

博士論文番号: 1581015

# Ric-8A による中心体形成制御機構の解析

堀部 修平

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子情報薬理学研究室

(主指導教官: 伊東 広 教授)

提出日: 平成 30 年 3 月 6 日

# 目次

要旨	-4-
第1章 序論	
1.1 ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質	-6-
1.2 受容体非依存的な G タンパク質活性化因子 Ric-8	-6-
1.3 中心体	-7-
1.4 中心小体複製過程	-8-
1.5 中心小体数異常と細胞分裂	-9-
1.6 Ric-8A、Gai、PKA と中心体の関係性	-10-
1.7 本研究の目的	-11-
第2章 材料と方法	
2.1 細胞培養	-14-
2.2 試薬及び抗体	-14-
2.3 プラスミドと siRNA	-15-
2.4 タンパク質過剰発現系並びに遺伝子発現抑制実験	-17-
2.5 Ric-8A knockout 細胞の作成	-18-
2.6 Western blotting	-18-
2.7 免疫沈降実験	-20-
2.8 免疫染色	-20-
2.9 qPCR	-21-
2.10 BrdU を用いた細胞周期解析	-21-
2.11 フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析	-22-
2.12 Double-thymidine block 法による G1/S 期での細胞周期同調	-22-
2.13 微小管再合成アッセイ	-22-
第3章 結果	
3.1 Ric-8A 発現抑制及びノックアウトにより引き起こされる中心小体様構造体の形成	
3.1.1 背景	-23-
3.1.2 siRNA を用いた Ric-8A 発現抑制による表現型の確立	-23-
3.1.3 Ric-8A 発現抑制における増加した中心小体の構造推察	-23-
3.1.4 Ric-8A ノックアウト細胞を用いた中心小体様構造体の検討	-24-

3.2 Ric-8A 下流シグナルの解析	
3.2.1 背景	-30-
3.2.2 異常 G $\alpha$ i シグナルの CLS 形成への関与検討	-30-
3.2.3 PKA シグナルの CLS 形成への関与検討	-30-
3.2.4 中心体数制御における Ric-8A、G $\alpha$ i、PKA の順位の解析	-31-
3.2.5 G $\alpha$ i の細胞内局在の検討	-31-
3.2.6 Ric-8A ノックアウト細胞における各種 G タンパク質の解析	-32-
3.2.7 中心体における PKA の異常活性の影響検討	-32-
3.3 中心小体様構造体(CLS)の解析	
3.3.1 背景	-40-
3.3.2 Ric-8A 発現抑制による細胞周期の影響検討	-40-
3.3.3 Ric-8A 発現抑制による中心小体過剰複製検討	-40-
3.3.4 Ric-8A 発現量低下による Centriolar satellites (CS)への影響検討	-41-
3.4 MTOC 活性への影響解析	-50-
3.4.1 背景	-50-
3.4.2 中心小体複製時における G $\alpha$ i シグナル異常による細胞分裂への影響解析	-50-
3.4.3 CLS の MTOC 活性の検討	-50-
3.5 下流因子の検討	
3.5.1 背景	-55-
3.5.2 Ric-8A ノックアウトによる SPAG5 の局在並びに発現量の検討	-55-
3.5.3 Ric-8A 及び PKA と SPAG5 相互作用の検討	-56-
第4章 考察	
4.1 Ric-8A 発現抑制による中心小体様構造体(CLS)の形成	-60-
4.2 中心体形成に関与する G タンパク質シグナルの検討	-60-
4.3 中心小体様構造体(CLS)の形成原因	-61-
4.4 MTOC 活性への影響	-62-
4.5 下流因子の探索	-63-
第5章 引用文献	-66-
謝辞	-73-

所属 (主指導教員)	分子情報薬理学研究室 (伊東広 教授)		
氏名	堀部修平	提出	平成 29 年 12 月 12 日
題目	Ric-8A による中心体形成制御機構の解析		

要旨

●研究背景

ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質)は  $\alpha$  サブユニット ( $G\alpha$ )と  $\beta\gamma$  サブユニット ( $G\beta\gamma$ )から構成され、細胞膜受容体である G タンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor: GPCR)と共役し、細胞外の情報を細胞内へ伝達する分子スイッチとして機能する。一方、GPCR 非依存的な G タンパク質活性化因子として Ric-8 (resistance to inhibitors of cholinesterase-8)が同定され、細胞外リガンドによる制御とは異なる、G タンパク質シグナルの新たな活性制御機構が提唱されている。Ric-8 は  $G\alpha$  の GDP-GTP 交換因子(GEF)として  $G\alpha$  を活性化することや、シャペロン活性、ユビキチン化阻害活性により  $G\alpha$  の安定化に寄与することが報告されている。哺乳類には Ric-8A と Ric-8B の二つのホモログが存在し異なる  $G\alpha$  を標的とするが、哺乳動物細胞において Ric-8 がどのような生命現象に関与するかについては不明な点が多く残されている。

中心体は中心小体と周辺物質(Pericentriolar material: PCM)によって構成され、間期において微小管形成中心(Microtubule Organizing Center: MTOC)として働き、分裂期において紡錘体形成を担う。これまでに三量体 G タンパク質が中心体形成に関与する報告は無いが、本研究において G タンパク質調節因子 Ric-8A が三量体 G タンパク質シグナルを介して中心体形成を制御する可能性を見出した。

●研究結果

① Ric-8A 発現抑制及びノックアウトにより引き起こされる中心小体様構造体の形成

ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞に Ric-8A を標的とする siRNA を導入し、Ric-8A 発現抑制時の中心小体タンパク質の様子を免疫染色法で評価した。その結果、Ric-8A 発現抑制により中心小体タンパク質(CP110、Centrin、Talpid3)及び中心体タンパク質( $\gamma$ -tubulin)のドット数が増加する一方、一部の中心小体タンパク質(C-Nap1、SAS-6)のドット数は増加しなかった。この結果は CRISPR/Cas9 を用いて作成した Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞においても確認された。これらの結果から、Ric-8A の発現抑制は中心小体自身を増加させないが、中心小体に類似した構造体(以下、中心小体様構造体: Centriole-Like Structure (CLS))の形成を引き起こすことが示唆された。

## ② Ric-8A 下流シグナルの解析

Ric-8A の標的タンパク質の 1 つである Gai はアデニル酸シクラーゼを抑制して cAMP 量の低下を引き起こし、結果として PKA (Protein kinase A) の活性を低下させる。前記の表現型において Ric-8A の下流で Gai 並びに PKA が関与するかを検討するため、Gai 特異的阻害剤である百日咳毒素を処理したところ、CLS が観察された。その際、百日咳毒素と同時に PKA 阻害剤を処理すると CLS 形成がキャンセルされた。さらに Ric-8A 発現抑制と Gai もしくは PKA の過剰発現を同時に行った結果、Ric-8A 発現抑制で誘導された CLS 形成に対し、Gai 過剰発現は抑制効果を示した。一方、PKA 過剰発現と Ric-8A 発現抑制を同時に行った細胞では、それぞれの単独処理細胞と比べて相加的な増加を示さなかった。これらの結果から、Ric-8A→Gai→PKA というシグナル経路が CLS 形成に関与することが示唆された。

## ③ 中心小体様構造体(CLS)の解析

Ric-8A 発現抑制によって CLS が形成された要因として、中心体へのタンパク質輸送を担う Centriolar satellites (CS) と呼ばれる構造体に着目した。Ric-8A ノックアウト細胞において CS タンパク質 PCM-1 の局在を免疫染色法で検討した結果、Ric-8A ノックアウト細胞では PCM-1 の異常凝集が観察され、その凝集に中心小体タンパク質 Centrin が共局在している様子が確認された。これらの結果から、Ric-8A 発現抑制細胞では CS の動態異常が起こり、結果として CLS が形成される可能性が示唆された。一方、一部の CLS は PCM1 と共局在せず、 $\gamma$ -Tubulin と共局在することも見出された。 $\gamma$ -Tubulin は中心体の構成タンパク質で MTOC 活性に寄与することから、Ric-8A 発現抑制細胞で形成される CLS の一部は MTOC 活性を持つ可能性が示唆された。

## ④ 細胞分裂への影響解析

Ric-8A 発現抑制細胞で形成される CLS が MTOC 活性を有するかを検討するために、微小管再合成アッセイを行った。Ric-8A ノックアウト細胞の微小管ネットワークを破壊後、CLS を基点に微小管の再合成が起きている様子を確認した。この結果から、CLS は MTOC 活性を持つことが分かった。次に、CLS が細胞分裂に影響するかを調べるために、Ric-8A ノックアウト細胞における紡錘体形成を観察した。その結果、Ric-8A ノックアウトにより異形紡錘体である pseudo bipolar 紡錘体や多極性紡錘体を形成する細胞が増加することが分かった。

### ●総括

本研究結果から、Ric-8A の発現抑制は中心小体様構造体(CLS)の形成を引き起こすこと、その一部は微小管形成中心(MTOC)活性を持つこと、CLS の MTOC 活性は紡錘体形成異常を引き起こすことが分かった。従って Ric-8A は MTOC 形成制御を介して正常な細胞分裂の維持に重要な役割を担っていると考えられる。今後は Ric-8A→Gai→PKA の下流で CLS 形成に寄与する因子の同定が必要である。

## 第1章 序論

### 1.1 ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質

ヘテロ三量体 GTP 結合タンパク質 (以下、G タンパク質)は細胞外の情報を細胞内へと伝達するスイッチ様の役割を担うシグナル伝達タンパク質の一つである。三量体 G タンパク質は  $\alpha$  サブユニット( $G\alpha$ )と  $\beta\gamma$  サブユニット( $G\beta\gamma$ )にて構成され、細胞膜内側にて膜受容体である G タンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor: GPCR)と共役している。ホルモンや神経伝達物質などのリガンドが GPCR に結合することで GPCR が構造変化を起こし、共役する  $G\alpha$  に結合した GDP を GTP に交換する反応を促す。交換反応により G タンパク質と受容体の相互作用並びに  $G\alpha$ -GTP、 $G\beta\gamma$  間の相互作用が減弱することで解離を引き起こす。解離した  $G\alpha$ -GTP と  $G\beta\gamma$  はそれぞれ独立または協調的に下流エフェクタータンパク質を活性化し、シグナルをさらに下流に伝達する(図 1 A)。その後、 $G\alpha$  サブユニット自身の持つ GTP 加水分解活性により  $G\alpha$  に結合した GTP を GDP に加水分解し、再び  $G\beta\gamma$  並びに受容体と結合することで G タンパク質シグナルは増幅される(Kaziro Y. *et al.*, 1991)。

G タンパク質の多様なシグナル伝達経路は  $G\alpha$  の多様性に起因する。 $G\alpha$  は機能や構造から  $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha i}$ 、 $G_{\alpha q}$ 、 $G_{\alpha 12}$  の4種類のサブファミリーで構成される。 $G_{\alpha s}$  はアデニル酸シクラーゼを下流エフェクタータンパク質とし、細胞内 cAMP 濃度を増加させる機能を有する。それに対し、 $G_{\alpha i}$  はアデニル酸シクラーゼに抑制的に働き、cAMP シグナルを阻害する。 $G_{\alpha q}$  はホスホリパーゼ C を活性化し、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸とジアシルグリセロールの産生を促す。 $G_{\alpha 12}$  は RhoGEF を制御し、アクチン骨格の再編成などを誘導することが知られている。さらに  $G\alpha$  は組織特異的な発現様式を示すものも存在し、多様なエフェクターとの組み合わせにより特徴的なシグナル伝達経路を構築している(堀部修平, 伊東広, 2015; Blumer, J. and Lanier, S., 2013)。

### 1.2 受容体非依存的な G タンパク質活性化因子 Ric-8

*RIC-8* (Resistance to inhibitors of cholinesterase-8)は線虫の遺伝学的解析によりアセチルコリンエステラーゼ阻害剤に対して耐性を示す変異体の原因遺伝子の一つとして同定された、G タンパク質シグナル制御因子である(Miller, K. G., *et al.*, 1996)。線虫における研究により、 $G_{\alpha q}$  シグナルを制御することで神経伝達物質の放出を制御すること、さらに GPR-1/2 (線虫の  $G_{\alpha i}$  オルソログ)に対し GEF として機能し、胎生期に起こる非対称細胞分裂の配向を制御することが報告された (Miller, K. G., and Rand, J. B., 2000)。

脊椎動物は Ric-8A 及び Ric-8B の2種類のホモログを持ち、45%のアミノ酸相同性を

示す。Ric-8A 及び Ric-8B は  $G\alpha$  サブファミリーに対する特異性に違いが見られ、Ric-8A は  $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$  及び  $G\alpha_{12}$  と、Ric-8B は  $G\alpha_s$  及び  $G\alpha_q$  と結合する。さらに *in vitro* において Ric-8A が  $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$  及び  $G\alpha_{12}$  に対する GEF 活性を有すること、 $G\alpha_q$  のシグナルを増強する機能を有することが明らかとなった(Tall, G.G., *et al.* 2003; Nishimura, A. *et al.* 2006)。それに対し、Ric-8B は  $G\alpha_s$  及び  $G\alpha_{olf}$  に対する GEF 活性を有することが報告されている(Von Daneecker, L.E., *et al.*, 2005; Chan, P., *et al.*, 2011)。さらに、Ric-8A は  $G\alpha_i$  及び  $G\alpha_q$ 、Ric-8B は  $G\alpha_s$  と結合することで  $G\alpha$  のユビキチン化を抑制しプロテアソームによる分解を抑制することが示されている(Chishiki, K., *et al.*, 2013; Nagai, Y., *et al.*, 2010; Jenie, R. I., *et al.*, 2013)。これに加え、Ric-8A 及び Ric-8B はターゲット G タンパク質の発現量増加や局在に影響を与えることからシャペロン活性を有し、G タンパク質の膜局在化や安定性を向上に寄与するとも考えられている(Gabay, M., *et al.*, 2011; Chan, P., *et al.*, 2013)。このように、Ric-8 は  $G\alpha$  に対する様々な機能を有し、G タンパク質シグナルを増強する役割を担うと考えられている(図 1 B)。

線虫やショウジョウバエの胎生初期において Ric-8 が非対称細胞分裂に必須であること、さらに Ric-8A のノックアウトマウスは胎生致死を示すことから、Ric-8A も哺乳類胎生期において機能を担うことが考えられる(Afshar, K., *et al.*, 2004; David, N. B., *et al.*, 2005; Wang, H., *et al.*, 2005; Tonissoo, T., *et al.*, 2010)。Ric-8A は  $G\alpha_i$  と複合体を形成することで細胞分裂時の紡錘体牽引力を制御する役割を担うことが示された (Cho, H., and Kehrl, J., 2008; Woodard, G., *et al.*, 2010; Boullaran, C., *et al.*, 2014)。M 期の紡錘体極延長線上にある細胞膜において GTP- $G\alpha_i$  は LGN/NuMA/ダイニン複合体と結合し、ダイニンの活性により紡錘体の牽引力を発生させる。Ric-8A は M 期における  $G\alpha_i$  の活性化を促し、紡錘体極の延長線上に  $G\alpha_i$  及び LGN/NuMA/ダイニン複合体をリクルートする機能を有する。よって Ric-8A 発現抑制や  $G\alpha_i$  の阻害は紡錘体牽引力の低下を起し、有糸分裂の失敗や遅延を惹起すると考えられている。

### 1.3 中心体

中心体は微小管形成中心(Microtubule Organizing Center: MTOC)として機能する細胞小器官である。中心体は垂直に配向した 2 つの中心小体とそれを取り囲む周辺タンパク質群 (Pericentriolar Material: PCM)によって中心体を構成している(図 2 A)。中心小体はトリプレットのチューブリン 9 本が対称に配向したシリンダー様の構造を持ち、線虫から哺乳類に至るまで幅広く保存されている。中心体の主な機能は細胞周期 M 期での紡錘体形成による染色体分配である。G1 期の細胞は 2 つの中心小体を持ち、S 期から G2 期にかけて複製→成熟を経て 4 つの中心小体へと複製される。M 期における核膜崩壊後、2 対の中心小体はそれぞれ両極へ配向し、MTOC 活性により紡錘体を

形成し染色体を分配する。細胞質分裂後、1細胞は2つの中心小体を有し再び細胞周期が進行する(図2B)。その他の中心小体の機能として繊毛形成が挙げられる。細胞周期G0期において中心小体は細胞膜近傍に移動し、微小管を伸長させることで細胞外に突出した繊毛を形成することが知られる。繊毛の一つである一次繊毛には様々なシグナル伝達因子が集積し、WntシグナルやHedgehogシグナルの足場として機能していることが報告されている(Eggenchwiler J.T., *et al.* 2007)。これらのことから、中心小体は胎生期における細胞分裂から成体期におけるシグナル伝達を制御する重要な細胞内小器官であると考えられる。

#### 1.4 中心小体複製過程

中心小体の複製は細胞周期と密接に関連し、細胞周期ごとに一度だけ複製される(Strnad, P. and Gonczy, P., 2008)。G1/S期においてCyclin-E/CDK2複合体はDNA合成を制御すると共に、中心小体複製開始を制御することが知られる(Hanashiro, K., *et al.*, 2008)。中心小体複製に関与するCyclin-E/CDK2の基質はCP110などが知られているが(Chen, Z., *et al.*, 2002)、詳細なメカニズムは不明なままである。CDK2の活性化後、PLK4 (Polo Like Kinase 4)の活性化が誘導される。PLK4は中心小体複製必須因子として線虫からヒトまで広く保存された中心小体キナーゼの一種である。PLK4の基質の一つとして知られるSAS-6 (Spindle ASsembly abnormal protein-6)は中心小体の複製基点となるCart wheel構造の主骨格である。Cart wheel構造とはSAS-6のコイルドコイルドメインで結合したホモ二量体がN末端同士で結合し、9回対称性構造物を形成した中心小体基底部である(Kitagawa, D., *et al.*, 2011)。PLK4は中心小体へのSAS-6リクルートを制御しCart wheel構造の形成を開始させる(Ohta, M., *et al.*, 2014)。このような中心小体複製開始を担うPLK4やSAS-6などの中心小体必須因子を過剰発現させると中心小体の過剰複製が誘導されることが知られている(Kleylein-Sohn, J., *et al.*, 2007; Strnad, P., *et al.*, 2007)。

中心小体複製開始起点であるCart wheel構造が形成されると中心小体は伸長・成熟の過程を経るが(Strnad, P. and Gonczy, P., 2008)、その過程では中心小体タンパク質が輸送されている。輸送には中心体に繋がった微小管ネットワークを通じてCentriolar satellites (CS)と呼ばれる構造物が担う(Dammermann, A. and Merdes, A., 2002)。CSは70 nm-100 nmの球状のelectron dense materialであり、中心体の周りでダイニンの活性により常に動いている(Kubo, A., *et al.*, 1999)。CS構成因子の一つであるPCM-1 (PeriCentriolar Material-1)はCSの足場を形成しているタンパク質であり、PCM-1発現抑制などによって誘導されるCSの不安定化は中心小体の複製停止や繊毛形成不全などの症状を引き起こす(Kodani, A., *et al.*, 2015; Kim, J., *et al.*, 2008)。CSは様々なタンパク質を輸送しており、CSの異常による中心体への輸送失敗は小頭症(Microcephaly)な

どの原因となることが知られる(Barbelanne, M. and Tsang, W., 2014)。小頭症は胎生期における神経幹細胞の細胞分裂異常により脳発達が未成熟になることが原因であるとされており、CS が中心体機能の一端を担い、生理機能を維持するために重要な構造物であることが推測される。

このように、中心小体は S 期から M 期にかけて複製基点の形成(Cart wheel 構造)、伸長・成熟、CS によるタンパク質輸送などにより制御され、中心小体数を厳密に維持している。

## 1.5 中心小体数異常と細胞分裂

厳密に維持されている中心小体複製過程に何らかの原因により異常を来した場合、中心小体の数や構造に異常が起きる。例えば、細胞周期が乱れ S 期が伸長した場合、中心小体が 1 度ではなく複数回の複製が起き、異常な数の中心小体を形成する、①中心小体の再複製が起こる。これは特に細胞周期制御タンパク質の異常などが要因となる(Wong, C. and Stearns, T., 2003)。次に S 期初期に起こる中心小体複製開始段階の異常では、異常な数の Cart wheel 構造の形成により中心小体が一度に 3 つ以上形成される、②過剰複製が挙げられる。これは Cart wheel 構造の主骨格である SAS-6 や複製開始を制御する PLK4 の過剰な発現や活性が原因の一つとして知られる(Kleylein-Sohn, J., *et al.*, 2007; Strnad, P., *et al.*, 2007)。そして中心小体複製過程中に絶えず起こっている中心小体へのタンパク質輸送に異常を来した、③タンパク質輸送異常で数や構造の異常が起こる。この表現型は輸送を担う CS タンパク質の欠失や PCM 構成タンパク質の欠損による微小管ネットワークの破綻などが要因として報告されており(Madarampalli, B., *et al.*, 2015; Hori, A., *et al.*, 2015)、中心小体タンパク質の凝集体や中心小体の断片化を誘導する。その他に、細胞分裂時の異常である細胞質分裂の失敗は中心小体の蓄積を起こし、これもまた中心小体が過剰な数見られる原因の一つである。このような場合、過剰複製・再複製・細胞分裂失敗では中心小体の異常増加が、タンパク質輸送異常は中心小体タンパク質の凝集物形成が起こる。

過剰に形成された中心小体が MTOC 活性を有していた場合、細胞分裂の錯乱を引き起こす。通常、2 つの中心小体が 1 つの紡錘体極として機能し、双極に位置した紡錘体極が双極性紡錘体を形成することで正常な細胞分裂を行う。しかしながら過剰な中心小体が形成された場合、紡錘体極が 3 つ以上になり多極性の紡錘体(Multi-polar spindle)を形成することが度々起こる。さらに、一見、双極性紡錘体であるが、片側の紡錘体極に 4 つ以上の中心小体が集積した Pseudo-bipolar 紡錘体といった表現型も観察される。多極性紡錘体は染色体の正常な分配が行われず、分裂後に細胞死もしくはゲノム不安定な状態を維持して生き残る。Pseudo-bipolar 紡錘体は紡錘体の左右の牽

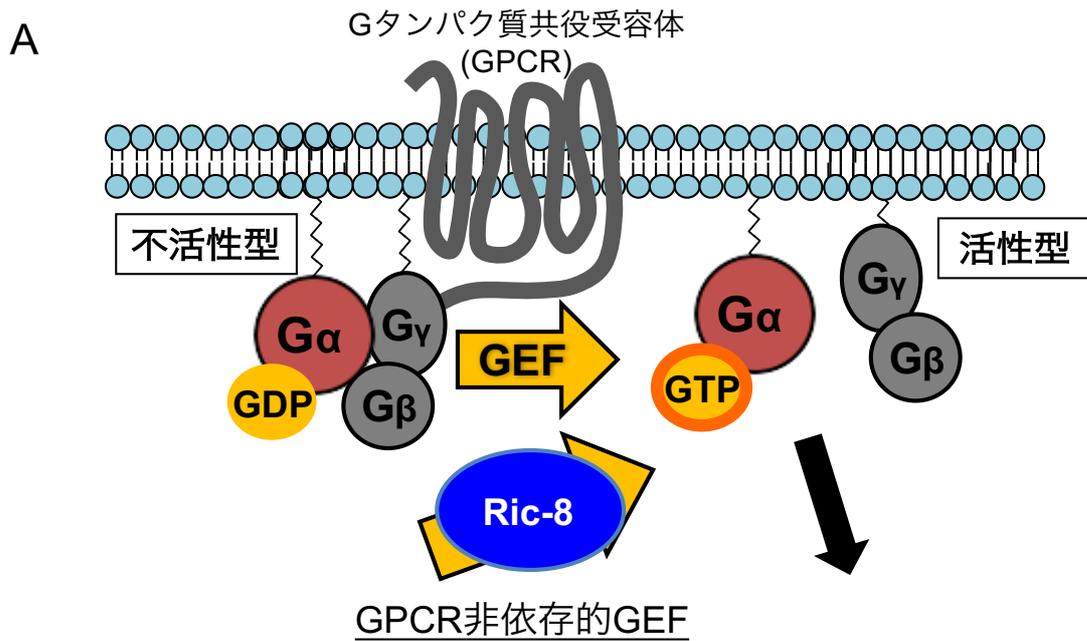
引力に差が生じてしまい、均等な染色体分配が失われることでゲノム不安定な状態を誘導する(Ganem, N., *et al.*, 2009)。それぞれの異常紡錘体においてゲノム不安定な状態を誘導し、これがガン化の原因となることが知られる(Levine, M., *et al.*, 2017)。現に、がん組織では1つの細胞に5つ以上の中心小体が確認される事が多い。このように、中心小体の複製過程の厳密な制御機構は中心小体の正常な数を維持することにより細胞の恒常性維持やガン化の抑制に重要な役割を有している。

### 1.6 Ric-8A、Gai、PKA と中心体の関係性

これまでに Ric-8A が中心体に関係する数少ない知見として、Ric-8A が細胞質のみならず中心体においても局在すること、さらに Ric-8A の下流  $G\alpha$  の一つである Gai の過剰発現を行うと中心体付近に局在することが報告されている(Woodard, G., *et al.*, 2010; Cho, H and Kehrl, H., 2007)。Gai が制御する cAMP によって活性化する PKA (protein kinase A) に関しては AKAP9 (A-kinase anchoring protein 9; 別名 AKAP350, AKAP450, CG-Nap, Yotiao) や中心体タンパク質 Pericentrin (別名 Kendrin) と結合し、中心体に局在することが知られる(Takahashi, M., *et al.*, 1999, Diviani, D., *et al.*, 2000)。PKA は調節サブユニット(R)と触媒サブユニット(C)のそれぞれ2つずつが会合した四量体構造をとり、調節サブユニットに cAMP が結合すると触媒サブユニットが解離し、触媒サブユニットが基質をリン酸化する。PKA は調節サブユニットを介して AKAP タンパク質と結合し、局在が制御されている(Wong, W., and Scott, J., 2004)。AKAP9 は中心小体の proximal 側及びゴルジ体に局在し、PKA の局在制御のみならず足場タンパク質として中心体タンパク質(Cep170 や Cep68)の局在を制御する(Takahashi, M., *et al.*, 1999; Kolobova, E., *et al.*, 2017)。さらに、AKAP9 は中心小体複製への関与が知られ(Keryer, G., 2003)、AKAP9 の過剰発現は Cyclin-E / CDK2 複合体の過剰なリクルートを起こし中心体が異常に増加することや(Nishimura, T., *et al.*, 2004)、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞において AKAP9 発現抑制で DNA 合成が止まることにより中心体複製が抑制されることが報告されている(Mattaloni., *et al.*, 2013)。さらに AKAP9 には PDE4D3 と呼ばれるホスホジエステラーゼが結合し中心体における cAMP 量を調節すること(Terrin, A., *et al.*, 2012)、PKA が中心小体タンパク質である Centrin を M 期にリン酸化することが報告されている(Lutz, W., *et al.*, 2002)。このように、中心体における PKA や AKAP9 の関与は幾つか報告があるのに対し、Ric-8A 及び Gai に関しては知見が少なく、Ric-8A シグナルが中心体形成に関与するか不明である。

## 1.7 本研究の目的

これまでに Ric-8A 及び Ric-8B の担う細胞機能に関しては知見が殆ど無い。このことから、本研究では哺乳類 Ric-8A 及び Ric-8B が持つ未解明の細胞機能の解明を目指した。その結果、Ric-8A 発現抑制時に異常な数の中心小体タンパク質が見られ、さらに異常な細胞分裂が増えることを見出した。この結果から、Ric-8A が制御する細胞分裂は紡錘体の牽引力調節のみならず、複数の制御機構を持つことが示唆された。



GEF: GDP-GTP交換反応因子

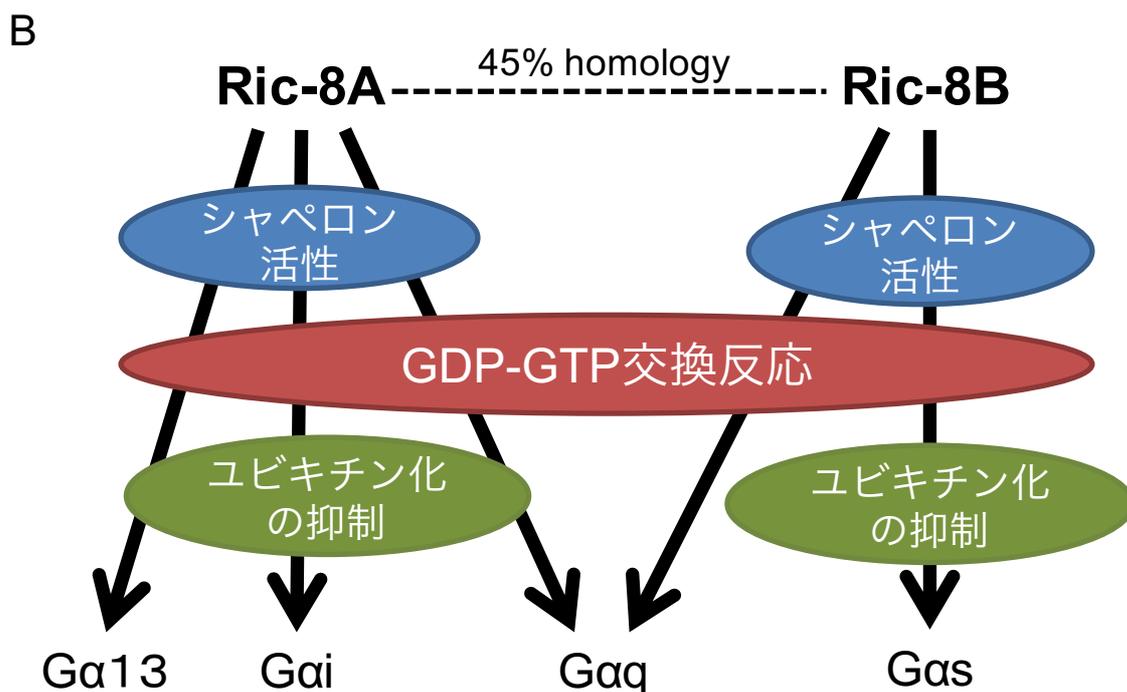


図1 三量体Gタンパク質シグナルと Ric-8 の機能

A) 三量体Gタンパク質シグナル模式図。Ric-8は細胞質に存在するGPCR非依存的なGタンパク質活性化因子である。(GEF: GDP-GTP exchange factor)

B) 哺乳類 Ric-8 の機能とターゲット Ga を示す。脊椎動物は Ric-8A 及び Ric-8B という2つのホモログを持ち、Ga に対する特異性が異なる。

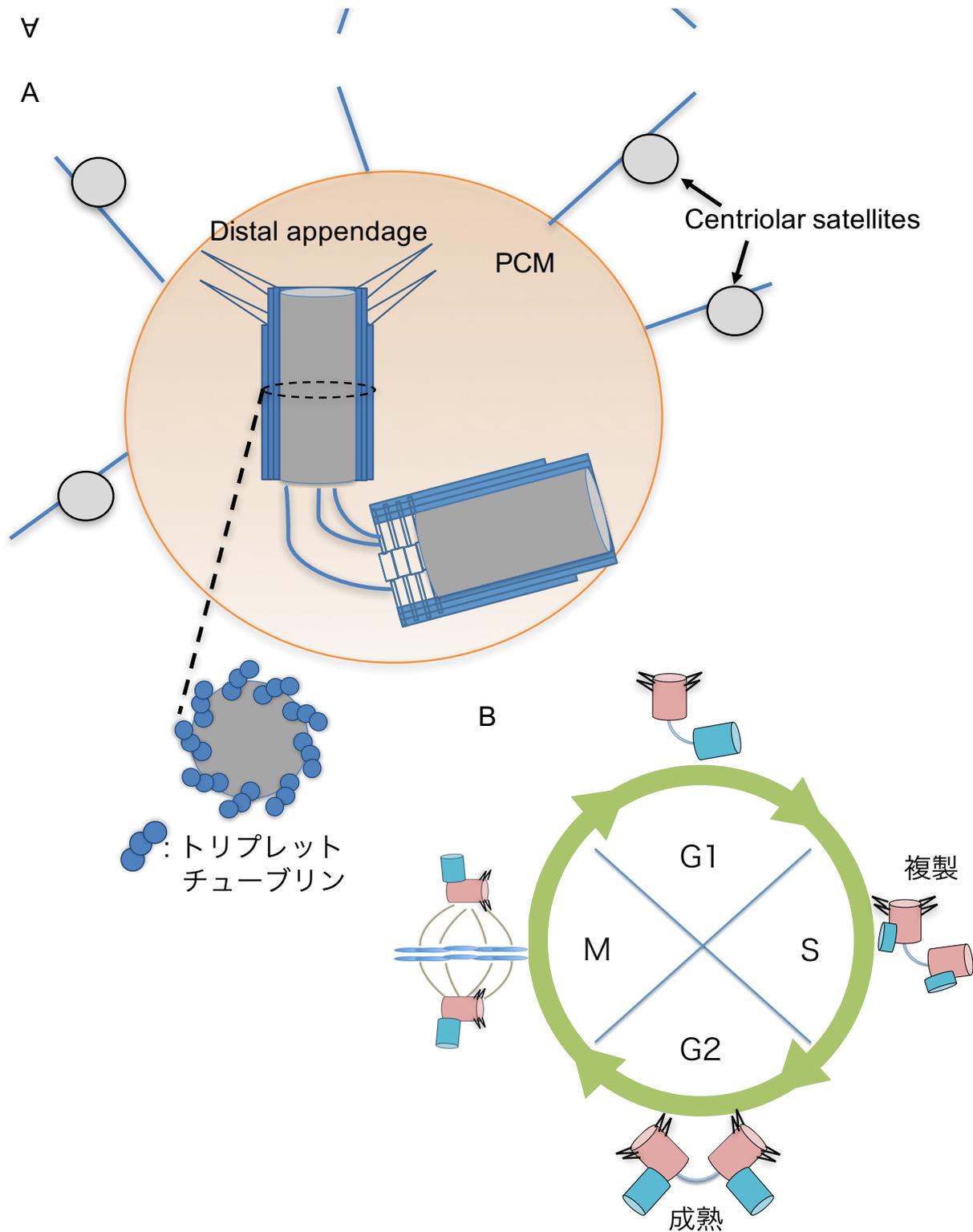


図2 中心体模式図及び中心小体複製過程

A) 中心体の模式図。中心体は2つの中心小体とその周りを取り囲むPCMによって構成されている。中心小体の主骨格はトリプレットチューブリンである。PCMには微小管ネットワークが連結しており、Centriolar satellitesによってタンパク質輸送が行われている。

B) 細胞周期中における中心小体複製過程を示す。G1期の2つの中心小体はS期に入ると複製を開始し、G2期にかけて成熟が起こることで新たな中心小体を完成し、M期において紡錘体極として働き、細胞分裂とともに再分配されるサイクル様式をとる。

## 第2章 材料と方法

### 2.1 細胞培養

ヒト骨肉腫由来U2OS細胞、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞及びヒト胎児腎臓由来HEK293T細胞は10%ウシ胎児血清、100 µg/mlストレプトマイシン及び100 U/mlペニシリンを含むDoublecco's modified eagle's medium (DMEM: nacalai tesque #0848-16)中で、37 °C, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。ヒト結腸がん由来Caco-2細胞は20%ウシ胎児血清、100 µg/mlストレプトマイシン及び100 U/mlペニシリンを含むModified Eagle's Medium (MEM; nacalai tesque #21443-15)中で、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

### 2.2 試薬及び抗体

細胞への処理薬剤と抗体について以下に記述する。

処理薬剤	メーカー	Cat. No.
百日咳毒素 (pertussis toxin: PTX)	Calbiochem	51656069
Dibutryl-cAMP (dbcAMP)	Sigma Aldrich	D0627
KT5720	Calbiochem	420320
Thymidine	Sigma Aldrich	T1895
Bromodeoxyuridine (BrdU)	Roche	10280879001
Static	Abcam	ab120952
抗体		Cat. No.
Anti-Ric-8A rabbit monoclonal antibody	Abcam	ab97808
Anti-Gai 2 rabbit polyclonal antibody	愛媛県心身障害者コロニー 発達障害研究所 浅野富子先生より譲渡	
Anti-Gai 1/2 rabbit polyclonal antibody	愛媛県心身障害者コロニー 発達障害研究所 浅野富子先生より譲渡	
Anti-Gas rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-383
Anti-Gaq/11 rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-393
Anti-Gα12 rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-409
Anti-Gα13 rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-410

Anti-Gβ rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-378
Anti-CP110 rabbit polyclonal antibody	New York大学 Brian David Dynlacht教授 より譲渡 (Chen, Z., <i>et al.</i> , 2002)	
Anti-CP110 rabbit polyclonal antibody	Bethyl	A301-343A
Anti-Centrin mouse monoclonal antibody	Millipore	04-1624
Anti-Talpid3 rabbit polyclonal antibody	New York大学 Brian David Dynlacht教授 より譲渡 (Kobayashi, T., <i>et al.</i> , 2014)	
Anti-γ-tubulin mouse monoclonal antibody	Abcam	Ab-11316
Anti-γ-tubulin goat polyclonal antibody (C-20)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7396
Anti-Cep164 goat polyclonal antibody (N-14)	Santa Cruz Biotechnology	sc-240226
Anti-Glutamylated tubulin mouse monoclonal antibody (GT335)	Adipogen	AG-2013-0020
Anti-C-nap1 rabbit polyclonal antibody	Protein tech	14998-1-AP
Anti-PCM-1 rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-67204
Anti-HsSAS6 mouse monoclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-81431
Anti-PLK4 mouse monoclonal antibody (6H5)	Merck Millipore	MABC544
Anti-SPAG5 rabbit polyclonal antibody	Protein tech	14726-1-AP
Anti-BrdU mouse polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-32323
Anti-FLAG mouse monoclonal antibody (M2)	Sigma Aldrich	F1804
Anti-FLAG rabbit monoclonal antibody	Sigma Aldrich	F7425
Anti-Myc mouse monoclonal antibody (9E10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-40Ac
Anti-c-Myc rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-789

Anti-β-actin antibody	mouse	monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778
-----------------------	-------	------------	--------------------------	----------

## 2.3 プラスミドとsiRNA

### ・ pCMV5-Flag-SPAG5

ヒト骨肉腫由来U2OS細胞からSepasol-RNA 1 Super G (Nacalai Tesque #09379)を用いてRNAを抽出後、SuperScript IIIとOligo(dT)20を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作成した。cDNAを鋳型として以下に示すプライマーを用いて、1段階目に5'UTRから3'UTR領域、2段階目に翻訳領域をPCR反応にて増幅させた。その後、pCMV5-Flagベクターに挿入した。

### SPAG5 nested PCR

FW: 5'-CTCGACTTGGTCTGAGACGTGA-3'

RV: 5'-GGGTAAGGGGGTATTGCAGGTAA-3'

### SPAG5 2<sup>nd</sup> PCR (下線部は制限酵素サイトを付加したことを示す)

FW: 5'-TTGTCGACATGTGGCGAGTGAAAAAACTGAGC-3' (SalI付加)

RV: 5'-TTCCCGGGTTAGCTCAGAAATTCCAGCAATCCC-3' (SmaI付加)

### ・ pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) hRic-8A

当研究室の仲山が下記のオリゴDNAを用いて作成(下線部は制限酵素サイトを付加したことを示す)。pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)はAddgene社から購入した(Ran, F., *et al.*, 2013)。

FW: 5'-CACCGACGGCTTCTGCAACCGCCCG-3'

RV: 5'-AAACCGGGCGGTTGCAGAAGCCGTC-3'

Target sequence: 5'-CCCCGGGCGGTTGCAGAAGCCGT-3'

(hRic-8A coding region 7-29bpの配列)

### ・ pCMV5-Flag-mRic-8A, pCMV5-Myc-Ric-8A (Mouse)

マウス脳由来 cDNA を鋳型とし Nishimura, A., *et al.*, 2006 にて作成。

### ・ pCMV5-myc-PKA C-subunit WT (Rat)

浦野大輔, 博士論文, (2008)にて作成

・ pCMV5-Gai2 WT, pCMV5-Gai2 QL, pCMV5-Flag-Gai2 WT, pCMV5-Flag-Gai2 QL (Human)

当研究室にて保有。

・ pCMV5-myc-PKA C-subunit K73R (KD; Rat)

当研究室にて保有。

・ sihRic8A

#1: GUGUCUGGAUGUUCUCCUC、Dharmacon、BBISJ-002621

#2: GCUUGUCCGCCUCAUGACA、Dharmacon、BBISJ-002623

・ sihAKAP9

AACUUUGAAGUUAACUAUCAA、Sigma

## 2.4 タンパク質過剰発現系並びに遺伝子発現抑制実験

・ HEK293T細胞への遺伝子導入

HEK293T細胞を10 cmディッシュに $1.6 \times 10^5$  cells播種し、翌日ポリエチレンイミンMAX (PEI MAX、Polysciences #24765)を用いてPEI法により遺伝子導入を行った。プラスミドDNA溶液に対しPEI溶液を5倍量加え、ボルテックス後20分室温でインキュベートしたのち、細胞培地に全量滴下し、24時間培養後に培地交換を行った。細胞回収は遺伝子導入から48時間後行った。

・ U2OS、Caco-2細胞へのトランスフェクション

タンパク質過剰発現系ではLipofectamine 2000 (Invitrogen #11668)、遺伝子発現抑制系ではLipofectamine RNAiMAX (Invitrogen #13778)を用いたリポフェクション法により遺伝子導入を行った。特に記述が無い場合、遺伝子導入から6時間後に培地交換を行い、更に42時間培養し細胞を回収した。過剰発現プラスミドとsiRNAを同時に導入する際にはLipofectamine 2000を用いた。

## 2.5 Ric-8A ノックアウト細胞の作成

6well plate に U2OS 細胞を  $1.5 \times 10^5$  cells で播種し、1 日培養した。その後、

pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) hRic-8A プラスミドを Lipofectamine 2000 で遺伝子導入し、6 時間後に培地交換、その後 42 時間後に Trypsin/EDTA にて剥離させ 0.05% BSA, 2 µg/ml PI (Propidium Iodide)/PBS 溶液にて再懸濁し細胞懸濁液とした。フローサイトメトリー (FACS Aria special order、Becton Dickinson)を用いて細胞懸濁液中の GFP 陽性細胞を 96 well plate に 1 cell / well でソーティングし、約 2 週間培養した。生存した細胞を適宜スケールアップし、Ric-8A ノックアウト (KO) 細胞候補株とした。細胞株の一部は Cell lysis buffer を用いて細胞抽出液を調製後、Ric-8A タンパク質量を anti-Ric-8A 抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。Ric-8A の発現が見られなかった細胞株のゲノム変異を検討するために、Quick Extract DNA Extract solution (epicentre)を用いてゲノム DNA を抽出し、抽出した DNA を鋳型として以下に示すプライマーと Ex-taq polymerase (Takara #RR001A)を用いて 2 度 PCR 反応を行いゲノム上の Ric-8A KO target 領域を増幅させた。その後シーケンサーを用いて増幅した PCR 産物の塩基配列を解読した。

#### Ric-8A genome nested PCR (1<sup>st</sup> PCR)

FW: 5'-ATCGGTTCTGTGGAGCTCGAG-3' (chromosome 11 GRCh38. P7 980-1000)

RV: 5'-TCAGAACGGATGGCAGGGTC-3' (chromosome 11 GRCh38. P7 1641-1660)

#### Ric-8A genome direct PCR (2<sup>nd</sup> PCR)

FW: 5'-GGCTGAGATCGTTTCCTGTTGG-3' (chromosome 11 GRCh38. P7 1035-1056)

RV: 5'-CAACACTGCATCCCAGACCTG-3' (chromosome 11 GRCh38. P7 1561-1581)

#### Ric-8A direct sequencing

FW: 5'-TCGGTTCAGAGCGACTCAGC-3' (chromosome 11 GRCh38. P7 1101-1120)

RV: 5'-CCTACGCTTGCTGACACAGC-3' (chromosome 11 GRCh38. P7 1519-1538)

## 2.6 Western blotting

遠心分離により回収した細胞にCell lysis buffer (50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5%(v/v) NP-40, 10% (w/v) Glycerol, 1 mM DTT, 2 µg/ml Leupeptin, 0.5 mM PMSF)にて懸濁し、on iceで30分インキュベート後、15000 rpm, 4 °C, 15分間遠心分離し上清を回収した。CBB G-250溶液 (5倍濃縮、Nacalai tesque #29449-15)を用いたBradford法により上清のタンパク質量を測定し任意の濃度に希釈後、sample buffer (5x)を加え95 °Cで5分間インキュベートしサンプルとした。アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し、その後 polyvinylidene difluoride

membrane (PVDF膜: Millipore #IPVH00010)に転写した。転写したメンブレンをBlocking buffer (4% (W/V) skim milk / PBS-T)中で30分振盪しブロッキング後、Blocking bufferで希釈した一次抗体を用いて室温2時間静置し一次抗体反応を行った。その後メンブレンをPBS-T (137 mM NaCl, 8 mM NaHPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% (W/V) Tween-20)で洗浄し、Blocking bufferで希釈したHRP標識二次抗体を用いて室温1時間静置し二次抗体反応を行った。再びメンブレンをPBS-Tで洗浄後、Chemi-Lumi One (Nacalai tesque #07880-70)もしくはChemi-Lumi One Ultra (Nacalai tesque #11644-40)を用いて化学発光を検出した。

#### WBで用いた一次抗体及び希釈率

Anti-Ric-8A rabbit monoclonal antibody: 1/1000  
Anti-Gai 2 rabbit polyclonal antibody: 1/500  
Anti-Gai 1/2 rabbit polyclonal antibody: 1/1000  
Anti-Gas rabbit polyclonal antibody: 1/1000  
Anti-Gaq/11 rabbit polyclonal antibody: 1/500  
Anti-Ga12 rabbit polyclonal antibody: 1/500  
Anti-Ga13 rabbit polyclonal antibody: 1/500  
Anti-Gβ rabbit polyclonal antibody: 1/1000  
Anti-PCM-1 rabbit polyclonal antibody: 1/1000  
Anti-HsSAS6 mouse monoclonal antibody: 1/1000  
Anti-PLK4 mouse monoclonal antibody (6H5): 1/1000  
Anti-SPAG5 rabbit polyclonal antibody: 1/1000  
Anti-FLAG mouse M2 monoclonal antibody: 1/2000  
Anti-FLAG rabbit monoclonal antibody : 1/1000  
Anti-Myc mouse monoclonal antibody (9E10): 1/1000  
Anti-c-Myc rabbit polyclonal antibody: 1/1000  
Anti-β-actin mouse monoclonal antibody: 1/2000

#### 二次抗体及び希釈率

Anti-Mouse-IgG, HRP-Linked F (ab')<sub>2</sub> Fragment (GE Healthcare #NA-9310): 1/5000  
Anti-Rabbit-IgG, HRP-Linked F (ab')<sub>2</sub> Fragment (GE Healthcare #NA-9340): 1/5000

## 2.7 免疫沈降実験

HEK293T細胞に発現プラスミドを導入し48時間後、遠心分離により細胞を回収し

Cell lysis bufferにて懸濁後on iceにて30分間インキュベートした。その後15000 rpm、4°C、15分間遠心分離し上清を回収した。得られた上清にAnti-FLAG M2 affinity Gel (Sigma Aldrich #A2220)を添加し4°Cにて3時間緩やかに混和することで反応させた。その後、Cell lysis bufferにて6回洗浄を行い、Sample bufferを添加し95 °Cで5分間インキュベートすることで沈降物を溶出させ、このサンプルをwestern blot法により解析した。

## 2.8 免疫染色

細胞が接着したカバーガラスをPBSで1度洗浄後、適したfixation solutionを添加し各条件でインキュベートすることで細胞を固定した。PBSを用いて2度洗浄後、膜透過処理のために0.2% triton x-100 / PBSを添加し室温で10分間インキュベートした。再びPBSで2度洗浄後、Blocking solution (5% BSA / PBS)を添加し室温で30分間静置しブロッキングを行った。次にBlocking solutionで希釈した一次抗体溶液を用いて室温で3時間の一次抗体反応を行った。PBSで10分間ごとに3回PBSで洗浄し、蛍光物質で標識された二次抗体とDNA染色のためのHoechst 33324 (Nacalai tesque # 04929-82)をBlocking solutionで希釈したものをを用いて暗所室温で1時間の二次抗体反応を行った。PBSで洗浄後、Mountant, PermaFlour (Thermo scientific #TA-030-FM)を用いて包埋した。その後蛍光顕微鏡Axio Observer (Carl Zeiss)を用いて蛍光を観察した。

### Fixation solution、固定条件

- 4% Paraformaldehyde(PFA) / PBS、室温10分間
- -30°C 100 % MeOH、on ice 5分間
- 3.7% formalin、室温10分間

### 免疫染色で用いた一次抗体及び希釈率

Anti-Ric-8A rabbit monoclonal antibody: 1/1000

Anti-Gai 2 rabbit polyclonal antibody: 1/1000

Anti-CP110 rabbit polyclonal antibody (Chen, Z., et al. 2002): 1/1000

Anti-CP110 rabbit polyclonal antibody (Bethyl #A301-343A): 1/500

Anti-Centrin mouse monoclonal antibody: 1/1000

Anti-Talpid3 rabbit monoclonal antibody: 1/1000

Anti- $\gamma$ -tubulin mouse monoclonal antibody (abcam #27074): 1/500

Anti- $\gamma$ -tubulin goat polyclonal antibody (C-20) (Santa Cruz Biotechnology #sc-7396): 1/500

Anti-Cep164 goat polyclonal antibody: 1/200

Anti-Glutamylated tubulin mouse monoclonal antibody (GT335): 1/1000

Anti-C-Nap1 rabbit polyclonal antibody: 1/1000

Anti-PCM-1 rabbit polyclonal antibody: 1/1000  
Anti-HsSAS6 mouse monoclonal antibody: 1/500  
Anti-PLK4 mouse monoclonal antibody (6H5): 1/100  
Anti-SPAG5 rabbit polyclonal antibody: 1/500  
Anti-BrdU mouse polyclonal antibody: 1/1000

#### 二次抗体及び希釈率

Alexa 488-labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probe #A11029): 1/3000  
Alexa 488-labeled donkey anti-mouse IgG (Molecular Probe #A21202): 1/3000  
Alexa 488-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe #A11034): 1/3000  
Alexa 488-labeled donkey anti-goat IgG (Molecular Probe #A11055): 1/3000  
Alexa 594-labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probe #A11032): 1/3000  
Alexa 594-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe #A11012): 1/3000  
Alexa 594-labeled donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probe #A21207): 1/3000  
Alexa 594-labeled donkey anti-goat IgG (Molecular Probe #A11058): 1/3000  
Alexa 350-labeled donkey anti-mouse IgG (Molecular Probe #A10035): 1/3000

## 2.9 qPCR

細胞からSepasol-RNA 1 Super G (Nacalai Tesque #09379)を用いてRNAを抽出後(製品のprotocol準拠)、ReverTraAce qPCR RT kit (Toyobo #FSQ-101)を用いて逆転写反応を行った(製品のprotocol準拠)。500 ngのRNAを鋳型としcDNAを作成した。得られたcDNAにTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo #QPS-201)と以下に示すプライマーを添加し、Lightcycler 96 (Roche)にてPCR反応及び定量を行った。

### hAKAP9

FW: 5'- GAGAGTGAGAAACCAAGCCAAG -3'

RV: 5'- TACTGCTGAGCTCCACTTGC -3'

### hGAPDH

FW: 5'- GGCTGAGAACGGGAAGCTTG -3'

RV: 5'- ACTCCACGACGTACTCAGCG -3'

## 2.10 BrdUを用いたDNA合成解析

細胞をカバーガラスに接着させ、回収1時間前にBrdUを終濃度10  $\mu$ Mで添加し、1時間培養することでBrdUを細胞に取り込ませた。PBSで洗浄し、4% PFA / PBSを添加し室温10分間静置することで固定した。PBSで洗浄後、0.2% triton x-100 / PBSを添加し

室温10分間静置し膜透過処理を行った。洗浄後、核を露出させるために4 M HClを添加し室温10分間インキュベートした。PBSで3度洗浄後、Blocking bufferにてブロッキングを行い、Anti-BrdU抗体を用いた免疫染色を行いサンプルとした。サンプルを蛍光顕微鏡にて観察し、Hoechstの数に対するBrdU陽性細胞の割合を算出し、細胞周期S期の細胞の割合とした。

### 2.11 フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析

細胞をtrypsin / EDTA溶液により剥離させ遠心分離により回収し、PBSで1度洗浄した。PBSで懸濁後、ボルテックスをしながら-30 °C 100% EtOHを終濃度70%になるように滴下し、on iceで30分間静置して細胞を固定した。PBSで2度洗浄後、再びPBSで懸濁しRNaseを終濃度100 µg/mlになるように添加し37°Cで20分間インキュベートすることでRNAを分解した。遠心分離し上清を除去後、PBSで再懸濁しPIを終濃度5 µg/mlになるよう添加しon iceで20分間インキュベートした。その後0.1% BSA / PBSを加え希釈し、フローサイトメトリー(FACS Calibar、Becton Dickinson)を用いてPIの蛍光強度分布を測定した。得られたデータは解析ソフトウェアFlowjo (FLOWJO, LLC)を用いて細胞周期を算出した。

### 2.12 Double thymidine block法によるG1/S期での細胞周期同調

培養細胞に終濃度2 mMになるようにThymidine溶液を培地に添加し、16時間培養した。その後培地を除去しPBSで2度洗浄後、8時間培養した。再度終濃度2 mMになるようにThymidine溶液を培地に添加し、16時間培養した。培地を除去しPBSで2度洗浄後、培地を添加した細胞をG1/S期に同調した細胞として各実験に用いた。

### 2.13 微小管再合成アッセイ

培養細胞を回収前に氷上で1時間インキュベーションし、細胞内の微小管構造を破壊した。その後、再び37 °Cにてインキュベーションを行うことで微小管伸長を促し、任意のタイミングで回収、固定後に免疫染色し観察した。

## 第3章 結果

これまでに Ric-8A は Gai、Gaq 及び Ga13 に対する GEF 活性を有すること、Gai 及び Gaq に対しユビキチン化を抑制及びシャペロン活性を持つことなどが明らかとされ(Tall, G.G., *et al.* 2003; Chishiki, K., *et al.*, 2013; Gabay, M., *et al.*, 2011)、分子レベルの機能は解明されつつある。しかし、Ric-8A の制御する生理機能の報告は数少なく、生理機能の解明には更なる表現系の探索と制御機構の解明が重要である。そのためまず Ric-8A 発現抑制による表現系の確立 (3.1 章)、次に下流  $G\alpha$  シグナルの解析 (3.2 章)、増加した構造物の解析 (3.3 章)、及び MTOC 活性への影響解析 (3.4 章)、そして原因となる下流因子の検討 (3.5 章) を行い、Ric-8A が制御する生理機能の分子機構の解明を目指した。

### 3.1 Ric-8A 発現抑制及びノックアウトにより引き起こされる中心小体様構造体の形成

#### 3.1.1 背景

先に述べた通り、Ric-8A の制御する生理機能を明らかにするため、培養細胞を複数種用いた Ric-8A 発現抑制実験と、CRISPR/Cas9 システムを利用し樹立した Ric-8A ノックアウト細胞を用い、表現系の解析を行うことで Ric-8A が持つ細胞機能について探索を行った。

#### 3.1.2 siRNA を用いた Ric-8A 発現抑制による表現型の確立

ヒト Ric-8A に対する siRNA を用いてヒト骨肉腫 U2OS 細胞及びヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞の Ric-8A 発現抑制を行い(図 3 A)、免疫染色法によって細胞の様子を観察した。その結果、Ric-8A を発現抑制したそれぞれの細胞種において中心小体マーカー (CP110、Centrin、Talpid3) の異常な数(4<)が観察された(図 3 B, C)。この結果から、Ric-8A 発現抑制は中心小体の数に影響する可能性が示唆された。

#### 3.1.3 Ric-8A 発現抑制における増加した中心小体の構造推察

Ric-8A 発現抑制で見られた中心小体タンパク質の異常増加において、正常な構造の中心小体が増加しているのか、中心小体タンパク質の凝集体が増加しているのかを検討するために、中心小体における詳細な局在が知られる中心小体タンパク質の増加を確認した。中心小体の Distal 側に局在する CP110、Centrin、Talpid3、Proximal 側に局在する C-Nap1、主骨格であるグルタミル化チューブリン、母中心小体特異的な構造

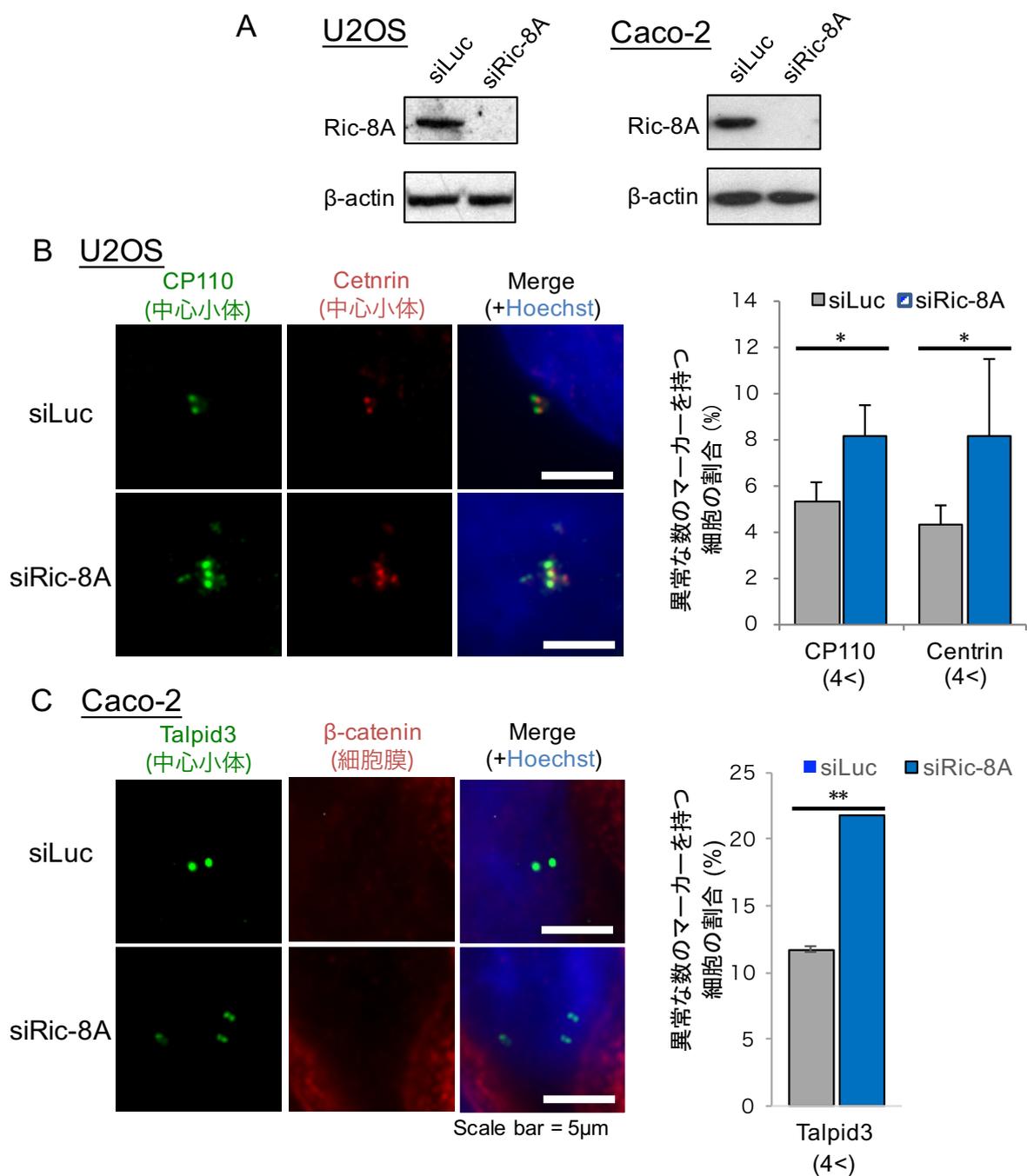
物である Distal appendage の構成タンパク質である Cep164、中心小体を取り囲む PCM に局在する  $\gamma$ -チューブリンをマーカーとして用いた(図 4 A 参照)。その結果、Distal 側マーカーである CP110、Centrin、Talpid3、PCM マーカーである  $\gamma$ -tubulin の異常増加が有意に認められたが、proximal 端のマーカーである C-Nap1 と主骨格マーカーであるグルタミル化チューブリン、さらに Distal appendage タンパク質 Cep164 の有意な増加は認められなかった(図 4 F)。このことから、Ric-8A の発現抑制は正常な構造からなる中心小体ではなく、いくつかの中心小体タンパク質の凝集物の形成を誘導した可能性が示唆された。以後、この凝集物を中心小体様構造体(Centriole-like structure: CLS)と呼称する。しかしながら発現抑制では大きな差が見られなかったことからノックアウト細胞を作成し、解析することとした。

#### 3.1.4 Ric-8A ノックアウト細胞を用いた中心小体様構造体の検討

siRNA を用いた Ric-8A 発現抑制による CLS の増加が本当に Ric-8A 発現抑制に起因するのか検討するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて染色体の Ric-8A 翻訳領域に変異を導入し、Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞を樹立した (図 5 A, B)。その結果、1 塩基欠失(図 6 A, #1)と 1 塩基挿入(図 5 A, #2)の 2 種類の異なる変異を持つ細胞を得ることができ、正常な翻訳産物が合成されていないことを確認した。次に Ric-8A ノックアウトが CLS 形成を引き起こすのか検討するために、3.1.3 と同様に局在が既知の中心小体タンパク質である CP110、Centrin、C-Nap1 及び中心体タンパク質  $\gamma$ -tubulin に加え、中心小体複製基点にある SAS-6 に対する抗体を用いた免疫染色を行った(図 5 C-E)。その結果、2 種類の Ric-8A ノックアウト細胞のいずれにおいても CP110 及び Centrin、 $\gamma$ -tubulin の異常増加が高頻度に観察されたのに対し、C-Nap1 と SAS-6 の異常増加は見られなかった(図 5 F)。よって Ric-8A ノックアウトにおいても CLS 形成を惹起することが示された。

次に Ric-8A ノックアウト細胞において増加した CLS が本当に Ric-8A の遺伝子変異依存的な表現形なのか検討するために、Ric-8A ノックアウト細胞に Flag-Ric-8A を過剰発現し CLS 形成がレスキューされるのか確認した(図 5 G, H)。その結果、Ric-8A 過剰発現による CLS 形成のレスキュー効果が見られたことから、Ric-8A ノックアウトによる発現消失が CLS 形成の原因であることが明らかとなった。

これらの結果から、Ric-8A は中心体形成過程において何らかの制御機構を介して働いており、発現低下は CLS 形成を惹起すること、また正確な中心体形成に重要であることが示唆された。



**図3 siRNAを用いた Ric-8A 発現抑制による表現型の確立**

A) hRic-8A に対する siRNA (siRic-8A #1) を導入した U2OS 及び Caco-2 細胞を用いて Ric-8A 発現抑制効率をウェスタンブロットにて確認した。Luciferase に対する siRNA (siLuc) をコントロールとした。

B) siRNA を導入した U2OS を用いて中心小体マーカーである CP110 と Centrin に対する抗体を用いて免疫染色を行った(図左、Green: CP110、Red: Centrin、Blue: Hoechst、scale bar=5  $\mu$ m)。CP110、Centrin 共にシグナルが4つより多い細胞の割合を300個の細胞の観察により算出し、3回の実験の平均値と標準誤差を示す(図右、n=3、\*p<0.05、標準誤差)。

C) siRNA を導入した Caco-2 を用いて中心小体マーカーである Talpid3 と細胞膜マーカーとして  $\beta$ -カテニンに対する抗体を用いて免疫染色を行った(図左、Green: Talpid3、Red:  $\beta$ -catenin、Blue: Hoechst、scale bar=5  $\mu$ m)。Talpid3 シグナルが4つより多い細胞の割合を100個の細胞の観察から算出した(図右、n=3、\*\*p<0.01、標準誤差)。

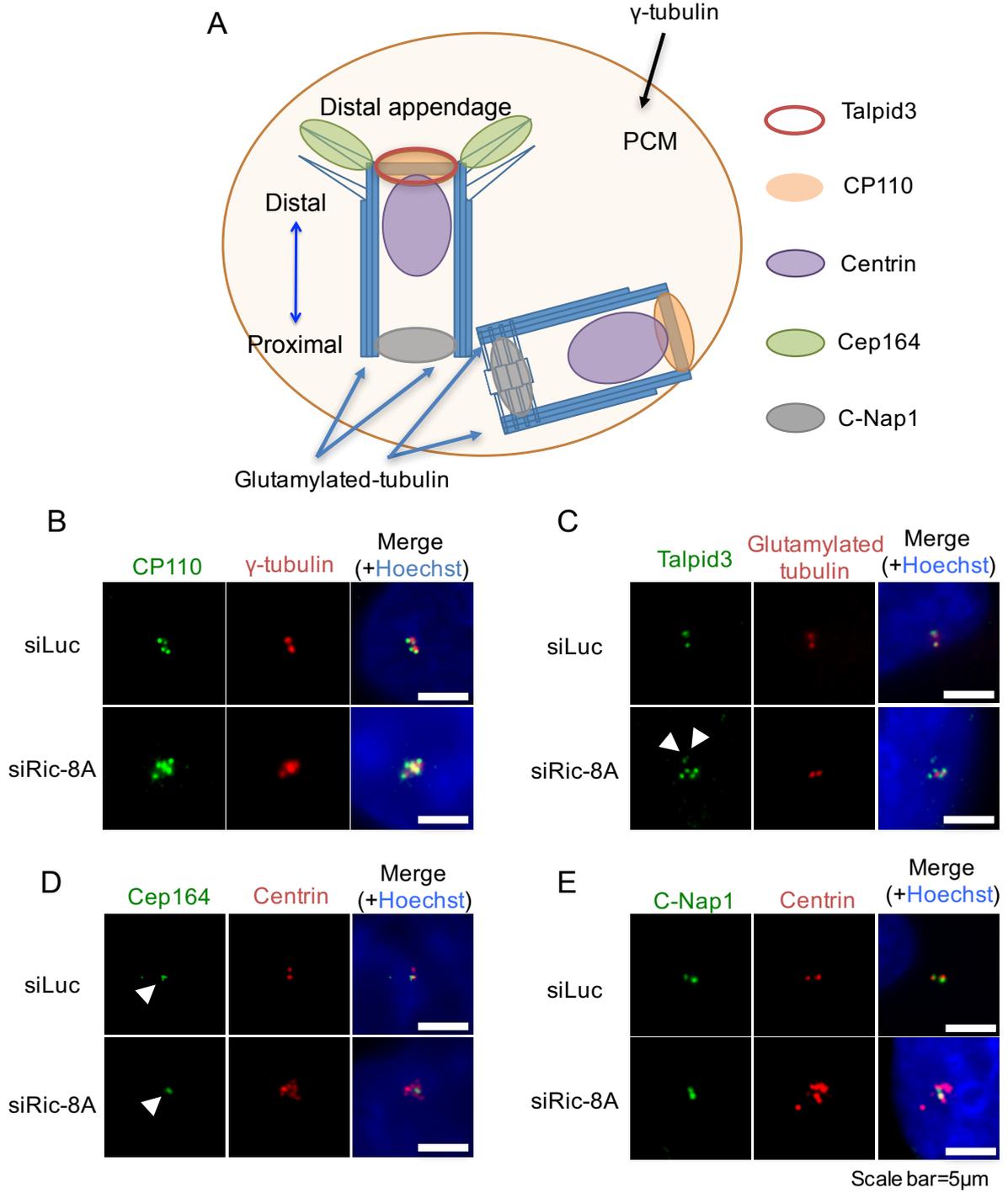


図 4 の説明は次ページに記述

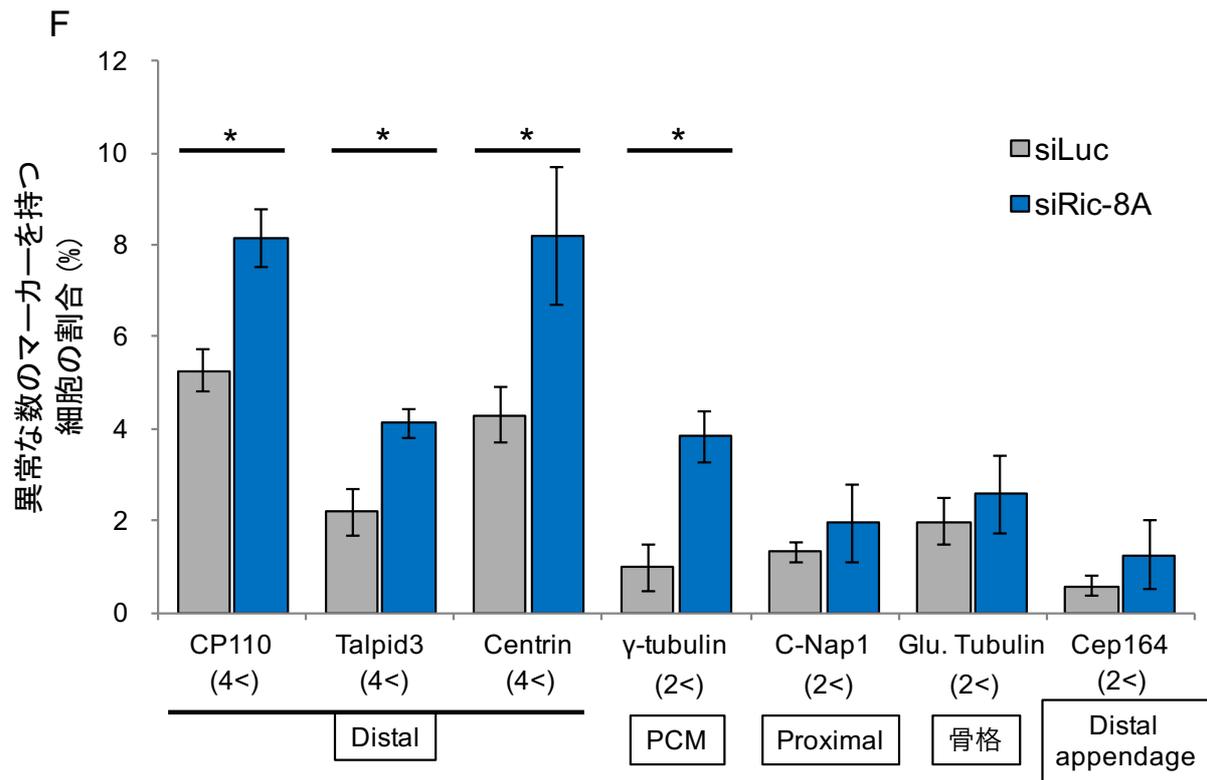


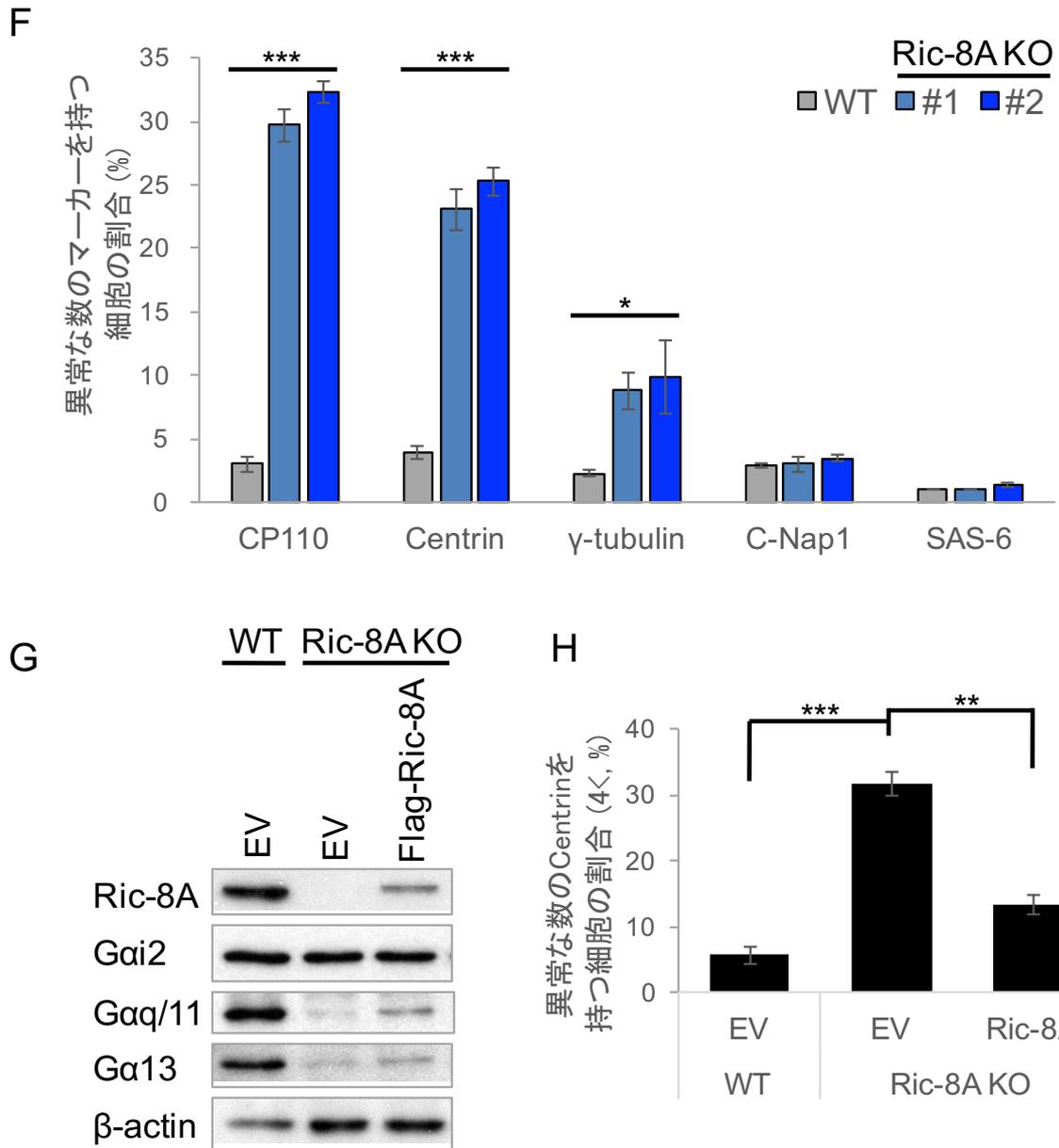
図 4 Ric-8A 発現抑制による中心体タンパク質の異常増加検討

A) 中心小体の模式図と各中心小体タンパク質の局在部位。

B-E) Ric-8A 発現抑制 U2OS 細胞における各中心小体タンパク質抗体での免疫染色像。Scale bar=5 μm。

F) B-E の免疫染色サンプルにおいて 300 個の細胞の内、異常な数のシグナルが観察された割合の定量結果 (n=4-5、\*p<0.05、標準誤差)。これまでの知見から CP110、Talpid3、Centrin は 4 つより多く、γ-tubulin、C-Nap1、Glutamylated tubulin、Cep164 は 2 つより多い場合に異常であると判断した。





**図5 Ric-8A ノックアウト(KO)における中心小体への影響**

A) CRISPR/Cas9 とヒト Ric-8A に対する gRNA を U2OS に導入し#1 及び#2 細胞を樹立しゲノム DNA を抽出後、ターゲット領域の配列を解析した。赤枠は WT と共通部分であり、PAM 配列と gRNA を示している。

B) Ric-8A KO 細胞における Ric-8A 発現量をウェスタンブロットにて解析した。

C, D, E) U2OS 細胞と Ric-8A KO 細胞における中心小体及び中心体局在タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行った(scale bar=5 μm)。各タンパク質の局在位置は図 4 A 参照。

F) U2OS WT と Ric-8A KO 細胞における異常な数の中心小体及び中心体タンパク質を持つ細胞の割合を 200 個の細胞観察から算出した(n=3-4、\*\*\*p<0.001、標準誤差)。

G, H) Ric-8A 過剰発現による CLS 形成レスキュー実験。Ric-8A ノックアウト細胞#1 に遺伝子導入後、96 時間後に細胞を回収し、G タンパク質等の発現量を確認した(G)。またその時の過剰な Centrin を持つ細胞を免疫染色により定量した(H) (n=3、\*\*\*p<0.001、\*\*p<0.01、標準誤差)。

## 3.2 Ric-8A 下流シグナルの解析

### 3.2.1 背景

Ric-8A は G タンパク質制御因子であることから、Ric-8A の発現量低下による中心小体様構造体(CLS)の形成は Ric-8A が制御する  $G\alpha$  シグナルに異常を来すことが原因であると考えられる。Ric-8A は  $G\alpha i$ 、 $G\alpha q$  及び  $G\alpha 13$  に対する GEF 活性を有すること、 $G\alpha i$  及び  $G\alpha q$  に対しユビキチン化を抑制及びシャペロン活性を持つことなどが明らかとされている(Tall, G.G., *et al.* 2003; Chishiki, K., *et al.*, 2013; Gabay, M., *et al.*, 2011)。これまでに中心体付近の cAMP が減少していることや PKA が中心体に局在しキナーゼ活性を持つ知見から(Terrin, A., *et al.*, 2012; Lutz, W., *et al.*, 2002)、Ric-8A の下流においても cAMP シグナルが関与する可能性が考えられた。このことから、Ric-8A のターゲット因子であり cAMP を制御する  $G\alpha i$  に着目し、Ric-8A 発現抑制による CLS の形成原因が  $G\alpha i$  シグナルの異常であるのか検証を試みた。

### 3.2.2 異常 $G\alpha i$ シグナルの CLS 形成への関与検討

$G\alpha i$  はアデニル酸シクラーゼに抑制的に働き、cAMP レベルを下げることで cAMP によって活性化される PKA の活性を減弱させる。本項では  $G\alpha i$  シグナルが中心小体様構造体形成に関与するのか検討するために、 $G\alpha i$  シグナルに阻害的に働く百日咳毒素 (Pertussis toxin: PTX)及び dybutyl cAMP (dbcAMP)を用いた。百日咳毒素は  $G\alpha i$  の C 末端から 4 番目のシステイン残基を ADP リボシル化し GPCR との相互作用を欠失させる  $G\alpha i$  特異的阻害剤である。さらに近年、百日咳毒素は  $G\alpha i$  と Ric-8A の相互作用も減弱させることが報告されている (Chishiki, K., *et al.*, 2017)。dbcAMP は膜透過性 cAMP アナログであり、細胞内 cAMP 量を著しく増加させる薬剤であり、 $G\alpha i$  シグナル不活化によるアデニル酸シクラーゼの抑制が減弱し、過剰な cAMP 量が産生された環境を模倣するために用いた(図 6 A 参照)。ヒト子宮頸がん HeLa 細胞と U2OS 細胞に百日咳毒素 (終濃度 400 ng/ml)もしくは dbcAMP (終濃度 1 mM)を添加し、24 時間後に中心小体マーカー(CP110)にて染色し、異常な数の CP110 (4<)を持つ細胞の割合を算出した(図 6 B)。その結果、HeLa 細胞及び U2OS 細胞それぞれにおいて百日咳毒素及び dbcAMP 処理により CP110 の異常増加の割合が増加した。この結果から、 $G\alpha i \rightarrow$  cAMP シグナルの異常は中心体形成に影響することが明らかとなった。

### 3.2.3 PKA シグナルの CLS 形成への関与検討

百日咳毒素及び dbcAMP 処理による  $G\alpha i$  シグナル異常の模倣は中心小体マーカーである CP110 の異常増加を誘導した(図 6 B)。この時、増加した cAMP 量によって異常

に活性化した PKA が CLS 形成の原因であるのか検討するために、PKA 阻害剤である KT5720 を用いた。百日咳毒素の処理により誘導された中心小体様構造体の形成が KT5720 によってキャンセルされるのか検討するために、U2OS 細胞に百日咳毒素 (終濃度 400 ng/ml) と KT5720 (終濃度 5  $\mu$ M) の両方を添加し、抗 CP110 抗体を用いて免疫染色し異常に増加した CP110 (4<) を持つ細胞の割合を定量した(図 7 A, B)。その結果、百日咳毒素処理により誘導された異常な数の CP110 が KT5720 の添加によりキャンセルされることが確認された。この結果から、Gai $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ PKA のシグナル経路の異常が CLS の形成に関与していることが示された。

さらに、Flag-Gai2 WT もしくは myc-PKA WT を pEGFP と共に U2OS 細胞に過剰発現させ、GFP 陽性細胞における異常増加した CP110 の割合を定量した(図 7 C)。その結果、Gai2 の過剰発現では mock よりも減少傾向にあり、PKA 過剰発現では mock より増加傾向が見られた。この結果は百日咳毒素と KT5720 の結果とよく一致することから、Gai シグナルが正常な中心体形成に重要な役割を果たしてしていることが更に示された。

### 3.2.4 中心体数制御における Ric-8A、Gai、PKA の順位の解析

これまでに Ric-8A、Gai、PKA が中心小体の数に影響する結果を得た。しかしながら、これまでの表現型において本当に Ric-8A $\rightarrow$ Gai $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ PKA の順序だったシグナル経路が関与しているのかは定かではない。このことから、シグナル経路の順列を解明するため、Ric-8A の発現抑制時において Gai もしくは PKA の過剰発現が中心小体数に与える影響について検証を試みた。U2OS 細胞に siRic-8A と Gai2 WT (野生型) もしくは QL (恒常活性化変異体、Q205L)、PKA WT を pEGFP と共に発現させ、GFP 陽性細胞における異常な数の CP110 の割合を定量した(図 8)。その結果、Ric-8A 発現抑制によって増加した異常な数の CP110 は Gai の過剰発現によって顕著に抑制され、PKA の過剰発現では相加的な増加が見られなかった。この結果は Ric-8A の下流として Gai が存在するが故に CLS 形成のレスキューが成立し、Ric-8A と PKA は同経路であるが故に相加的な増加が見られなかったと考えられる。これにより、Ric-8A $\rightarrow$ Gai $\rightarrow$ cAMP $\rightarrow$ PKA というシグナル順列が中心体形成に影響していることが示唆された。

### 3.2.5 Gai の細胞内局在の検討

これまでに過剰発現した Gai2 は中心体にも局在することが報告されている。(Cho, H., *et al.*, 2007)。このことから、Gai は細胞膜のみならず内在的に中心体に局在する可

能性が考えられた。さらに、Ric-8A は中心体に局在する報告もあることから(Woodard, G., *et al.*, 2010)、次に内在性 Gai 及び Ric-8A の細胞内局在を検討した。Caco-2 細胞を抗 Gai2 抗体と抗 Centrin 抗体にて免疫染色を行ったところ、内在性の Gai2 は Centrin と共局在していることが確認された(図 9)。これにより、Gai は中心小体付近に局在することで中心体形成を制御する可能性が考えられた。同様に、Ric-8A の局在を検討したが、特異的なシグナルを得ることができなかった。

### 3.2.6 Ric-8A ノックアウト細胞における各種 G タンパク質の解析

Ric-8A 発現量低下による CLS 形成は Ric-8A の持つ G $\alpha$  に対する GEF 活性、安定化、シャペロン活性のどの機能欠失が原因であるのか不明である。本項では Ric-8A の G $\alpha$  に対する安定化消失が原因であるのか検討するために、Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞における各種 G $\alpha$  タンパク質の発現量をウェスタンブロットにて解析した(図 5 G, 10 A)。その結果、Ric-8A ノックアウト細胞では G $\alpha$ q/11 及び G $\alpha$ 12 と G $\alpha$ 13 のタンパク質量が顕著に減少していた。一方で、cAMP シグナルを調節する Gas と Gai の発現量にはあまり影響しなかった。この結果から、CLS 形成は Ric-8A 発現抑制によって起こる Gai に対する安定化機構破綻が原因ではなく、GEF 活性の減弱もしくはシャペロン活性減弱による局在変化が原因である可能性が考えられる。

次に Ric-8A ノックアウトによる CLS 形成は Gai の活性低下が原因であるのか検討を行うため、Ric-8A ノックアウト細胞に Gai を過剰発現するレスキュー実験を試みた(図 10 B, C)。その結果、Gai2 恒常活性化変異体である QL 変異体の過剰発現において Centrin の異常増加が顕著に抑制された。このことから、CLS 形成は Ric-8A 発現抑制により Gai シグナルが減弱し引き起こる現象であることが示唆された。

### 3.2.7 中心体における PKA の異常活性の影響検討

Ric-8A→Gai→PKA シグナルの異常が CLS 形成を惹起することから、PKA の過剰な活性が CLS 形成に影響する可能性が考えられる。PKA は中心体において AKAP9 依存的に中心体に局在する報告から、CLS 形成は中心体に局在する PKA の過剰な活性が原因であるのか検討するために、AKAP9 の発現抑制を行い PKA を中心体に局在出来ないようにすることで Ric-8A ノックアウトによる CLS 形成がレスキューされるのか検討した(図 11)。その結果、AKAP9 発現抑制により Centrin 及び  $\gamma$ -tubulin の異常増加が抑制されることを確認した(図 11 B)。この結果から、Ric-8A 発現抑制による CLS 形成は中心体に局在する PKA の過剰な活性が原因であることが示唆された。

これらの結果から、中心体付近における Ric-8A→Gai→PKA というシグナル経路の異常が CLS 形成の原因である可能性が示唆された。

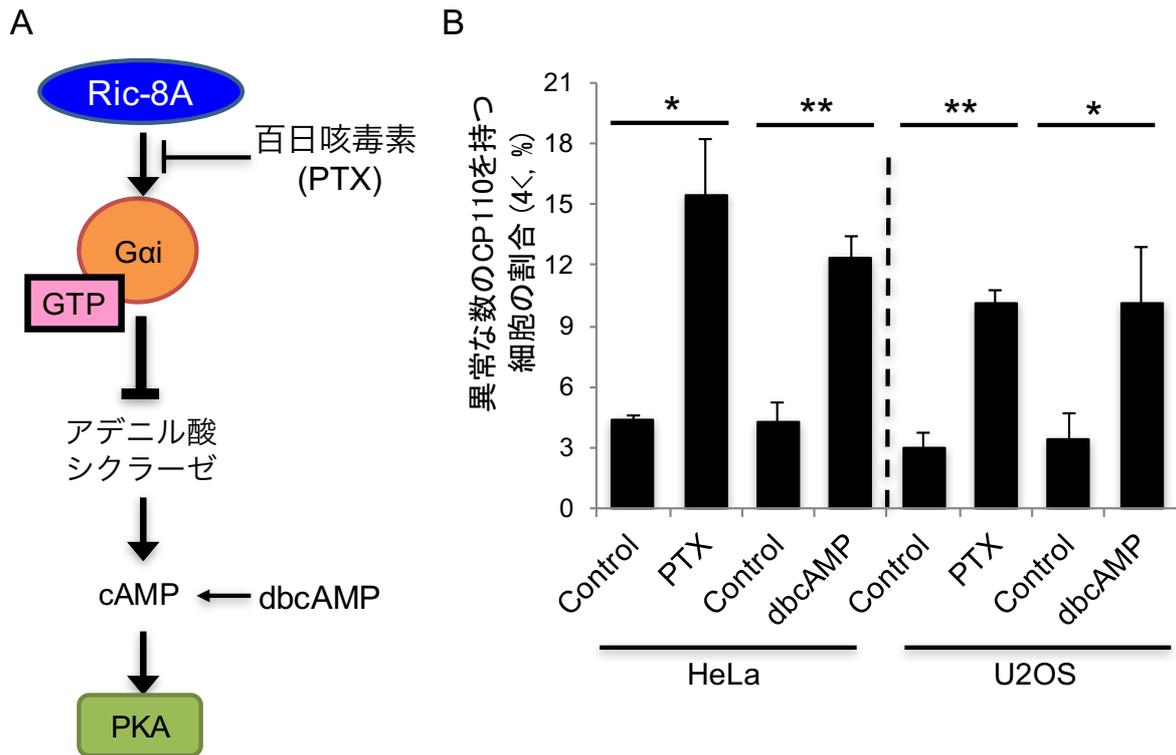


図 6 Gai シグナルの中心小体数への影響

A) Gai シグナル経路。百日咳毒素 (PTX) と dbcAMP はそれぞれ Gai の活性化阻害もしくは細胞内 cAMP 量の増加に作用し、Gai シグナルの減弱を引き起こす。

B) PTX もしくは dbcAMP を処理した HeLa 細胞及び U2OS 細胞における異常な数の CP110 (4<) を持つ細胞を 300 個の細胞観察により定量した (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01、標準誤差)。PTX 及び dbcAMP が溶けている buffer を Control とした (PTX: phosphate buffer; dbcAMP: PBS)。

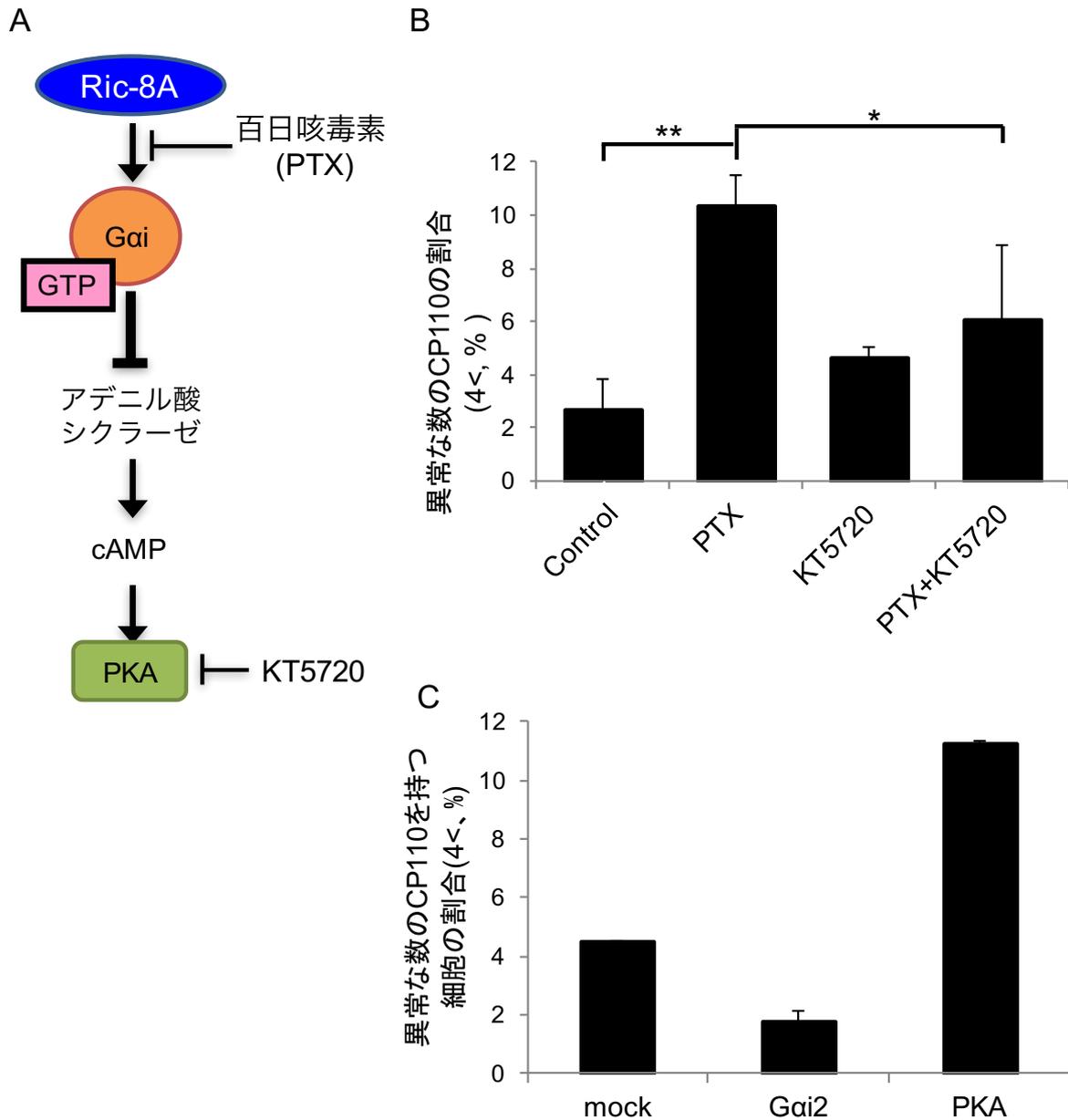
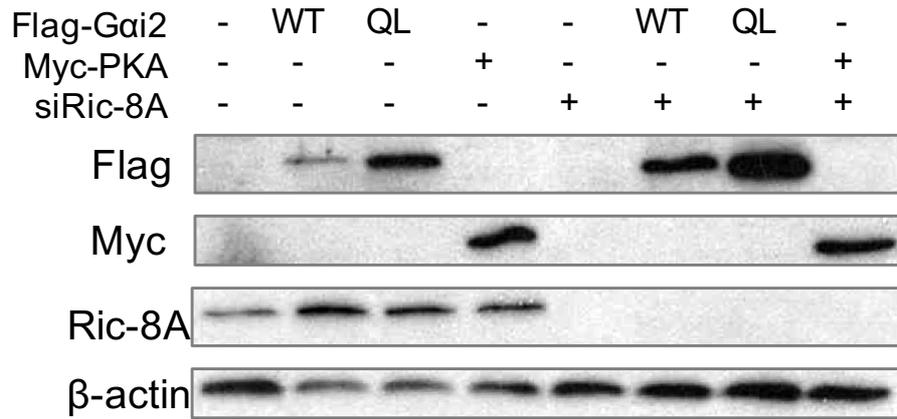


図7 PKA シグナルの中心小体マーカー数への影響

A) Gai シグナル経路と各種阻害剤の作用段階。KT5720 は PKA のキナーゼ活性を抑制する。  
 B) KT5720 を用いたキャンセル実験の定量結果。PTX によるアデニル酸シクラーゼの活性上昇→cAMP 量増加→PKA 活性過剰の状態の U2OS 細胞に KT5720 を作用させると CP110 の過剰増加がキャンセルされた。Control は PTX 及び KT5720 の溶媒である phosphate buffer と DMSO を加えたサンプルであり、300 個の細胞を観察し定量した (n=3、\*p<0.05、標準誤差)。

C) U2OS 細胞に Flag-Gai2 WT もしくは myc-PKA 触媒サブユニット WT (PKA) と共に pEGFP のプラスミドを導入し、GFP 陽性細胞における CP110 の過剰増加の割合を 200 個の細胞観察により定量した。(n=2、標準誤差)

A



QL: 恒常活性化変異体

B

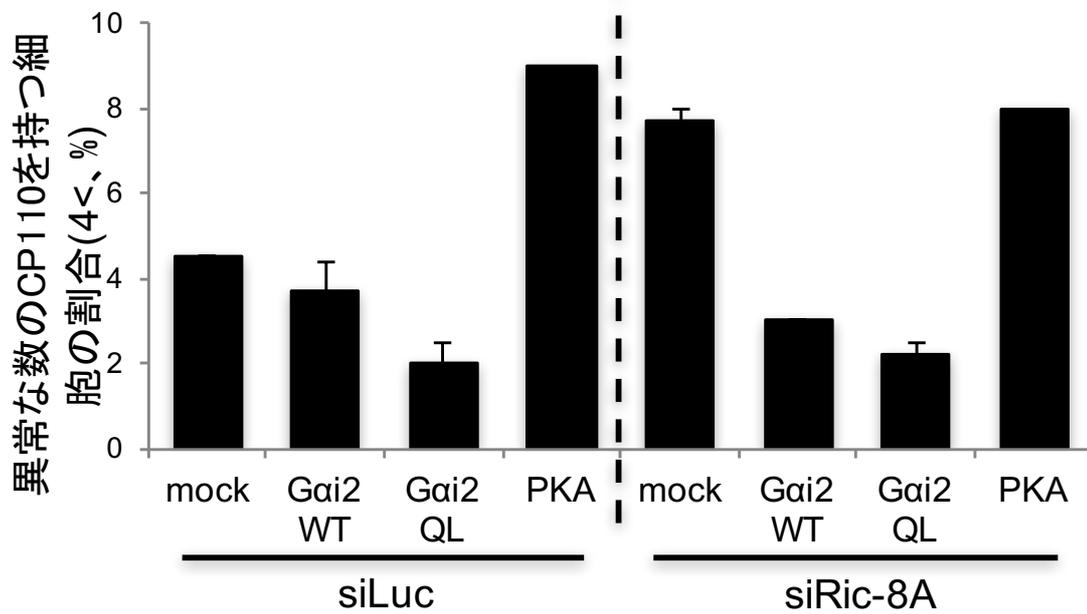


図 8 Ric-8A、Gai、PKA のシグナル順序の解明

U2OS 細胞に siLuc もしくは siRic-8A と Flag-Gai2 WT か QL(恒常活性化変異体)もしくは myc-PKA 触媒サブユニット WT (PKA)と pEGFP を同時に導入し、タンパク質量確認(A)及び GFP 陽性細胞における異常な数の CP110 の割合を 200 個の細胞観察により定量した(B)。(n=2)

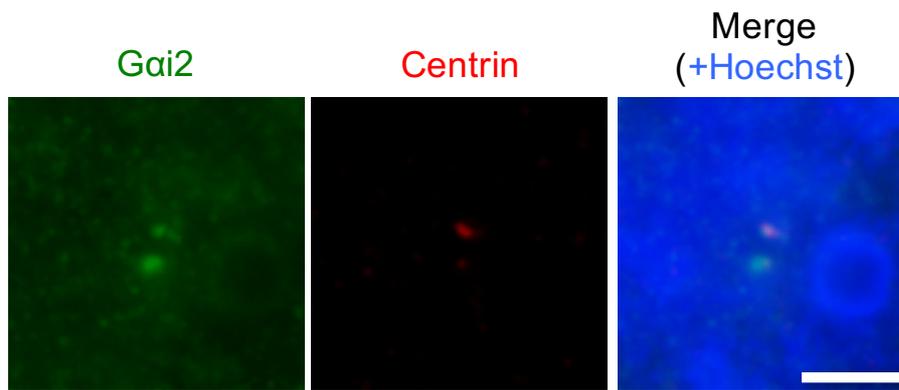
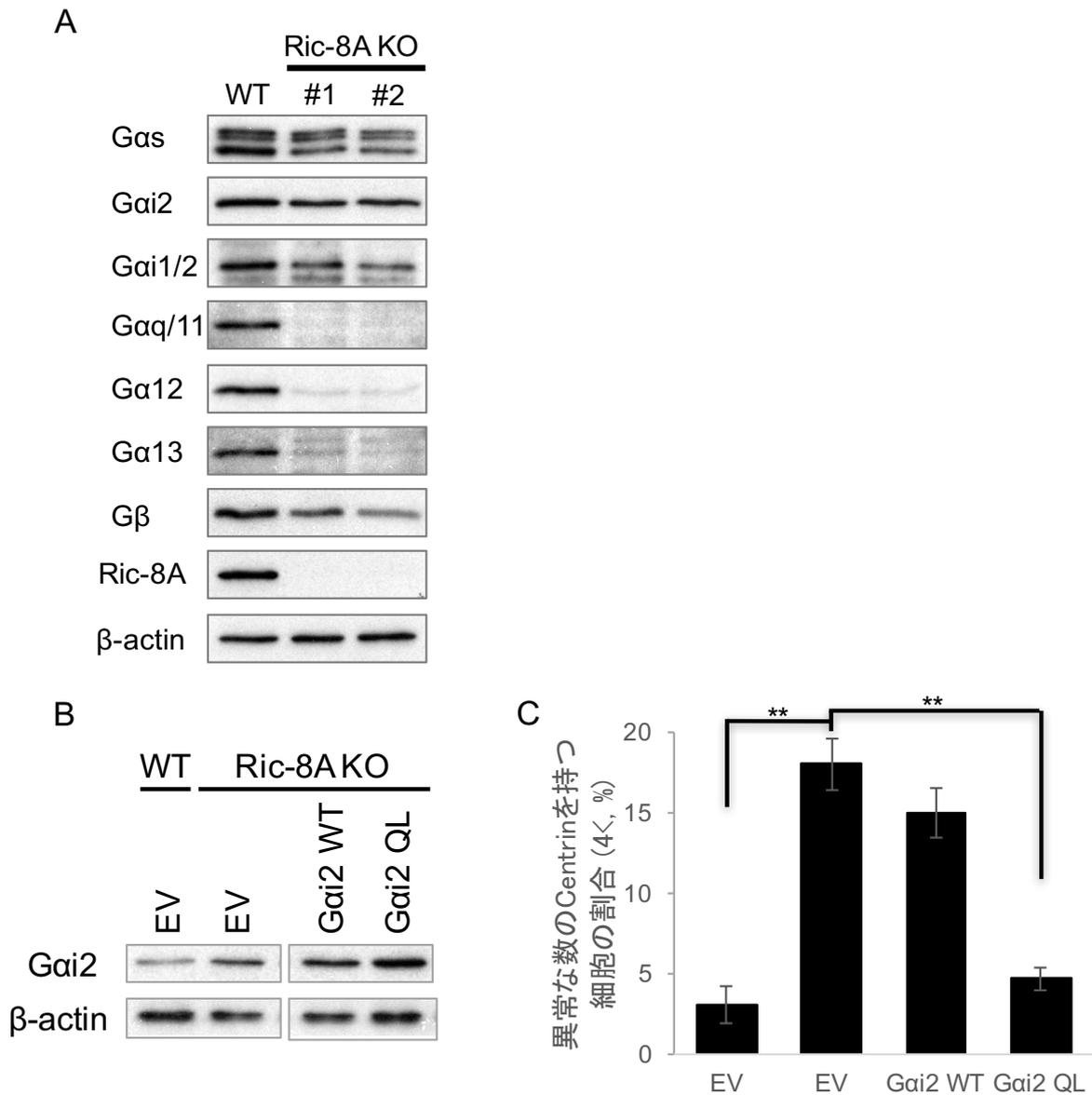


図9 内在性 Gai2 の局在検討

Caco-2 細胞を抗 Gai2 抗体と抗 Centrin 抗体を用いて免疫染色を行った。(Green: Gai2、Red: Centrin、Blue: Hoechst、scale bar=5  $\mu$ m)



**図 10 Ric-8A ノックアウトによる G タンパク質への影響解析**

A) Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞における各種 G タンパク質サブユニットの発現量をウェスタンブロットにて解析した。

B, C) Gai 過剰発現による CLS 形成レスキュー実験。Ric-8A ノックアウト細胞#1 に各種プラスミド及び pEGFP プラスミドを遺伝子導入後、48 時間に回収しタンパク質量(B)及び免疫染色により Centrin の数を確認した(C)。100 個の GFP 陽性細胞の観察により定量した(n=3、\*\*p<0.01、標準誤差)。

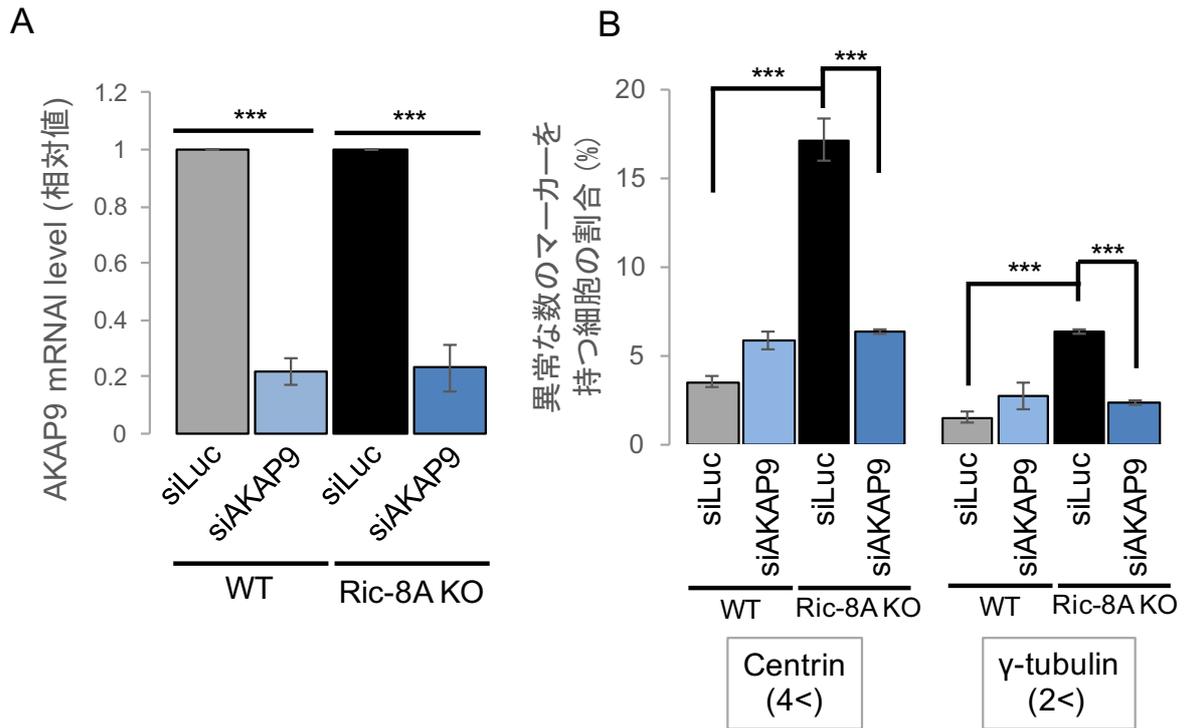


図 11 AKAP9 発現抑制の中心体数への影響解析

A) AKAP9 に対する siRNA を用いた発現抑制確認。細胞から RNA を抽出し hAKAP9 に特異的なプライマーを用いて qPCR にて mRNA レベルを解析した。(n=3, \*\*\*p<0.001)

B) AKAP9 発現抑制による CLS 形成への影響解析。AKAP9 の siRNA を WT 及び Ric-8A ノックアウト細胞に導入し、Centrin 及び  $\gamma$ -tubulin に対する抗体を用いて免疫染色を行った。100 個の細胞観察により定量した(n=3, \*\*\*p<0.001、標準誤差)

### 3.3 中心小体様構造体 (CLS)の解析

#### 3.3.1 背景

これまでに Ric-8A→Gai→cAMP→PKA のシグナル経路の異常が CLS 形成に関与することが示された。本研究で見出した中心小体タンパク質の異常増加は①再複製、②過剰複製、③中心小体タンパク質輸送異常のいずれかの現象を見ていると考えられる(図 12 参照)。各現象の原因は①細胞周期の乱れによる S 期伸長、②PLK4 や SAS-6 などの過剰な発現や活性化、③中心体と微小管の結合異常などである。

③に関しては中心小体複製過程というよりタンパク質輸送が原因であり、増加した中心小体らしき構造体はタンパク質凝集物であることが多く、完全な中心小体の構造を保っていないことが多い。3.1.1 において、Ric-8A 発現抑制により増加したのは中心小体タンパク質が幾つか欠損した CLS であると推察したことから、Ric-8A の発現抑制は中心小体複製過程中に起こるタンパク質輸送に影響を与えている可能性が考えられる。本項では①②③それぞれの場合における可能性を検証し、Ric-8A が中心小体複製過程のどの過程を制御しているのか検討を行った。

#### 3.3.2 Ric-8A 発現抑制による細胞周期への影響の検討 (①の検証)

Ric-8A 発現抑制による細胞周期への影響を検討するために、Ric-8A 発現抑制 Caco-2 細胞を PI 染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期を算出した(図 13 A)。その結果、Ric-8A 発現抑制は細胞周期全体においてほぼ影響を与えていないことが明らかとなった。

次に S 期の長さを検討するために、BrdU 法を用いて Ric-8A 発現抑制細胞における DNA 合成を行っている細胞の割合を算出した(図 13 B)。その結果、Ric-8A 発現抑制は DNA 合成細胞の割合に影響していなかった。

これらの結果から、Ric-8A の発現量低下は細胞周期に影響を与えず、Ric-8A 発現抑制による CLS 形成の原因は、①S 期伸長による中心小体複製回数異常ではないことが示唆された。

#### 3.3.3 Ric-8A 発現抑制による中心小体過剰複製検討 (②の検証)

SAS-6 や PLK4 が中心小体の根元に過剰集積すること、もしくは過剰なタンパク質発現が起きた際に中心小体の過剰複製が観察される。Ric-8A 発現量低下が SAS-6 や PLK4 の局在や発現量に影響を与え中心小体の過剰複製が起きた結果、CLS の形成が誘導されたのか検討した。Ric-8A 発現抑制 U2OS 細胞及び Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞を抗 SAS-6 抗体もしくは抗 PLK4 抗体と抗 CP110 抗体を用いて免疫染色を行い、

CP110 が過剰に増加した細胞において SAS-6 又は PLK4 の局在または数に変化しているのか観察した(図 14 A, B, C)。その結果、CP110 の異常増加を起こした細胞においても SAS-6 及び PLK4 それぞれのタンパク質は WT と同様に 2 ドットで確認され、異常な局在や異常蓄積はほとんど観察されなかった。

次に Ric-8A 発現抑制が SAS-6 及び PLK4 の発現量に影響するのか検討するために、Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞において SAS-6 及び PLK4 の発現量をウェスタンブロットにより検討した(図 14 D)。その結果、Ric-8A ノックアウトは SAS-6 及び PLK4 の発現量に影響を与えていないことが明らかとなった。

これらの結果から、Ric-8A 発現抑制による CLS 形成は SAS-6 及び PLK4 の異常による②中心小体過剰複製が要因ではないことが示唆された。ただ更なる検討として Ric-8A 発現量低下が PLK4 のキナーゼ活性に影響するのか検討する必要があると考えられる。

### 3.3.4 Ric-8A 発現量低下による Centriolar satellites (CS)への影響検討 (③の検証)

Ric-8A 発現量低下が CS による中心小体タンパク質輸送に影響するのか検討するために、Ric-8A ノックダウン細胞もしくはノックアウト細胞における CS の局在を確認した。CS タンパク質である PCM-1 を CS マーカーとし、中心小体マーカーとして Centrin を用いた(図 15 A, B)。Ric-8A を発現抑制した細胞では PCM-1 の異常な集積が観察され、さらに PCM-1 が Centrin のドットと共局在している様子が確認された。この表現型は Ric-8A ノックアウト細胞においてより顕著に見られた(図 15 B)。次に Ric-8A ノックアウト細胞における PCM-1 のタンパク質量を確認したところ、Ric-8A ノックアウトによって PCM-1 の発現量に変化は見られなかった(図 15 C)。

次に、CLS がタンパク質輸送異常による中心小体タンパク質の凝集物であるのか検討するために、ノコダゾールを用いた検討を行った。CS は微小管ネットワークに沿って輸送されていることから、微小管重合阻害剤であるノコダゾールを用いて微小管構造を破壊するとそれに伴い CS 及びその積み荷タンパク質も消失することが知られている。このことから、Ric-8A ノックアウト細胞にノコダゾール処理を行い、異常増加した Centrin (中心小体マーカー)及び  $\gamma$ -tubulin (中心体マーカー)の数が減少するのか観察を行った(図 16 A, B)。その結果、Ric-8A ノックアウトにより異常増加した Centrin はノコダゾール処理により消失したのに対し(図 16 A)、異常な数の  $\gamma$ -tubulin は減少が見られなかった(図 16 B)。さらに Ric-8A ノックアウト細胞を Centrin、 $\gamma$ -tubulin、PCM-1 に対する抗体を用いて免疫共染色を行ったところ、異常増加した Centrin は PCM-1 と共局在するのに対し、 $\gamma$ -tubulin は PCM-1 と共局在しないことが観察された(図 16 C)。Centrin は  $\gamma$ -tubulin と共局在しているものも見られることから、Ric-8A 発現抑制は二種類の CLS、すなわち CLS ( $\gamma$ -tubulin +)および CLS ( $\gamma$ -tubulin -)の形成を起こしている

ことが示唆された。

次に CLS ( $\gamma$ -tubulin +)は微小管構造を有しているのか検討するために、氷上1時間インキュベートすることで微小管ネットワークを破壊し、アセチル化チューブリンに対する抗体を用いて免疫染色を行った(図 16 D)。その結果、ノコダゾール非感受性である CLS ( $\gamma$ -tubulin +)はアセチル化された微小管構造を有していることが示唆された。

これらの結果から、Ric-8A 発現量低下は PCM-1 の発現量非依存的に CS の異常な集積を起こし、それにより中心小体タンパク質が輸送されず集積し CLS が形成された可能性が想定される。さらに一部の CLS は  $\gamma$ -tubulin を含むことから、Ric-8A 発現抑制は二種類の CLS 形成を惹起する可能性が考えられる(図 17)。

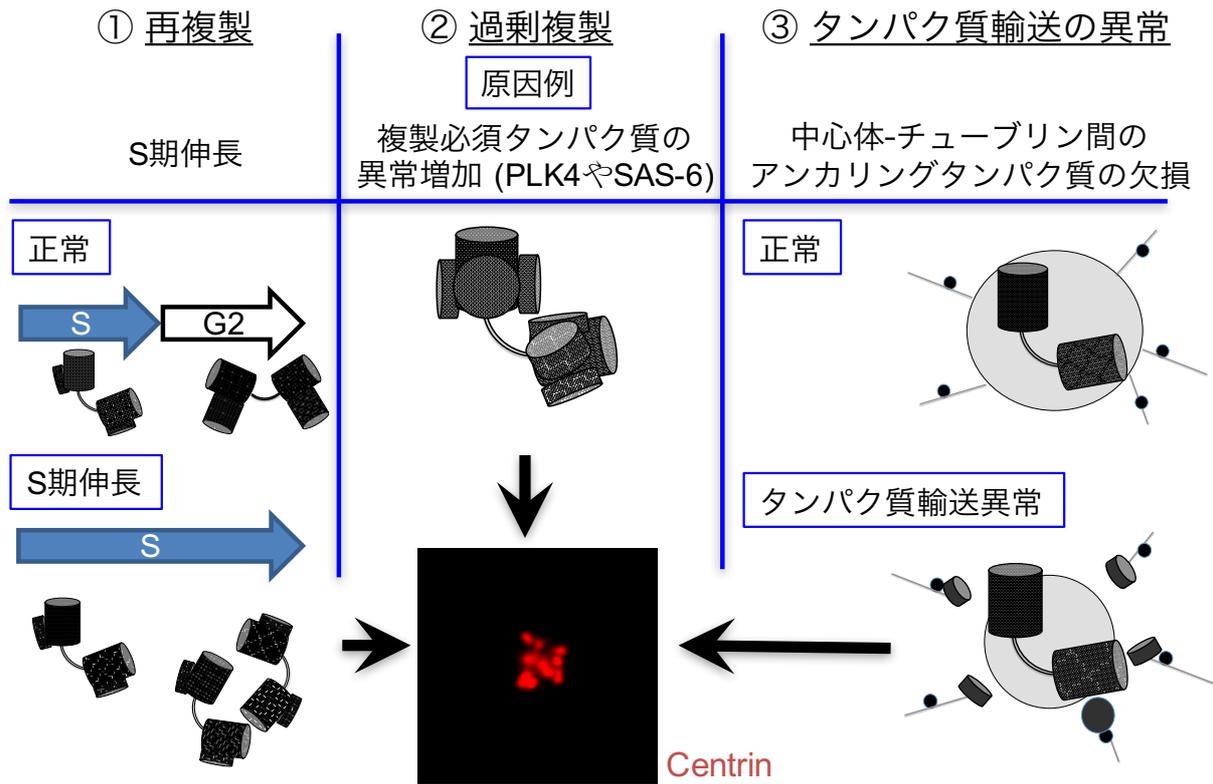
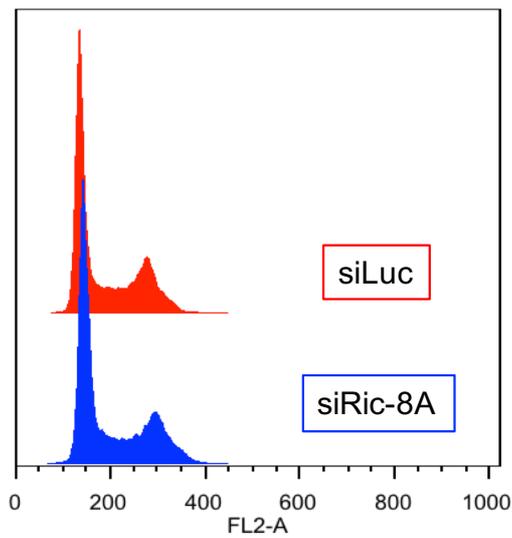


図 12 中心小体の異常増加における 3つの要因と過程

中心小体タンパク質が異常増加した際に考えられる要因を 3つ示している。

A



	%G1	%S	%G2/M
siLuc	46.2	29.4	21.1
siRic-8A	46.1	29.9	21.1

B

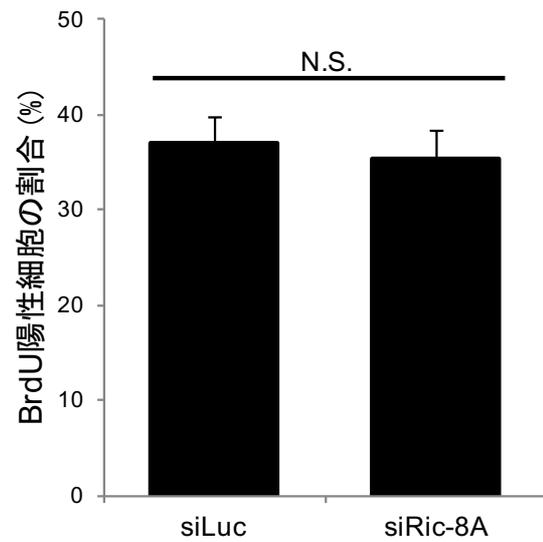


図 13 Ric-8A 発現抑制による細胞周期への影響解析

A) siRNA を導入した Caco-2 細胞を PI で染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期を検討した結果を示している。

B) siRNA を導入した U2OS 細胞の細胞周期を BrdU 法にて解析した。BrdU 陽性細胞 / 全細胞の数値を 200 個の細胞観察から算出し、S 期の割合として算出した。(n=3)

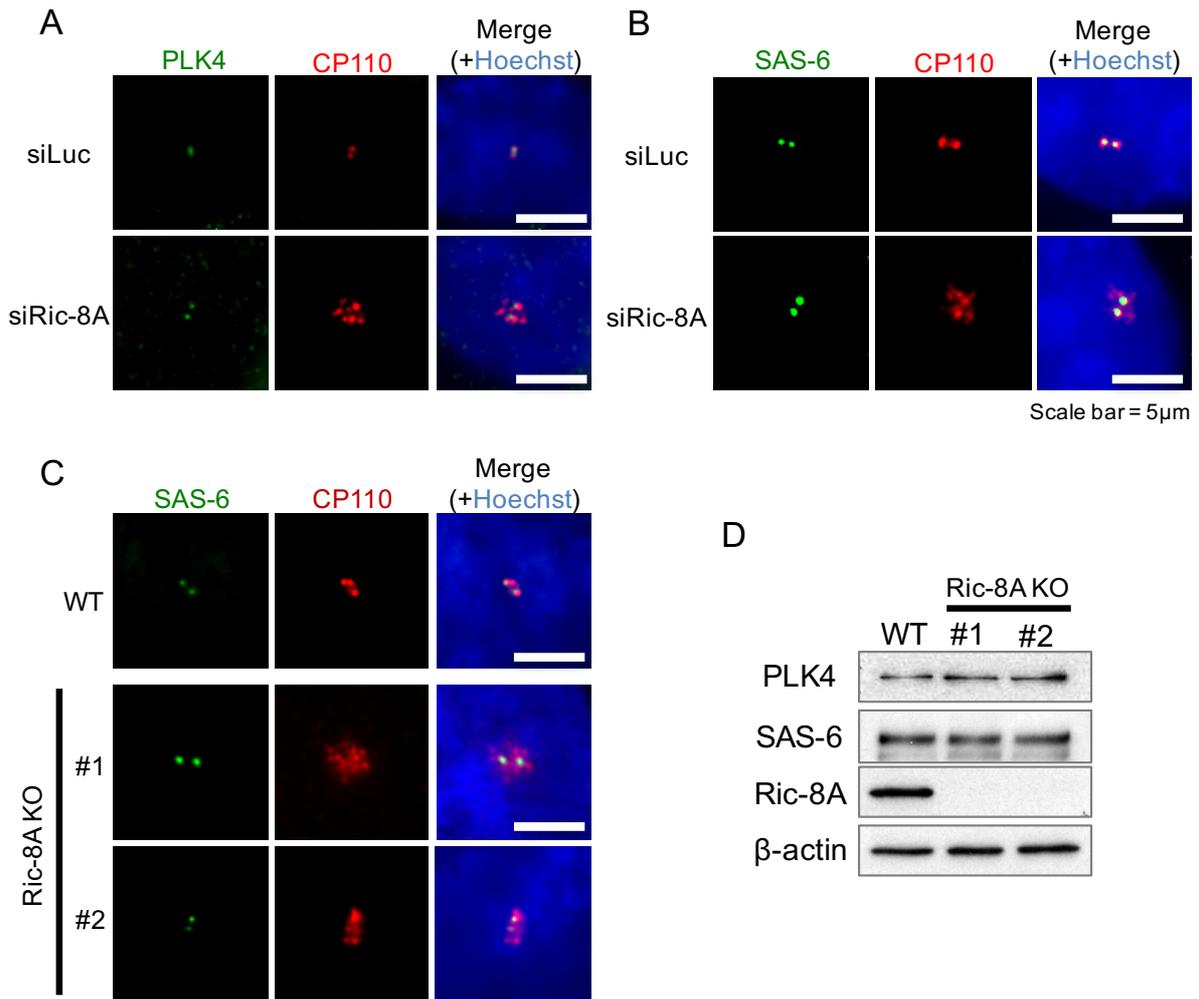


図 14 Ric-8A 発現抑制の中心小体形成タンパク質への影響の検討

A, B) siRNA を用いて Ric-8A 発現抑制を行った U2OS 細胞を抗 PLK4 抗体もしくは抗 SAS-6 抗体と抗 CP110 抗体を用いて免疫染色を行った。PLK4 と SAS-6 は 2 つのドットが正常な数である。(Green: PLK4(A), SAS-6(B)、Red: CP110、Blue: Hoechst、scale bar=5 μm)

C) Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞における抗 SAS-6 抗体と抗 CP110 抗体を用いて免疫染色を行った。Ric-8A KO 細胞#1#2 については図 6 A 参照。(Green: SAS-6、Red: CP110、Blue: Hoechst、scale bar=5 μm)

D) Ric-8A ノックアウト細胞における PLK4 及び SAS-6 の発現量をウェスタンブロットにより確認した。

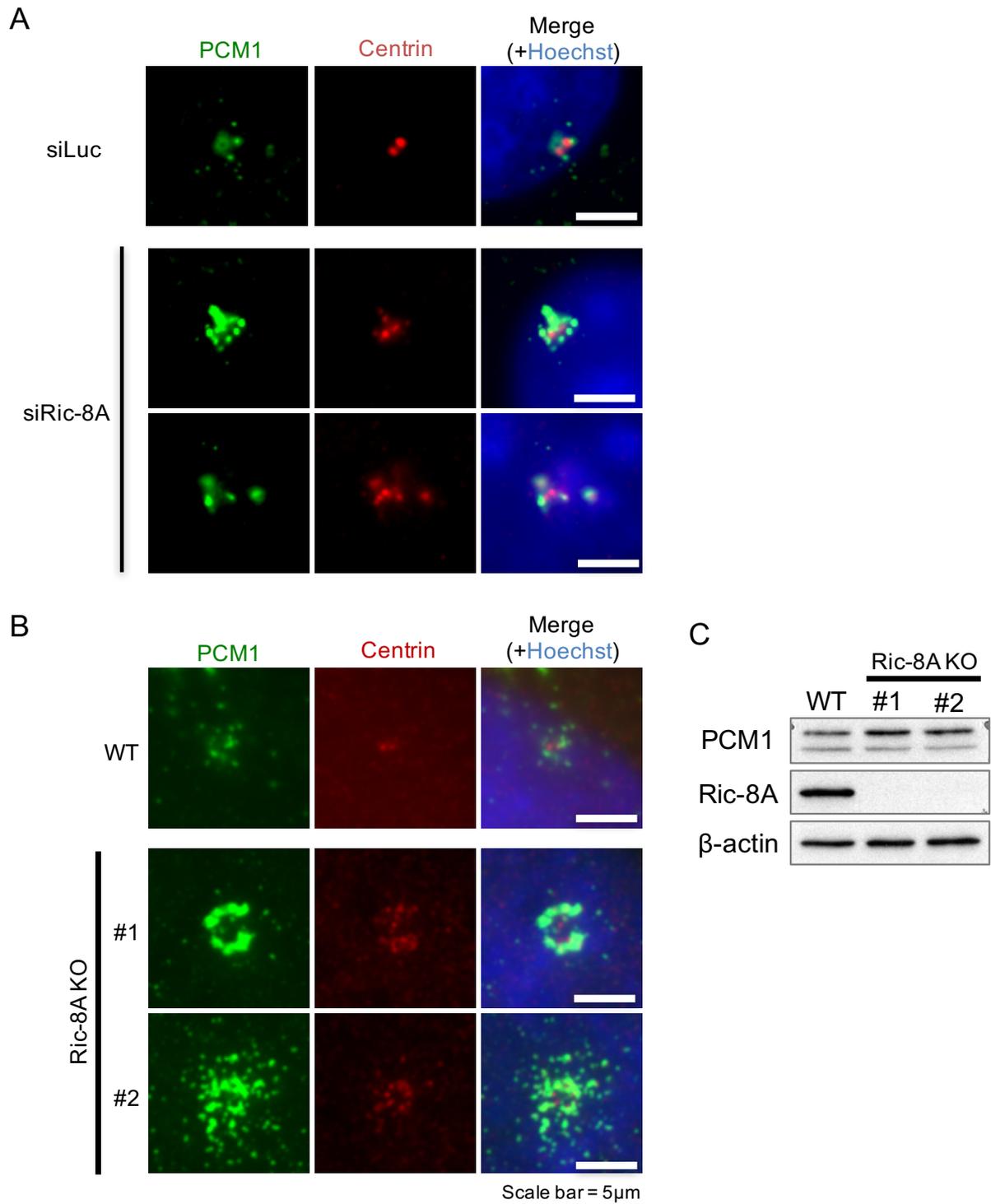
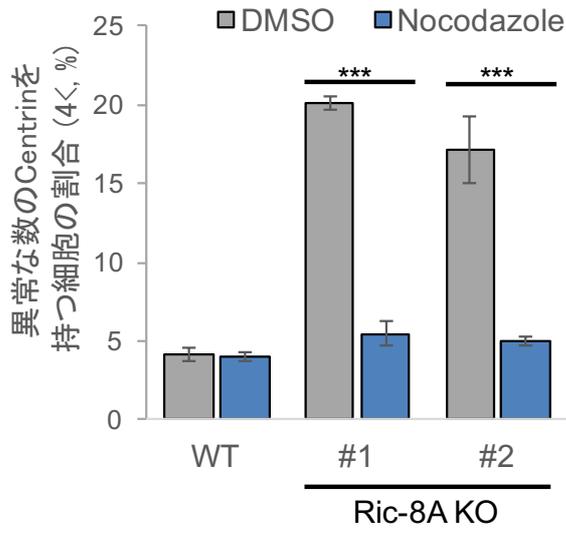


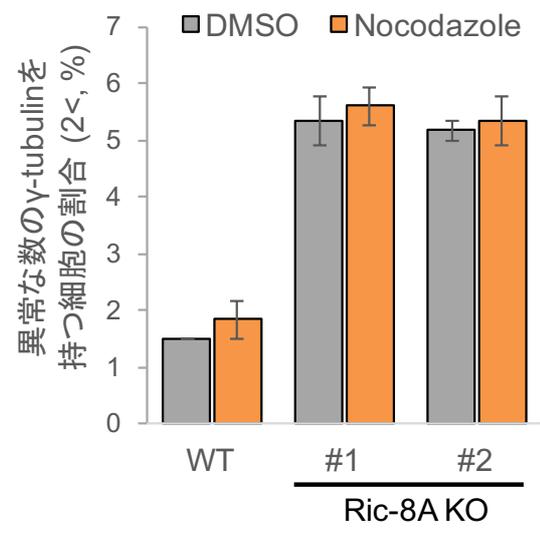
図 15 Ric-8A の発現量低下における PCM-1 の局在及び発現量への影響

A, B) Ric-8A 発現抑制 U2OS 細胞(A)もしくは Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞における抗 PCM-1 抗体を用いた免疫染色像。(Green: PCM-1、Red: Centrin、Blue: Hoechst、scale bar=5  $\mu$ m)  
 C) Ric-8A ノックアウト細胞における PCM-1 の発現量をウェスタンブロットによって解析した。

A



B



C

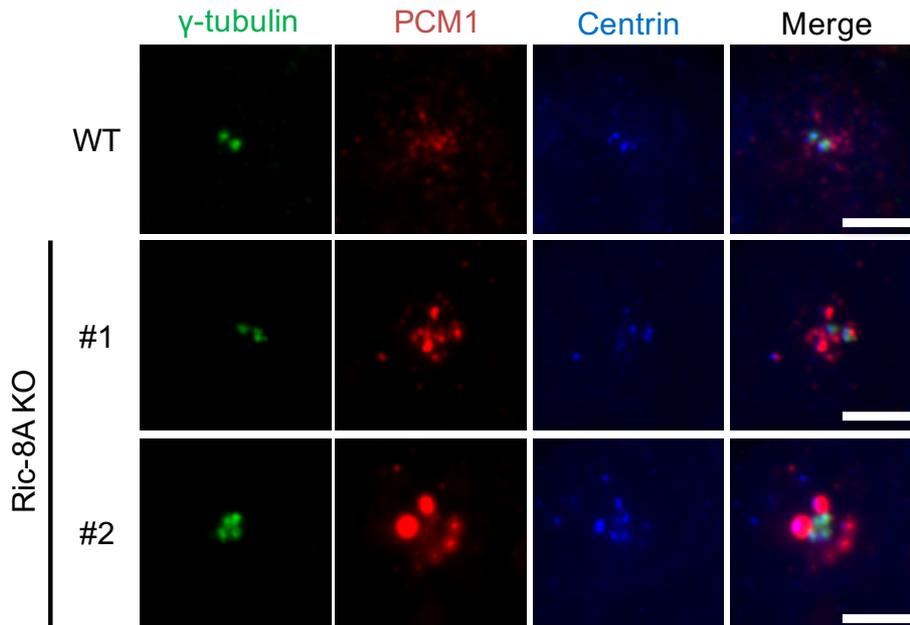
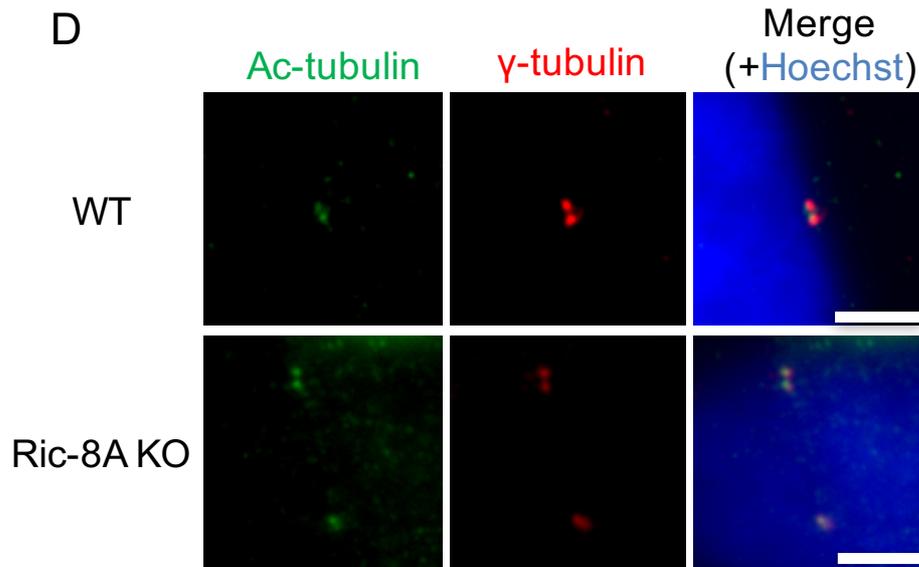


図 16 の説明は次ページに記載。

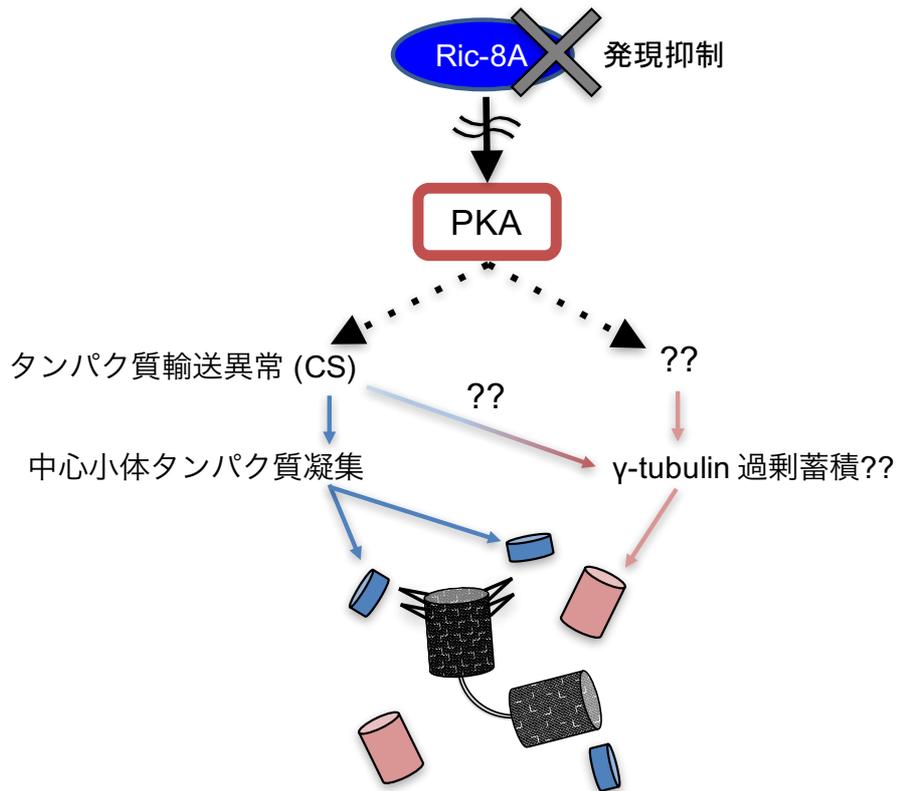


#### 図 16 CLS の原因及び構造の解析

A, B) ノコダゾール処理による Centrin ドットと  $\gamma$ -tubulin ドットに対する影響解析。ノコダゾールを  $1 \mu\text{M}$  で細胞を 3 時間処理し、Centrin (A) もしくは  $\gamma$ -tubulin (B) に対する抗体で染色し、100 個の細胞観察により定量した。(n=3, \*\*\*p<0.001、標準誤差)

C) Centrin (Blue)、 $\gamma$ -tubulin (Green)、PCM-1 (Red) に対する抗体を用いた免疫染色像。(scale bar=  $5 \mu\text{m}$ )。

D) CLS が微小管構造を有するのかが検討するための免疫染色。氷上で 1 時間インキュベート後、アセチル化チューブリン (Green)、 $\gamma$ -tubulin (Red) に対する抗体を用いて染色を行った。(scale bar=  $5 \mu\text{m}$ )



	Distal端 〔CP110 Centrin〕	Proximal端 〔C-Nap-1 SAS-6〕	Distal appendage 〔Cep164〕	γ-tubulin	アセチル化 tubulin	Nocodazole 抵抗性	MTOC 活性
正常な 中心小体 	+	+	+	+	+	+	+
CLS (γ-tubulin +) 	+	-	-	+	+	+	+
CLS (γ-tubulin -) 	+	-	-	-	?	-	?

図 17 予想される CLS 構成物及び特徴

現段階までに予想される 2 種類の CLS の特徴。3.1.3 及び 3.1.4 から両 CLS には中心小体の proximal 端及び Distal appendage は存在しないと考えられる。

### 3.4 MTOC 活性への影響解析

#### 3.4.1 背景

これまでに Ric-8A 発現抑制により形成された CLS の一部には  $\gamma$ -tubulin を有しているものが存在することが明らかとなった。 $\gamma$ -tubulin は微小管伸長の基点として役割を担うことから、MTOC 活性を制御する重要な因子の一つである。このことから、Ric-8A 発現抑制により誘導された CLS ( $\gamma$ -tubulin +) は MTOC 活性を持ち、細胞分裂に悪影響を与える可能性が想定される。よって本項では Ric-8A 発現抑制及び Gai シグナル異常が細胞分裂及び MTOC 活性に与える影響に焦点を当て解析を試みた。

#### 3.4.2 中心小体複製時における Gai シグナル異常による細胞分裂への影響解析

細胞周期間期の中心小体複製過程における Gai シグナルは M 期の細胞分裂に影響するのか検討するために、細胞周期依存的な薬剤処理を行った。Caco-2 細胞を Double thymidine block 法により中心小体複製が開始される G1/S 期に細胞周期を同調し、M 期に至るまでの 9 時間全て、前半のみ、後半のみの 3 パターンに分けて薬剤処理を行った(図 18 A 参照)。その後、多極性紡錘体の形成率を定量した(図 18 B, C)。その結果、百日咳毒素並びに dbcAMP それぞれにおいて、S 期→M 期(9 時間)と S 期→G2 期 (前半)の薬剤処理によって多極性紡錘体形成率が有意に増加した。このことから、本研究で見出された Gai シグナル異常による中心小体タンパク質の増加は M 期における Gai の機能を阻害した結果ではなく、間期における中心小体複製過程に影響した結果であること、さらに間期における Gai シグナルは細胞分裂においても影響し得ることが示唆された。

#### 3.4.3 CLS の MTOC 活性の検討

Ric-8A 発現抑制により形成される CLS は MTOC 活性を有し M 期において細胞分裂に影響するのか検討を試みた。Ric-8A 発現抑制 U2OS 細胞及び Caco-2 細胞、Ric-8A ノックアウト細胞を紡錘体マーカー(アセチル化チューブリン)と中心小体マーカー(CP110 もしくは Talpid3)にて免疫共染色を行った(図 19 A, B, C 左)。紡錘体を形成している細胞における Pseudo-bipolar 紡錘体、多極性紡錘体(Multi polar)の割合を算出した結果、U2OS、Caco-2 細胞それぞれにおいて Ric-8A の発現抑制により Pseudo-bipolar 紡錘体及び多極性紡錘体の割合が増加する傾向が見られた(図 19 A, B, C 右)。この結果から、Ric-8A 発現抑制によって形成される CLS は異常紡錘体の形成を起し、細胞分裂異常を引き起こすことが示唆された。

CLS ( $\gamma$ -tubulin +)が間期においても MTOC 活性を有しているのか検討するために、微小管再合成アッセイを行った。氷上にてインキュベートし微小管ネットワークを破壊後、37 °Cにて微小管を伸長させた結果、Ric-8A ノックアウトにより増加した

$\gamma$ -tubulin の各々から微小管構造が伸長している様子が確認された(図 20 A)。次に、M 期における紡錘体形成能を検討するため、STAT3 の阻害剤である stattic を用いた。中心体が異常増加した細胞では通常、増加した中心体を 2 極に集合させ Pseudo bipolar 紡錘体を形成する「中心体のクラスタリング」という保守機構が働くことが知られる。近年、中心体のクラスタリングは STAT3 が担っており、阻害剤である stattic の処理によりクラスタリング能力を弱めることで pseudo bipolar 紡錘体を多極性紡錘体に誘導することができるという報告された(Morris, E., *et al.*, 2017)。このことから、Ric-8A 発現抑制により増加した pseudo bipolar 紡錘体が stattic 処理により多極性紡錘体に誘導されるのか、すなわち CLS が紡錘体極として紡錘体を形成可能なのかを検討した(図 20 B)。Ric-8A ノックアウト細胞に stattic を処理すると異常紡錘体の合計の割合は変化しないのに関わらず、pseudo bipolar の割合が減少し多極性紡錘体の割合が増加することが確認された。これらの結果から、Ric-8A 発現抑制により形成される CLS ( $\gamma$ -tubulin +)は MTOC 活性を有し、細胞分裂に影響を与えることが明らかとなった。このことから、Ric-8A は細胞分裂の制御を介し細胞の生育維持に必要な機能を持つことが示唆された。

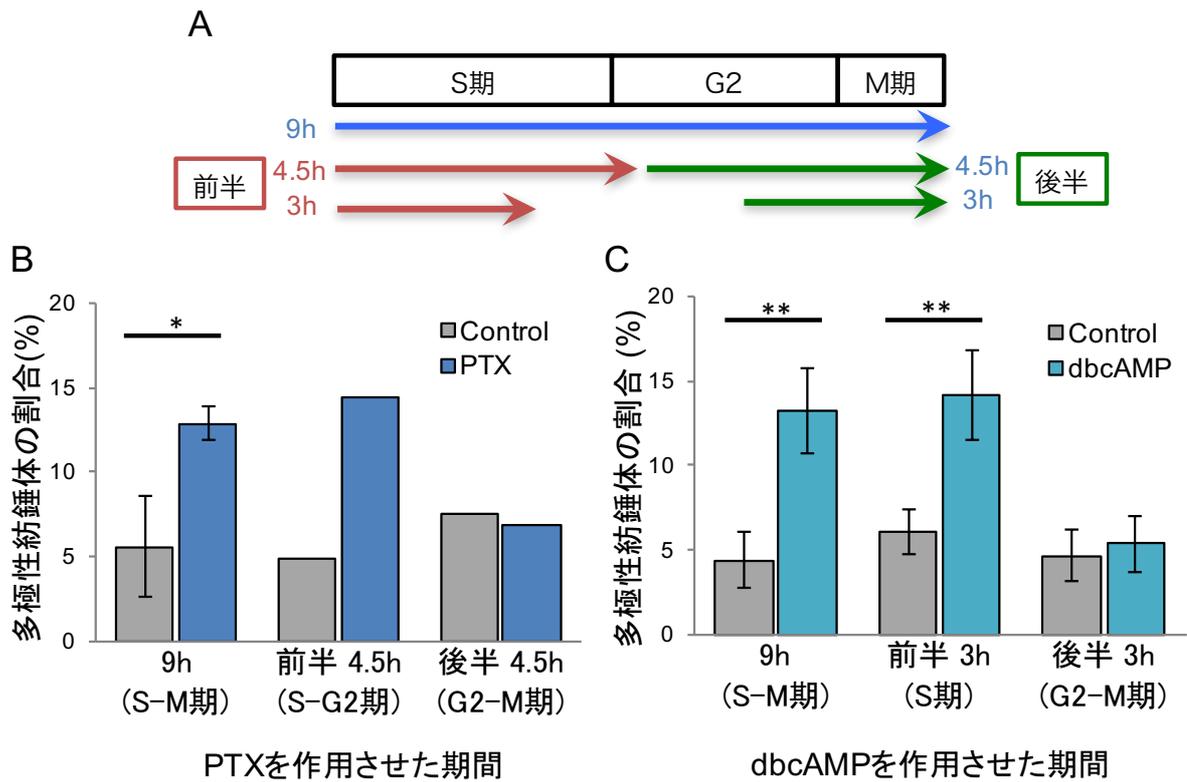
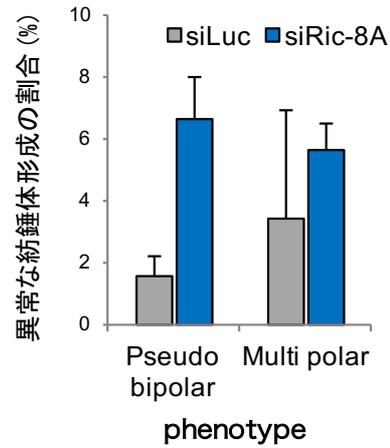
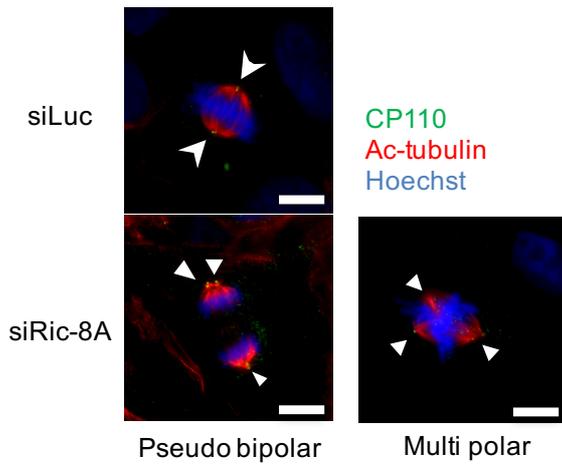


図 18 細胞周期依存的な PTX もしくは dbcAMP 処理による細胞分裂への影響解析

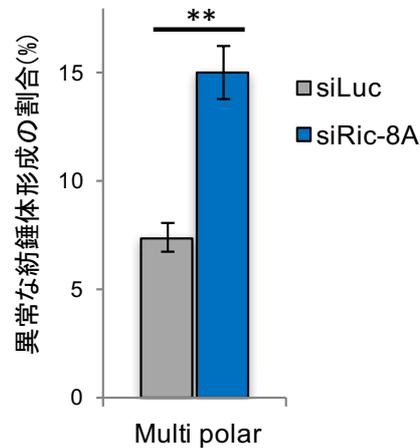
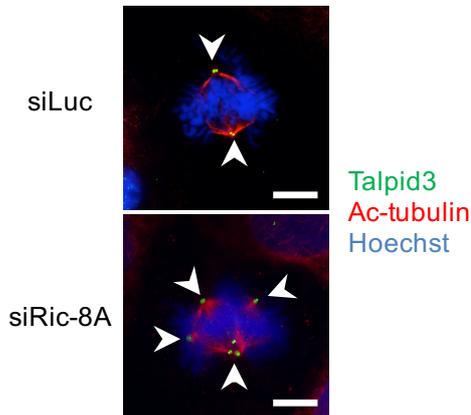
A) 細胞周期依存的な薬剤処理模式図。Double-thymidine block 法を用いて S 期初期に細胞を同調し、S-M 期にかけての 9 時間、S-G2 期もしくは S 期にかけての前半 4.5 時間もしくは 3 時間、G2-M 期にかけての後半 4.5 時間もしくは 3 時間にかけて薬剤処理を行った。

B, C) A に示す時間軸にて Caco-2 細胞に PTX もしくは dbcAMP を処理し、M 期において回収、アセチル化チューブリンと Talpid3 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、多極性紡錘体の割合を 100 個の分裂細胞を観察することで定量した。B は PTX 処理、C は dbcAMP 処理による定量結果を示す。(n=2-3、\*p<0.05、\*\*p<0.01、標準誤差)

### A U2OS



### B Caco-2



### C Ric-8A KO U2OS

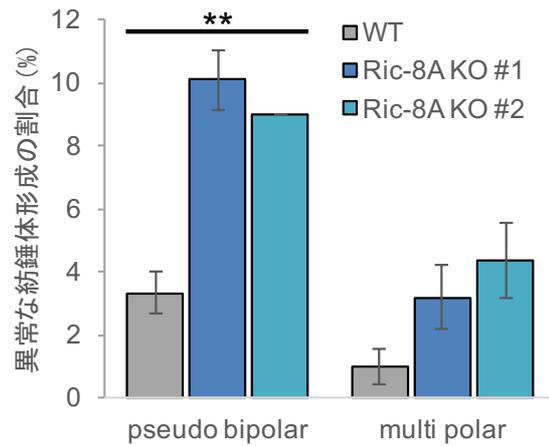
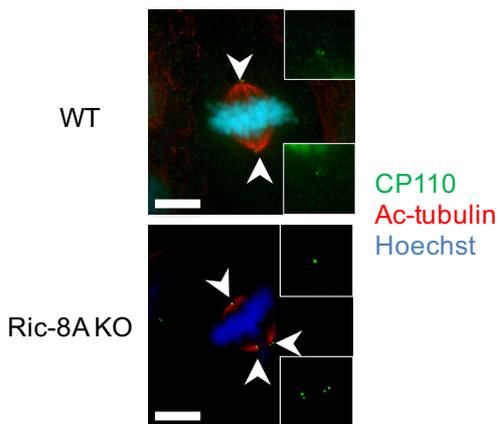
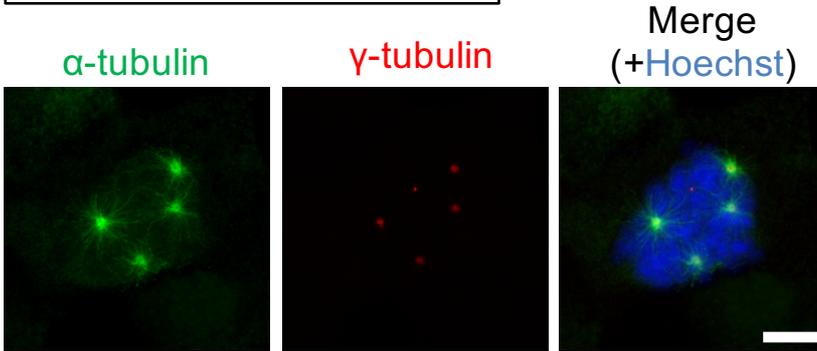
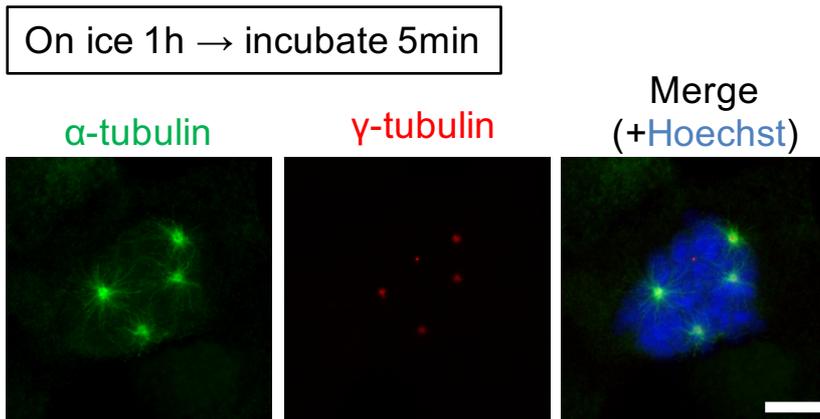


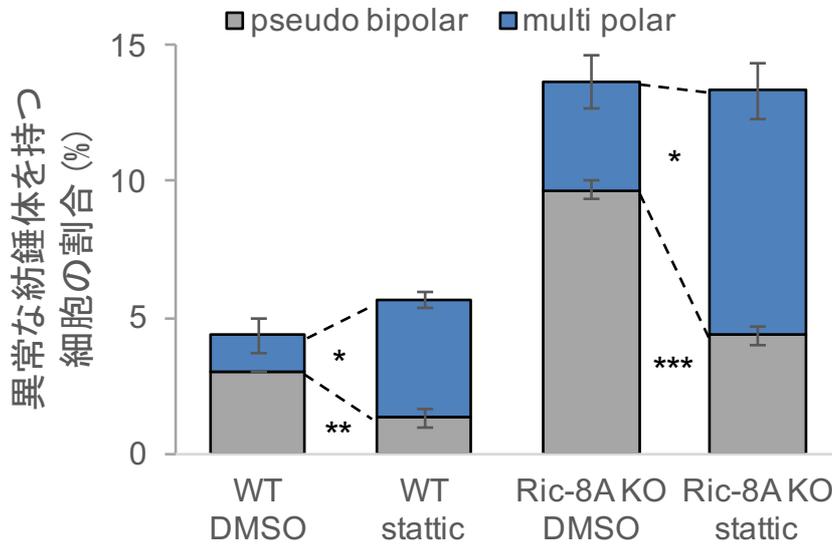
図 19 Ric-8A 発現抑制による細胞分裂への影響検討

A, B, C) CP110 もしくは Talpid3 及び Acetylated-tubulin の抗体を用いた免疫染色像と定量結果 (A: U2OS, B: Caco-2, C: Ric-8A ノックアウト U2OS)。矢頭は中心小体を示す。異常な紡錘体は Pseudo bipolar 紡錘体と Multi polar 紡錘体の表現型の割合を定量した。(n=2-3, \*\*p<0.01, scale bar=10 μm)

A



B



### 図 20 CLS の MTOC 活性の解析

A) 微小管再合成アッセイ。Ric-8A ノックアウト細胞を氷上で1時間処理した後、37 °Cで微小管を5分間伸長させた。α-tubulin 及び γ-tubulin に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

B) static による CLS の MTOC 活性検討。Ric-8A ノックアウト細胞を DMSO もしくは static を 3 μM で 4 時間処理し、固定後に CP110 とアセチル化チューブリンに対する抗体を用いて免疫染色した。pseudo bipolar 紡錘体および多極性紡錘体の割合を 100 個の分裂細胞の観察により定量した。(n=3、\*p<0.05、\*\*\*p<0.001、標準誤差)

### 3.5 下流因子の検討

#### 3.5.1 背景

これまでの解析から Ric-8A→Gai→cAMP→PKA のシグナル経路の異常が中心体へのタンパク質輸送の異常を誘導し CLS 形成に関与する可能性が示唆された。しかしながら、Ric-8A シグナルの下流で中心小体へのタンパク質輸送を直接制御する PKA 以下の下流因子が未だ不明である。タンパク質相互作用データベースである BioGrid (<https://thebiogrid.org/>)にて Ric-8A と相互作用するタンパク質を検討したところ、SPAG5 (SPerm-Associated Antigen 5; 別名 Astrin)と呼ばれるタンパク質が Ric-8A と相互作用する可能性が見られた(Huttlin EL., *et al.*, 2014, 論文としては未発表)。SPAG5 は M 期において紡錘体とキネトコアに局在し、セパレーズ活性を制御することで染色体の整列や分配を正常に維持する機能を持つ CS 局在タンパク質である(Chung, H., *et al.*, 2016)。間期において SPAG5 は CS に局在し、中心小体タンパク質の輸送を担う CDK5RAP2 の安定性並びに局在を制御することで中心体複製を維持する機能を有すると考えられている(Kodani, A., *et al.*, 2015)。SPAG5 の発現抑制はセパレーズ活性の異常を誘導し中心小体の解離による多極性紡錘体の形成や M 期進行の停止が起き、細胞死が誘導されるという報告がある(Chung, H., *et al.*, 2016)。SPAG5 は M 期において CDK1 や PLK1 によるリン酸化を受けるが、間期におけるリン酸化制御並びに PKA によるリン酸化の報告例はない。本項では PKA の候補基質として SPAG5 に着目し、Ric-8A ノックアウト細胞における SPAG5 の局在の検討、Ric-8A もしくは PKA と SPAG5 のタンパク質相互作用を解析し Ric-8A の下流因子であるかどうか検討した。

#### 3.5.2 Ric-8A ノックアウトによる SPAG5 の局在並びに発現量の検討

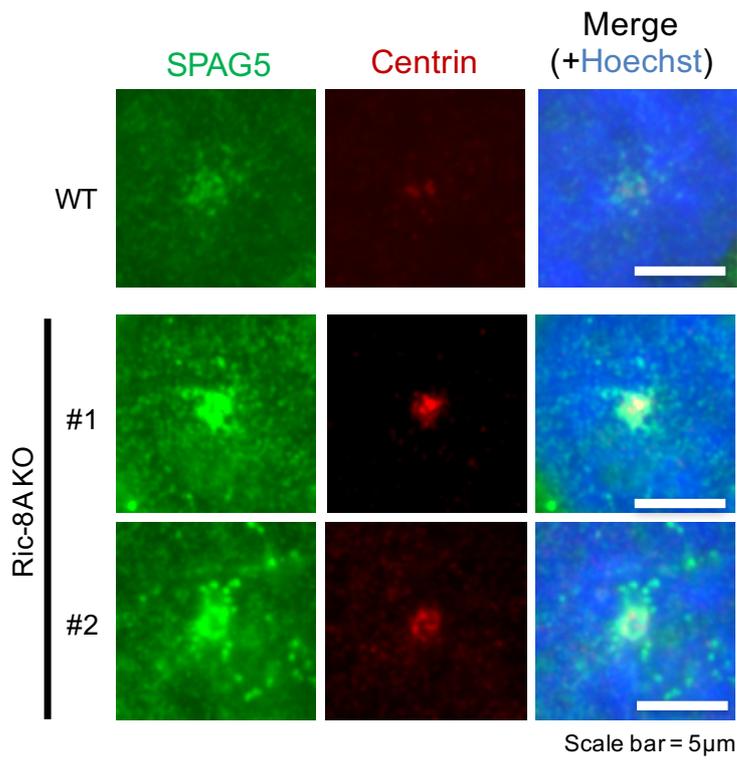
Ric-8A 発現抑制が SPAG5 の局在並びにタンパク質発現量を変化させるのか検討を試みた。まず Ric-8A ノックアウト細胞にて SPAG5 と Centrin に対する抗体を用いて免疫染色を行い、Centrin 異常増加細胞における SPAG5 の局在を検討した。その結果、コントロール U2OS 細胞と比較して SPAG5 の異常な集積が確認され、さらに Centrin と共局在している様子が確認された(図 21 A)。次に Ric-8A ノックアウト細胞において SPAG5 の発現量をウェスタンブロットにて検証した結果、Ric-8A ノックアウトは SPAG5 の発現量に影響を与えないことが明らかとなった(図 21 B)。これらの結果から、Ric-8A 発現量低下は SPAG5 の発現量には影響しないが、凝集を引き起こすことが明らかとなった。この結果は CS タンパク質である PCM-1 の挙動と同様の傾向である(図 15 B)。

### 3.5.3 Ric-8A 及び PKA と SPAG5 相互作用の検討

データベース上で示された Ric-8A と SPAG5 の相互作用、並びに SPAG5 が PKA と相互作用するかの二点を検討するために 2 者を共発現させ免疫沈降実験を行った。HEK293T 細胞に Flag-SPAG5 と myc-Ric-8A もしくは myc-PKA WT を同時に過剰発現させ、Flag タグを利用した免疫沈降実験を行い、抗 myc タグ抗体を用いたウェスタンブロットにより SPAG5 と Ric-8A もしくは PKA との相互作用を検討した(図 22)。その結果、SPAG5 と Ric-8A の相互作用が観察された。SPAG5 と PKA の相互作用に関しては、抗 Flag 抗体での Flag-SPAG5 を発現させていない細胞抽出液からも Myc-PKA の沈降が見られたが、Flag-SPAG5 を発現させた細胞抽出液ではより多くの Myc-PKA の沈降が認められた。さらに興味深いことに PKA 過剰発現時において SPAG5 のバンドパターンが変化し 48kDa あたりにバンドが確認された。さらに 135-180kDa 付近のバンドが低分子量側へシフトしている様子から、SPAG5 タンパク質の断片化が PKA の過剰発現で起きている可能性が示唆された。

次に、このバンドシフトが PKA のキナーゼ活性に依存した結果なのか調べるために、PKA 不活性化変異体(kinase dead: KD、K73R)を用いた実験を行った。先の実験に PKA 不活性化変異体を追加し、Flag タグで免疫沈降後、ウェスタンブロットにて共沈降並びに SPAG5 のバンドシフトを確認した(図 23)。その結果、SPAG5 と Ric-8A の共沈降、並びに PKA WT の過剰発現による SPAG5 のバンドシフトが再び確認された。一方、SPAG5 と PKA 不活性化変異体の共発現では SPAG5 のバンドシフトは確認されず、さらに SPAG5 と PKA 不活性化変異体の共沈降が確認された。PKA 不活性化変異体はキナーゼ活性を持たないが基質との結合能は保持していることから、SPAG5 は PKA の基質である可能性が示唆された。しかしながら、本研究においては中心体形成における Ric-8A と SPAG5 の関係性は不明瞭な部分が多く残っており、更なる詳細な解析が必要である。

A



B

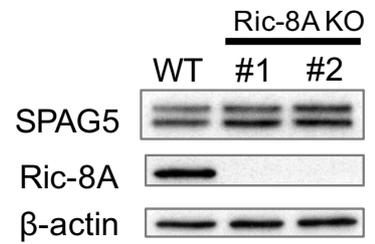


図 21 Ric-8A ノックアウトによる SPAG5 の局在および発現量への影響解析

A) Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞における抗 SPAG5 抗体を用いた免疫染色像。(Green: SPAG5、Red: Centrin、Blue: Hoechst、scale bar=5  $\mu$ m)  
 B) Ric-8A ノックアウト U2OS 細胞における SPAG5 の発現量をウェスタンブロットによって検討した。

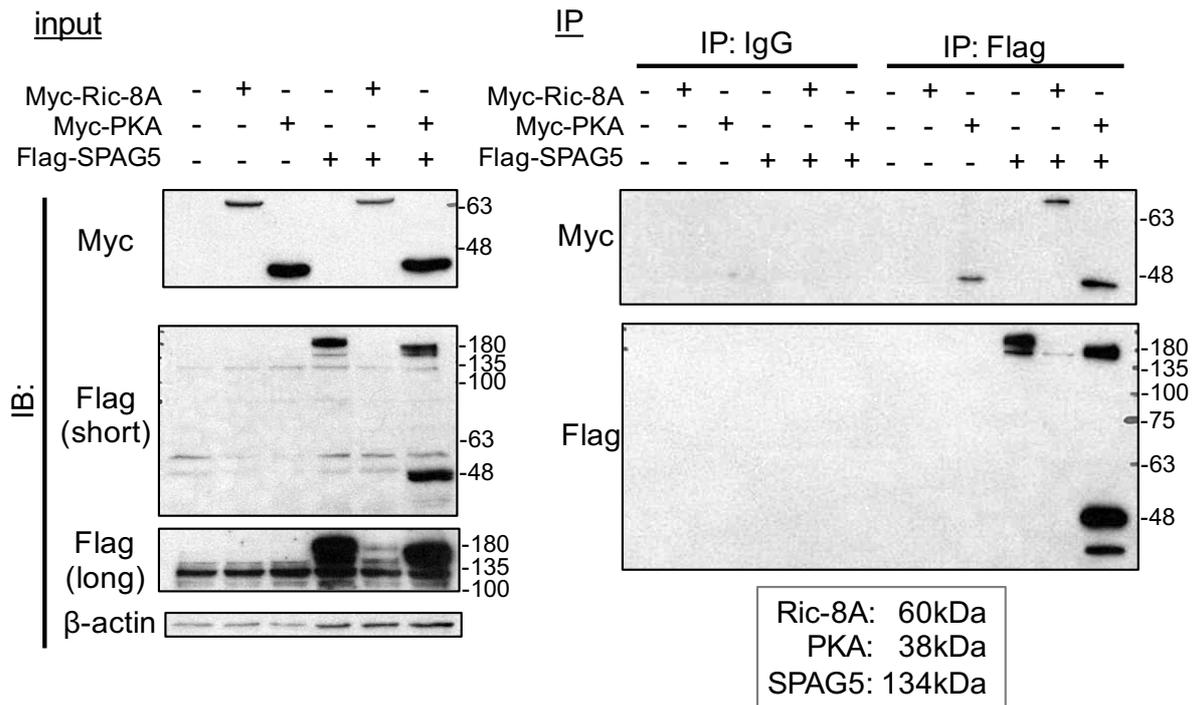


図 22 Ric-8A もしくは PKA と SPAG5 間の相互作用の検討

HEK293T 細胞に Myc-Ric-8A、Myc-PKA C-subunit WT (Myc-PKA)、Flag-SPAG5 を組み合わせて導入し、細胞抽出液を用いて Flag タグ免疫沈降実験を行った。その後ウェスタンブロットにて Flag、Myc、 $\beta$ -アクチンに対する抗体を用いて検出した。(図左: Input、図右: 免疫沈降サンプル)

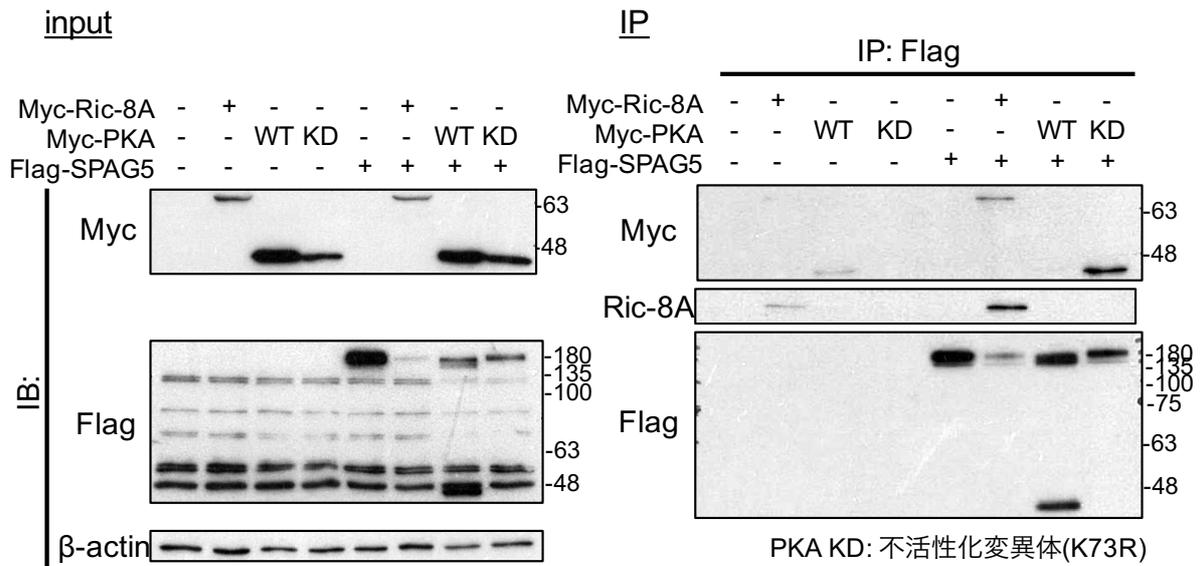


図 23 Ric-8A と SPAG5 間の相互作用確認及び PKA 活性の SPAG5 断片化への影響検討

HEK293T 細胞に myc-Ric-8A、Myc-PKA C-subunit WT (WT) および K73R 変異体(KD)、Flag-SPAG5 を組み合わせて導入し、細胞抽出液を用いて Flag タグ免疫沈降実験を行った。その後 Flag、Myc、Ric-8A、 $\beta$ -アクチンに対する抗体を用いて検出した。(図左: Input、図右: 免疫沈降サンプル)

## 第4章 考察

### 4.1 Ric-8A 発現抑制による中心小体様構造体(CLS)の形成

これまで不明瞭であった Ric-8A の制御する生理機能の解明を目指し表現型の探索を行った結果、Ric-8A は中心小体の数や質を制御することで細胞分裂を正常に保つ機能を有する可能性が示唆された。3.1.2 及び 3.1.5 において siRNA もしくはノックアウトという 2 種類の方法にて Ric-8A の発現抑制を行い、それぞれ中心小体タンパク質の異常増加が観察されたことから(図 3 B, C、図 5 D)、Ric-8A は中心体形成に何らかの機能を有する可能性が考えられる。しかし Ric-8A ノックアウト細胞における中心小体タンパク質の異常増加は Ric-8A が発現していないのに関わらず 20%程度に留まっている。これは 3.2 で示した通り、下流因子が Gai であり、セカンドメッセンジャーである cAMP を介したシグナル経路であることに起因すると考えられる。cAMP 調節機構は増加を促す Gas シグナルや cAMP を分解するホスホジエステラーゼなど多岐にわたっていることから、Ric-8A ノックアウト細胞であるとしても他の cAMP 制御機構により CLS 形成の割合が 20%程度に留まっている可能性が考えられる。

さらに 3.1.3 にて Ric-8A 発現抑制によって中心小体様構造体 (CLS)の形成が想定され(図 4 F)、さらにノコダゾールを用いた検討から CLS にはノコダゾール感受性と非感受性の二種類存在していることが考えられた(図 17)。この 2 種類の CLS の大きな違いは  $\gamma$ -tubulin を持つか否かである(図 16 C)。Ric-8A ノックアウトにより中心体タンパク質が異常増加する割合は Distal 側(CP110 や Centrin)では 20%以上であるのに対し、PCM ( $\gamma$ -tubulin)では 10%程度に留まっている(図 5 F)。この差は Ric-8A 発現抑制が Distal 側タンパク質に深く影響する表現型であるのに対し、 $\gamma$ -tubulin に対しては直接的に影響していない可能性が考えられる。これらのことから、Ric-8A 発現抑制による 2 種類の CLS 形成には原因が 2 つ以上ある、もしくは  $\gamma$ -tubulin を持たない CLS が何らかの要因により  $\gamma$ -tubulin を獲得したことが想定される(図 17)。

### 4.2 中心体形成に関与する G タンパク質シグナルの検討

本研究から、Ric-8A→Gai→cAMP→PKA のシグナル経路が中心体形成に関与する新たな機構が見出された(図 24)。三量体 G タンパク質は細胞膜にて GPCR の制御により機能することが知られるが、中心小体は細胞質に存在することから、Gai シグナルもしくは下流因子が中心体付近で働く可能性が想定される。3.2.6 から、内在性 Gai2 は中心小体に局在していること、それに加え中心体付近の cAMP 量は細胞質全体の cAMP 量よりも低い状態に保たれている報告から(Terrin, A., *et al.*, 2012)、中心小体に局在する Gai は cAMP ホスホジエステラーゼの一つである PDE4D3 による cAMP 分解と協調して cAMP 量減弱に作用している可能性が考えられる。しかしながら、Gai が

抑制するアデニル酸シクラーゼ (Adenylate Cyclase: AC)は AC type1, 3, 5, 6, 8, 9 の全て膜貫通型 AC であり、中心体に局在するとは言い難い。水溶性 AC (sAC)は中心小体に局在しているが(Zippin, L., 2002)、G $\alpha$ i は sAC を抑制し得ないことから中心体 G $\alpha$ i が中心体近辺 cAMP 減少に影響する可能性は考えづらい。しかし近年、AC type3 (AC3) が中心体に局在する可能性が示された(Hua, K. and Feriland, R., 2017)。このことから、中心小体における G $\alpha$ i が AC3 を制御することで cAMP 量を制御する可能性が考えられるため、今後 AC3 の局在や活性化レベルに関して検討が必要である。PKA に関しては 3.2.8 から、AKAP9 を介して中心体に局在する PKA の過剰な活性が CLS 形成原因であることが明らかとなった。さらに Ric-8A の既知の機能である紡錘体牽引力の制御において cAMP 及び PKA の関与は報告されていないことから(Woodard, G., *et al.*, 2010)、本研究で見出した中心体形成に関する Ric-8A の機能は M 期における紡錘体牽引力調節とは別の新規機構であると考えられる。

Ric-8A ノックアウトは cAMP 量を制御する Gas 及び G $\alpha$ i のタンパク質量に大きく影響しないことから(図 10 A)、Ric-8A 発現抑制による CLS 形成には G $\alpha$ i に対する GEF 活性の減弱もしくはシャペロン活性減弱による局在変化が原因であると考えられる。しかしながら、恒常活性化変異体である G $\alpha$ i2 QL 変異体により CLS 形成がレスキューされたことから、G $\alpha$ i 活性化因子としての Ric-8A が発現抑制された結果、G $\alpha$ i 活性が減弱し CLS 形成が起きた可能性が有力であると考えられる。

Ric-8A ノックアウト細胞における Gas 及び G $\alpha$ i 発現量に変化が見られなかったのに対し、Ric-8A がユビキチン化を抑制する G $\alpha$ q/11 や G $\alpha$ 12、G $\alpha$ 13 は劇的にタンパク質量が減少していた(図 10 A)。よって本研究で確認される CLS 形成において G $\alpha$ q/11 及び G $\alpha$ 12 サブファミリー発現量減少が原因である可能性が残されている。このことから、今後各種 G $\alpha$  タンパク質の発現抑制によって CLS が形成されるのか更なる検討が必要である。

### 4.3 中心小体様構造体(CLS)の形成原因

中心体タンパク質の過剰複製の原因として①再複製、②過剰複製、③中心小体タンパク質輸送の障害の3点の可能性を 3.3 にて検証した。

まず①について、3.3.1 にて Ric-8A の発現抑制は細胞周期に影響を与えないことが明らかとなったが(図 13)、中心小体複製の発端は cyclin-E / CDK2 複合体によるリン酸化であることから、Ric-8A ノックアウト細胞における CDK2 及び cyclin-E の発現量並びにキナーゼ活性を測定し、①に対する詳細な検証が今後必要である。

次に②について、Ric-8A の発現抑制は PLK4 及び SAS-6 の局在及び発現量に影響を与えなかったことから(図 14)、Ric-8A による中心小体タンパク質の異常増加は過剰複

製が原因ではない可能性が示唆された。今後さらにこの仮説を検証するためには Ric-8A 発現抑制が PLK4 のキナーゼ活性に影響するのかを検討する必要があると考えられる。

次に③について、Ric-8A 発現量低下は PCM-1 の異常な凝集を起こし(図 15)、PCM-1 の凝集と異常増加した Centrin が共局在している様子から、Ric-8A 発現抑制による CS 凝集が積み荷の凝集を起こしている可能性が予想される。中心小体複製過程では proximal 側から Distal 側の中心小体タンパク質が積み重なる様に伸長、成熟の過程を経ることから、タンパク質輸送異常が起こると Distal 側の中心小体タンパク質が凝集し構造物を形成することが考えられる。PCM と微小管ネットワークとのアンカリングを担う ATF5 と呼ばれるタンパク質がある。ATF5 発現抑制は中心小体と微小管の結合が外れ、中心体付近において中心小体タンパク質の凝集物が形成される (Madarampalli, B., et al., 2015)。Ric-8A 発現抑制による CLS には Cart wheel 構造の主骨格である SAS-6 及び proximal 端のタンパク質 C-Nap1 が含まれておらず(図 6 F)、主に Distal 側のタンパク質が異常に増加している。このことから、CLS は中心小体複製初期における Cart wheel 形成異常による産物ではなく、中心小体複製と並行して起こるタンパク質輸送の異常が原因である可能性が考えられる。

3.3.4 から Ric-8A 発現抑制は CLS ( $\gamma$ -tubulin +) 及び CLS ( $\gamma$ -tubulin -)の二種類の CLS が形成されたが、形成原因の一つとして G2/M 期における中心小体セパレーションの異常が可能性として挙げられる。セパレーションとは複製された中心小体が M 期にて紡錘体として両極に局在するために解離する過程を指す。この過程には PKA が Centrin の 170 番目のセリンをリン酸化することが関与しており、間期における過剰な Centrin リン酸化は早期のセパレーションを起こすことが報告されている (Lutz, W., et al., 2001)。このことから、CLS ( $\gamma$ -tubulin +)は Centrin の過剰なリン酸化による異常なセパレーションが原因である可能性が考えられる。しかしながら、少なくとも CLS ( $\gamma$ -tubulin -)は CS と共局在することやノコダゾール感受性構造物であることから微小管上にあることが想定され、セパレーション異常ではなくタンパク質輸送異常が原因であると予想される。このことから、Ric-8A シグナルには Centrin を含む複数の下流因子が存在する可能性が考えられる。

#### 4.4 MTOC 活性への影響

3.4.2 において Ric-8A を発現抑制した際に異型紡錘体の形成率が増加することから、CLS は MTOC 活性を有しており、Ric-8A 発現抑制により増加した CLS に MTOC 活性に影響する  $\gamma$ -tubulin が含まれていることに起因すると考えられる(図 19)。さらに CLS は間期においても MTOC 活性を持つこと(図 20 A)、static 処理により多極性紡錘

体が増加したことから(図 20 B)、CLS は紡錘体を形成できる能力を有していることが明らかとなった。これらの結果は CLS ( $\gamma$ -tubulin +)が細胞分裂に影響することを示している。このことから、Ric-8A は紡錘体牽引力調節のみならず、中心体形成を制御することで細胞分裂を維持し、生育維持に重要な役割を持つ可能性が考えられる。

#### 4.5 下流因子の探索

PKA は非常に広範囲のタンパク質をリン酸化し制御することが知られていることから、中心体においても PKA によってリン酸化を受けたタンパク質が中心体形成を制御する可能性が想定された。Ric-8A が制御する中心体形成制御を詳細に解明するためには中心体における PKA の基質の同定が重要である。PKA のリン酸化コンセンサス配列は-RRXpSX-もしくは-RXXpSX-である。本研究で着目した SPAG5 は PKA のコンセンサス配列を 3 箇所 (pS: 831a.a., 871a.a., 954a.a.)含む CS タンパク質であり、発現抑制すると中心小体の輸送に異常を起こすことが報告されているタンパク質である(Kodani, A., *et al.*, 2015)。このことから、Ric-8A 発現抑制による PKA の異常なキナーゼ活性が SPAG5 のリン酸化レベルに影響し、中心小体様構造体の形成を促した可能性が想定される。現に、Ric-8A ノックアウト細胞において SPAG5 の発現量に大きな変化は見られないのに対し、SPAG5 の凝集が見られた(図 21)。さらに SPAG5 と PKA の共発現により SPAG5 バンドパターンが大きく変化することや、PKA 不活性化変異体との共沈降などの結果から、PKA の基質である可能性がある (図 22-23)。免疫沈降実験において、PKA WT と SPAG5 のはっきりとした共沈降が確認できなかった理由として、PKA は基質のリン酸化後に結合が外れるために基質との結合時間が短いことが原因であることが考えられる。これは AKAP9 の足場タンパク質としての機能が影響している可能性がある。AKAP タンパク質は PKA 及び基質と結合することで基質のリン酸化を促す足場タンパク質としての機能を有する。このことから、SPAG5、PKA、AKAP9 を過剰発現した状態で免疫沈降を行うことで SPAG5 と PKA の結合が強くなるようになる可能性が考えられる。

免疫沈降実験から見出されたものの一つは PKA キナーゼ活性依存的に SPAG5 を示す Flag タグのバンドパターンが変化したことである(図 23)。PKA WT の過剰発現を行うと SPAG5 の 135-180kDa 付近のバンドが 40kDa 程度低分子量側へシフトし、尚且つ 48kDa あたりにバンド現れること、SPAG5 の N 末端に Flag タグを付加しているのにも関わらず、48kDa と 135kDa のあたり二箇所にバンドが確認された。もし PKA キナーゼ活性によって SPAG5 の断片化が起きている場合、Flag タグで検出すると低分子量もしくは高分子量のどちらかのみが検出されると考えられるため、実際に何が起きている結果であるのか現状は不明である。今後は Ric-8A ノックアウト細胞における SPAG5 のリン酸化レベル変化や SPAG5 疑似リン酸化変異体及び非リン酸化変異体を

作製し中心小体様構造体形成のレスキュー実験により、中心体形成過程におけるタンパク質輸送制御機構として Ric-8A→Gai→cAMP→PKA→SPAG5 というシグナル伝達経路が関与しているのか検証することが必要である。

今後検討すべき基質候補として Centrin が挙げられる。PKA による Centrin のリン酸化はすでに報告されているが(Lutz, W., *et al.*, 2001)、Ric-8A の下流でも PKA が Centrin のリン酸化に関与しているのかは明らかではない。このことから、Ric-8A ノックアウト細胞にて Centrin のリン酸化レベルの検討及び Centrin 疑似リン酸化変異体及び非リン酸化変異体を用いたレスキュー実験を行い、Centrin のリン酸化が CLS 形成に関与するのか検討が必要である。

本研究から、Ric-8A は Gai の活性を制御することにより cAMP の減弱を起し、中心体における PKA の活性を制御することで CS を介した中心体形成を制御する Ric-8A の新規機構が示唆された。本研究によりこれまでの AKAP9 の経路とは異なる、中心体形成制御における上流の経路及び Gα シグナルの関与を明らかにした。さらに、Ric-8A はこれまでの知見である M 期における紡錘体の牽引力の制御のみならず(Woodard, G., *et al.*, 2010)、間期での中心体形成制御により正常な細胞分裂を維持することから、Ric-8A は細胞分裂に関する生体維持に必要な機能を複数持つことが示された。この結果は Ric-8A ノックアウトマウスが胎生致死を示す結果により支持される(Tonissou, T., *et al.*, 2010)。今後は下流因子候補である SPAG5 の更なる検討もしくは候補分子の新規同定により詳細な機構を明らかにする必要があると考えられる。

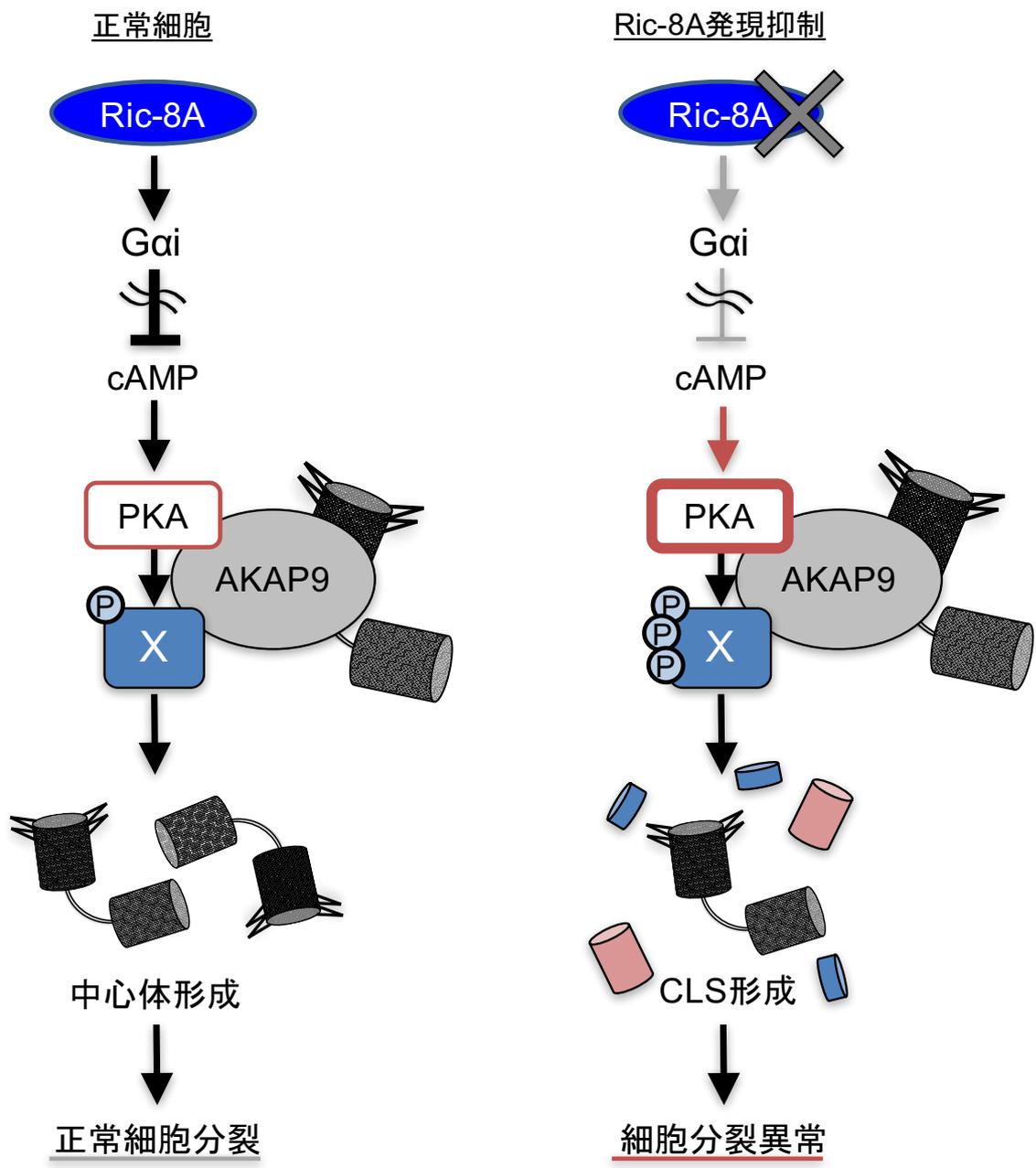


図 24 モデル図

本研究から、Ric-8A は Gai を介したシグナルにより中心体における PKA の活性を制御し、下流タンパク質 X の過剰なリン酸化を防ぐことで中心体形成を正常に保つ機構により正常な細胞分裂を維持するモデルが想定される。

## 第 5 章 引用文献

Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent  $G\alpha$  function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* **119**, 219-230.

Barbelanne, M. and Tsang, W. (2014). Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *BioMed Res. Int.* 2014, 1-13.

Blumer, J. and Lanier, S. (2013). Activators of G protein signaling exhibit broad functionality and define a distinct core signaling triad. *Mol. Pharmacol.* **85**, 388-396.

Boullaran, C., Kamenyeva, O., Cho, H. and Kehrl, J. (2014). Resistance to inhibitors of cholinesterase (Ric)-8A and  $G\alpha i$  contribute to cytokinesis abscission by controlling vacuolar protein-sorting (Vps)34 activity. *PLoS ONE* **9**, 86680.

Chan, P., Gabay, M., Wright, F. and Tall, G. (2011). Ric-8B is a GTP-dependent G proteins guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **286**, 19932-19942.

Chan, P., Thomas, C., Sprang, S. and Tall, G. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3794-3799.

Chen, Z., Indjeian, V., McManus, M., Wang, L. and Dynlacht, B. (2002). CP110, a Cell Cycle-Dependent CDK Substrate, Regulates Centrosome Duplication in Human Cells. *Dev. Cell* **3**, 339-350 .

Chishiki, K., Kamakura, S., Hayase, J., Yuzawa, S. and Sumimoto, H. (2017). Ric-8A-mediated stabilization of the trimeric G protein subunit  $G\alpha i$  is inhibited by pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 941-945.

Chishiki, K., Kamakura, S., Yuzawa, S., Hayase, J. and Sumimoto, H. (2013). Ubiquitination of the heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits Gai2 and G $\alpha$ q is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **435**, 414-419.

Cho, H. and Kehrl, J. (2007). Localization of G $\alpha$  proteins in the centrosomes and at the midbody: implication for their role in cell division. *J. Cell Biol.* **178**, 245-255.

Cho, H. and Kehrl, J. (2008). Beyond the plasma membrane: New functions for heterotrimeric G-protein signaling in asymmetric and symmetric cell division. *Cell Cycle.* **7**, 573-577.

Cho, H. and Kehrl, J. (2007). Localization of G $\alpha$  proteins in the centrosomes and at the midbody: implication for their role in cell division. *J. Cell Biol.* **178**, 245-255.

Chung, H., Park, J., Lee, N., Kim, H. and Jang, C. (2016). Phosphorylation of Astrin Regulates Its Kinetochore Function. *J. Biol. Chem.* **291**, 17579-17592.

Dammermann, A. & Merdes, A. (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.* **159**, 255-266.

David, N.B., Martin, C.A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., and Bellaiche, Y. (2005). Drosophila Ric-8 regulates Gai cortical localization to promote Gai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1083-1090.

Diviani, D., Langeberg, L., Doxsey, S. and Scott, J. (2000). Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain. *Curr. Biol.* **10**, 417-420.

Eggenchwiler, J. and Anderson, K. (2007), Cilia and Developmental Signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 345-373.

Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D. and Tall, GG. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein  $\alpha$  subunit membrane association. *Sci Signal.* **4**, ra79

Ganem, N., Godinho, S. and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* **460**, 278-282.

Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S., Dunican, D. and Knoblich, J. (2005). Drosophila Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1099-1105.

Hanashiro, K., Kanai, M., Geng, Y., Sicinski, P. & Fukasawa, K. (2008). Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells. *Oncogene* **27**, 5288-5302.

Hori, A., Peddie, C., Collinson, L. and Toda, T. (2015). Centriolar satellite and hMsd1/SSX2IP-dependent microtubule anchoring is critical for centriole assembly. *Mol. Biol. Cell* **26**, 2005-2019.

堀部修平, 伊東広. (2015). 三量体 G タンパク質. 生体の科学 **66** 巻第 5 号, 400-401

Hua, K. and Ferland, R. (2017). Fixation methods can differentially affect ciliary protein immunolabeling. *Cilia* **6**.

Jenie, R. I., Nishimura, M., Fujino, M., Nakaya, M., Mizuno, N., Tago, K., Kurose, H. and Itoh, H. (2013). Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal. *Genes. Cells* **18**, 1095-1106.

Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. and Takaya Satoh. (1991). Structure and function of signal-transducing Gtp-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 349-400.

Keryer, G. (2003). Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2436-2446.

Kim, J., Krishnaswami, S. and Gleeson, J. (2008). CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3796-3805.

Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortfeld, M., Erat, M., Flückiger, I., Gönczy, P. and Steinmetz, M. (2011). Structural basis of the 9-Fold symmetry of centrioles. *Cell* **144**, 364-375.

Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y. and Nigg, E. (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev. Cell* **13**, 190-202.

Kodani, A., Yu, T., Johnson, J., Jayaraman, D., Johnson, T., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Partlow, J., Kim, H., Krup, A., Dammermann, A., Krogan, N., Walsh, C. and Reiter, J. (2015). Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication. *eLife*, 4. e07519

Kolobova, E., Roland, J., Lapierre, L., Williams, J., Mason, T. and Goldenring, J. (2017). The C-terminal region of A-kinase anchor protein 350 (AKAP350A) enables formation of microtubule-nucleation centers and interacts with pericentriolar proteins. *J. Biol. Chem.* **292**, 20394-20409.

Kubo, A., Sasaki, H., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S. & Shiina, N. (1999). Centriolar Satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J. Cell Biol.* **147**, 969-980.

Levine, M., Bakker, B., Boeckx, B., Moyett, J., Lu, J., Vitre, B., Spierings, D., Lansdorp, P., Cleveland, D., Lambrechts, D., Foijer, F. and Holland, A. (2017). Centrosome amplification is sufficient to promote spontaneous tumorigenesis in mammals. *Dev. Cell* **40**, 313-322.

Lutz, W., Lingle, W., McCormick, D., Greenwood, T. and Salisbury, J. (2001). Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* **276**, 20774-20780.

Madarampalli, B., Yuan, Y., Liu, D., Lengel, K., Xu, Y., Li, G., Yang, J., Liu, X., Lu, Z. and Liu, D. (2015). ATF5 connects the pericentriolar materials to the proximal end of the mother centriole. *Cell* **162**(3), pp.580-592.

Mattaloni, S., Ferretti, A., Tonucci, F., Favre, C., Goldenring, J. and Larocca, M. (2013). Centrosomal AKAP350 modulates the G1/S transition. *Cell. Logist.* **3**, e26331.

Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D. and Rand, J.B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12593-12598.

Miller, K.G., and Rand, J.B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (Go $\alpha$ ) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. **156**, 1649-1660.

Morris, E., Kawamura, E., Gillespie, J., Balgi, A., Kannan, N., Muller, W., Roberge, M. and Dedhar, S. (2017). Stat3 regulates centrosome clustering in cancer cells via Stathmin/PLK1. *Nat Commun.* **8**, 15289.

Nagai, Y., Nishimura, A., Tago, K., Mizuno, N. and Itoh, H. (2010). Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. *J Biol Chem.* **285**, 11114-11120.

Nigg, E. and Raff, J. (2009). Centrioles, Centrosomes, and Cilia in health and disease. *Cell* **139**, 663-678.

Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J. and Itoh, H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes. Cells* **11**, 487-498.

Nishimura, T., Takahashi, M., Kim, H., Mukai, H. and Ono, Y. (2004). Centrosome-targeting region of CG-NAP causes centrosome amplification by recruiting cyclin E-cdk2 complex. *Genes. Cells* **10**, 75-86.

Ohta, M., Ashikawa, T., Nozaki, Y., Kozuka-Hata, H., Goto, H., Inagaki, M., Oyama, M. and Kitagawa, D. (2014). Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nat Commun.* **5**, 5267.

Ran, F., Hsu, P., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281-2308.

Strnad, P. and Gönczy, P. (2008). Mechanisms of procentriole formation. *Trends Cell Biol.* **18**, 389-396.

Strnad, P., Leidel, S., Vinogradova, T., Euteneuer, U., Khodjakov, A. and Gönczy, P. (2007). Regulated HsSAS-6 levels ensure formation of a single procentriole per centriole during the centrosome duplication cycle. *Dev. Cell* **13**, 203-213.

Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H. and Ono, Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **274**, 17267-17274.

Tall, G. (2002). Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **278**(10), 8356-8362.

Tall, G.G., Krumins, A.M., and Gilman, A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 8356-8362.

Terrin, A., Monterisi, S., Stangherlin, A., Zoccarato, A., Koschinski, A., Surdo, N., Mongillo, M., Sawa, A., Jordanides, N., Mountford, J. and Zaccolo, M. (2012). PKA and PDE4D3 anchoring to AKAP9 provides distinct regulation of cAMP signals at the centrosome. *J. Cell Biol.* **198**, 607-621.

Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M. and Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Dev. Dyn.* **239**, 3404-3415.

Von Dannecker, L.E., Mercadante, A.F., Malnic, B., (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein G $\alpha$  olf. *J. Neurosci.* **25**, 3793-3800.

Wang, H., Ng, K.H., Qian, H., Siderovski, D.P., Chia, W., and Yu, F. (2005). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1091-1098.

Wong, C. and Stearns, T. (2003). Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication. *Nat Cell Biol.* **5**, 539-544.

Wong, W. and Scott, J. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 959-970.

Woodard, G., Huang, N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. and Kehrl, J. (2010). Ric-8A and Gi recruit LGN, NuMA, and Dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3519-3530.

## 謝辞

本研究は奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 分子情報薬理学研究室における博士課程中の研究成果を纏めたものである。

伊東広教授には本研究の機会を与えて頂きました。博士前期過程2年進学時において研究の方向性に関して様々な助言を頂いたこと、深く感謝しております。さらに総説の執筆や数々の学会への参加機会など様々な経験をさせて頂き、研究の進め方のみならず書類の書き方から考え方までご教授賜りました。これらの経験が本論文に深く結びついております。心から感謝申し上げます。

小林哲夫先生には実験の方向性から考え方まで幅広くお教え頂きました。貴重な御意見、ご鞭撻が無ければ本研究成果は得られませんでした。深く感謝致します。また、梶紀子先生及び水野憲一先生(現 青森大学 薬学部)、高見健太特別研究員には研究生生活において様々な観点からご助言を頂きました。心から感謝致します。

アドバイザー委員として奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科の加藤順也先生、石田靖雅先生には貴重な御助言、ご指導を頂きましたこと、熱く御礼申し上げます。

国立遺伝学研究所 中心体生物学研究部門 北川大樹先生及び白土玄博士には研究手法に関しご鞭撻を頂き、また奈良先端科学技術大学院大学の市川ひとみ氏には研究のお力添えを頂きました。深く感謝致します。

さらに分子情報薬理学研究室の皆様には研究に関する意見の他、真摯に研究に取り組む姿に励まされ、私自身も尽力することができました。特に同時期に配属された伊達山泉氏の元気な姿には幾度となく励まされました。さらに秘書の瀬川裕美子氏、谷本早苗氏、平野育子氏には事務手続きなど大変お世話になりました。同研究室の全ての皆様のおかげで楽しい研究生生活を送ることができ研究に打ち込むことが出来ました。熱く御礼申し上げます。

最後に、本論文執筆には5年間の長い研究生生活において様々な方面から支えてくれた家族の力なしには遂行できませんでした。長きに渡りご援助並びに応援していただき、両親並びに家族の皆様には心から感謝申し上げます。