

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	新しい中心体蛋白質の同定と性状解析
Author(s)	牧野, 公治
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11088
Right	

学位論文

Doctor's Thesis

新しい中心体蛋白質の同定と性状解析

(Identification and characterization of novel centrosomal proteins)

牧野 公治

Koji Makino

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻皮膚機能病態学

指導教員

尹 浩信 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻皮膚機能病態学

中西 宏之 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻細胞情報薬理学

2008年3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名： 新しい中心体蛋白質の同定と性状解析
(Identification and characterization of novel centrosomal proteins)

著者名： 牧野 公治
Koji Makino

指導教員名： 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻皮膚機能病態学 尹 浩信 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻細胞情報薬理学 中西 宏之 教授

審査委員名： 器官制御学担当教授 中尾 光善
初期発生学担当教授 永淵 昭良
機能病理学担当教授 伊藤 隆明
消化器外科学担当教授 馬場 秀夫

2008年3月

目次

1. 要旨
2. 学位論文の骨格となる参考論文
3. 謝辞
4. 略語一覧
5. 研究の背景と目的
6. 実験方法
 - 6-1. 微小管の作製
 - 6-2. ラット脳組織の蛋白質の回収
 - 6-3. 微小管と共沈する蛋白質の回収とBio Assist Qカラムクロマトグラフィー
 - 6-4. p70及びCentleinの遺伝子クローニング
 - 6-5. 細胞培養とトランスフェクション
 - 6-6. ノザンプロット
 - 6-7. 抗体の作製
 - 6-8. 免疫染色
 - 6-9. ショ糖密度勾配遠心法
 - 6-10. p70のRNA干渉
 - 6-11. BrdU取り込み率と分裂指数測定
 - 6-12. フローサイトメトリー
 - 6-13. その他
7. 実験結果
 - 7-1. 新しい中心体蛋白質の同定
 - 7-2. p70の性状解析
 - 7-2-1. p70の遺伝子クローニング
 - 7-2-2. p70の分子マス
 - 7-2-3. p70の組織分布
 - 7-2-4. p70の細胞内局在
 - 7-2-5. p70の生化学的解析

7-2-6. p70の細胞分裂期における細胞内局在

7-2-7. p70 RNA干渉の細胞増殖に対する影響

7-2-8. p70 RNA干渉の細胞周期に対する影響

7-3. Centleinの性状解析

7-3-1. Centleinの遺伝子クローニング

7-3-2. Centleinの分子マス

7-3-3. Centleinの組織分布

7-3-4. Centleinの細胞内局在

7-3-5. Centleinの生化学的解析

7-3-6. Centleinの分裂期での細胞内局在

7-3-7. 細胞周期に依存したCentleinの中心体内での局在

8. 考察 (文献的考察を含む)

9. 結語

10. 参考文献

1. 要旨

【目的】 中心体は、微小管のオーガナイズリングセンターとして機能し、間期では細胞の形態、運動、接着、極性を制御し、分裂期では紡錘体を形成して染色体の分離に関わっている。さらに、中心体は細胞周期を制御しているが、これらの中心体による制御機構は十分に解明されていない。私は微小管と共沈する蛋白質群の質量分析による解析を進める過程で、分子マスが約70kDと100kDと推定される2つの新しい中心体蛋白質を見出した。両蛋白質の性状を明らかにし、中心体による細胞機能の制御機構を解析することを目的とした。

【方法】 新しい中心体蛋白質の遺伝子をクローニングし、種々の培養細胞にこれらの遺伝子をトランスフェクションさせて、免疫染色を行った。また、新しい中心体蛋白質に対するポリクローナル抗体を作製し、ウエスタンブロットや免疫染色を行った。CHO細胞をノコダゾール処理して微小管を脱重合させた後、ショ糖密度勾配遠心法で中心体を精製した。さらに、small interfering RNAを用いて蛋白質の発現をノックダウンした。細胞をPropidium Iodide染色して、フローサイトメトリーを用いて細胞周期の解析を行った。細胞周期はMitotic shake-offによって同調させた。

【結果】 微小管と共沈する蛋白質群の質量分析による解析を進める過程で、670アミノ酸と721アミノ酸からなるそれぞれ分子マスが約70kDと100kDと推定される蛋白質を見出した。前者をp70と仮称し、後者をCentleinと命名した。両蛋白質とも、コイルド・コイル構造を持ち、既知の分子と相同性を示さなかった。ウエスタンブロットで組織分布を解析すると、両蛋白質ともに組織普遍的に発現していた。両蛋白質をEnhanced Green Fluorescent Proteinとの融合蛋白質として培養細胞に発現させると、それぞれ中心体に局在した。また、それぞれのポリクローナル抗体で局在を解析すると、ともに間期と分裂期を通じて中心体に局在した。CHO細胞からノコダゾール処理後に中心体を精製すると、いずれの蛋白質も中心体蛋白質 γ -チューブリンと同じフラクションに回収された。網膜色素上皮hTERT-RPE1細胞のp70をノックダウンさせると、分裂指数は低下したが、BrdU取り込みは変化しなかった。p53が不活化されているHeLa細胞においてp70をノックダウンさせた場合も、同様の結果を得た。hTERT-RPE1細胞とHeLa細胞をノコダゾール処理してM期で停止させ、フローサイトメトリーで細胞周期を解析すると、いずれの細胞も4nの染色体を持つ細胞が増加した。細胞周期を同期させたHeLa細胞を用いてCentleinの局在を解析した。G1期ではCentleinは中心体蛋白質ODF2と局在が一致し、 γ -チューブリンよりも限局した局在を示した。G1/S期では、CentleinはODF2と γ -チューブリンの局在と一致した。

【考察】 p70は、ノックダウンさせるとp53非依存的にG2/Mチェックポイントが活性化されることが示唆された。これまで多くの中心体蛋白質はノックダウンさせるとG1チェックポイントが活性化されると言われている。したがってp70はこれまでの中心体蛋白質と異なった機能を有すると考えられる。

ODF2はG1期では母中心小体に局在し、G1/S期では母娘いずれの中心小体にも局在することが知られている。CentleinはODF2と同じく細胞周期に依存した局在の変化を示すことが示唆された。Centleinは中心小体の複製や線毛の形成など母中心小体に関連した機能に関わっていることが考えられる。

[結論] p70とCentleinは間期と分裂期を通じて中心体に局在する蛋白質であり、中心体への局在は微小管非依存的であることが明らかになった。p70のノックダウンはp53非依存的にG2/Mチェックポイントを活性化させることが示唆された。Centleinは、G1期に母中心小体に局在しており、G1/S期では母娘中心小体に局在していることが示唆された。

2. 学位論文の骨格となる参考論文

① 関連論文および、参考論文

1. Makino, K., Umeda, K., Uezu, A., Hiragami, Y., Sakamoto, T., Ihn, H., and Nakanishi, H.

Identification and characterization of the novel centrosomal protein centlein
Biochemical and Biophysical Research Communications. 366: 958-962, 2008.

② その他の論文

1. Sakamoto, T., Uezu, A., Kawauchi, S., Kuramoto, T., Makino, K., Umeda, K., Araki, N., Baba, H., and Nakanishi, H.

Mass spectrometric analysis of microtubule-cosedimented proteins from rat brain

Genes to Cells. In press.

3. 謝辞

学位論文及び本研究を遂行するにあたり、ご指導賜りました、熊本大学大学院医学教育部皮膚機能病態学分野 尹 浩信 教授、細胞情報薬理学分野 中西 宏之 教授に深く感謝いたします。そして、研究をご指導下さいました細胞情報薬理学分野の梅田 一彰 助教、上江洲 章吉 助教、藤田 直之 准教授、山本 秀幸 元助教（現・琉球大学医学部生化学講座 教授）に感謝いたします。また、実験に際しご助力下さいました元細胞情報薬理学分野・平上 ゆかり氏（現・熊本大学大学院医学教育部脳回路構造学分野）、落合 和 元助手に感謝いたします。実験を行うにあたり、大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学講座分子生体情報学・月田 早智子 教授に抗ODF2抗体をご供与頂き、御礼申し上げます。この研究は、文部科学省及び独立行政法人科学技術振興機構の科学研究費補助金の支援を受けました。

4. 略語一覽

BrdU	; 5-bromo-2'-deoxy-uridine
BSA	; Bovine serum albumin
CHO cells	; Chinese hamster ovary cells
DAPI	; 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEAE	; Diethylaminoethyl
DMEM	; Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	; Dimethyl sulfoxide
DTT	; Dithiothreitol
EDTA	; Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	; Enhanced Green Fluorescence Protein
EGTA	; Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether) -N,N,N',N'-tetraacetic acid
FCS	; Fetal calf serum
GST	; Glutathione S transferase
HeLa cells	; Henrietta Lacks's cervix cells
HPLC	; High Performance Liquid Chromatography
hTERT	; human telomerase reverse transcriptase
MDCK cells	; Madin-Darby Canine Kidney cells
ODF2	; Outer dense fiber 2
PBS	; Phosphate-buffered saline
PCR	; Polymerase chain reaction
PI	; Propidium Iodide
PMSF	; Phenylmethylsulfonyl fluoride
RPE cells	; Retinal Pigment Epithelial cells
SDS-PAGE	; Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	; small interfering RNA
TTBS	; Tween-20 containing Tris-buffered saline

5. 研究の背景と目的

中心体の主な機能は、多くの動物細胞において微小管形成中心となることである (Fig.1A) [1-3]。間期では細胞の形態、運動、接着、極性を制御し、分裂期では紡錘体を形成し、染色体の分離、細胞質分裂を制御する。多くのヒト悪性腫瘍は、正常に機能しない紡錘体の形成や遺伝子不安定性への関与などの中心体の異常を有するのが特徴である。

中心体はpericentriolar materialで覆われた2つ1組の円柱形をした中心小体から構成されている (Fig.1A)。1回細胞周期が回る間に各中心小体が複製され娘中心小体が生じる (Fig.1B)。G1期では細胞の持つ中心小体は1組である。G1期からS期に進展する際に中心小体の複製が始まる。S期からG2期にかけて、新しい娘中心小体は伸長し、本来の大きさになる。そしてG2/M期で2組の中心小体が分離し、複製が完了する[1,3]。2つの中心小体のうち、母中心小体の方が自身の複製や線毛の形成などに関与するとされている。

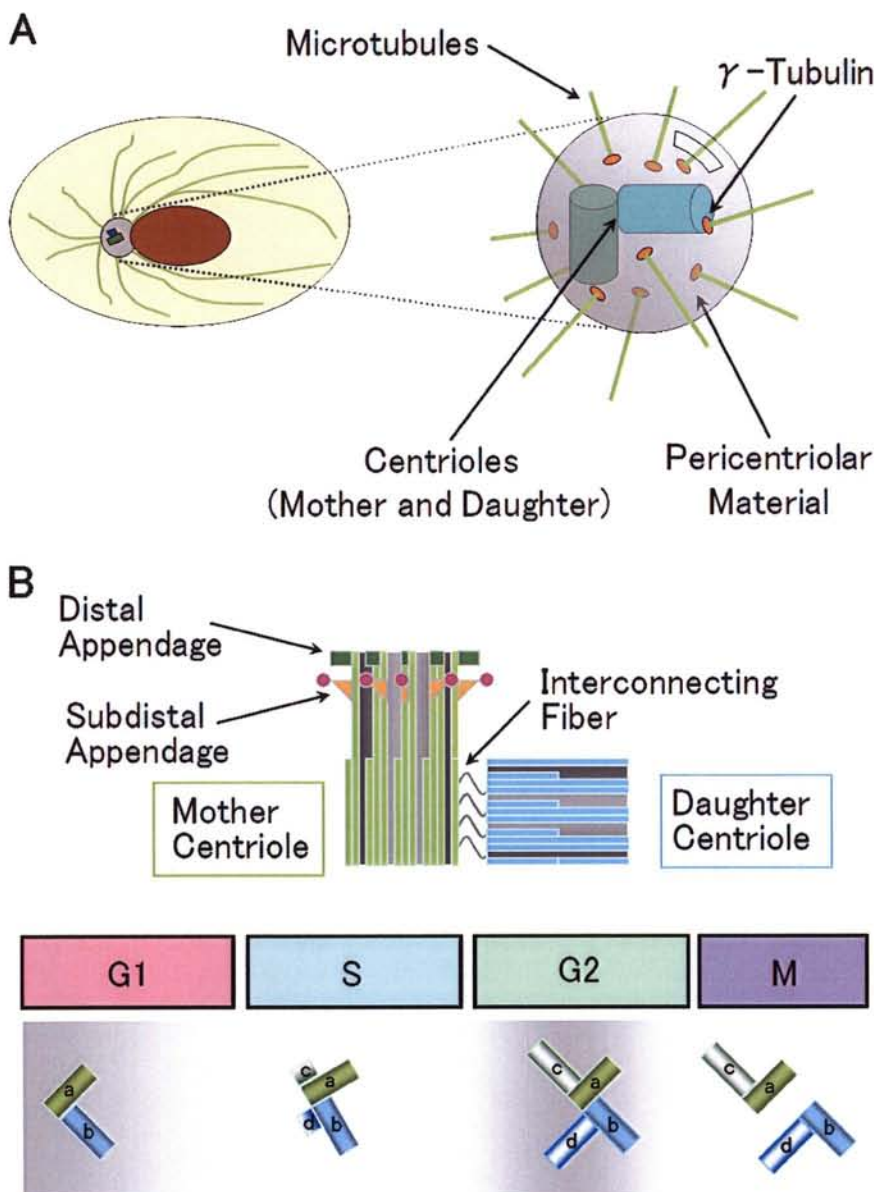


Fig.1 中心体と中心小体の構造

(A)左:間期での中心体の位置、右:中心体の構造。Pericentriolar materialとそれで覆われた1組の中心小体から構成される。Material中に γ -チューブリンがあり、それを核として微小管が重合されている。

(B)中心小体の構造と細胞周期との関係。Distal appendageとsubdistal appendageを持つ母中心小体、それらを持たない娘中心小体がinterconnecting fiberで連結されて組になっている。1回細胞周期が回る間に中心小体が複製される。a:母中心小体。b:娘中心小体。M期までに成熟して新しい母中心小体となる。c:aから複製された娘中心小体。d:bから複製された娘中心小体。

そして中心体は細胞周期を制御する機能も持つ。細胞周期の過程にはG1チェックポイント、G2/Mチェックポイント、紡錘体チェックポイントがある (Fig.2)。G1チェックポイントはp53依存的に機能し、G2/Mチェックポイントはp53依存的、非依存的いずれでも機能する。ペリセントリン2をはじめとする多くの中心体蛋白については、ノックダウンさせるとp53依存的にG1チェックポイントが活性化されることが知られている[4]。

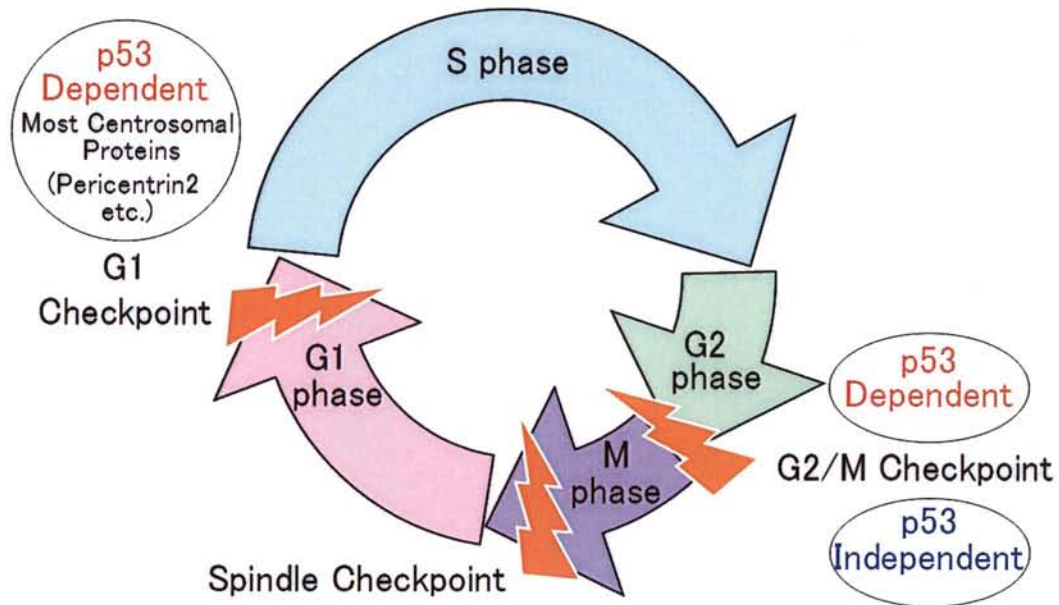


Fig.2 細胞周期とチェックポイント

G1チェックポイント、G2/Mチェックポイント、紡錘体チェックポイントがある。G1チェックポイントはp53依存的に機能し、G2/Mチェックポイントはp53依存的、非依存的いずれでも機能する。

私は微小管と共沈する蛋白質群の質量分析による解析を進める過程で、分子マスが約70kDと100kDと推定される2つの新しい中心体蛋白質を見出した。両蛋白質の性状を明らかにし、中心体による細胞機能の制御機構を解析することを目的とした。

6. 実験方法

6-1. 微小管の作製

チューブリンはブタの脳より、3回の温度依存重合・脱重合サイクル[5]と HPLC (Amersham Pharmacia Biotech) を用いたDEAE・セファロースカラムクロマトグラフィー[6]によって精製した。精製されたチューブリン4 mg/mlを、polymerization buffer (80 mM PIPES/NaOH, pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM GTP, 10% グリセロール) [7,8]で37°C、20分インキュベートして微小管を重合した後、タキソールを最終濃度15 μMになるまで加えた。

6-2. ラット脳組織の蛋白質の回収

全過程は0-4°Cで行われた。20匹のラット脳を100 mlバッファA (50 mM Hepes/NaOH, pH 7.5, 2 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin A) でホモジナイズし、100,000 gで1時間、遠心分離した。上清と沈殿をそれぞれ可溶分画と不溶分画とした。

不溶分画を1 M NaClを含む20 mlバッファAを加えてゆっくり攪拌しながらホモジナイズしたのち、4°C、100,000 gで1時間遠心分離した。得られた上清を120 mlのバッファAで希釈してから4°C、100,000 gで1時間遠心分離した。最終的に100 mM NaClになるようにバッファAで希釈し、4°C、100,000 gで1時間、遠心分離して得られた上清を抽出分画とした。

6-3. 微小管と共沈する蛋白質の回収とBio Assist Qカラムクロマトグラフィー

全過程は0-4°Cで行われた。可溶分画と抽出分画 (Fig.3 Ori) にそれぞれ4 mM MgCl₂, 1 mM GTP, 20 μM タキソールを加え、精製した微小管と3時間インキュベートした。サンプルを、HEMバッファ (50 mM Hepes/NaOH, pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM GTP, 20 μM タキソール) に10% スクロースを加えたものに重層し、100,000 gで30分間、遠心分離した。沈殿 (Fig.3 P1) をHEMバッファで洗浄した後、20 mlのHEMバッファ (50 mM NaCl を含む) で再懸濁し、100,000 gで30分間遠心分離した。得られた沈殿 (Fig.3 P2) をHEMバッファで洗浄した後に、20 mlのHEMバッファ (0.5 M NaCl, 1 mM ATP を含む) でホモジナイズし、100,000 gで30分間遠心分離して上清を得た (Fig.3 S3)。

可溶分画と抽出分画のS3 (それぞれ10 mg蛋白質) をそれぞれchloroform/methanol/water法[9]で遠心し、蛋白を精製した。サンプルを5 mlのバッファB (40 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.6% CHAPS, and 4 M 尿素) に溶解し、TSK BioAssist Qカラム (東ソー、4.6 mm×5 cm) に添加した。カラムは前もって20 mlのバッファBで平衡化していた。溶出ははじめに連続した12.5 mlのバッファBのNaClの直線勾配 (0-0.25 M)、次に6.25 mlのバッファBのNaClの直線勾配 (0.25-0.5 M)、最後に6.25 mlの1 M NaClを含むバッファBで

行った。0.5 mlの各分画を回収した。

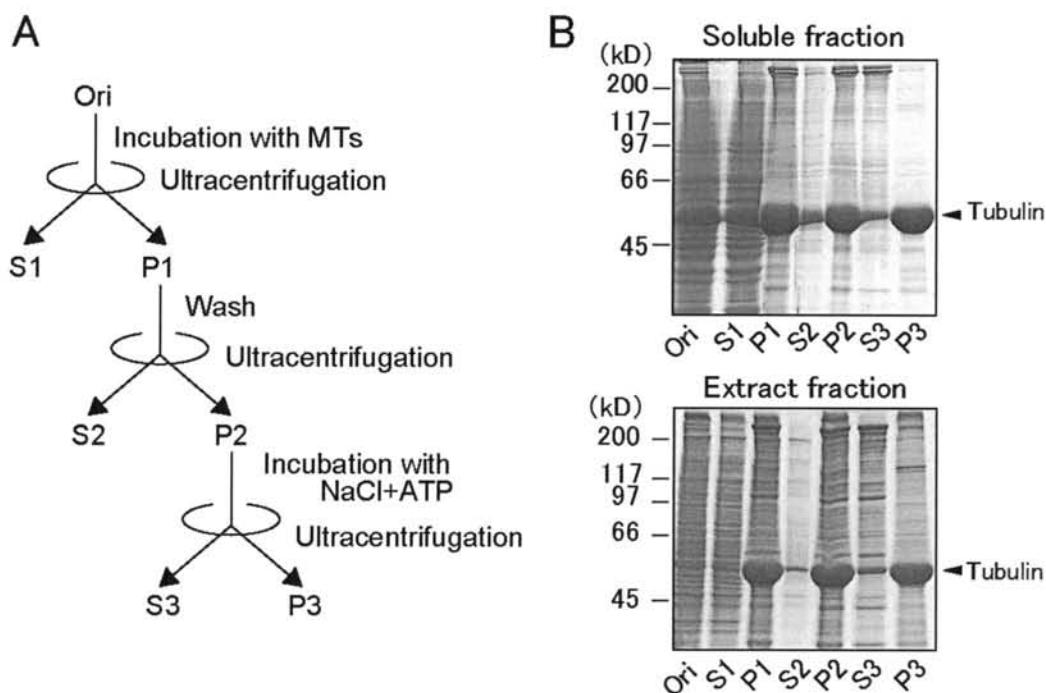


Fig.3 微小管共沈蛋白質の準備

(A) 微小管共沈法の手順。

(B) SDS-PAGE電気泳動サンプルの蛋白染色。ラット脳の可溶分画及び抽出分画 (Ori) を微小管とインキュベートし超遠心した。得られた上清をS1、沈殿をP1とした。P1をホモジナイズして超遠心し、得られた上清をS2、沈殿をP2とした。P2をNaClとATPで処理して超遠心し、得られた上清をS3、沈殿をP3とした。各分画のサンプルをSDS-PAGE電気泳動 (10%ポリアクリルアミドゲル) したのちゲルをクマシーブリリアントブルー染色した。

6-4. p70及びCentleinの遺伝子クローニング

p70の遺伝子は、5'-GAA TTC ATG GAG GAG TTC CGG CGC TCC TAC-3'と5'-GTC GAC TCA TTT AGG GGG ATC CAA GGC TCT C-3'の2つのオリゴヌクレオチド (前者には5'側にEcoR1、後者には3'側にSal1の制限酵素配列が付加されている) を用いて、マウス脳cDNAをテンプレートにしてPCRを行い、pT7-Blue vectorに組み込んだ。pT7 Blue-p70のシーケンス解析を行い、塩基配列を決定した後、制限酵素EcoR1、Sal1を用いてp70遺伝子を切り出してpMXII-myc vector[10]に組み込み、pMXII-myc-p70を作製した。同様にpCMV-myc[11]、pEGFPC1 vector (Clontech) に組み込み pCMV-myc-p70とpEGFPC1-p70を作製した。

Centleinの遺伝子は、5'-GAA TTC ATG AAT CTT CAA GAT GAA TTG GAT G-3'と5'-GTC GAC TCA TTT AAT GTC TTT CAT GAC TGT G-3'の2つのオリゴヌクレオチドプライマー (前者には5'側にEcoR1、後者には3'側にSal1の制限酵素配列が付加されている) を用

いて、ラット脳cDNAをテンプレートにしてPCRを行い、pT7-Blue vectorに組み込んだ。pT7 Blue-Centleinのシーケンス解析を行い、塩基配列を決定した後、制限酵素であるEcoR1、Sal1を用いて Centlein遺伝子を切り出し、pCMV-myc vectorに組み込んでpCMV-myc-Centleinを作製した。同様にpMXII-myc、pEGFPC1 vectorにもCentleinを組み込んで、pMXII-myc-Centlein、pEGFPC1-Centleinを作製した。

6-5. 細胞培養とトランスフェクション

COS7細胞とHeLa細胞は、37°C条件下で10% FCSを含むDMEMで培養した。hTERT-RPE1細胞は、37°C条件下で10%FCSと100 μ g/mlハイグロマイシンBを含むDMEMで培養した。HeLa細胞でのp70とCentleinの一過性発現を検討する際には、TransIT-LT1 (Mirus Bio) を用いて添付文書に従いトランスフェクションさせた。COS7細胞でのp70とCentleinの一過性発現を検討する際には、Lipofectamine2000を用いて添付文書に従いトランスフェクションさせた。COS7細胞にpCMV-myc-p70またはpCMV-myc-Centleinをトランスフェクションさせた後、細胞をPBSで2回洗浄した後、SDSサンプルバッファ (4% SDS, 26 mM Tris/HCl pH 6.8, 6.6% グリセリド, 5% 2-mercaptoethanol) を加えてSDS化した。

6-6. ノザンブロット

p70のcDNA668-1306bpをプローブとしてランダムプライマー法により、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を用いてプローブをラベルした。各臓器から得られたtotal RNAが転写されたRNA blot membrane (Clontech, Palo Alto, CA) を42°Cで20時間反応させた。2×SSCと0.05%SDSを含む溶液を20分ごとに交換しながら室温で60分間、さらに0.1×SSCと0.1%SDSを含む溶液を40分ごとに交換しながら50°Cで80分間洗い、オートラジオグラフィーを行った。

6-7. 抗体の作製

抗p70抗体は、393-523アミノ酸のフラグメントを認識する抗体を作った。5'-GGA ATT CTA ACC AAG CAG GAG CTG ATC AA-3'と5'-GTC GAC TCA GCA GGT GCC CTG AGC CTC GT-3'の2つのプライマー (前者5'側にはEcoR1、後者3'側にはSal1の制限酵素配列が付加されている) を用いて、pT7-p70をテンプレートにしてPCRを行い、pT7-Blue vectorに組み込んだ。同様に抗Centlein抗体は、Centlein172-322アミノ酸のフラグメントを認識する抗体を作成した。5'-GAA TTC TAC CAA CAG ACA AAG CTA AAT CTG AG-3'と5'-GTC GAC TCA AAG GGC ACT GTG TAA GTT CTT CTG-3'の2つのプライマー (前者には5'側にEcoR1、後者には3'側にSal1の制限酵素配列が付加されている) を用いて、pT7-CentleinをテンプレートにしてPCRを行い、pT7-Blue vectorに組み込んだ。

いずれのプラスミドもシーケンス解析を行い塩基配列確認の後、制限酵素EcoR1、Sal1を用いて遺伝子を切り出してpGEX-KG vector[12]に組み込み、それぞれのGST融合リコンビナント

蛋白質を獲得してグルタチオンセファロースビーズで精製し、ウサギに免疫を行った。

6-8. 免疫染色

カバースリップ上で培養した細胞を100% MeOH -20°C 5分で固定後、ブロッキングを1%BSA/PBSに室温下60分、または4°Cで一晩行った。1次抗体は、私が作製したウサギ抗p70ポリクローナル抗体 (1:1000) 、ウサギ抗Centlein抗体 (1:1000)、マウス抗Mycモノクローナル抗体 (9E10) (American Type Culture Collection) 、マウス抗 γ -チュブリンモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)、ウサギ抗EGFPポリクローナル抗体 (MBL Co.) を用いた。また、大阪大学の月田 早智子 教授のご厚意により、ラット抗ODF2モノクローナル抗体の供与を受けた。二次抗体は、Alexa Fluor 488, 594, and 647 (Invitrogen) を用いた。染色像は、BX-51正立型蛍光顕微鏡 (オリンパス) またはFLUOVIEW FV500共焦点顕微鏡 (オリンパス) で観察した。

6-9. ショ糖密度勾配遠心法

中心体をCHO細胞から精製した[13, 14]。細胞を10 μ g/mlノコダゾール (Sigma) と5 μ g/mlサイトカラシンD (Sigma) に37°Cで2時間反応させた。細胞をPBS、1/10PBS+8% (w/v) スクロース、8% (w/v) スクロースで洗浄し、lysis buffer (1 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, and 10 μ g/ml leupeptin) と反応させた。ライセートを回収し、体積の1/50の50×PE (500 mM PIPES/NaOH, PH 7.2, 50 mM EDTA, and 5% 2-mercaptoethanol) を加えてから、サンプルを1,500 gで5分遠心した。上清を20% Ficoll in PE + 0.1% Triton X-100に上層し、25,000 gで15分間遠心した。境界面を回収しPE+0.1%Triton X-100で希釈した後、112,000 gで1時間ショ糖密度勾配遠心を行った。ショ糖の濃度勾配は5 ml 70% (w/v) 、3 ml 50% (w/v) 、3 ml 40% (w/v) で、バッファは10 mM PIPES/NaOH, pH 7.2, 0.1%Triton X-100, and 0.1% 2-mercaptoethanolを用いた。遠心後、0.5 μ lずつ順にサンプルを回収した。

6-10. p70のRNA干渉

ステルス二重鎖RNAはInvitrogenより購入した。p70をコードするmRNAを標的として、BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen) を用いて、5'-CCU CGA CUU GAU GGA GAC UAU UGA U-3'とデザインした。ペリセントリン2のRNA干渉にStealth Select RNAi (Oligo ID:HSS107667) (Invitrogen) を用いた。コントロールとしてルシフェラーゼに対するsiRNA (5'-CGU ACG CGG AAU ACU UCG AAA UGU C-3') を用いた。siRNAはLipofectamine2000を用いて、以下の用量で添付文書に従いトランスフェクションした。HeLa細胞:35 mm dish内に2 mlの培地中で培養されている 1×10^5 の細胞に対し、Lipofectamine2000 2 μ l, siRNA 100 pmolを使用した。hTERT-RPE1細胞:6 cm dish内に5 mlの培地中で培養されている 2×10^5 の細胞に対し、Lipofectamine2000 20 μ l, siRNA

400 pmolを使用した。ただしペリセントリン2をノックダウンする場合は、10 cm dish内に15 mlの培地中で培養されている 6×10^5 の細胞に対し、Lipofectamine2000 60 μ l、siRNA 1200 pmolを使用した。24時間後に2回目のトランスフェクションを行った。その24時間後に細胞をまき直し、72時間培養後、各実験を進めた。

6-11. BrdU取り込み率と分裂指数測定

BrdUの取り込みは、siRNAをトランスフェクションした細胞を10 μ M BrdUを含む培地で培養し、BrdUラベリング&ディテクションキットI (Roche Diagnostics) を用いて、添付文書に従い実験した。BrdUを含む培地下での培養時間は、HeLa細胞は2時間、hTERT-RPE細胞は16時間とした。BX-51正立型蛍光顕微鏡 (オリンパス) を用いて約500個の細胞のBrdU陽性細胞を数えて算出した。BrdUラベリング&ディテクションキットI 処理中に、125 ng/ml DAPIを用いて30分間核染した。BrdU陽性細胞計測時に同時に約500個の細胞から有糸分裂中の細胞を数え、分裂指数を算出した。

6-12. フローサイトメトリー

siRNAをトランスフェクションした細胞を5 μ g/mlのノコダゾール (Sigma) および0.1% DMSOを含む培地に、HeLa細胞は12時間、hTERT-RPE1細胞は18時間培養した。HeLa細胞はトリプシン処理し、PBSで洗浄しエタノールで固定した。2回PBSで洗い、室温で100 μ g/mlのRNase Aに30分間反応させた後、25 μ g/mlのPI (Molecular Probes) で30分間核染した。hTERT-RPE1細胞はトリプシン処理し、PBSで洗浄しエタノールで固定した。室温でPBSに15分間浸透して再水和させ、最後に15分間PI染色液 (20 μ g/ml PI, 100 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40) で核染した。フローサイトメトリーはBD FACSCaliburフローサイトメーター (BD Biosciences) とCellQuest software (BD Biosciences) を用いた。

6-13. その他

蛋白濃度は、BSAの濃度を基準に決定した[15]。SDS-PAGEは文献の通りに行った[16]。細胞周期を同期化するmitotic shake-off法は以下のように行った[17]。HeLa細胞を10 cm dishに培養した。培地を37°Cにあらかじめ温めた約2 mlの培地と交換し、dishを両側から用手的に振盪して分裂期の細胞を遊離させた。それをカバースリップ入りの35 mm dishにまき直した。

7. 実験結果

7-1. 新しい中心体蛋白質の同定

ラット脳組織から微小管結合蛋白質や微小管をベースとした構造のコンポーネントを網羅的に同定するために、ラット脳組織から微小管と共沈する蛋白質群を収集し、質量分析によってプロテオミクス解析を行った。まず、ラットの脳組織をホモジナイズし、超遠心によって上清（可溶分画）と沈殿からの抽出物（抽出分画）を得た。両分画をブタの脳組織より精製・調製した微小管とインキュベーションしたのち、超遠心を行った。得られた沈殿が微小管とその共沈蛋白質群である。共沈した分子を微小管より遊離させたサンプルをBioAssist Qカラムクロマトグラフィーによって分画した（6-3. 参照）。各フラクションをSDS-PAGEの後に蛋白染色し、可溶分画からは505個、不溶分画からは732個、合計1237個のバンドを切り出した。ゲル内にトリプシンを浸潤させペプチド化したサンプルをApplied Biosystems 4700 Proteomics Analyzerで分析した結果、最終的に391個の蛋白質が同定され、その中の42種類は新規蛋白質であった（Fig.4A）。

新規蛋白質の遺伝子のうちLRRC45とHypothetical proteinに焦点を絞って解析を行った（Fig.4B）。

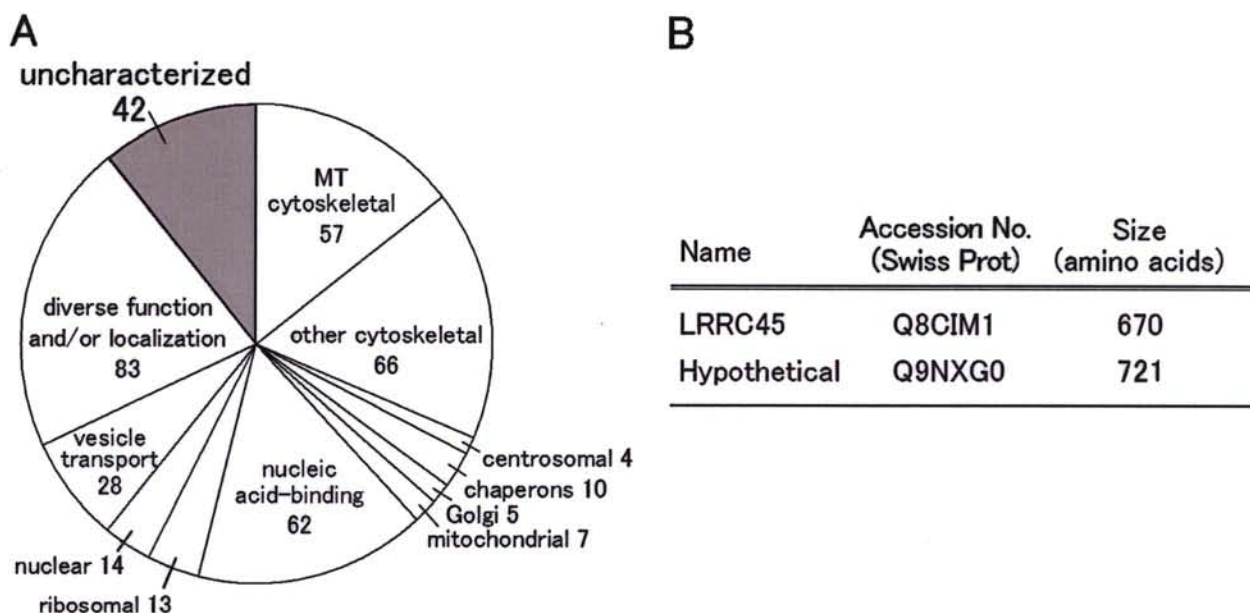


Fig.4 同定された蛋白

(A) 391蛋白質の機能別内訳。

(B) 新規蛋白質のAccession No.と構成アミノ酸数。

7-2. p70の性状解析

7-2-1. p70の遺伝子クローニング

新規の蛋白質LRRC45の遺伝子をHeLa細胞から作成したcDNAをテンプレートとしてPCRによりクローニングした。LRRC45は670個のアミノ酸から構成され、分子マスは約70kDaであるため、p70と仮称した (Fig.5A)。またcoiled-coil domainと複数のleucine-rich repeat domainを持ち、既知の分子との相同性を示さなかった (Fig.5B)。

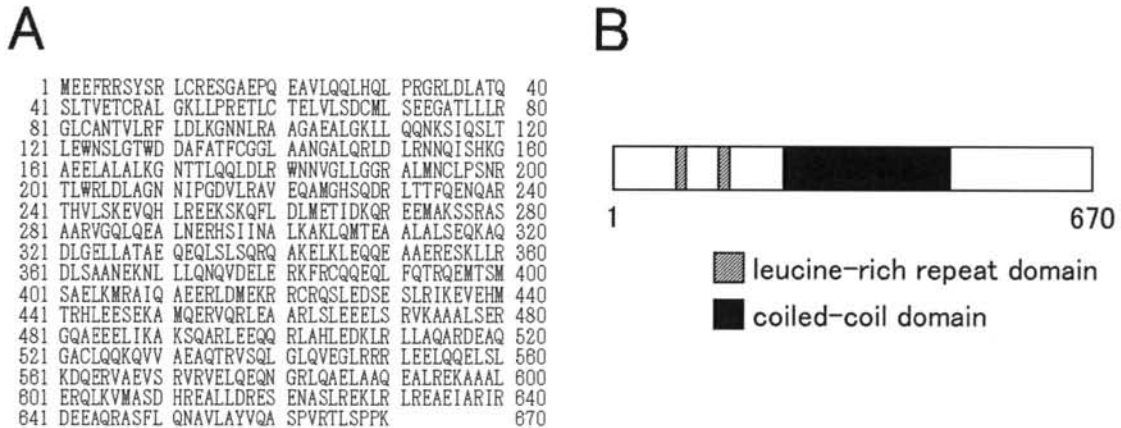


Fig.5 p70のアミノ酸配列とcoiled-coil構造

(A)p70のアミノ酸配列。 (B)p70の構造。数字はアミノ酸番号を示す。

7-2-2. p70の分子マス

COS7細胞にMycタグを付加したp70遺伝子 (Myc-p70) をトランスフェクションさせた。細胞のライセートをSDS化し、抗Myc抗体でウエスタンブロットしたところ、分子マスが約70kDの蛋白質が検出された。抗p70抗体でもウエスタンブロットしたところ、Myc-p70をトランスフェクションさせたCOS7細胞、MockのCOS7細胞いずれにおいても同等の分子マスの蛋白質を検出した (Fig.6)。このことから内因性p70は約70kDの分子マスを持ち、クローニングされたcDNAは全長をコードしていることが明らかになった。

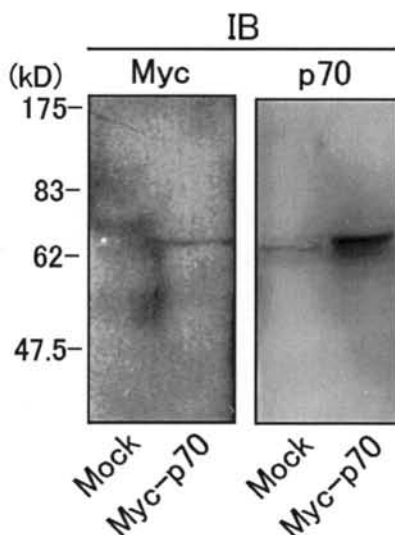


Fig.6 p70の分子マス。Mycタグを付加したp70の遺伝子をCOS7細胞にトランスフェクションさせ、そのSDS化したライセートを10%ポリアクリルアミドゲルに泳動してウエスタンブロットを行った。

7-2-3. p70の組織分布

p70がどの臓器に発現しているかを調べた。ノザンブロット解析を行い、mRNAレベルでp70の発現を検討したところ、臓器全般、特に上皮組織である肝臓や腎臓に強い発現を認めた (Fig.7A)。ウエスタンブロット解析において蛋白質レベルでp70の発現を検討したところ、同様に種々の組織に分布していた。これらの結果から、p70は広く分布する蛋白質であることが明らかになった (Fig.7B)。

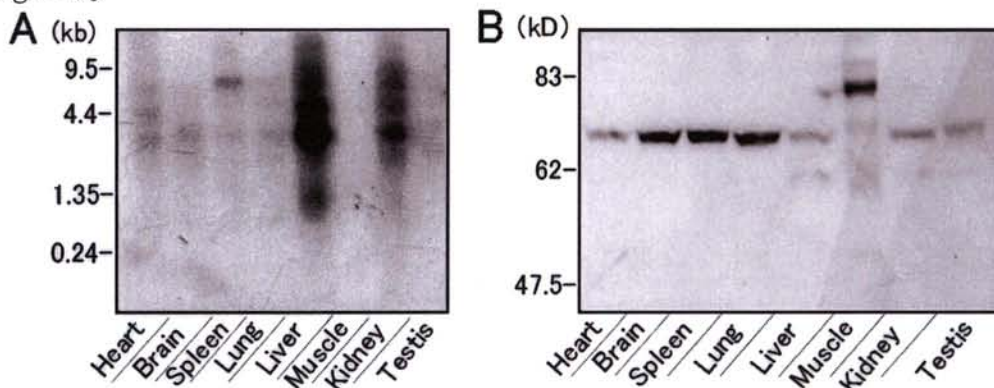


Fig.7 p70の組織分布

(A)ノザンブロット。³²Pでラベルしたp70のDNAプローブでハイブリダイゼーションを行なった。

(B)ウエスタンブロット。各組織のホモジネートを12%ポリアクリルアミドゲルに泳動し、抗p70抗体でウエスタンブロットを行った。

7-2-4. p70の細胞内局在

p70の細胞内での局在を調べるため、EGFPタグを付加したp70遺伝子をHeLa細胞に外来性に発現させた。抗EGFP抗体と中心体蛋白質である γ -チューブリンの抗体を用いて免疫染色したところ、p70と γ -チューブリンが共局在していた (Fig.8A)。さらに抗p70抗体と抗 γ -チューブリン抗体を用いて免疫染色したところ、内因性p70も γ -チューブリンと共局在した (Fig.8B)。これらの結果から、p70は中心体蛋白質であり、間期には中心体に局在することが明らかになった。

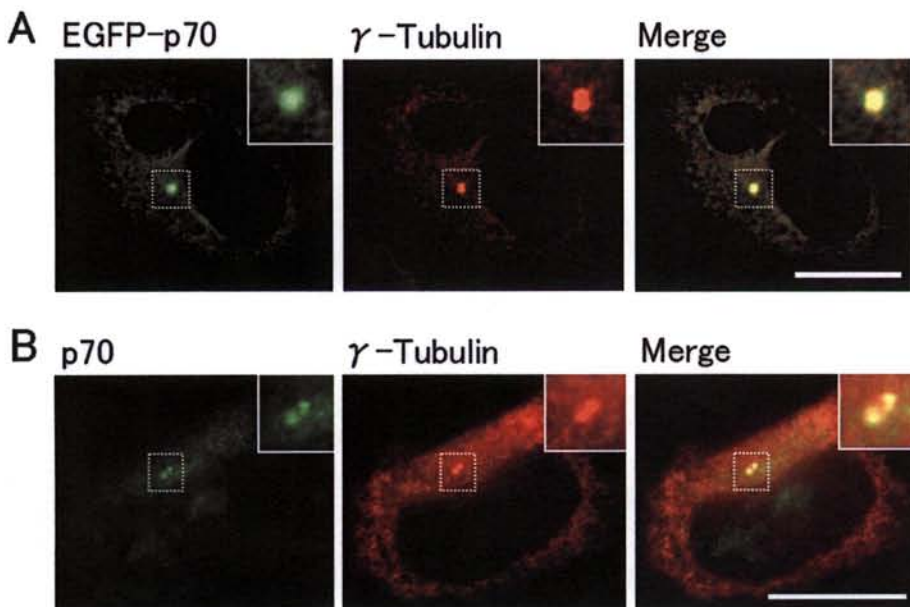


Fig.8 p70の細胞内局在

(A)EGFP-p70の HeLa細胞における細胞内局在。緑:抗EGFP抗体、赤:抗 γ -チューブリン抗体。

(B)内在性p70のHeLa細胞における局在。緑:抗p70抗体、赤:抗 γ -チューブリン抗体。
右上挿入図:点線部拡大
スケールバー:10 μ m
固定:100%メタノール

7-2-5. p70の生化学的解析

p70と中心体の関係を生化学的に検討した。ノコダゾール処理し微小管を脱重合したCHO細胞から中心体をシヨ糖濃度勾配遠心分離法で精製した。各フラクションに回収された蛋白をSDS-PAGE（10%ポリアクリルアミドゲル）を用いて泳動し、抗p70抗体と抗 γ -チューブリン抗体でウエスタンブロットした。p70と γ -チューブリンの濃度ピークが一致した。このことから、p70は中心体に局在し、その局在は微小管非依存的であることが明らかになった（Fig.9）。



7-2-6. p70の細胞分裂期における細胞内局在

p70の細胞分裂期での局在を検討した。HeLa細胞を抗p70抗体、抗 α -チューブリン抗体及びTOTO-3を用いて三重染色し、共焦点顕微鏡で観察した。p70は分裂各期においても中心体に局在していた（Fig.10）。

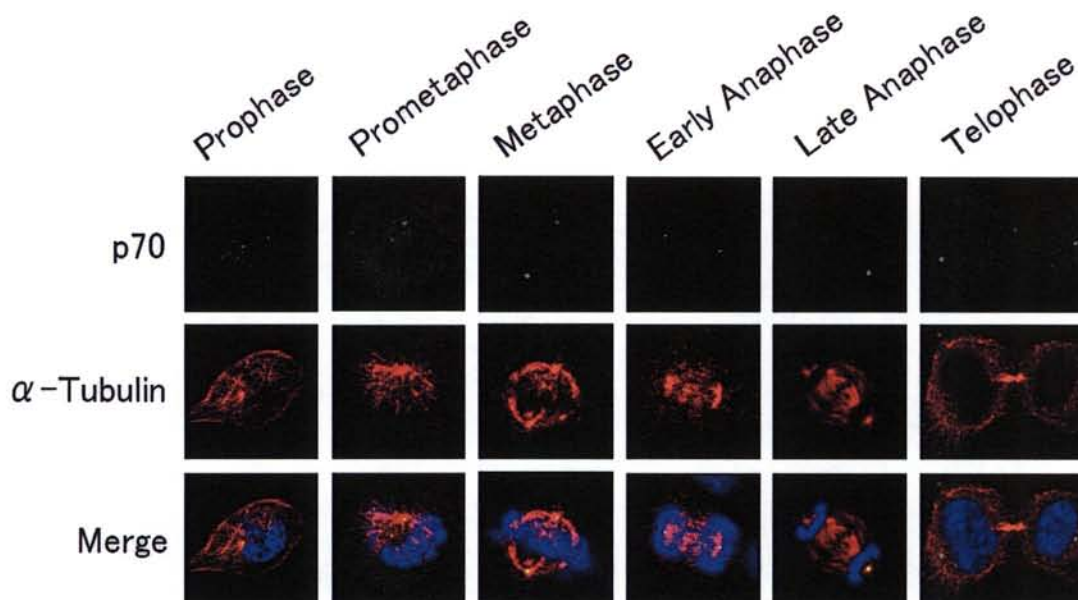


Fig.10 HeLa細胞における細胞分裂期のp70の局在
緑:抗p70抗体、赤:抗 α -チューブリン抗体、青:核
固定:100%メタノール

7-2-7. p70 RNA干渉の細胞増殖に対する影響

p70は間期、分裂期を通じて中心体に局在していることが明らかになった。一方、中心体に局

在する蛋白質をノックダウンあるいはノックアウトさせると多くが細胞周期に影響を及ぼすと報告されているので、p70も細胞周期に関与しているのではないかと考えた。そこでRNA干渉法を用いてHeLa細胞のp70をノックダウンさせ、細胞周期への影響を調べた。細胞のライセートを抗p70抗体でウエスタンブロットすると、コントロールのsiRNAではp70のバンドが検出されたのに対し、p70のsiRNAではp70の発現が著明に抑制された (Fig.11A)。またp70をノックダウンさせると、コントロールと比べて細胞数が著明に抑制された (Fig.11B)。これらのことから、p70のノックダウンは細胞周期に影響をおよぼすことが示唆された。

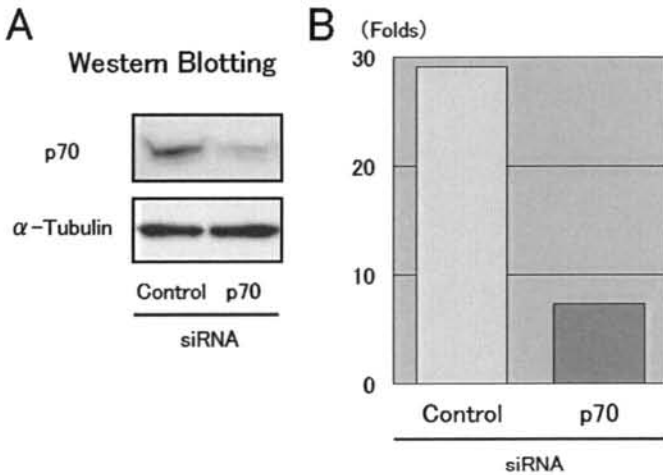


Fig.11 p70 RNAiの細胞増殖に対する影響

HeLa細胞にルシフェラーゼ (コントロール) またはp70に対するsiRNAをトランスフェクションさせた。

(A)両細胞のライセートをSDS-PAGE (10% アクリルアミドゲル) し、抗p70抗体、抗α・チューブリン抗体でウエスタンブロットした。

(B)siRNAトランスフェクションから96時間後の細胞数を、トランスフェクション前の細胞数と増殖率で比較した。代表的実験結果を掲載。

7-2-8. p70 RNA干渉の細胞周期に対する影響

一般に用いられているHeLa細胞はp53が不活化されている。中心体に局在する蛋白質セントリンやペリセントリン2をノックダウンさせるとp53依存的にG1チェックポイントが活性化されることが知られており、HeLa細胞でこれらの中心体蛋白質をノックダウンさせてもG1チェックポイントが活性化されない。そこでp53の活性が正常であるhTERT-RPE1細胞も用いて、p70のノックダウンの細胞周期に対する影響を検討した。まず分裂指数を調べたところ、HeLa細胞とhTERT-RPE1細胞でもp70をノックダウンさせると分裂指数が低下した (Fig.12A)。したがってp70をノックダウンさせるとp53非依存的に細胞周期のチェックポイントが活性化されることが示唆された。次にp70のノックダウンがBrdUの取り込みに影響するかを調べた。HeLa細胞とhTERT-RPE1細胞のp70をノックダウンさせてからBrdUと一定時間反応させ、その取り込み率を測定した。どちらの細胞も、p70をノックダウンさせてもBrdUの取り込み率はコントロールと同等だった (Fig.12B)。BrdUはS期で取り込まれることから、p70をノックダウンさせても細胞周期はG1からS期へ移行することが明らかになった。つまり、G1チェックポイントは活性化されず、G2/Mチェックポイントのみが活性化されることが示唆された。

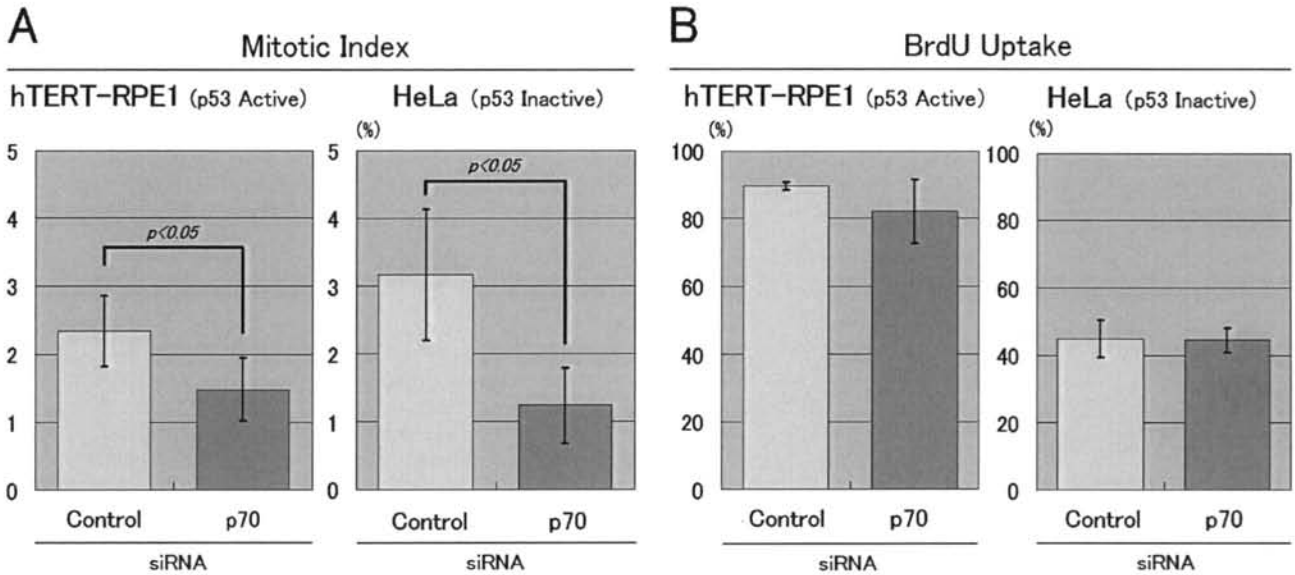


Fig.12 p70 RNA干渉法の細胞周期に対する影響

hTERT-RPE1細胞とHeLa細胞にルシフェラーゼ(コントロール)又はp70に対するsiRNAをトランスフェクションさせた。(A)細胞の分裂指数。(B)細胞のBrdU取り込み率。3回の実験の平均値を掲載。分裂指数は両細胞ともt検定にて有意差を認めた。

最後に、p70をノックダウンさせ細胞周期の影響をフローサイトメトリーを用いて検討した。細胞をルシフェラーゼ(コントロール)、ペリセントリン2、p70のsiRNAでノックダウンした後ノコダゾール処理して細胞周期をM期で停止させ、フローサイトメトリーを行った。hTERT-RPE1細胞について、コントロールではノコダゾール処理すると細胞周期がM期で停止するため、染色体2nの細胞の割合が減り、4nの細胞が増えた(Fig.13)。逆に、中心体蛋白質の1つであるペリセントリン2をノックダウンさせると、G1チェックポイントが活性化されて細胞周期が停止するため、ノコダゾール処理の有無に拘わらずコントロールよりも染色体2nの細胞が増え、4nの細胞が減った。p70をノックダウンさせると、コントロールと同様に染色体が4nの細胞が増えるパターンとなった。これらのことから、p70をノックダウンさせると、G2/Mチェックポイントが活性化されることが示唆された。HeLa細胞では、コントロールはhTERT-RPE1細胞と同じパターンを示した。しかし、ペリセントリン2をノックダウンさせるとhTERT-RPE1細胞と異なるパターンを示した。これはHeLa細胞はp53が不活化されているのでG1チェックポイントが活性化されなかったからであると考えられる。p70をノックダウンさせるとhTERT-RPE1細胞と同様のパターンを示した。以上のことから、p70をノックダウンさせると、G1チェックポイントではなく、G2/Mチェックポイントが活性化されることが示唆された。

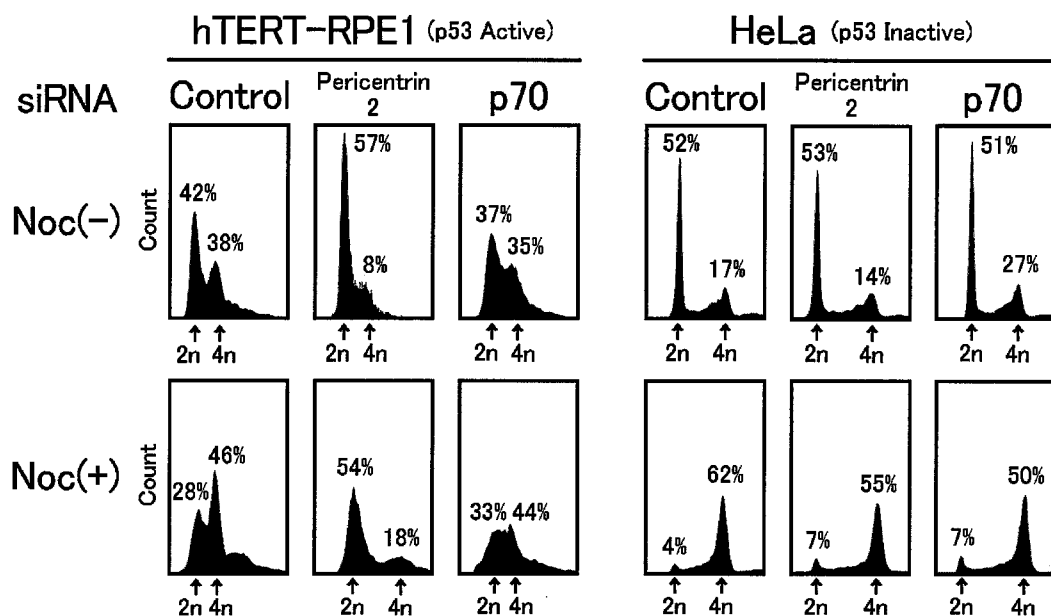


Fig.13 p70 RNAi細胞のフローサイトメトリー解析。

hTERT-RPE1細胞、HeLa細胞のペリセントリン2、p70をノックダウンさせた場合と、コントロールでの細胞周期の変化を、核をPI染色して検討した。上はノコダゾール処理をしていない細胞、下はノコダゾール処理しM期で細胞周期が停止されている細胞。横軸は染色体量、縦軸は細胞数を表す。

7-3. Centleinの性状解析

7-3-1. Centleinの遺伝子クローニング

質量分析で同定した新しい分子のうち、Swiss Prot上Accession No. Q9NXG0であるヒトの蛋白質と相同性を持つHypothetical proteinに注目した。ラットにおいてこれに相当する遺伝子を調べたところ、Ensembl上Accession No. RGD1308101上に見出した。この遺伝子情報に基づいてその遺伝子をラット脳cDNAをテンプレートとしてPCRによってクローニングした。後述するように中心体に局在することが判明したのでCentlein (Centrosomal protein) と命名した。Centleinは721個のアミノ酸からなり、分子マスは82,717であった (Fig. 14A) (GenBank accession number, AB369315)。Centleinは複数のコイルド・コイル構造を持つことが予想され、既知の分子との相同性を示さなかった (Fig.14B)。

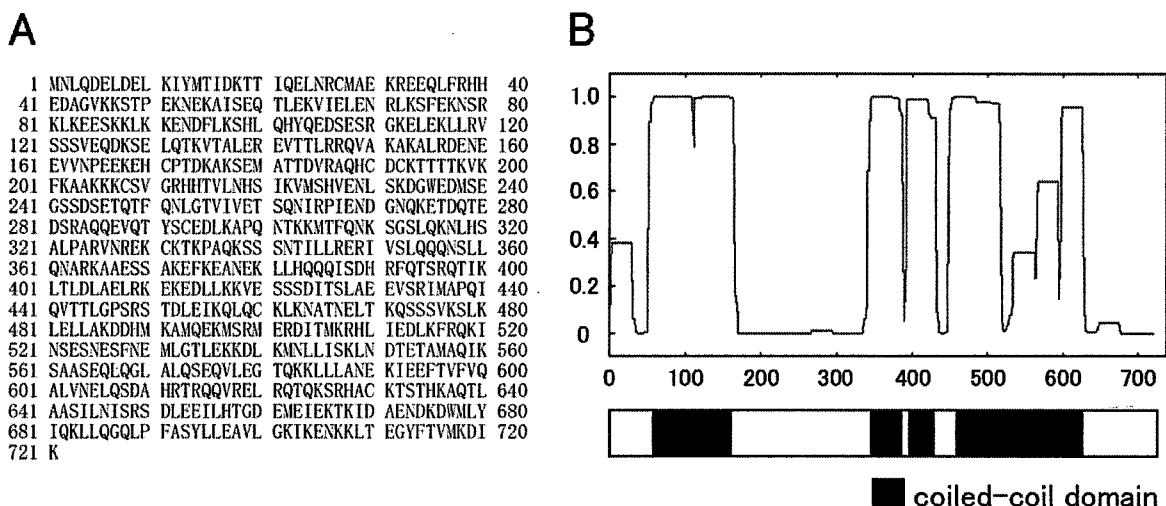


Fig.14 Centleinのアミノ酸配列とcoiled-coil構造

(A)Centleinのアミノ酸配列。

(B)Centleinのcoiled-coil構造。縦軸はProbability of coiled-coil structure、横軸はアミノ酸番号を示す。

7-3-2. Centleinの分子マス

COS7細胞にMycタグを付加したCentlein遺伝子をトランスフェクションさせた。細胞のライセートをSDS化し、抗Myc抗体でウエスタンブロットしたところ、分子マスが約100kDの蛋白質が検出された。抗Centlein抗体でもウエスタンブロットしたところ、Myc-CentleinをトランスフェクションさせたCOS7細胞でも、MockのCOS7細胞いずれにおいても同等の分子マスの蛋白質を検出した。このことから内因性Centleinは約100kDの分子マスを持ち、クローニングされたcDNAは全長をコードしていることが明らかになった (Fig.15)。

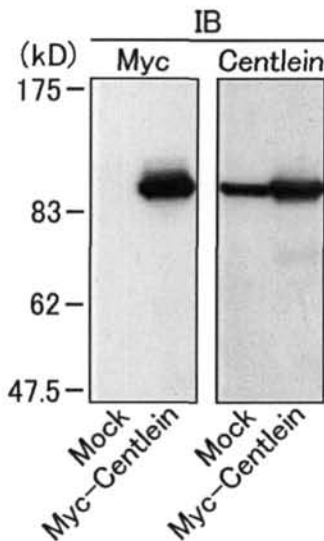


Fig.15 Centleinの分子マス。Mycタグを付加したp70の遺伝子をCOS7細胞にトランスフェクションさせ、そのライセートをSDS-PAGE (10%ポリアクリルアミドゲル) してウエスタンブロットした。

7-3-3. Centleinの組織分布

Centleinがどの臓器に発現しているかを調べた。ウエスタンブロット解析において蛋白質レベルのCentleinの組織分布を検討したところ、調べた全ての組織に分布していた (Fig.16A)。また、各種培養細胞のライセートを用いてウエスタンブロット解析を行ったが、調べた細胞全てに発現していた (Fig.16B)。これらの結果から、Centleinは広く分布する蛋白質であることが明らかになった。

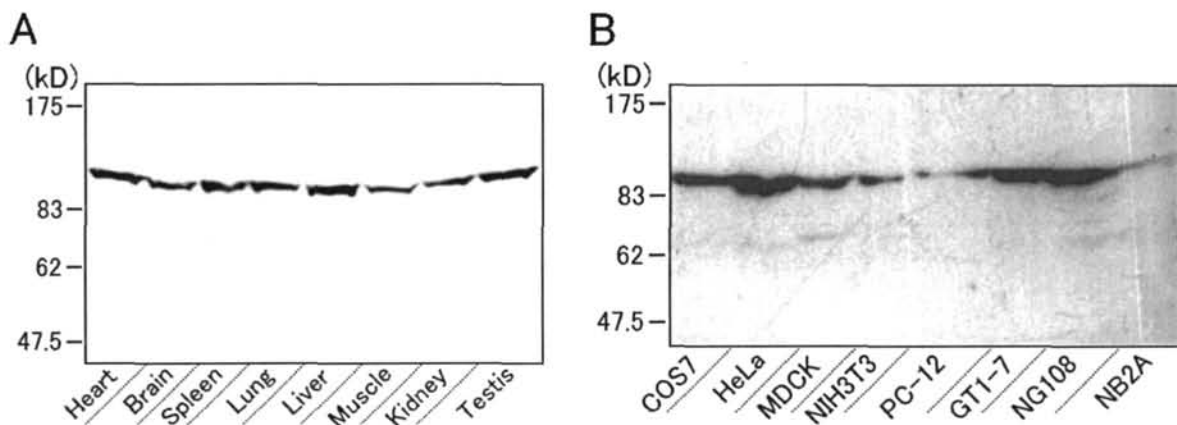


Fig.16 Centleinの組織分布

(A)組織ホモジネートサンプルに対するウエスタンブロット。抗Centlein抗体を用いた。

(B)培養細胞ライセートに対するウエスタンブロット。抗Centlein抗体を用いた。

7-3-4. Centleinの細胞内局在

Centleinの細胞内での局在を調べるため、EGFPタグをつけたCentlein遺伝子をCOS7細胞に外来性に発現させた。抗EGFP抗体と中心体蛋白質である γ -チューブリンの抗体を用いて免疫染色したところCentleinと γ -チューブリンが共局在していた (Fig.17)。このことから、p70は中心体蛋白質であることが明らかになった。



Fig.17 EGFP-Centleinの細胞内局在
 緑:抗EGFP抗体、赤:抗 γ -チューブリン抗体
 右下挿入図:点線部拡大
 固定:100%メタノール
 スケールバー:10 μ m

7-3-5. Centleinの生化学的解析

Centleinと中心体の関係を生化学的に検討した。ノコダゾール処理し微小管を脱重合したCHO細胞から中心体をショ糖濃度勾配遠心分離法で精製した。各フラクションに回収された蛋白をSDS-PAGE (10%ポリアクリルアミドゲル) を用いて泳動し、抗Centlein抗体と抗 γ -チューブリン抗体でウエスタンブロットした。Centleinと γ -チューブリンの濃度ピークが一致した。このことから、Centlein中心体に局在し、その局在は微小管非依存的であることが明らかになった (Fig.18)。

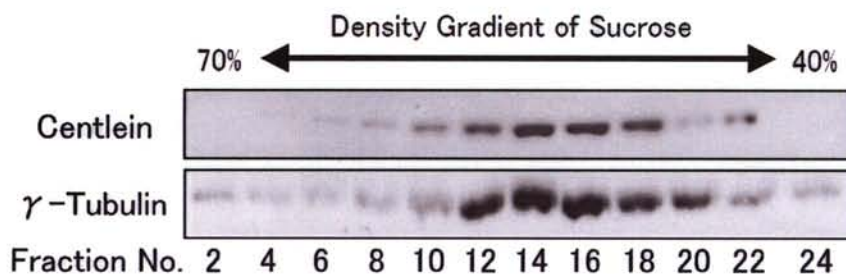


Fig.18 Centleinの局在の生化学的検討。
 Centleinと γ -チューブリンが同じ分画 (No.12~18) に回収された。

7-3-6. Centleinの分裂期での細胞内局在

Centleinの細胞分裂期の局在を検討した。HeLa細胞を抗Centlein抗体と抗 α -チューブリン抗体を用いて二重染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果Centleinは間期、分裂期を通じて中心体に局在していることが明らかになった (Fig.19)。

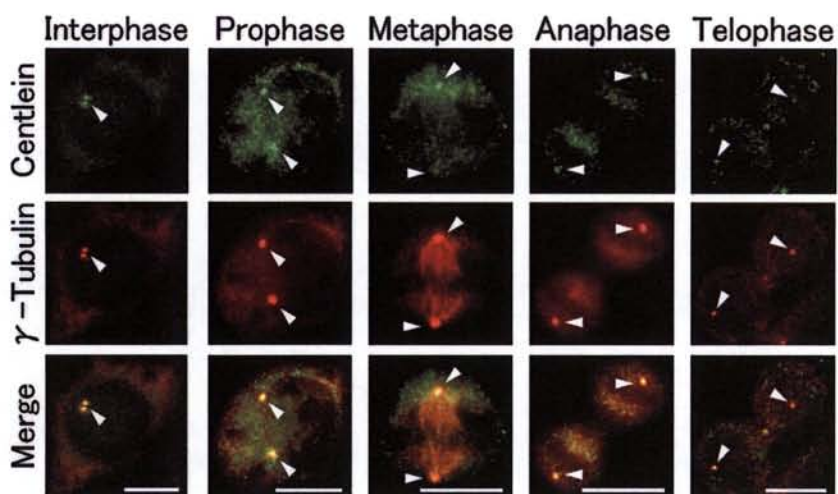


Fig.19 細胞分裂中のCentleinの局在
 緑:抗Centlein抗体、赤:抗 α -チューブリン抗体
 矢頭:中心体
 固定:100%メタノール
 スケールバー:10 μ m

7-3-7. 細胞周期に依存したCentleinの中心体内での局在

中心体蛋白質ODF2やnineinは、中心体での局在が細胞周期に依存して変化すると言われている[17,18]。ODF2とnineinは母中心小体に局在し、G1/S期では母娘中心小体両者に同じように分布する。Centleinも同じく中心体内での局在が細胞周期に依存して変化するか検討した。細胞をMitotic shack-offによってM期で同調させた。細胞をまき直した後4時間培養し（細胞の大部分はG1期）、抗Centlein抗体、抗ODF2抗体[19]、抗 γ -チューブリン抗体で三重染色し、共焦点顕微鏡で観察した。G1期では、Centleinの局在はODF2と一致したが、 γ -チューブリンより限局した局在を示した（Fig.20）。細胞がG1/S期の中心小体が複製される前においてCentleinはODF-2陽性、 γ -チューブリン陽性の母と娘の中心小体に局在した。これらの結果から、CentleinはG1期に母中心小体に局在し、G1/S期に進むにしたがって母と娘の中心小体両方に分布することが示唆された。

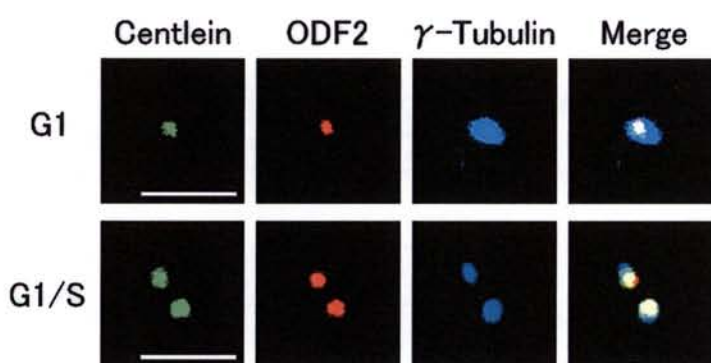


Fig.20 CentleinのG1からS期にかけてのHeLa細胞中心体での局在。

緑:抗Centlein抗体、赤:抗ODF2抗体、青:抗 γ -チューブリン抗体。

固定:100%メタノール

スケールバー:5 μ m

8. 考察 (文献的考察を含む)

本研究は、本来新しい微小管結合蛋白質と微小管をベースにした構造のコンポーネントを同定するために、ラット脳組織から微小管と共沈する蛋白質を網羅的に質量分析によって解析した。結果として新しい分子42種を含む391種の蛋白質を同定した。それらは11の機能(微小管骨格、他の細胞骨格、中心体、シャペロン、ゴルジ小体、ミトコンドリア、核酸、リボソーム、核、細胞内輸送、その他)に分類され、そのなかに私が性状解析した新しい中心体蛋白質p70とCentleinがあった。

新規に同定したp70およびCentleinは、共にcoiled-coil構造を有していた。中心体は多くのcoiled-coil構造を持つ蛋白質で構成されており[20]、これは蛋白質の複合体を構成しやすいようにするためと考えられている。また、両蛋白質とも細胞周期を通じて微小管非依存的に中心体に局在していた。p70とCentleinは微小管と共沈してくる蛋白質として同定されたが、直接に微小管と結合するかは不明のままである。両蛋白質とも脳の不溶画分/抽出画分から回収された蛋白質であり、リコンビナント蛋白質も難溶性を示し、微小管と直接結合するかを実験することが出来なかった。この難溶性はcoiled-coil構造に由来するものと考えられる。いずれにせよp70とCentleinが中心体に局在するメカニズム、微小管結合活性の有無は今後の重要な研究課題である。

p70をノックダウンさせた細胞ではp53非依存的にG2/Mチェックポイントが活性化されて細胞周期が停止することが示唆された。これまで中心体蛋白質をノックダウンさせるとG1チェックポイントが活性化されるという報告が多い。例えばペリセントリン2は、ノックダウンさせるとp53が活性化され、核内に蓄積する[4]。チェックポイントではサイクリンファミリーとサイクリン依存性キナーゼ(CDK)が中心的役割を果たしており、G1チェックポイントではp53によってサイクリンDとCDK4の複合体の活性化が阻害される。一方、G2/MチェックポイントではサイクリンBとCDK1の複合体の活性化が阻害されるが、p53依存的な機構と非依存的な機構がある[21,22]。p70のノックダウンはp53非依存的にG2/Mチェックポイントの活性化へ何らかの作用をすると考えられる (Fig.21)。

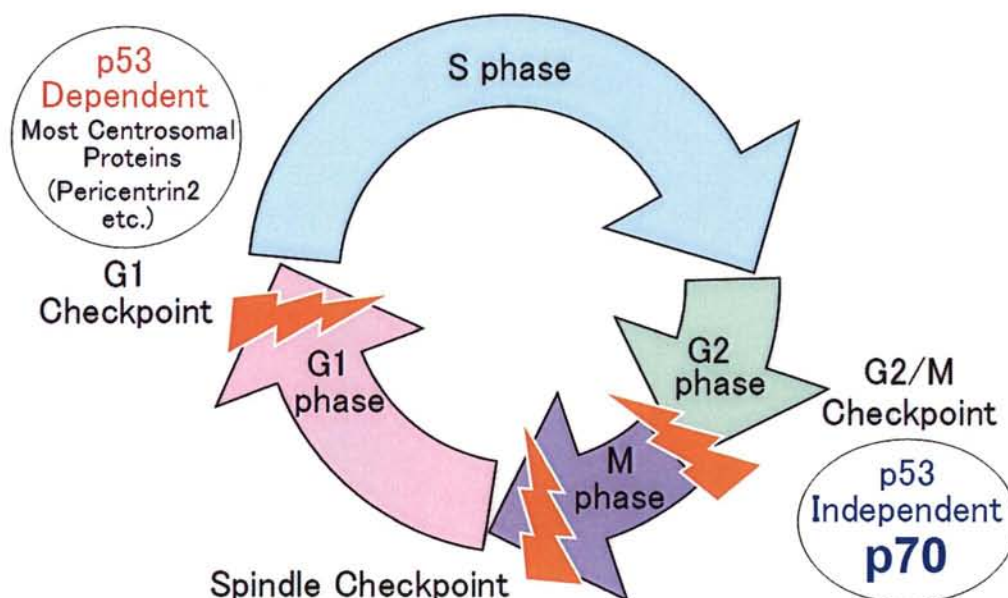


Fig.21 p70と細胞周期

今後はp70をノックダウンさせると本当にG2/Mチェックポイントが活性化されるのかをより詳細に確認する必要がある。G2/M期でのサイクリンAとBの発現量やCDK1のリン酸化の程度を測定することでG2/Mチェックポイントの活性化を確認していく予定である。

CentleinはG1期に母中心小体に局在することが示唆された。母と娘の中心小体の違いは、母中心小体には電顕的にdistal appendage、subdistal appendageと呼ばれる構造が存在することである。したがってCentleinはこのappendageに局在するかもしれない。Appendageに局在する蛋白質としてはこれまでninein[18]、ε-チューブリン[23]、centriolin[24]、CEP110[25]が報告されている。ninein、ε-チューブリン、centriolin、CEP110をRNA干渉や中和抗体でノックダウンさせると、細胞周期や微小管形成中心の活性に影響を及ぼすことが報告されている[4,23-25]。一方ODF2をノックダウンさせると一次線毛の形成が抑制されることが報告されている[19]。このように母中心小体は中心小体の複製、線毛の形成、微小管の形成に重要な役割を担っている。Centleinも母中心小体に関連したこのような機能に関わっていると考えられる (Fig.22)。

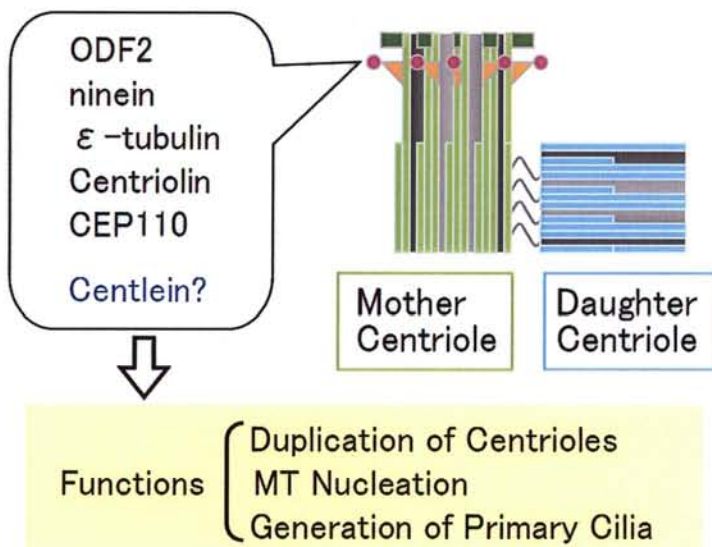


Fig.22 Appendageに局在する中心体蛋白質 (上) と母中心小体の機能 (下)。

9. 結語

p70とCentleinは、種々の組織に広く分布する蛋白質であり、間期と分裂期を通じて中心体に局在すること、かつ中心体への局在は微小管非依存的であることが明らかになった。p70はp53非依存的にG2/Mチェックポイントに関与することが示唆された。Centleinは、G1期に母中心小体に局在しており、中心小体の複製や一次線毛の形成など母中心小体に関わる機能に関与しているかもしれない。

10. 参考文献

- [1] Bournes, M. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 25-34, 2002.
- [2] Doxsey, S., McCollum, D., and Theurkauf, W. Centrosomes in cellular regulation, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 411-434, 2001.
- [3] Bettencourt-Dias, M., and Glover, D.M. Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 451-463, 2007.
- [4] Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurczyk, A., Hergert, P., and Doxsey, S. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest, *Nat. Cell Biol.* 9: 160-170, 2007.
- [5] Shelanski, M.L., Gaskin, F., and Cantor, C.R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 765-768, 1973.
- [6] Williams, R.C. Jr, and Lee, J.C., Preparation of tubulin from brain, *Methods Enzymol.* 85: 376-385, 1982.
- [7] Yamamoto, H., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Ono, T., and Miyamoto, E. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in its tubulin binding sites, *Arch. Biochem. Biophys.* 408: 255-262, 2002.
- [8] Uezu, A., Horiuchi, A., Kanda, K., Kikuchi, N., Umeda, K., Tsujita, K., Suetsugu, S., Araki, N., Yamamoto, H., Takenawa, T., and Nakanishi, H. SGIP1 α is an endocytic protein that directly interacts with phospholipids and Eps15, *J. Biol. Chem.* 282: 26481-26489, 2007.
- [9] Pohl, T. Concentration of proteins and removal of solutes, *Methods Enzymol.* 182 : 68-83, 1990.
- [10] Ono, Y., Nakanishi, H., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takahashi, K., Miyahara, M., Satoh-Horikawa, K., Mandai, K., and Takai, Y. Two actions of frabin: direct activation of Cdc42 and indirect activation of Rac, *Oncogene* 19: 3050-3058, 2000.
- [11] Nakanishi, H., Obaishi, H., Satoh, A., Wada, M., Mandai, K., Satoh, K., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., and Takai, Y. Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation, *J. Cell Biol.* 139: 951-961, 1997.
- [12] Guan, K.L., and Dixon, J.E. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase, *Anal. Biochem.* 192: 262-267, 1991.

- [13] Bornens, M., and Moudjou, M. Studying the composition and function of centrosomes in vertebrates, *Methods Cell Biol.* 61: 13-33, 1999.
- [14] Thompson, H.M., Cao, H., Chen, J. Euteneuer, U., and McNiven, M.A. Dynamin 2 binds γ -tubulin and participates in centrosome cohesion, *Nat. Cell Biol.* 6: 335-342, 2004.
- [15] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 : 248-254, 1976.
- [16] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685, 1970.
- [17] Nakagawa, Y., Yamane, Y., Okanoue, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. Outer dense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component preferentially associated with mother centrioles: its identification from isolated centrosomes, *Mol. Biol. Cell* 12: 1687-1697, 2001.
- [18] Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L., and Bornens, M. The respective conditions of the mother and daughter centrioles centrosome activity and behavior in vertebrate cells, *J. Cell Biol.* 149: 317-329, 2000.
- [19] Ishikawa, H., Kubo, A., Tsukita, S., and Tsukita, S. Odf-2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia, *Nat. Cell Biol.* 7: 517-524, 2005.
- [20] Doxsey, S., McCollum, D., and Theurkauf, W. Centrosomes in cellular regulation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 411-434, 2005.
- [21] Fukasawa, K. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes, *Nature Rev Cancer* 7: 911-924, 2007.
- [22] Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players ? Good targets ?, *Nat Rev Cancer.* 7: 495-507, 2007.
- [23] Chang, P., Giddings, T.H.Jr, Winey, M., and Stearns, T. ϵ -Tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization, *Nat. Cell Biol.* 5: 71-76, 2003.
- [24] Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M., and Doxsey S. A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stage of cytokinesis and entry into S phase, *J. Cell Biol.* 161: 535-545, 2003.
- [25] Ou, Y.Y., Mack, G.J., Zhang, M., and Rattner, J.B. CEP110 and ninein are located in a specific domain of the centrosome associated with centrosome maturation, *J. Cell Sci.* 115: 1825-1835, 2002.