pena, A., Mockel, M. M., Mayer, T. U., Topf, M. & Moores, C. A. Structural basis of human kinesin-8 function and inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E9539-E9548, doi:10.1073/pnas.1712169114 (2017).

- 239 Rogers, G. C., Rogers, S. L., Schwimmer, T. A., Ems-McClung, S. C., Walczak, C. E., Vale, R. D., . . . Sharp, D. J. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* **427**, 364-370, doi:10.1038/nature02256 (2004).
- 240 Basto, R., Scaerou, F., Mische, S., Wojcik, E., Lefebvre, C., Gomes, R., . . . Karess, R. In vivo dynamics of the rough deal checkpoint protein during *Drosophila* mitosis. *Curr Biol* **14**, 56-61 (2004).
- 241 Gluszek, A. A., Cullen, C. F., Li, W. J., Battaglia, R. A., Radford, S. J., Costa, M. F., . . . Ohkura, H. The microtubule catastrophe promoter Sentin delays stable kinetochore-microtubule attachment in oocytes. *J. Cell Biol.* **211**, 1113-1120, doi:10.1083/jcb.201507006 (2015).
- 242 Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N. & Vale, R. D. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J. Cell Biol.* **181**, 421-429, doi:DOI 10.1083/jcb.200711053 (2008).
- 243 Smurnyy, Y., Toms, A. V., Hickson, G. R., Eck, M. J. & Eggert, U. S. Binucleine 2, an isoform-specific inhibitor of *Drosophila* Aurora B kinase, provides insights into the mechanism of cytokinesis. *ACS Chem Biol* **5**, 1015-1020, doi:10.1021/cb1001685 (2010).
- 244 Arellano-Santoyo, H., Geyer, E. A., Stokasimov, E., Chen, G. Y., Su, X., Hancock, W., . . . Pellman, D. A Tubulin Binding Switch Underlies Kip3/Kinesin-8 Depolymerase Activity. *Dev Cell* **42**, 37-51 e38, doi:10.1016/j.devcel.2017.06.011 (2017).
- 245 Ayaz, P., Munyoki, S., Geyer, E. A., Piedra, F. A., Vu, E. S., Bromberg, R., . . . Rice, L. M. A tethered delivery mechanism explains the catalytic action of a microtubule polymerase. *Elife* **3**, doi:ARTN e03069 10.7554/eLife.03069 (2014).
- 246 Wieczorek, M., Bechstedt, S., Chaaban, S. & Brouhard, G. J. Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* **17**, 907-916, doi:10.1038/ncb3188 (2015).
- 247 Reid, T. A., Schuster, B. M., Mann, B. J., Balchand, S. K., Plooster, M., McClellan, M., . . . Gardner, M. K. Suppression of microtubule assembly kinetics by the mitotic protein TPX2. *J. Cell Sci.* **129**, 1319-1328,

- doi:10.1242/jcs.178806 (2016).
- 248 Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H. & Kirschner, M. W. Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1141-1154 (1992).
- 249 Ramirez-Rios, S., Denarier, E., Prezel, E., Vinit, A., Stoppin-Mellet, V., Devred, F., . . . Arnal, I. Tau antagonizes end-binding protein tracking at microtubule ends through a phosphorylation-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **27**, 2924-2934, doi:10.1091/mbc.E16-01-0029 (2016).
- 250 Roostalu, J., Cade, N. I. & Surrey, T. Complementary activities of TPX2 and chTOG constitute an efficient importin-regulated microtubule nucleation module. *Nat Cell Biol* **17**, 1422-1434, doi:10.1038/ncb3241 (2015).
- 251 Kellogg, E. H., Hejab, N. M. A., Poepsel, S., Downing, K. H., DiMaio, F. & Nogales, E. Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science* **360**, 1242-1245, doi:10.1126/science.aat1780 (2018).
- 252 Triclin, S., Inoue, D., Gaillard, J., Htet, Z. M., De Santis, M., Portran, D., . . . Thery, M. Self-repair protects microtubules from their destruction by molecular motors. *bioRxiv*, 499020, doi:10.1101/499020 (2018).
- 253 Gatt, M. K., Savoian, M. S., Riparbelli, M. G., Massarelli, C., Callaini, G. & Glover, D. M. Klp67A destabilises pre-anaphase microtubules but subsequently is required to stabilise the central spindle. *J. Cell Sci.* **118**, 2671-2682, doi:10.1242/jcs.02410 (2005).
- 254 Wang, H., Brust-Mascher, I., Cheerambathur, D. & Scholey, J. M. Coupling between microtubule sliding, plus-end growth and spindle length revealed by kinesin-8 depletion. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**, 715-728, doi:10.1002/cm.20482 (2010).
- 255 Buster, D. W., Zhang, D. & Sharp, D. J. Poleward tubulin flux in spindles: Regulation and function in mitotic cells. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3094-3104, doi:10.1091/mbc.E06-11-0994 (2007).
- 256 Goshima, G., Wollman, R., Stuurman, N., Scholey, J. M. & Vale, R. D. Length control of the metaphase spindle. *Curr Biol* **15**, 1979-1988, doi:10.1016/j.cub.2005.09.054 (2005).
- 257 Wang, H. F., Brust-Mascher, I., Cheerambathur, D. & Scholey, J. M. Coupling Between Microtubule Sliding, Plus-End Growth and Spindle Length Revealed

- by Kinesin-8 Depletion. *Cytoskeleton* **67**, 715-728, doi:10.1002/cm.20482 (2010).
- 258 Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C. & Wordeman, L. The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev. Cell* **14**, 252-262, doi:10.1016/j.devcel.2007.11.014 (2008).
- 259 De Wever, V., Nasa, I., Chamousset, D., Lloyd, D., Nimick, M., Xu, H., . . . Moorhead, G. B. The human mitotic kinesin KIF18A binds protein phosphatase 1 (PP1) through a highly conserved docking motif. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 432-437, doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.105 (2014).
- 260 Kim, H. & Stumpff, J. K. Kif18A promotes Hec1 dephosphorylation to coordinate chromosome alignment with kinetochore microtubule attachment. *bioRxiv*, 304147, doi:10.1101/304147 (2018).
- 261 Janssen, L. M. E., Averink, T. V., Blomen, V. A., Brummelkamp, T. R., Medema, R. H. & Raaijmakers, J. A. Loss of Kif18A Results in Spindle Assembly Checkpoint Activation at Microtubule-Attached Kinetochores. *Curr. Biol.* **28**, 2685-+, doi:10.1016/j.cub.2018.06.026 (2018).
- 262 Kern, D. M., Monda, J. K., Su, K. C., Wilson-Kubalek, E. M. & Cheeseman, I. M. Astrin-SKAP complex reconstitution reveals its kinetochore interaction with microtubule-bound Ndc80. *Elife* **6**, doi:ARTN e26866 10.7554/eLife.26866 (2017).
- 263 Fonseca, C. L., Malaby, H. L. H., Sepaniac, L. A., Martin, W., Byers, C., Czechanski, A., . . . Stumpff, J. Mitotic chromosome alignment ensures mitotic fidelity by promoting interchromosomal compaction during anaphase. *The Journal of Cell Biology*, jcb.201807228, doi:10.1083/jcb.201807228 (2019).
- 264 Crasta, K., Ganem, N. J., Dagher, R., Lantermann, A. B., Ivanova, E. V., Pan, Y., . . . Pellman, D. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* **482**, 53-58, doi:10.1038/nature10802 (2012).
- 265 Zhang, C. Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J. M., Jackson, E. K., Liu, S., . . . Pellman, D. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* **522**, 179-184, doi:10.1038/nature14493 (2015).
- 266 Nagahara, M., Nishida, N., Iwatsuki, M., Ishimaru, S., Mimori, K., Tanaka, F., . . . Mori, M. Kinesin 18A expression: clinical relevance to colorectal cancer

- progression. *Int J Cancer* **129**, 2543-2552, doi:10.1002/ijc.25916 (2011).
- 267 Zhu, H., Xu, W., Zhang, H., Liu, J., Xu, H., Lu, S., . . . Wang, Z. Targeted deletion of Kif18a protects from colitis-associated colorectal (CAC) tumors in mice through impairing Akt phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **438**, 97-102, doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.032 (2013).
- 268 Widlund, P. O., Podolski, M., Reber, S., Alper, J., Storch, M., Hyman, A. A., . . . Drechsel, D. N. One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Mol Biol Cell* **23**, 4393-4401, doi:10.1091/mbc.E12-06-0444 (2012).
- 269 Miki, T., Nishina, M. & Goshima, G. RNAi Screening Identifies the Armadillo Repeat-Containing Kinesins Responsible for Microtubule-Dependent Nuclear Positioning in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol* **56**, 737-749, doi:10.1093/pcp/pcv002 (2015).
- 270 Munzarova, A., Popova, J., Razuvaeva, A., Shloma, V., Gatti, M. & Omelyanchuk, L. Accurate measurement of poleward microtubule flux in the spindle of *Drosophila* S2 cells. *Cell Biol. Int.* **40**, 984-990, doi:10.1002/cbin.10638 (2016).
- 271 Buster, D. W., Zhang, D. & Sharp, D. J. Poleward tubulin flux in spindles: regulation and function in mitotic cells. *Mol Biol Cell* **18**, 3094-3104, doi:10.1091/mbc.e06-11-0994 (2007).
- 272 Laycock, J. E., Savoian, M. S. & Glover, D. M. Antagonistic activities of Klp10A and Orbit regulate spindle length, bipolarity and function in vivo. *J Cell Sci* **119**, 2354-2361, doi:10.1242/jcs.02957 (2006).

謝辞

五島剛太博士に感謝いたします。学部4年生から6年間、直接指導していただきました。コミュニケーションを何よりも大切に、常に私の意思を尊重しつつも、壁にぶつかったときは、貴重なアドバイスをしていただきました。常に愛と情熱をもって研究に全力をそそぐ姿は、研究者としての自分のロールモデルです。

清光智美博士には、本論文においてリエージェントを提供していただくと同時に、貴重な助言をいただきました。また、遺伝子編集やデグロン法など最新の技術に関してもリエージェントの提供とともに様々なアドバイスをいただきました。清光博士の論文におけるストーリーの作成やモデルの作り方、プレゼンテーションの仕方は分かりやすく、大変参考になるものでした。感謝いたします。西山朋子博士には、本研究の生化学実験において議論とともに貴重なアドバイスをいただきました。感謝いたします。谷知巳博士には *in vitro* 再構成実験における貴重なアドバイスをいただきました。感謝いたします。幸節健博士には、学部生の自分の拙い論文を、熱心に指導いただきました。植物の知識は進化的な視点で考える上で大変な貴重なものでした。また食事をたくさん奢っていただきました。感謝いたします。渡邊定則博士には、微小管生成機構に関して様々な知識、意見をいただきました。またキャリアパスに関して貴重なアドバイスをいただきました。感謝いたします。上原亮太博士、釜崎とも子博士、易培珊博士、Elena Kozgunova 博士からはたくさんの知識や示唆をいただきました。感謝いたします。

三木智博博士からは、研究室に配属されてから、すぐに気さくに話しかけていただき、研究室の環境に自然に打ち解けることができました。日々の議論や雑談を通じて、様々なアイデアや示唆をいただきました。また、何度も奢っていただきました。感謝いたします。中岡由貴博士には、学部時代糸状菌を研究していた際にオーグミンに関して、貴重な意見やアドバイスをいただきました。また研究に対する好奇心や視点、忍耐力は大変参考になるものでした。感謝いたします。森脇崇史博士には、本研究の *in vitro* 再構成実験を行うにあたり、タンパク質精製方法から、顕微鏡観察、解析にいたるまで、貴重なアドバイスを数多くいただきました。チューブリン精製をともに何度も乗り越えたことは良い思い出です。また、たくさん奢っていただきました。感謝いたします。

伊藤亜実博士には、自分が研究室に配属されたときに、何も分からない自分の実験の手ほどきをしていただきました。また非常に誠実に物事に取り組む姿は大変参考になるものでした。感謝いたします。

山田萌恵さんに感謝いたします。日々の雑談、議論だけでなく、同期として6年間、様々な場面でお世話になりました。学位論文を提出するまでに至ることができたのも山田さんのおかげです。内藤晴子さん、林久登さんには同期として、3年間自分とは異なった視点を数多く提供していただきました。感謝いたします。土屋賢汰さん、有賀孝輔さん、Elsa Amelia Tungadiさん、Leong Shu Yaoさん、加藤優花さん、熊崎泰成さん、Kim Juyoungさん、武田葵さん、吉田真理さん、藤原万櫻さん、西川真利恵さんに感謝いたします。たくさんの後輩を指導する機会に恵まれ、逆に多くの気づきを得ることもありました。また日々の議論や雑談を快く、聞いていただきました。感謝いたします。

稲葉理絵さんには事務的な手続きや、実験器具の洗浄、培地、試薬作成など日々の研究生生活をあらゆる面でサポートしていただきました。感謝いたします。仁科桃子さん、前佛恭子さん、川村京子さんには、様々な実験のサポートをいただきました。感謝いたします。

最後に温かく見守ってくれた友人、家族に感謝いたします。

2019年2月 江塚 智哉