

CAMSAP3 由来微小管による
アクチン繊維の動態制御に関する研究

長江 成典

目次

要旨	1
第一章 序論	3
1-1 微小管	4
1-1-1 微小管の構造とダイナミクス	4
1-1-2 中心体微小管と非中心体微小管	6
1-2 CAMSAP ファミリー	8
1-2-1 CAMSAP ファミリーの構造	8
1-2-2 CAMSAP ファミリーの機能	10
1-2-3 本研究について	13
第二章 結果	15
2-1 CAMSAP3 は細胞形態と微小管の配向を制御する	16
2-2 CAMSAP3 はアクチン繊維や細胞の形態に影響を及ぼす	22
2-3 CAMSAP3 は GEF-H1 を介して RhoA を活性化する	28
2-4 CAMSAP3 はチューブリンの翻訳後修飾を通じて GEF-H1 の活性を調節する	34
第三章 考察	43
3-1 CAMSAP3 と微小管の制御	44
3-2 RhoA、GEF-h1 に対する CAMSAP3 の影響	45
3-3 他の CAMSAP ファミリータンパク質との関連	47
3-4 今後の展望	48
第四章 材料と方法	51
4-1 試薬の組成	52
4-2 使用した抗体と薬剤	53

4-3 培養細胞の免疫染色	54
4-4 ウェスタンブロッティング	54
4-5 細胞の培養と遺伝子導入	55
4-6 大腸菌からのタンパク質精製	55
4-7 微小管の配向の測定	56
4-8 EB1 コメットの方向の測定	57
4-9 RhoA の活性測定	57
4-10 微小管沈降アッセイ	57
4-11 顕微鏡観察とライブイメージング	58
文献	59
謝辞	67

要旨

動物細胞の微小管には、そのマイナス端が中心体に結合しているものとそうでないものが存在する。これらの微小管の間にどのような機能的差異があるか、余りわかっていない。CAMSAP3 (Nezha ともよぶ) は、細胞接着または細胞質に分布して微小管のマイナス端に結合するタンパク質で、中心体とは独立に微小管の重合起点となり同時にマイナス端を安定化させる作用がある。本研究は、この分子に着目し、CAMSAP3 由来の微小管と、中心体由来の微小管に機能的差異があるかどうかを明らかにすることを目的とする。

研究は HeLa 細胞を用いて行った。HeLa 細胞には、中心体由来の微小管とそれ以外の微小管が共存するが、CAMSAP3 の発現量を siRNA により減少させる (ノックダウンする) と中心体から放射状に伸びる微小管が増加した。この CAMSAP3 ノックダウン細胞では周縁部の突起が伸びるという形態変化が観察され、さらに、ストレスファイバーの形成が亢進していることが明らかになった。また、ストレスファイバーの終末に局在する接着斑が大きくなっていた。これらの変化の原因を調べると RhoA の活性が上昇しており、これがストレスファイバーと接着斑の形成を促進していることが分かった。

次に、RhoA 活性亢進の原因を探るため、RhoA 活性制御に関わる RhoGEF に注目した。RhoGEF の 1 つ GEF-H1 は、微小管と結合して活性が抑制されることが知られているので、その関与を調べたところ、CAMSAP3 ノックダウンによって引き起こされる変化には GEF-H1 が必要であること、そして、CAMSAP3 のノックダウンによって微小管に結合していない GEF-H1 の割合が増えていることが明らかになった。さらに CAMSAP3 のノックダウンによって脱チロシン化微小管が増えること、GEF-H1 はこの脱チロシン化微小管には結合しないことが細胞組織学的観察から示唆された。これを確認するため、試験管内で微小管の脱チロシン化を誘導したところ、GEF-H1 の微小管に対する結合が有意に減少していた。

以上の結果から、CAMSAP3 によって安定化されている微小管は、中心体由来の微小管に比べてより強くチロシン化されており、GEF-H1 をより効果的に捕捉することで活性を抑えていること、そしてこの非中心体微小管の存在が RhoA の活性を適切に制御していることが示唆された。本研究により、1 つの細胞内にある微小管には、その重合起源によって機能的違いがあることが初めて明らかにされた。

第一章

序論

1-1 微小管

細胞は状況によって形態を変化させ、周囲の環境と適切に接触しなければならない。また細胞は、成長し、分裂するのに伴って、内部の細胞小器官を配置しなければならない。これらの機能を支えるものが微小管である。この節では、微小管の構造、ダイナミクスと細胞内での形成過程について、これまでの知見をまとめる。

1-1-1 微小管の構造とダイナミクス

微小管は α -チューブリンと β -チューブリンが多数重合してできるポリマーである。 α -チューブリンと β -チューブリンがヘテロダイマーを形成し、それが螺旋状に積み重なっていくことで、半径が約 25 nm の中空の管状の微小管を形成する (図 1 - 1)。微小管内におけるヘテロダイマーの配列は非常に規則的で、 β -チューブリンが向いている側はプラス端 (+端)、その反対側はマイナス端 (-端) と呼ばれている (図 1 - 1A)。

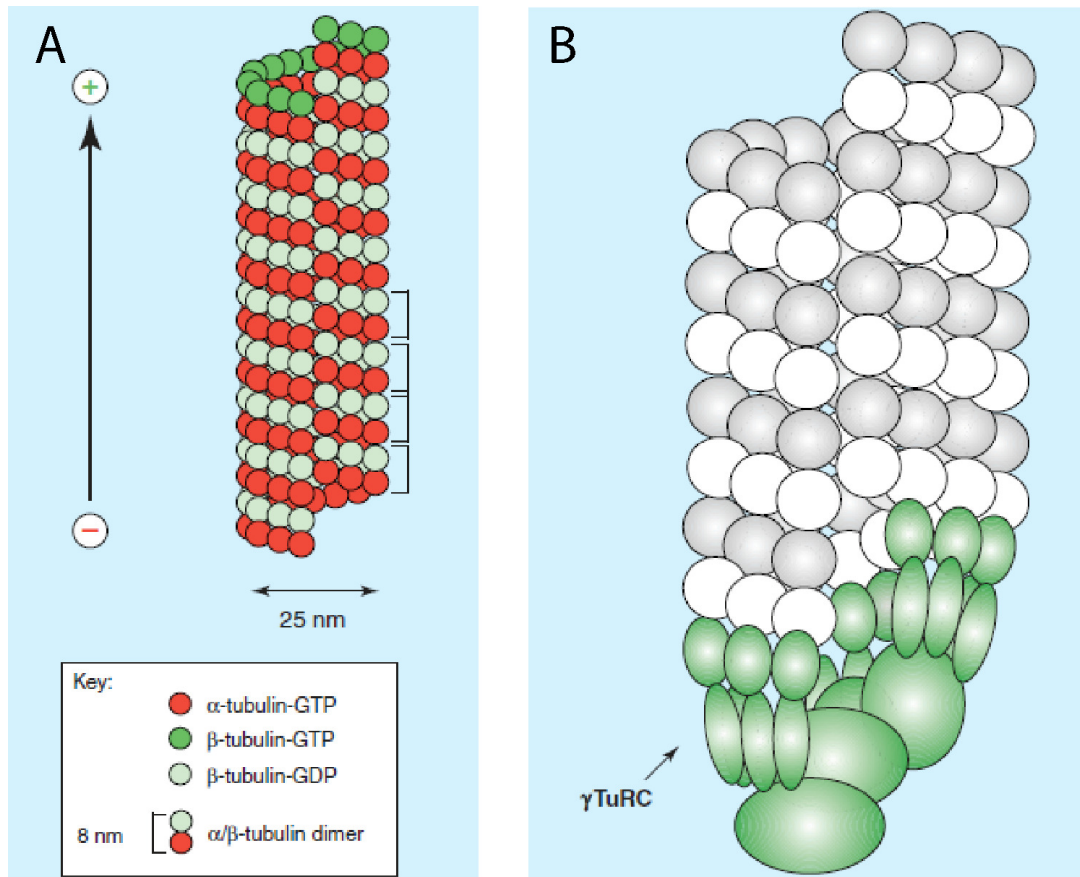
精製チューブリンだけでも微小管を形成することができる。この場合、まず核となる小さい微小管の集合体ができ、そこからプラス端、マイナス端ともに重合が開始される。この反応の律速段階は核形成であり、核となる特別な複合体が存在している場合、より効率的に微小管を形成することができる (Rice et al., 2008)。

細胞内におけるそのような重合核として、 γ -チューブリンを含む γ -チューブリン環複合体 (γ -tubulin ring complex, γ TuRC) がよく調べられている (図 1 - 1B)。 γ TuRC を核として微小管が形成される場合、 γ TuRC がマイナス端に結合し、微小管はプラス端の方向に伸びていく。

微小管は静的な構造ではなく、状況に合わせて伸び縮みしたり、再構築されたりする。微小管のダイナミクスは、その構成要素であるチューブリンの重合、脱重合のバランスによって決定される。

in vitro で精製チューブリンを重合させると、微小管の典型的なダイナミクスが観察できる。微小管はほぼ一定の速度で伸長し、突然急に退縮を始める。そしてまた伸長し…といったことを繰り返す (Akhmanova and Steinmetz, 2008)。このように、伸長状態と退縮状態の交代を繰り返す性質を動的不安定性という。微小管のダイナミクスは、伸長状態の時の伸長速度、伸長状態から退縮状態 (カタストロフィ) に移行する頻度、退縮状態における退縮の速さ、退

縮状態から伸長状態へ移行（レスキュー）する頻度の4つのパラメータで決定できる（Desai and Mitchison, 1997）。



(Dammermann et al., 2003) より抜粋

図 1-1 微小管の構造

(A) 微小管は、 α -チューブリンと β -チューブリンのヘテロダイマーが多数結合した円筒状の構造体である。微小管は長軸方向に非対称な構造をしていて、 β -チューブリンが露出している方向をプラス端、その反対側をマイナス端という。(B) 細胞内の多くの微小管では、マイナス端は γ -チューブリンを含むタンパク質複合体である γ -チューブリン環複合体 (γ tubulin ring complex, γ TuRC) が結合している。

in vitro では微小管のプラス端とマイナス端のどちらも同じようにカタストロフィ、およびレスキューが観察されるが、その速度は異なっている(Walker et al., 1988)。一般にプラス端のほうがマイナス端よりも重合、短縮の速度が速いが、その比はほぼ同じで、プラス端もマイナス端もチューブリンの解離定数は等しい。

しかし *in vivo* では、微小管のダイナミクスは様々なタンパク質によって制御されている。特に EB (end binding)ファミリータンパク質や CLIP170 (Cytoplasmic linker protein 170) など、プラス端に濃縮するタンパク質は plus end tracking proteins (+TIPs) と呼ばれ、微小管のダイナミクス研究の中心的な対象となっている (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Galjart, 2010)。それに対してマイナス端からの重合はほぼ起こらない。前述したように、マイナス端は γ TuRC などによってキャップされており、新規のチューブリンの重合が妨げられていると考えられている。また、キャップの存在しないマイナス端は不安定で、すばやく分解されていくと考えられている (Dammermann et al., 2003)。

1-1-2 中心体微小管と非中心体微小管

微小管の形成の多くは微小管形成中心 (microtubule organizing center, MTOC) とよばれる特別な場所で起こる。動物細胞では、1個のはっきり識別できる MTOC が核の近傍にあり、中心体と呼ばれている (Bornens, 2002)。中心体には多数の γ TuRC が含まれており、これを重合核として多数の微小管が伸びている。このため、中心体から伸びる微小管は核の近傍 (中心体の位置) にマイナス端があり、細胞辺縁部にプラス端を伸ばしている。

しかし、マイナス端が中心体に結合していない微小管も存在し、これらは非中心体微小管 (non-centrosomal microtubules) と呼ばれている。この非中心体微小管と中心体微小管の割合は細胞の種類によって異なり (図 1-2)、上皮細胞や神経細胞では非中心体微小管が多いが、線維芽細胞などでは中心体微小管が多くなる (Bartolini and Gundersen, 2006)。また、植物細胞では中心体が存在しないため、多くの微小管のマイナス端は細胞表面に結合している (Lloyd and Chan, 2004)。多核の筋肉細胞では、細胞の長軸にそって非中心体微小管が配列している (Tassin et al., 1985)。

これらの非中心体微小管はいくつかの異なるメカニズムで形成されている。

たとえば、神経細胞では短い非中心体微小管が神経突起内にたくさん存在している。神経細胞において、微小管はまず中心体で形成され、その後 Katanin などの微小管切断酵素で切断され、軸索と樹状突起に運ばれると考えられている (Sharp and Ross, 2012)。

このように、中心体で形成された微小管が中心体から離れて非中心体微小管ができる場合もあるが、中心体以外の場所で核形成し、微小管が形成される場合もある。

そのような例の一つとして、中心体を取り除いたアフリカツメガエルの卵抽出液や、中心体のない植物細胞では、紡錘体が染色体付近から自発的に形成される (Heald et al., 1996; Zhang and Dawe, 2011)。低分子量 GTPase である Ran はヒストン H3 と H4 に直接結合することができるため、染色体のそばで Ran が活性化され、その活性化 Ran の作用によって核形成に必要なタンパク質が集合し、微小管が形成されると考えられている (Zhang and Dawe, 2011)。

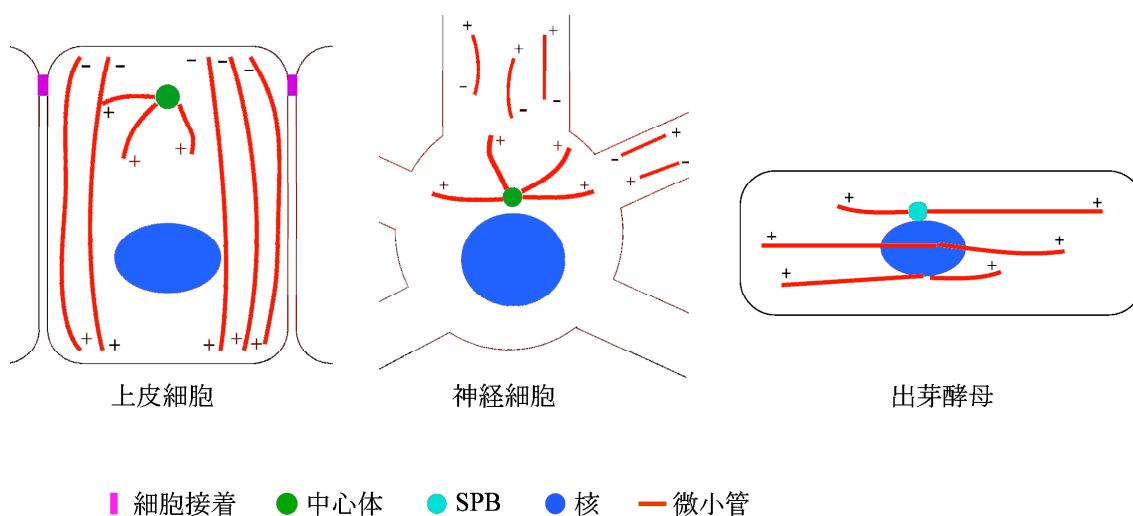


図 1-2 非中心体微小管を持つ細胞

細胞によって、非中心体微小管の配向は様々に異なっている。上皮細胞では、微小管のマイナス端が細胞頭頂付近に並び、プラス端が細胞の底面側に向いている (Bacallao et al., 1989)。神経細胞では、中心体で形成された微小管が katanin などの微小管切断酵素によって切断され、神経突起内に運ばれる (Sharp and Ross, 2012)。出芽酵母では、微小管は MTOC にあたる紡錘極体 (Spindle pole body, SPB) にマイナス端が結合しているものと、核膜付近に結合しているものがある (Hagan, 1998)。

また、微小管はゴルジ器官からも伸長できることが知られている (Chabin-Brion et al., 2001)。この微小管の形成には微小管のダイナミクスを制御するタンパク質である CLASP (cytoplasmic linker associated protein) やゴルジ器官の構成因子である GCC185 (Golgi coiled coil protein 185) などを必要とし (Maia et al., 2013)、ゴルジ器官由来の微小管はゴルジ器官の形成や適切な細胞の移動に必要なことがわかっている (Miller et al., 2009)。

以上のように、細胞内にはマイナス端が中心体に結合している中心体微小管と、それ以外の非中心体微小管の 2 種類の微小管が存在している。

微小管の機能について述べられる場合、その微小管が中心体由来のものか、それ以外のものかを区別している場合は少ない。特に細胞質に断片的に存在している非中心体微小管は、そのマイナス端を特異的に染色する方法が存在していなかったため、見分けることが非常に難しかったことも、研究があまり進んでいないことの原因であろう。

しかし 2008 年に CAMSAP3 (calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3, Nezha ともいう) というタンパク質が当研究室にて同定され、これが細胞質の非中心体微小管のマイナス端に結合するということがわかった (Meng et al., 2008)。これによって中心体由来の微小管と、細胞質に存在する非中心体微小管を区別することができるようになり、中心体由来の微小管と非中心体微小管の機能的差異を研究するという、本研究の端緒となった。

なお、CAMSAP3 は最初に報告された論文では Nezha と呼ばれていた (Meng et al., 2008) が、CAMSAP ファミリーの一員であることが認識されたため、CAMSAP3 という名前も使われている。本報告では、以後 CAMSAP3 という名前で統一する。

1-2 CAMSAP ファミリー

CAMSAP ファミリーは最近同定されたタンパク質ファミリーであり、まだまだ多くのことはわかっていない。この節では、哺乳類における CAMSAP ファミリーとショウジョウバエのホモログ分子である Patronin について概説する。

1-2-1 CAMSAP ファミリーの構造

CAMSAP ファミリーの中で最初に報告されたのは 2008 年、Baines らによるものである (Baines et al., 2008) が、これはスウェーデンで行われた “The Cytoskeleton Regulation and Motility” という学会における報告であり、現在ではアブストラクトしか手に入らない。アブストラクトによると、彼らは CAMSAP1 が calmodulin と spectrin に結合することを発見し、そこから calmodulin-regulated spectrin-associated protein (CAMSAP) という命名をしている。ただし、この後関連した報告が出ていないため、CAMSAP ファミリータンパク質が本当に calmodulin および spectrin と結合するのかわかっているわけではない。

CAMSAP ファミリー遺伝子は哺乳類では 3 つ存在し、それぞれ CAMSAP1、CAMSAP2 (CAMSAP1 like 1, CAMSAP1L1)、CAMSAP3 と呼ばれている。全て似た構造を持ち、N 末端付近に calponin homology (CH) ドメイン、中央部に coiled coil (CC) 領域が 3 つ、C 末端に CKK ドメインがある (図 1-3)。CKK の名前の由来は CAMSAP, KIAA1078, KIAA1543 の頭文字をとったもので、KIAA1078, KIAA1543 はそれぞれ、CAMSAP2、3 の名前が付く前のデータベース上の識別名である (Baines et al., 2009)。

CH ドメインは 100 残基ほどのドメインで、多数のアクチン結合タンパク質で発見されている (Gimona et al., 2002)。これらのアクチン結合タンパク質で同定されている CH ドメインは多くの場合 2 つ並列に並んだものであり、この場合 CH ドメインはアクチン結合能を持っていることがわかっている (Gimona et al., 2002)。

CAMSAP ファミリーは N 末端に CH ドメインを一つだけ持っており、この場合の CH ドメインの機能はアクチン結合とは異なる、さまざまな機能を持つことが知られている (Gimona et al., 2002)。+TIPs の一つである EB1 は N 末端に一つの CH ドメインを持ち、この CH ドメインは二量体を形成することで微小管に対する結合能を持つと考えられている (Slep and Vale, 2007)。また、CH ドメインの名前の由来であるアクチン結合タンパク質の calponin も、一つの CH ドメインをもつタンパク質であるが、この CH ドメインはアクチン結合能を持たず (Gimona et al., 2002)、ERK1, 2 (extracellular signal-regulated kinase 1, 2) に結合することが報告されている (Leinweber et al., 1999)。このように、単独の CH ドメインが何と結合し、どのような機能を持つかを予想することは難しく、現在のところ CAMSAP ファミリーの CH ドメインの機能はわかっていない。

CAMSAP1 の C 末端に位置する CKK ドメインは微小管に結合することが知られている (Baines et al., 2009)。このドメインは哺乳類では CAMSAP ファミリーのみ存在しており、Baines らは、この意味で CKK ドメインが CAMSAP ファミリーを定義する、と述べている (Baines et al., 2009)。

中央部に存在する 3 つの coiled coil 領域の役割はまだ知られていない。

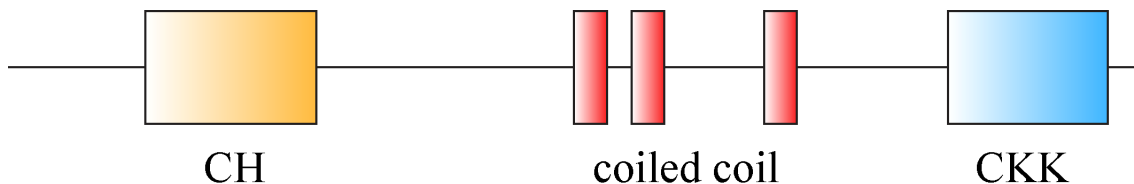


図 1-3 CAMSAP ファミリーの構造

哺乳類には CAMSAP ファミリー遺伝子が 3 つ存在し、全て似たドメイン構造を持つ。N 末端付近に calponin homology (CH) ドメインがあり、中央部に coiled coil (CC) ドメインが 3 つ、C 末端に CAMSAP, KIAA1078, KIAA1543 (CKK) ドメインがある。

1-2-2 CAMSAP ファミリーの機能

CAMSAP1 は小脳の顆粒細胞に発現しており、微小管上に局在していることが観察されている (Baines et al., 2009)。また前述した Baines らの学会報告のabstract (Baines et al., 2008) によれば、CAMSAP1 は軸索の形成に必要であると報告されている。

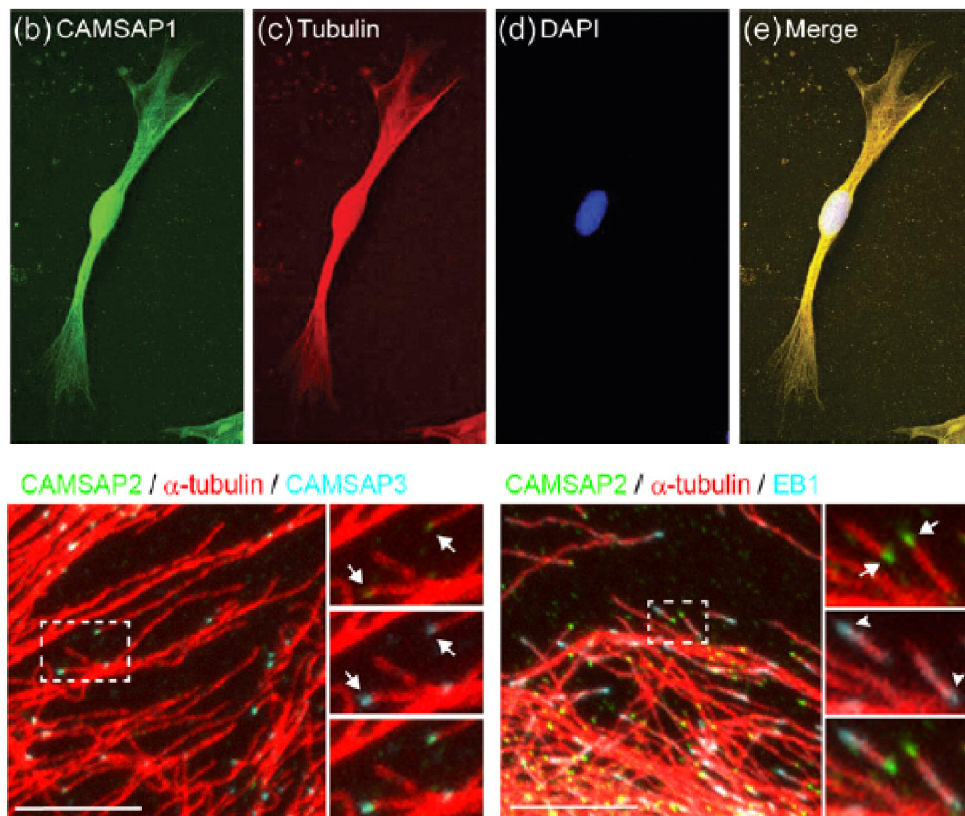
CAMSAP2 は、ヒト結腸癌由来の培養細胞であり上皮細胞様の構造をとる Caco-2 細胞において、非中心体微小管のマイナス端に結合することがわかっている (Tanaka et al., 2012)。CAMSAP2 のノックダウンによって中心体から伸びる微小管が増えるが、伸長中の微小管の総数は減少する。その結果として、重合した微小管の量が減少する。またゴルジ器官の集積にも影響をあたえることがわかっている (Tanaka et al., 2012)。

CAMSAP3 も CAMSAP2 とほぼ同様の機能を持つことが報告されている (Tanaka et al., 2012)。さらに、CAMSAP3 は PLEKHA7 (Pleckstrin homology domain-containing family A member 7), p120 カテニンを介して E-カドヘリンに結合することが知られている (Meng et al., 2008)。Caco-2 細胞において CAMSAP3 をノックダウンすると、E-カドヘリンの細胞間接着における集積が減少し、細胞間接着の形が崩れることから、CAMSAP3 が細胞間接着を安定化させる役割を果たしていることがわかっている (Meng et al., 2008)。

CAMSAP2 と CAMSAP3 はともに微小管のマイナス端に点状に局在し、似たような機能を持つが、CAMSAP1 は微小管全体に分布している (図 1 - 4)。このことから、CAMSAP1 は CAMSAP2, 3 とは異なる機能を持っているのかもしれない。

また、CAMSAP ファミリーのショウジョウバエ由来のホモログである Patronin についても報告がある。Patronin は最初ショウジョウバエ由来の培養細胞である S2 細胞における RNAi スクリーニングによって、紡錘体が短くなる遺伝子として同定され、ssp4 (short spindle phenotype 4) と名付けられた。その後微小管のマイナス端に結合して安定化する作用があることがわかり、ラテン語で「protector」を意味する Patronin と命名された (Goodwin and Vale, 2010; Goshima et al., 2007)。

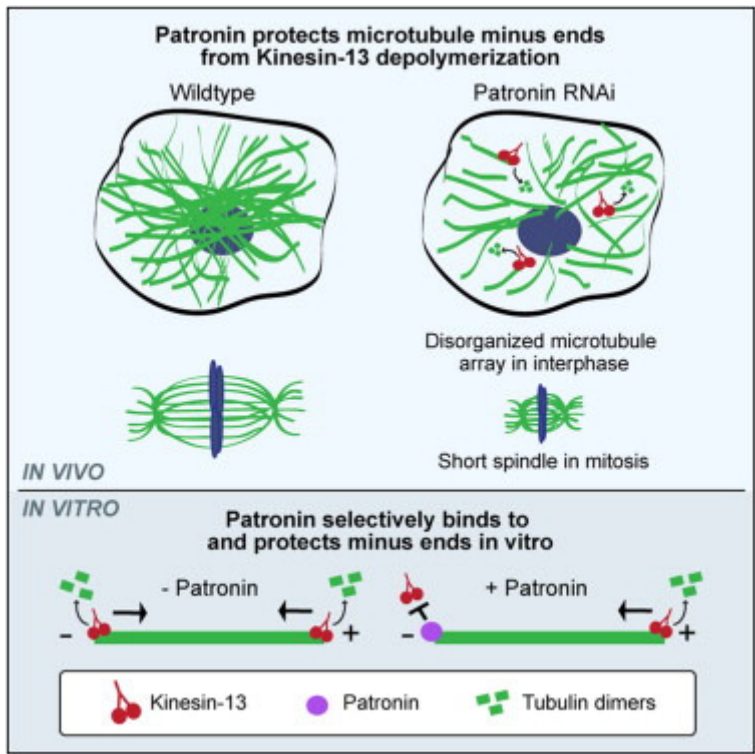
Patronin も *in vitro* において微小管のマイナス端に結合し、S2 細胞でノックダウンすると微小管のマイナス端が非常に不安定化する。この不安定化は Kinesin-13 によるものであり、Patronin は微小管のマイナス端に結合することで、Kinesin-13 の分解から微小管を守っていると考えられている (図 1 - 5) (Goodwin and Vale, 2010)。



(上) (Baines et al., 2009) 、(下) (Tanaka et al., 2012) より抜粋

図 1-4 CAMSAP1,2,3 と微小管の関係

(上) 小脳顆粒細胞における CAMSAP1 と β -チューブリンの免疫染色。微小管全体と非常によく共局在している (Baines et al., 2009)。(下、左) Caco-2 細胞における CAMSAP2, 3 と α -チューブリンの免疫染色。微小管の一端のみに点状に局在している。(下、右) Caco-2 細胞における CAMSAP2、 α -チューブリンとプラス端マーカである EB1 の免疫染色。CAMSAP2 が EB1 と反対側に局在していることから、CAMSAP2 がマイナス端に局在していることがわかる (Tanaka et al., 2012)。



(Goodwin and Vale, 2010) より抜粋

図 1 - 5 Patronin の機能

Patronin は微小管のマイナス端に結合し、Kinesin-13 による微小管の分解を防いでいると考えられている。(上) Patronin がロックダウンされた細胞では、Kinesin-13 により微小管が分解され、短い微小管断片が増える。また M 期では紡錘体のマイナス端が削られていき、短い紡錘体ができる。(下) *in vitro* で Kinesin-13 は精製チューブリンをプラス端とマイナス端の両方から分解するが、Patronin 存在下ではプラス端からしか分解できない。

1-2-3 本研究について

前述のとおり、中心体由来の微小管と非中心体微小管の機能の違いについては、まだあまりわかっていない。そこで本研究では、非中心体微小管が持つ機能を明らかにするため、CAMSAP3 に着目し、解析を行った。

特に CAMSAP3 の結合している非中心体微小管の、細胞接着以外における機能を明らかにするため、ヒト子宮頸癌由来の細胞株である HeLa 細胞を用いて研究を行った。その結果、HeLa 細胞においても CAMSAP3 は非中心体微小管

のマイナス端に局在し、CAMSAP3 のノックダウンによって非中心体微小管の割合が減少し、中心体から放射状に伸びる微小管が増加することがわかった。

さらに、CAMSAP3 ノックダウン細胞では細胞周辺部の突起が伸びるという形態変化が観察され、ストレスファイバーの形成の亢進が認められた。

この変化の原因を探るため解析を行った結果、CAMSAP3 のノックダウンによって RhoA の活性が上昇していること、また RhoA の活性化がストレスファイバーの形成に必要なことを明らかにした。

次に、CAMSAP3 による微小管の変化と RhoA の活性化を結びつける因子を明らかにするため、GEF-H1 に注目した。GEF-H1 は Rho に対する Guanine nucleotide exchange factor (GEF) であり、微小管との結合によって活性が抑制されることがわかっている (Birkenfeld et al., 2008)。

実験の結果、CAMSAP3 のノックダウンによるストレスファイバーの形成には GEF-H1 が必要であること、また CAMSAP3 ノックダウン細胞において微小管と結合していない GEF-H1 の割合が上昇し、RhoA との結合活性が上昇していることが明らかになった。これにより、CAMSAP3 をノックダウンすることで GEF-H1 が微小管から解離し、RhoA が活性化され、ストレスファイバーが形成されると考えられる。

それでは、なぜ CAMSAP3 ノックダウンにより GEF-H1 が微小管から離れるのだろうか？ その原因を探るため、微小管の翻訳後修飾の変化に注目して検討を行った。

その結果、CAMSAP3 のノックダウンにより脱チロシン化された微小管が増えていること、また GEF-H1 はこの脱チロシン化された微小管には結合しないことを発見した。このことから、GEF-H1 は脱チロシン化された微小管に対する親和性が低く、CAMSAP3 のノックダウンによって脱チロシン化された微小管が増えた結果、脱チロシン化微小管に結合できず遊離しているのではないかと考えた。このことを確かめるため、人為的に脱チロシン化微小管を増やすことによって、GEF-H1 は微小管から解離することを発見した。

以上の結果から、CAMSAP3 に結合している非中心体微小管は、中心体微小管に比べて脱チロシン化されておらず、そのため GEF-H1 をより効率的に抑制できること、またこの微小管が安定に存在することが RhoA の活性を適切に制御するために必要であることが示唆された。

なお、本研究の結果は (Nagae et al., 2013) に掲載され、以降の図は特に注釈がなければ、そこから引用している。

第二章

結果

2-1 CAMSAP3 は細胞形態と微小管の配向を制御する

まず、HeLa細胞においてCAMSAP3が発現していることをウェスタンブロッティングによって確認した（図2-1）。

次に、HeLa細胞においてCAMSAP3が非中心体微小管を制御する機能を持っているかどうか検討した。Caco-2細胞において、CAMSAP3が微小管のマイナス端に結合し、微小管の配向とダイナミクスを制御していることが調べられていた（Tanaka et al., 2012）。しかし、HeLaにおいてCAMSAP3がそのような機能を持っているかどうかはまだ明らかになっていない。

まず、免疫染色によってHeLa細胞におけるCAMSAP3と微小管の関係を調べた。その結果、Caco-2細胞と同じように、CAMSAP3は細胞質全体にわたって点状に分布し、微小管の端に結合していることが分かった（図2-2）。CAMSAP3が微小管のマイナス端に結合していることを確かめるため、HeLa細胞にCAMSAP3-RFPと微小管のプラス端マーカであるEB1-EGFPを遺伝子導入し、タイムラプス観察したところ、CAMSAP3-RFPのシグナルはほとんど動かないのに対し、EB1-EGFPは一方向に動いていることを確認した。そして、CAMSAP3-RFPからEB1-EGFPのシグナルが伸びていく過程が観察できた（図2-3）。これにより、CAMSAP3はHeLa細胞においても微小管のマイナス端に結合することが確認できた。

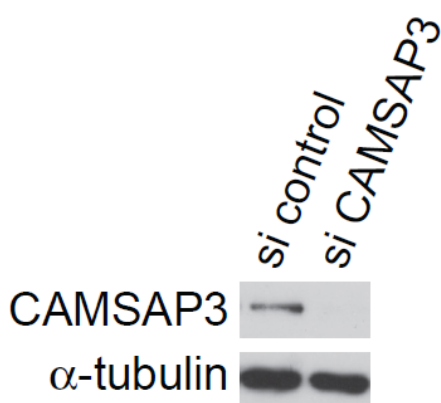


図2-1 HeLa細胞におけるCAMSAP3の発現

HeLa細胞の細胞抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行い、CAMSAP3の発現を確認した。ロード量をチェックするためにα-チューブリンを用いた。

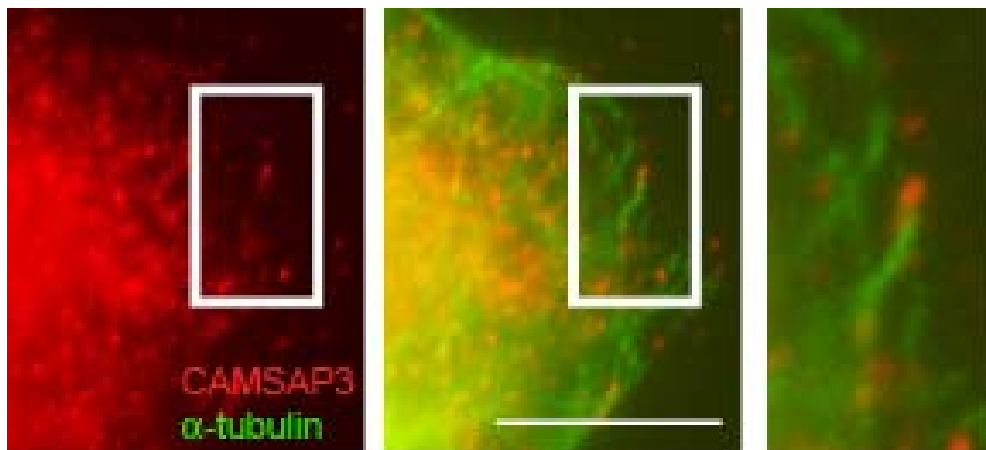


図 2 - 2 CAMSAP3 は微小管の端に結合する

HeLa 細胞において、CAMSAP3 と α -チューブリンの局在を免疫染色により調べた。右は白い枠で囲まれた部分を拡大したもの。CAMSAP3 が微小管の端に局在していることがわかる。スケールバーは 10 μ m。

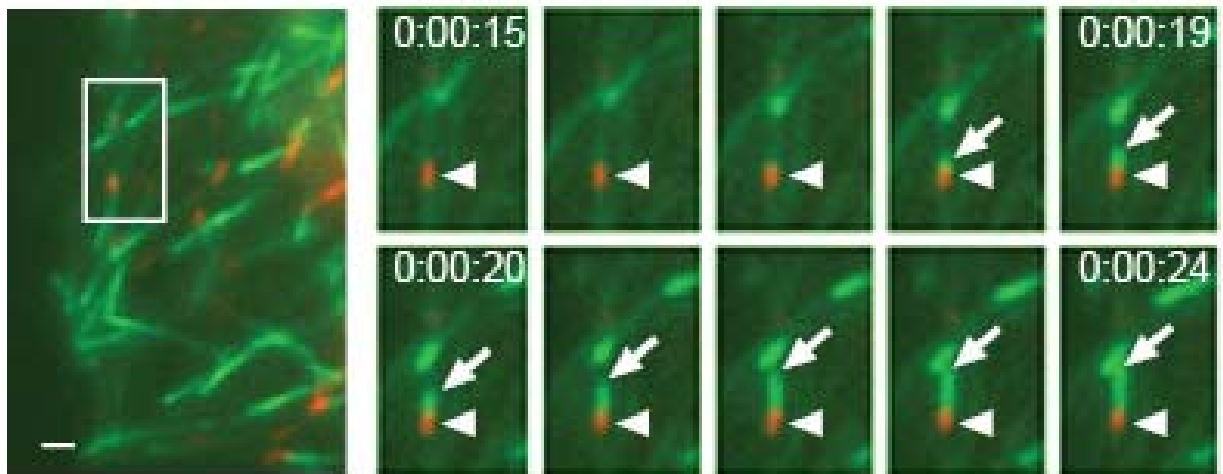


図 2 - 3 CAMSAP3 から生じる EB1-EGFP

HeLa 細胞に CAMSAP3-RFP と EB1-EGFP を遺伝子導入し、1 秒間隔でタイムラプス観察した。白枠で囲まれた部分のタイムラプス画像を右に示す。CAMSAP3-RFP (矢頭) から伸長する EB1-EGFP (矢印) のシグナルが観察された。スケールバーは 1 μ m。

次に、HeLa細胞におけるCAMSAP3の機能を調べるため、siRNAによってCAMSAP3をノックダウンした。すると、コントロール細胞と比べて細胞周辺部に細かい突起が増え、細胞間接着も少なくなるという細胞形態の変化が観察された(図2-4A)。タイムラプス観察によって、CAMSAP3ノックダウン細胞では細胞周辺部で細かい突起が出る頻度が高くなっていることがわかった。形態変化は、この突起形成の活発化を反映したものであろう(図2-4B)。

Caco-2細胞においてCAMSAP3は微小管の配向やダイナミクスに影響をおよぼすことがわかっている。すなわち、野生型のCaco-2細胞では中心体微小管があまり観察されないのに対して、CAMSAP3がノックダウンされたCaco-2細胞では中心体微小管が出現し、微小管の伸長速度と安定性が少し上昇していた。(Tanaka et al., 2012)。

そこで、HeLa細胞においても同じように、CAMSAP3が微小管の配向とダイナミクスを制御しているのかどうかを検討した。まずCAMSAP3をノックダウンしたHeLa細胞の微小管の様子を免疫染色で確認した(図2-5A)。すると、CAMSAP3がノックダウンされた細胞では、中心体付近から放射状に配向した微小管が増加しており、Caco-2細胞における表現形と似た結果となった(図2-5B)。

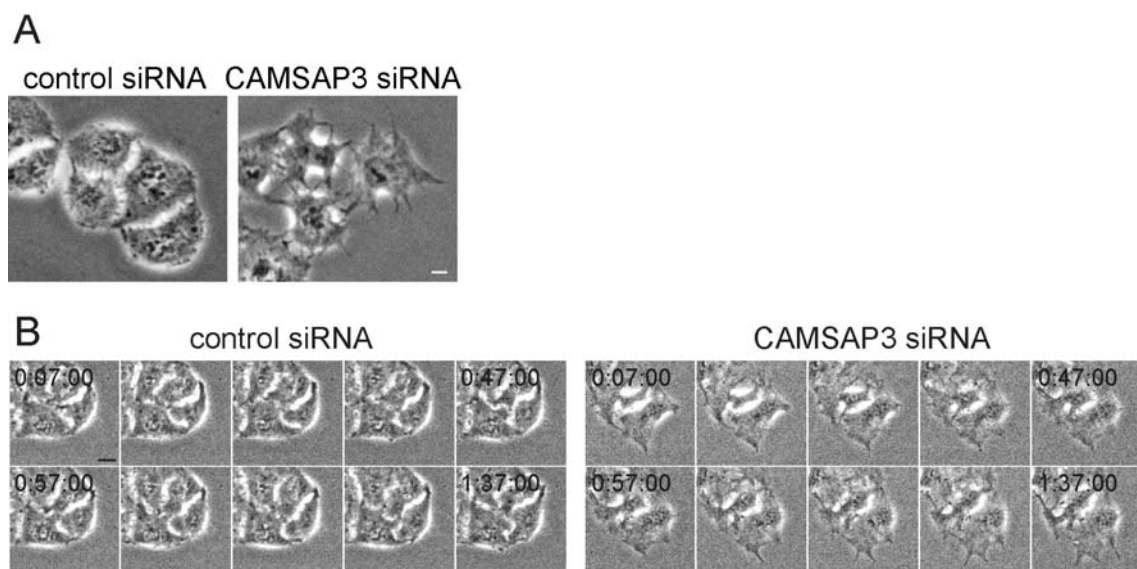


図2-4 CAMSAP3ノックダウンによる細胞形態の変化

(A) コントロール細胞とCAMSAP3をノックダウンしたHeLa細胞の細胞形態を位相差顕微鏡で観察した。CAMSAP3ノックダウン細胞において小さい突起が増えていた。(B) 上記の細胞を10分間隔でタイムラプス観察した。CAMSAP3ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べてより頻繁に細胞の形態が変化していた。スケールバーは10 μ m。

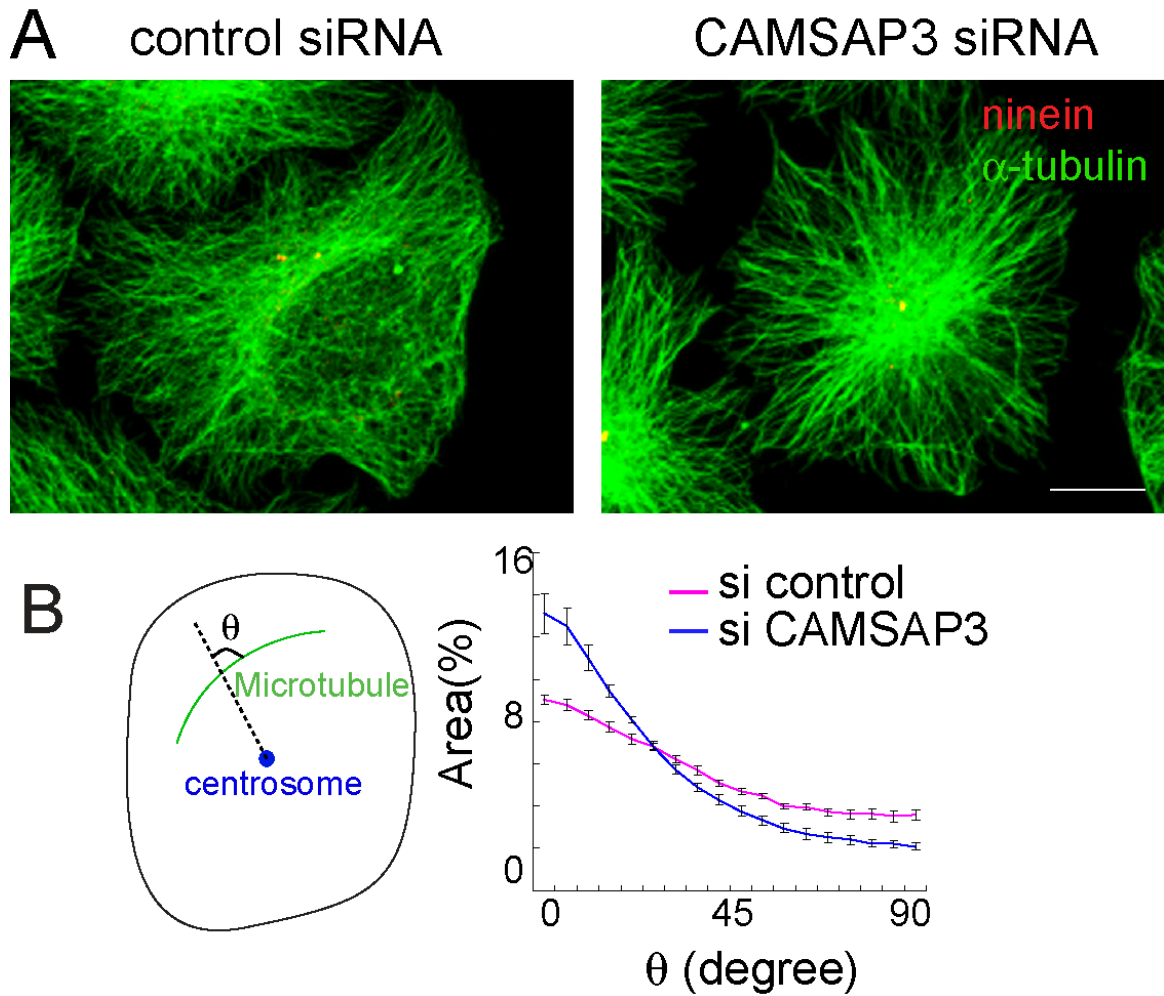


図 2 - 5 CAMSAP3 が微小管の配向に及ぼす影響

(A) 細胞に CAMSAP3 に対する siRNA を導入し、 α -チューブリンの配向を免疫染色で調べた。Ninein は中心体のマーカーとして使用した。(B) 左の図は微小管の配向を定量化するための方法を図示したものである。 α -チューブリンのシグナルが観察されるすべての点において、プログラムによって自動的に微小管の方向を検出し、中心体 (Ninein のシグナルによって同定) からその点までの直線と、微小管の方向とのなす角を測定した。右に、その角度が観察された部分の面積の、全体に占める割合についてヒストグラムを描いた。CAM SAP3 に対する siRNA を導入した細胞において、角度の小さい (中心体から放射状に伸びる) 微小管の割合が多くなっていた。解析には ImageJ と自作のプラグインを用いた。

CAMSAP3 のノックダウンにより、微小管の配向が変化していることは確認できた。しかし免疫染色では、これらの微小管が中心体から細胞の外側に向かって伸びているのか、それともマイナス端が細胞周辺部にあり、プラス端が細胞中心に向かっているのかわからない。そこで微小管の伸びる方向を確実に知るために、CAMSAP3 をノックダウンした細胞にEB1-EGFPを発現させ、その軌跡の方向性を調べた (図 2 - 6)。その結果、CAMSAP3 ノックダウン細胞において、細胞の中心から外側に向かって、放射状に動いていくEB1 の割合が多くなっていて観察できた。このため、CAMSAP3 のノックダウンによって、確かに非中心体微小管の割合が減り、中心体から放射状に伸びる微小管の割合が増えていることが確認できた。

また、微小管のダイナミクスについても調べるため、EB1-EGFP を発現させた HeLa 細胞を用いてタイムラプス観察を行い、EB1 のシグナルが出現してから消えるまでの持続時間と、EB1 のシグナルが移動する速さを測定した。

EB1 は微小管が伸長している間のみ微小管上に局在していることが知られている (Mimori-Kiyosue et al., 2000) ため、EB1 のシグナルの持続時間は微小管が伸長を開始してから停止するまでの時間と考えられる。またEB1 シグナルの移動速度は微小管の伸長速度であると考えられる。

測定の結果、CAMSAP3 ノックダウン細胞において、コントロール細胞と比べてEB1 シグナルの持続時間はあまり変化しないが、微小管の伸長速度が少し速くなっていることがわかった (図 2 - 7)。Caco-2 細胞においても、CAMSAP3 ノックダウンによって微小管の伸長速度が上昇していることが確認されている (Tanaka et al., 2012)。よって、CAMSAP3 はHeLa細胞においても、Caco-2 細胞と同じように微小管のダイナミクスを変化させることがわかった。

以上の実験の結果から、CAMSAP3 は HeLa 細胞においても Caco-2 細胞と同じように微小管のマイナス端に結合し、その配向とダイナミクスを制御していることがわかった。

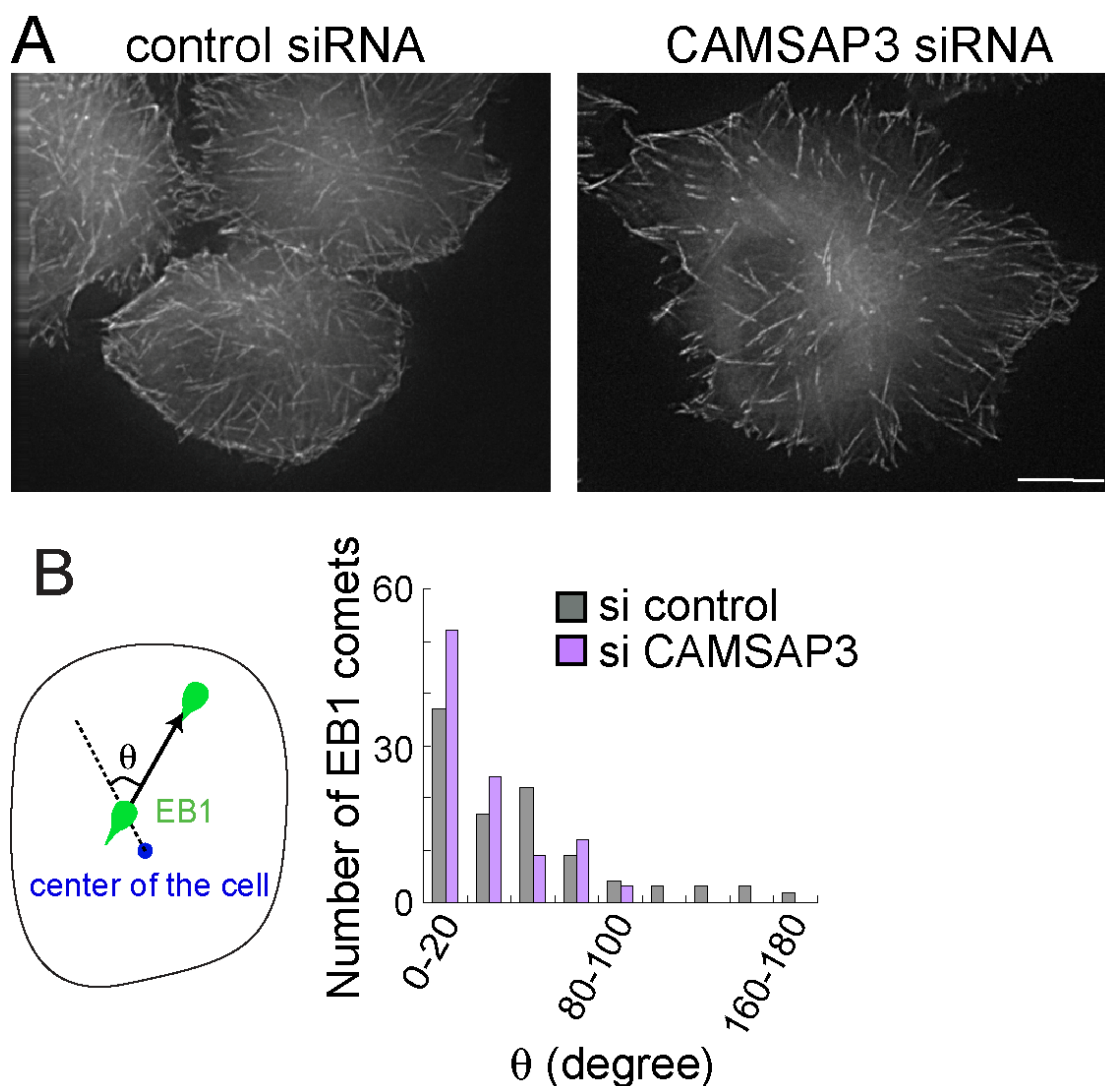


図 2 - 6 CAMSAP3 ノックダウンによる微小管の伸長方向の変化

(A) CAMSAP3 ノックダウン細胞に EB1-EGFP を発現させ、1 秒間隔でタイムラプス観察をした。写真は最初の 5 秒間を maximum projection によって射影したものである。スケールバーは 10 μ m。(B) EB1-EGFP の進行方向の変化を定量化するため、細胞の中心 (EB1-EGFP のシグナルの重心として定義) から EB1-EGFP のシグナルが現れた点までのベクトルと、EB1 の進行方向のベクトルとのなす角を測定し、その分布をヒストグラムにした。横軸に角度、縦軸にその角度が観察された EB1 コメットの数をとっている。コントロール細胞と CAMSAP3 細胞ともに 100 個の EB1 コメットを数えているので、縦軸は観察されたコメットの、全コメットに対する割合(%)と同義である。CAMSAP3 ノックダウン細胞のほうが小さい角度、すなわち細胞の中心から細胞周辺部に向かって、放射状に動く EB1 の数が多くなっていることがわかった。

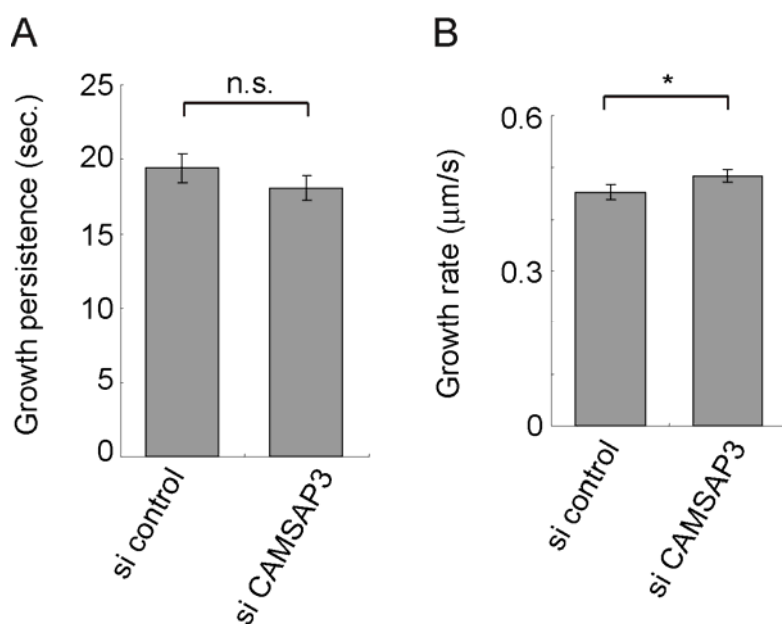


図 2 - 7 CAMSAP3 ノックダウンによる微小管ダイナミクスへの影響

CAMSAP3 ノックダウン細胞に EB1-EGFP を発現させ、(A) EB1-EGFP のシグナルが現れてから消えるまでの持続時間と、(B) 進む速さを測定した。持続時間については統計学的有意差は得られなかったが、EB1 シグナルの進行速度については CAMSAP3 ノックダウン細胞のほうがより速くなっていた。

2-2 CAMSAP3 はアクチン繊維や細胞の形態に影響を及ぼす

前述の実験、およびこれまでの報告によって、CAMSAP3 が微小管に影響をあたえることがわかっている (Goodwin and Vale, 2010; Tanaka et al., 2012) が、微小管以外の細胞骨格に与える影響についてはまだ知られていない。CAMSAP3 をノックダウンした HeLa 細胞で F-actin を染色すると、ストレスファイバーの形成が高度に亢進していることが観察された (図 2 - 10)。細胞外基質とストレスファイバーを結ぶ接着斑 (focal adhesion) のサイズも、CAMSAP3 ノックダウンにより大きくなっていた (図 2 - 12)。この結果より、CAMSAP3 は微小管だけでなくアクチン繊維の動態にも影響を与えることがわかった。

では、どのようにして CAMSAP3 はアクチン繊維に影響を及ぼしているのだろうか？

その一つの可能性として、細胞間接着の変化によるものを検討した。

Caco-2 細胞において、CAMSAP3 はE-カドヘリンなどの存在するadherens junctionに局在し、正常な細胞間接着構造を保つために必要であるということが報告されていた (Meng et al., 2008)。

HeLa細胞には上皮細胞に見られるようなクラシックカドヘリンによる強固な細胞間接着は見られないが、カドヘリン-10 による細胞間接着は存在することを確かめた (図 2 - 8)。HeLa細胞において、CAMSAP3 がこの接着構造に局在していることは観察できなかった。しかしCAMSAP3 をノックダウンすると細胞間の接着が緩やかになり、細胞同士の距離が広がる (図 2 - 4) ことから、CAMSAP3 がHeLa細胞においても細胞間接着の安定性に関与し、CAMSAP3 ノックダウンによって細胞間接着が不安定になった結果、何らかのシグナル伝達系の作用によりストレスファイバーの形成が起きた可能性もある。

そこでカドヘリン-10 をノックダウンすることで細胞間接着を阻害し、そのときにストレスファイバーの形成に変化が起きるかどうかなを確認した (図 2 - 9)。まず、カドヘリン-10 ノックダウン細胞では細胞間に点状に存在していたβ-カテニンの濃縮がなくなり、カドヘリン依存的な細胞間接着が無くなっていたことを確認した。しかし、このカドヘリン-10 がノックダウンされた細胞とコントロール細胞でアクチン繊維の構造を観察した結果、ストレスファイバーの形成に特に変化が見られなかった (図 2 - 9)。このことから、CAMSAP3 ノックダウンによるストレスファイバーの形成は細胞間接着構造の異常によるものではなく、別の因子によるものではないかと考えた。

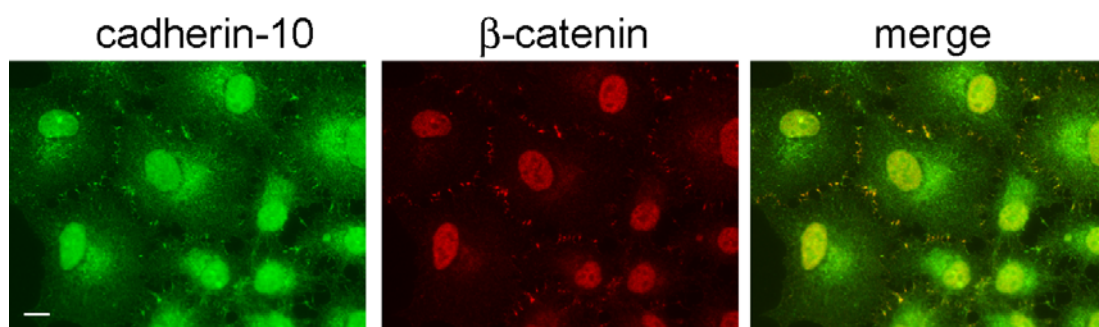


図 2 - 8 HeLa 細胞におけるカドヘリン-10 による細胞間接着

HeLa 細胞において、カドヘリン-10 とβ-カテニンを免疫染色で検出した。細胞間に点状にカドヘリン-10 とβ-カテニンが共局在しており、HeLa 細胞にもカドヘリン-10 による細胞間接着が存在することがわかった。スケールバーは 10μm。

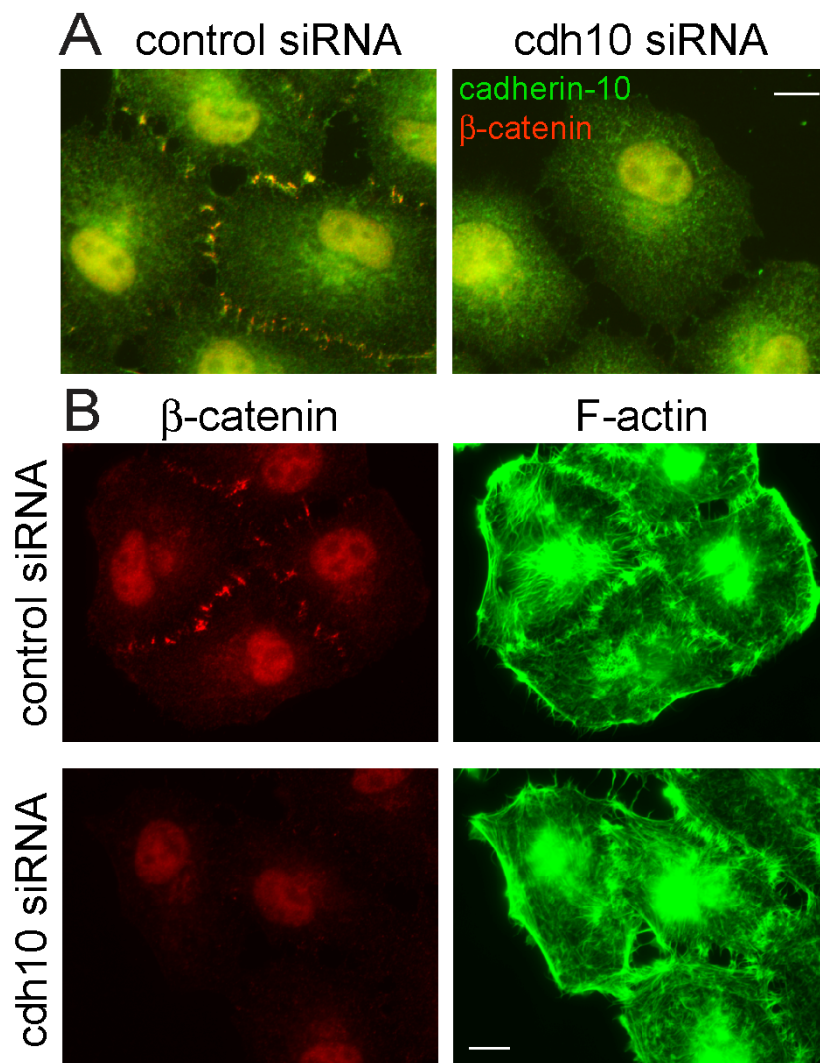


図 2 - 9 カドヘリン-10 のノックダウンによるアクチン繊維の動態の変化

(A) カドヘリン-10 に対する siRNA の効果を確認するため、HeLa 細胞に siRNA を導入し、カドヘリン-10 と β -カテニンを免疫染色によって検出した。細胞間のカドヘリン-10 のシグナルが消え、siRNA の効果が確認できた。さらに細胞間に点状に存在していた β -カテニンのシグナルが消えたことから、カドヘリン依存的な細胞間接着が消失していたことがわかった。(B) カドヘリン-10 に対する siRNA を導入した HeLa 細胞において β -カテニンと F-actin を免疫染色によって検出した。カドヘリン-10 のノックダウンによって、細胞間の β -カテニンの濃縮がなくなっているが、ストレスファイバーの形成に特に変化が見られなかった。スケールバーは 10 μ m。

CAMSAP3 ノックダウンによるストレスファイバー形成の分子メカニズムを明らかにするため、さまざまな分子に対する阻害剤を使って、この効果を抑制できないか試してみた。すると、ROCK阻害剤であるY-27632、およびRho阻害剤であるC3 によってCAMSAP3 ノックダウンによるストレスファイバーの形成が抑制できることがわかった (図 2 - 10)。

Rhoファミリーの一つであるRhoAは、タンパク質リン酸化酵素であるROCK (Rho-kinase) の活性化を通じてストレスファイバーの形成を促進することが知られている (Narumiya et al., 2009)。この結果は、CAMSAP3 のノックダウンによって、Rho、ROCKの経路を活性化され、ストレスファイバーの形成が亢進していることを示唆している。

実際にCAMSAP3 ノックダウンによってRhoの活性が上昇していることを確かめるため、RhoAの活性を直接測定することを試みた。Rhoは低分子量GTPaseファミリーであり、GTPが結合することによって活性化する。RhotekinはGTPが結合して活性化状態にあるRhoAとRhoCに特異的に結合する分子として同定され、GTPの加水分解を防ぐはたらきを持っていることが報告されている (Reid et al., 1996)。その特性を利用し、RhotekinのRho結合ドメイン (RBD) とGlutathione S-transferase (GST) を融合させたタンパク質を使ってGSTプルダウンアッセイを行うことで、HeLa細胞に発現しているRhoAのうち活性化状態にあるRhoAのみを得、ウェスタンブロッティングでその割合を測定する、という実験を行った (図 2 - 11)。

その結果、CAMSAP3 をノックダウンした細胞において活性化状態にあるRhoA の割合が上昇していることが観察された。以上の結果より、CAMSAP3 のノックダウンによって RhoA の活性が上昇し、ROCK を介してストレスファイバーの形成を亢進させていることがわかった。

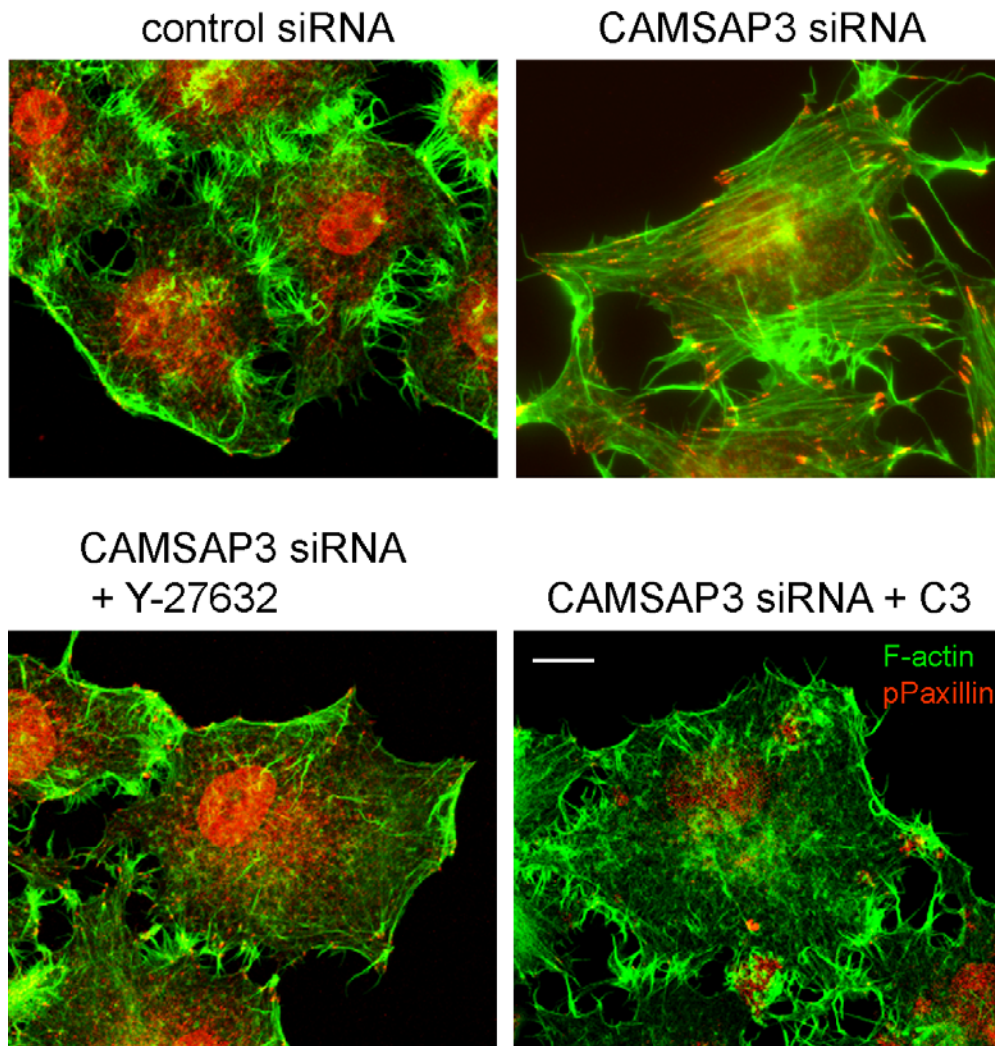


図 2 - 10 CAMSAP3 がストレスファイバーの形成に与える影響

コントロール、および CAMSAP3 に対する siRNA を入れた HeLa 細胞を、溶媒である DMSO (ネガティブコントロール)、 $5\mu\text{M}$ Y-27632 (ROCK 阻害剤)、もしくは $4\mu\text{g/ml}$ 細胞透過性 C3 (Rho 阻害剤) を入れて 1 時間培養し、F-actin と phospho-Paxillin (接着斑のマーカー) を免疫染色で検出した。DMSO を入れた HeLa 細胞では、CAMSAP3 ノックダウンによりストレスファイバーの形成が促進されているが、その効果は Y-27632、細胞透過性 C3 の添加によって抑制された。スケールバーは $10\mu\text{m}$ 。

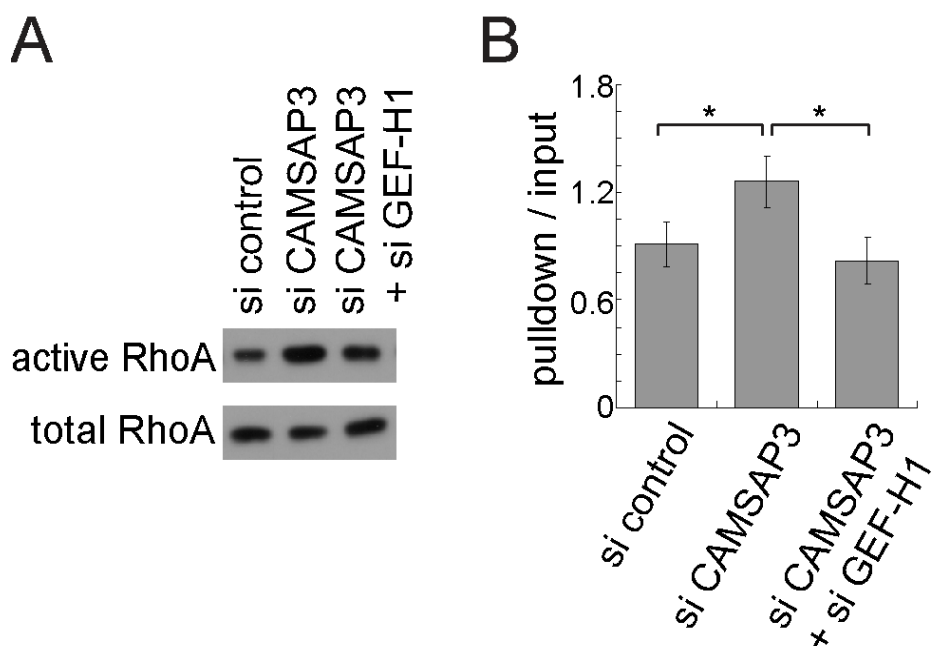


図 2 - 11 RhoA の活性測定

(A) それぞれの siRNA を導入した HeLa 細胞の抽出液と GST-Rhotekin RBD を用いて GST プルダウンアッセイを行い、活性化状態にある RhoA、および細胞抽出液の中に含まれていた RhoA の量をウェスタンブロッティングで検出した。(B) (A) で検出されたバンドの濃さを測定し、活性化 RhoA (pull-down) と全 RhoA (input) の比率を計算した。値は 5 つの独立した実験の平均で、エラーバーは標準誤差を示す。CAMSAP3 ノックダウン細胞において活性化状態にある RhoA の割合が有意に上昇し、GEF-H1 との同時ノックダウンによってコントロール細胞と同じレベルにまで下がっていることがわかった (*, $p < 0.05$)。

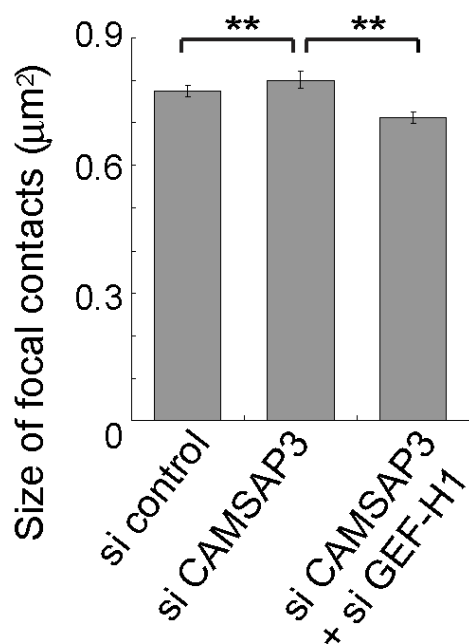


図 2 - 12 CAMSAP3 のノックダウンは接着斑の大きさを上昇させる

それぞれの siRNA を導入した HeLa 細胞を接着斑のマーカー分子である vinculin で染色し、観察された接着斑の大きさを測定してその平均を求めた。CAMSAP3 のノックダウンにより接着斑が大きくなったが、GEF-H1 を同時にノックダウンすることによりその効果は打ち消され、コントロール細胞よりも少し小さくなった(**, $p < 0.01$)。各 siRNA に対して約 7,000 個の接着斑を測定した。

2-3 CAMSAP3 は GEF-H1 を介して RhoA を活性化する

前節の結果により、CAMSAP3 は微小管だけではなく、RhoA、ROCK のシグナル伝達経路を介してストレスファイバーの形成にも関与できることがわかった。では、どのようにして CAMSAP3 は RhoA を制御しているのだろうか？

前述のように、Rhoを含む低分子量GTPaseファミリーは、GTPが結合していると活性化状態にある。逆にGTPがGTPaseのもつ加水分解作用によってGDPに加水分解されると、そのGDPが結合しているGTPaseは不活性化状態となる。GTPaseの活性調節は、主にこのGTPとGDPの間の変換を調整することによって行われる。この調節を担う分子には、主に3種類のグループが存在する。一つはGuanine nucleotide exchange factor (GEF) と呼ばれるもので、GDP結合型の低分子量GTPaseからGDPを取り除き、GTPに対する親和性を上げることでGTPaseを活性化する。2つ目はGTPase activating protein (GAP) と呼ばれ

るもので、結合したGTPaseの持つGTP加水分解活性を上昇させる。その結果、GTPaseは自身に結合しているGTPを加水分解してGDPにし、非活性化状態となる。最後にGuanosine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) と呼ばれるもので、GDP結合型のGTPaseに結合し、GDPとGTPの交換を阻害することでGTPaseを非活性化状態に保つ働きを持つ (Cherfils and Zeghouf, 2013; DerMardirossian and Bokoch, 2005; Rossman et al., 2005)。

これまで多数のRhoAに対するGEF、GAP、GDIが同定されているが、その中でもGEF-H1 というGEFは微小管と結合し、ノコダゾールによる微小管の分解にともなって活性化し、ストレスファイバーを形成するということが知られていた (Birkenfeld et al., 2008; Chang et al., 2008; Krendel et al., 2002)。そこで、このGEF-H1 がCAMSAP3 のノックダウンによるRhoAの活性化に関与しているかどうかを検討した。

まず、HeLa細胞においてGEF-H1 をノックダウンしても、ストレスファイバーの形成にあまり変化が見られなかった (図 2 - 13)。しかし、GEF-H1 とCAMSAP3 を同時にノックダウンするとCAMSAP3 単独ノックダウンで見られたようなストレスファイバーの形成が抑えられること (図 2 - 14)、また接着斑の大きさもコントロール細胞とほぼ同じになっていたことを確かめた (図 2 - 12)。このことにより、CAMSAP3 ノックダウンによるストレスファイバーの形成にはGEF-H1 が必要であることがわかった。

また、HeLa細胞にGEF-H1 を過剰発現させると、ストレスファイバーの形成が促進された (図 2 - 15)。

以上のことから、CAMSAP3 をノックダウンすると、GEF-H1 が活性化され、GEF-H1 の作用により RhoA が、そして RhoA の作用により ROCK が順次活性化され、ストレスファイバーの形成が促進されるというモデルが予想される。そのモデルを検証するため、CAMSAP3 ノックダウン細胞において実際にGEF-H1 が活性化されているのかを検討した。

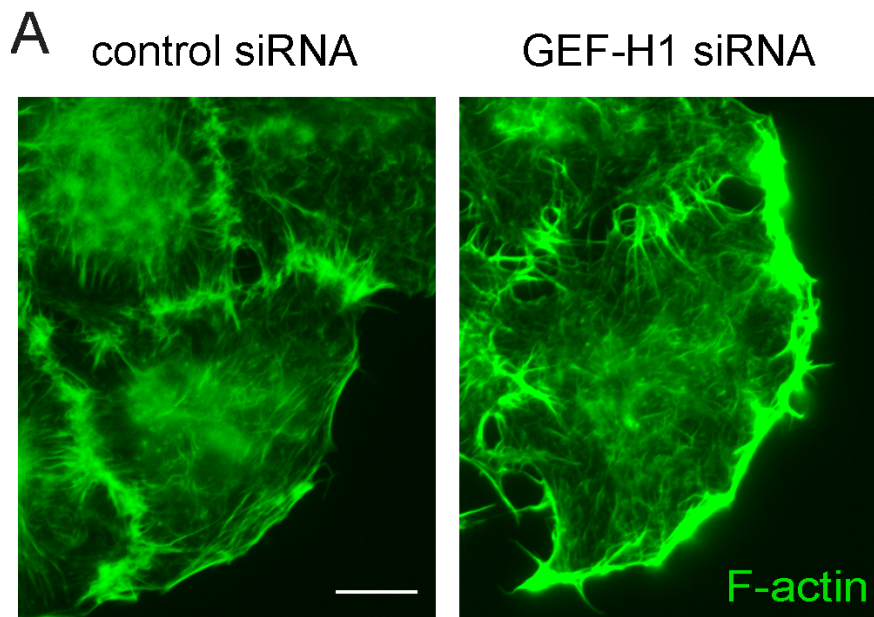


図 2 - 13 GEF-H1 によるストレスファイバー形成への影響

HeLa 細胞に GEF-H1 に対する siRNA を導入し、F-actin を染色することでストレスファイバーの形成に変化が起きているかを調べた。その結果、コントロール細胞と比べて、ストレスファイバーの形成に変化は見られなかった。スケールバーは 10 μ m。

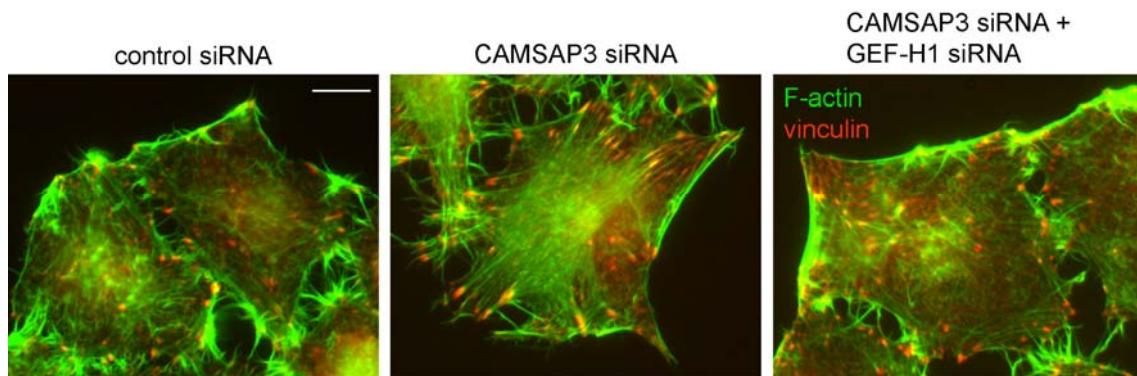


図 2 - 14 GEF-H1 は CAMSAP3 ノックダウンによるストレスファイバーの形成に必要である

HeLa 細胞に、コントロール、CAMSAP3、GEF-H1 に対する siRNA を導入し、vinculin (接着斑マーカー) と F-actin を免疫染色によって検出した。CAMSAP3 と GEF-H1 を同時にノックダウンした細胞では、CAMSAP3 単独ノックダウン細胞にみられるような激しいストレスファイバーの形成、および接着斑の増大は見られなかった。スケールバーは 10 μ m。

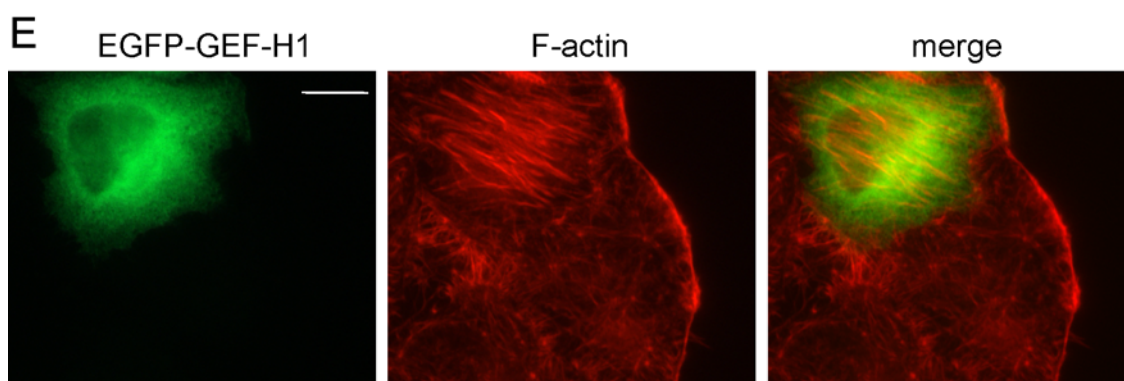


図 2 - 15 GEF-H1 の過剰発現によるストレスファイバーの形成

HeLa 細胞に EGFP を融合させた GEF-H1 を過剰発現させ、F-actin と EGFP を免疫染色によって検出した。EGFP-GEF-H1 を発現している細胞において、ストレスファイバーの形成が促進されていた。ストレスバーは 10 μ m。

GEF-H1 は微小管と結合しているときは不活性状態で、ノコダゾールなどによって微小管が破壊され微小管から遊離すると活性化状態になり、RhoAを活性化することができると言われている (Chang et al., 2008)。

そのため、GEF-H1 の活性を測る一つの指標として、微小管に結合している GEF-H1 の量を測定した。まず細胞抽出液を室温で遠心することによって、微小管と未重合のチューブリンを分画し、微小管とともに沈降した GEF-H1 の量と、未重合チューブリンの画分にある遊離した GEF-H1 の量を比較した。その結果、沈降した α -チューブリンの量 (微小管の量を表す) と、遊離した (未重合の) α -チューブリンの量の比は CAMSAP3 のノックダウンによっても変化しないのに対し、GEF-H1 は CAMSAP3 をノックダウンした細胞において遊離したものの割合が多くなっていた (図 2 - 16)。これは CAMSAP3 のノックダウンにより、GEF-H1 が微小管から解離し、活性化されるという現在のモデルを支持している。

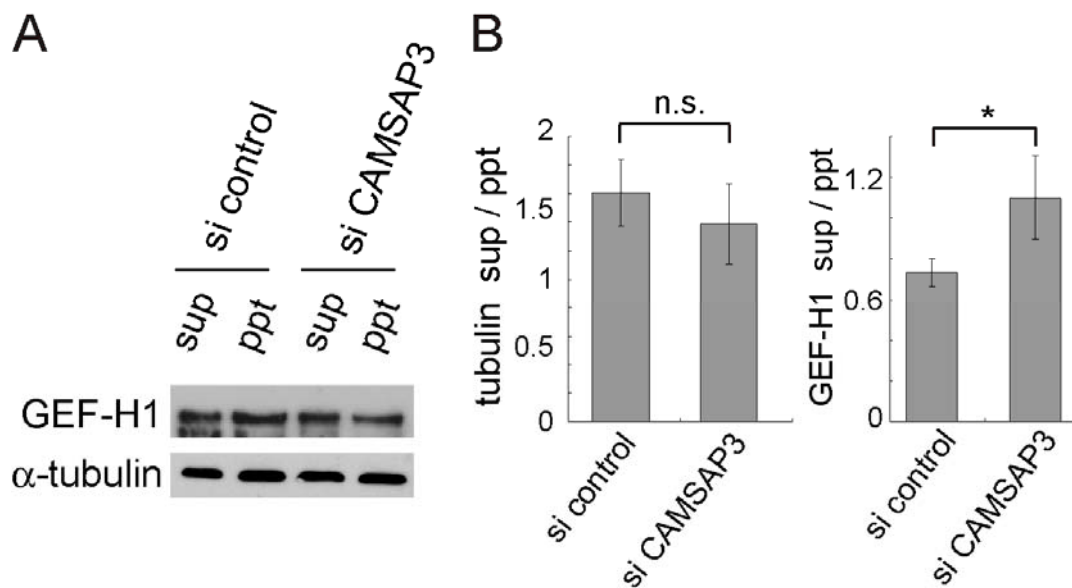


図 2 - 16 微小管と供沈する GEF-H1 の量の測定

(A) HeLa 細胞に CAMSAP3 に対する siRNA を導入し、微小管沈降アッセイによって、微小管とそれに結合しているタンパク質を含むの画分 (ppt) と、遊離したタンパク質画分 (sup) に分け、それぞれに含まれている GEF-H1 と α -チューブリンの量をウェスタンブロットティングで検出、測定した。(B) (A) で測定した、遊離してきたもの (sup) と沈降してきたもの (ppt) の比を計算し、棒グラフに描いた。左: α -チューブリン、右: GEF-H1。グラフの高さは 3 回の独立した実験の平均値を表し、エラーバーは標準誤差を表している。 α -チューブリンの遊離 / 沈降の値に関してはコントロール細胞と CAMSAP3 ノックダウン細胞の間で有意な差が見られなかったが、GEF-H1 については CAMSAP3 ノックダウン細胞のほうが遊離しているものの割合が多かった (*, $p < 0.05$)。

さらにモデルを検証するため、GEF-H1 の、RhoA に対する結合活性を直接測定することを試みた。

前述のとおり、GEFはGDP結合型のGTPaseからGDPを取り外し、GTPに対する親和性を上昇させることでGTPaseを活性化する。その反応の中間体として、GEFはGTP、GDPのいずれとも結合していないGTPaseとの親和性が高くなっており、GTPaseとGTPが会うまでGTPaseを保持している。そこで Garcia-MataらはGTP、GDPと結合できない変異型RhoA (G17A RhoA) を用いてプルダウンを行うことで、G17A RhoAとの結合活性が高いGEFを選択的に得る手法を開発した (Garcia-Mata et al., 2006)。この変異型RhoAは、上記

の反応中間体を模していると考えられ、G17A RhoAに対する結合活性の高い GEFは、野生型のRhoAを活性化する活性も高いと考えられる。

そこで、彼らの方法に従ってG17A RhoAのプルダウンを行い、CAMSAP3 ノックダウン細胞において、GEF-H1 のG17A RhoAに対する結合活性が変化していないかを検討した (図 2 - 17)。その結果、GEF-H1 のG17A RhoAに対する結合活性が、CAMSAP3 のノックダウンによって有意に上昇していることが確認できた。これはCAMSAP3 のノックダウンによってGEF-H1 のGEF活性が上昇していることを示唆しており、現在のモデルを支持していると考えられる。

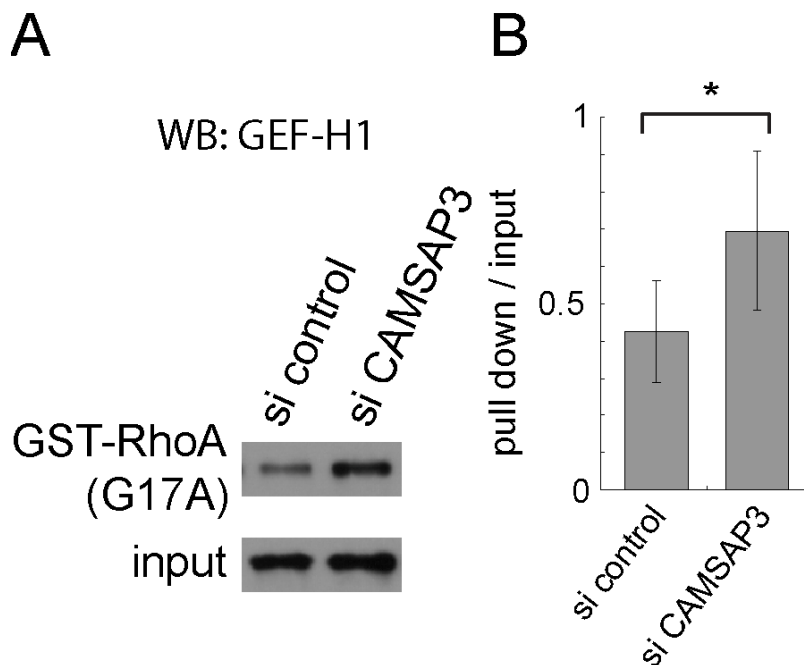


図 2 - 17 GEF-H1 の活性測定

(A) それぞれの siRNA を導入した細胞において、細胞抽出液を GST-G17A RhoA でプルダウンすることによって活性化した GEF-H1 の量を測定した。全 GEF-H1 量はプルダウンする直前の細胞抽出液を用いて測定した。(B) 全 GEF-H1 とプルダウンされた GEF-H1 のシグナルの比を棒グラフに描いた。グラフの高さは 3 回の実験の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。CAMSAP3 をノックダウンした細胞にのほうが、コントロール細胞よりも多くの GEF-H1 がプルダウンされた (*, $p < 0.05$)。

以上の実験結果により、次のようなモデルを提唱した (図 2 - 18)。すなわち、

HeLa細胞には中心体由来の微小管と非中心体微小管の両方が存在しているが、CAMSAP3 は非中心体微小管のマイナス端に結合し、その微小管を安定化している。CAMSAP3 のノックダウンにより非中心体微小管が不安定化し、その結果として、中心体由来の微小管の割合が増加する (図 2 - 5)。

GEF-H1 は中心体由来の微小管、および非中心体微小管のどちらにも結合している。この微小管に結合した GEF-H1 は不活性化状態であり、RhoA を活性化することはできない。そのため野生型の HeLa 細胞では RhoA の活性が低く保たれ、ストレスファイバーの形成はあまり起こっていない。

CAMSAP3 をノックダウンすることで非中心体微小管が不安定化し、分解される。それにともなって、その非中心体微小管に結合していた GEF-H1 が遊離し、遊離した GEF-H1 が RhoA を活性化し (図 2 - 11)、ストレスファイバーが形成される (図 2 - 10、図 2 - 13)。

2-4 CAMSAP3 はチューブリンの翻訳後修飾を通じて GEF-H1 の活性を調節する

前節で提出したモデルが正しければ、CAMSAP3 のノックダウンにより非中心体微小管が分解されているため、微小管の総量が減っているはずである。しかし、微小管沈降アッセイ (図 2 - 16) の結果によると、CAMSAP3 をノックダウンしても微小管と遊離チューブリンの割合は変化していない。つまり中心体微小管と非中心体微小管の割合が変化しただけで、全体として微小管の総量は変化していないことになる。それでは、なぜ GEF-H1 は微小管から遊離し、RhoA を活性化できたのだろうか？

チューブリンはアセチル化、脱チロシン化などの様々な翻訳後修飾を受けることが知られている (Wloga and Gaertig, 2010)。Caco-2 細胞における実験から、CAMSAP3 のノックダウンによりアセチル化チューブリンと脱チロシン化チューブリンの量が増えることがわかっていた (Tanaka et al., 2012)。また、Yoshimura らによると、GEF-H1 はアセチル化されていない微小管上に分布していることが報告されている (Yoshimura and Miki, 2011)。このことから、HeLa細胞においても CAMSAP3 のノックダウンによって微小管の翻訳後修飾が変化し、その結果、GEF-H1 との親和性が下がっているのではないかと考えた。

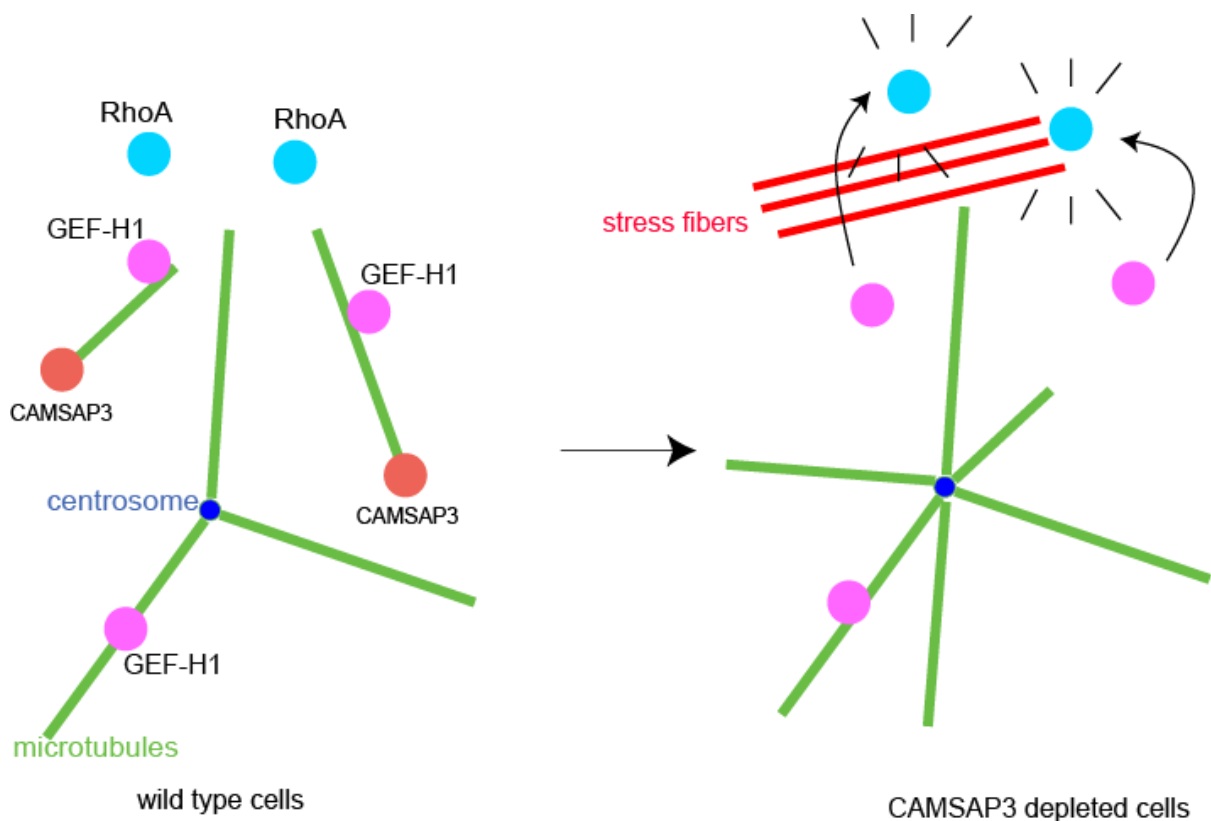


図 2 - 18 CAMSAP3 による RhoA 活性調節のモデル

(左) HeLa 細胞には、中心体由来の微小管と非中心体微小管が混在している。GEF-H1 は両方の微小管に存在している。この微小管に結合した GEF-H1 は活性が抑えられており、RhoA を活性化することはできないため、RhoA の活性は通常低く抑えられている。そのため、HeLa 細胞においてストレスファイバーの形成はあまり起きていない。(右) CAMSAP3 がノックダウンされた HeLa 細胞では、非中心体微小管のマイナス端から CAMSAP3 が消失し、この微小管が不安定化する。その結果、非中心体微小管の量が減少し、その微小管に結合していた GEF-H1 が遊離する。微小管から遊離した GEF-H1 は RhoA を活性化し、ストレスファイバーが形成する。

まず HeLa 細胞において、CAMSAP3 のノックダウンによってチューブリンの翻訳後修飾が変化しているかどうかをウェスタンブロッティングにより調べた。その結果、アセチル化チューブリンの量は変化していなかったが、脱チロシン化チューブリンの量が増えていた (図 2 - 19)。また、免疫染色によっても CAMSAP3 ノックダウンにより脱チロシン化チューブリンの量が増えることが確認できた (図 2 - 20)。

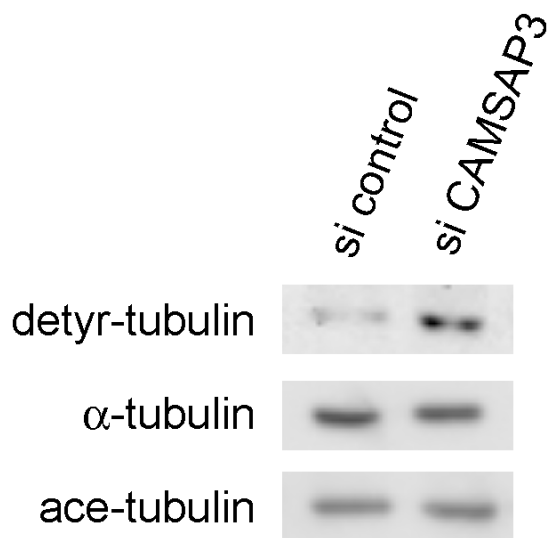


図 2 - 19 CAMSAP3 ノックダウンによるチューブリンの翻訳後修飾の変化

それぞれの siRNA を導入した HeLa 細胞の細胞抽出液を使い、ウェスタンブロッティングによって脱チロシン化チューブリン (detyr-tubulin)、アセチル化チューブリン (ace-tubulin) の量を全体のチューブリン (α -tubulin) の量と比較した。CAMSAP3 の siRNA を導入した細胞では、脱チロシン化チューブリンの量が多くなっていた。

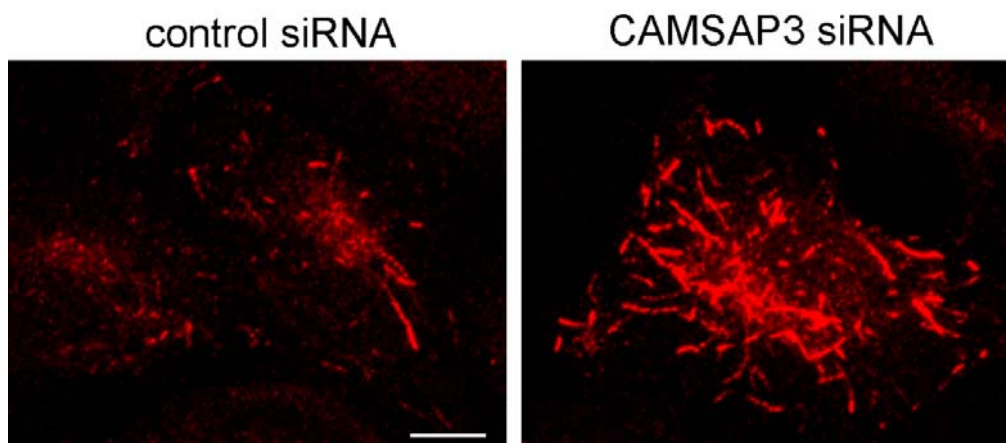


図 2 - 20 CAMSAP3 ノックダウンによる脱チロシン化チューブリンの変化

それぞれの siRNA を導入した HeLa 細胞を脱チロシン化チューブリンの抗体で免疫染色した。CAMSAP3 siRNA を導入した細胞では脱チロシン化チューブリンの量が増えていることがわかった。スケールバーは 10 μ m。

次にGEF-H1 と脱チロシン化微小管の関係について調べた。まず、HeLaにおいてGEF-H1 が微小管と共局在していることを免疫染色によって確認した(図 2 - 21) しかし、GEF-H1 の抗体と脱チロシン化チューブリンの抗体がともにウサギ由来のものしかなかったので、内在性のGEF-H1 と脱チロシン化チューブリンを同時に観察することはできなかつた。そのため、HA-GEF-H1 をHeLa細胞に強制発現させ、HAに対する抗体と脱チロシン化チューブリンの抗体で二重染色することによって、GEF-H1 と脱チロシン化された微小管の関係を調べることにした。その結果、野生型の細胞でも、CAMSAP3 がノックダウンされた細胞でも、HA-GEF-H1 は微小管とはよく共局在するが、脱チロシン化された微小管とはあまり共局在していないことがわかつた (図 2 - 22)。

以上の結果から、GEF-H1 は脱チロシン化された微小管に対して親和性が低く、CAMSAP3 ノックダウンにおいて脱チロシン化チューブリンの量が増えた結果、微小管から遊離した GEF-H1 の量が増えたのではないかと考えた。この予想を検証するため、カルボキシペプチダーゼ A を用いた、以下の実験を行った。

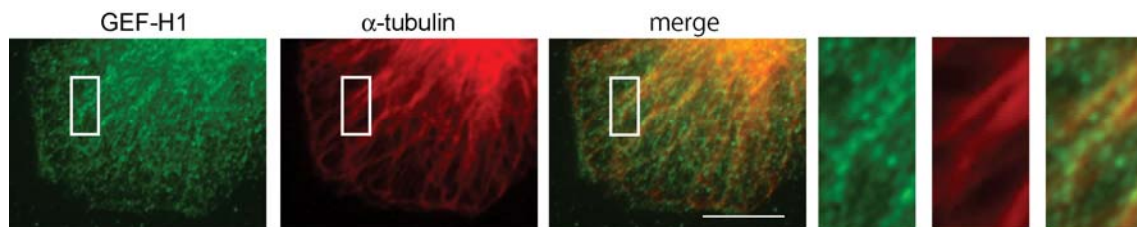


図 2 - 21 内在性 GEF-H1 の分布

HeLa 細胞において、免疫染色によって GEF-H1 と α -チューブリンを検出した。白枠の部分拡大したものを右側に示す。GEF-H1 のシグナルと α -チューブリンのシグナルは部分的に共局在している。スケールバーは 10 μ m。

カルボキシペプチダーゼA (carboxypeptidase A, CPA) はすい臓から分泌される消化酵素で、タンパク質のカルボキシル末端からアミノ酸を1つずつ取り除いていくエキソプロテアーゼである。CPAは消化するアミノ酸に選択性があり、バリン、ロイシンなどの分岐した脂肪族の側鎖を持つもの、チロシンなど

の芳香族環の側鎖を持つものを効率よく消化するが、それ以外のアミノ酸はほとんど消化できない (Austin et al., 2011)。 α -チューブリンのカルボキシル末端の配列はGEEYであり、CPAはカルボキシル末端のチロシンは消化できるが、その次のグルタミン酸は消化できない。従って α -チューブリンをCPAで処理することによって、脱チロシン化することができることが知られている (Lafanechere and Job, 2011)。

そこで、GEF-H1 と脱チロシン化された微小管との親和性をテストするため、HeLa細胞の細胞抽出液をCPAで処理し、人為的に脱チロシン化チューブリンを増やした時、GEF-H1 と微小管との結合がどうなるかを検証した (図 2 - 23)。その結果、CPAで処理すると脱チロシン化チューブリンの量が増えることを確認し、微小管と結合しているGEF-H1 の割合が減っていることがわかった。この結果は、GEF-H1 の脱チロシン化チューブリンに対する親和性が低いということを示唆している。

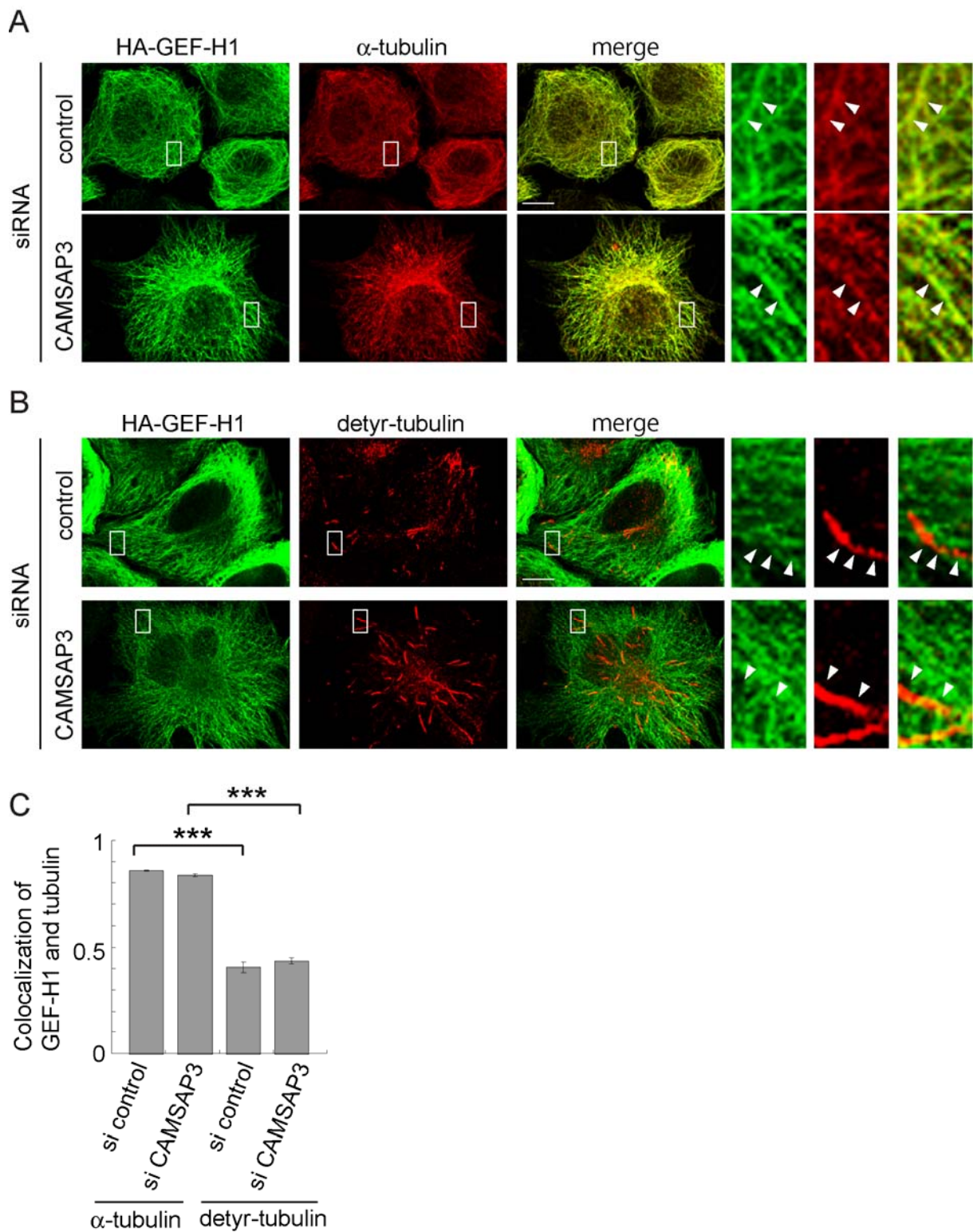


図 2 - 22 GEF-H1 と脱チロシン化された微小管の局在

(A) それぞれの siRNA を導入した HeLa 細胞に HA-GEF-H1 を発現させ、免疫染色による局在を解析した。図は代表例を示す。 (次ページへつづく)

(前ページからのつづき)

ってHA-GEF-H1と α -チューブリンを検出した。白枠で囲んだ領域を拡大したものを右に示した。矢頭は微小管を指している。どちらのsiRNAを導入された細胞においても、HA-GEF-H1は微小管とよく共局在していた。(B) それぞれのsiRNAを導入したHeLa細胞にHA-GEF-H1を発現させ、免疫染色によってHA-GEF-H1と脱チロシン化チューブリン(detyr-tubulin)を検出した。白枠で囲んだ領域を拡大したものを右に示した。矢頭は脱チロシン化された微小管を指している。どちらのsiRNAを導入された細胞においても、HA-GEF-H1は脱チロシン化された微小管とあまり共局在していなかった。(C) HA-GEF-H1と微小管、もしくは脱チロシン化された微小管との関連を定量的に調べるため、HA-GEF-H1のシグナルと α -チューブリン(左)、もしくは脱チロシン化チューブリン(右)のシグナルとの相関係数(Pearsonの相関係数)を計算した。測定はImageJと自作のプラグインを使って行った、グラフの高さは10個の細胞からの平均値を表し、エラーバーは標準誤差を表す。HA-GEF-H1と α -チューブリン、およびHA-GEF-H1と脱チロシン化チューブリンとの相関係数の間には有意に差が見られた(***, $p < 0.001$)。

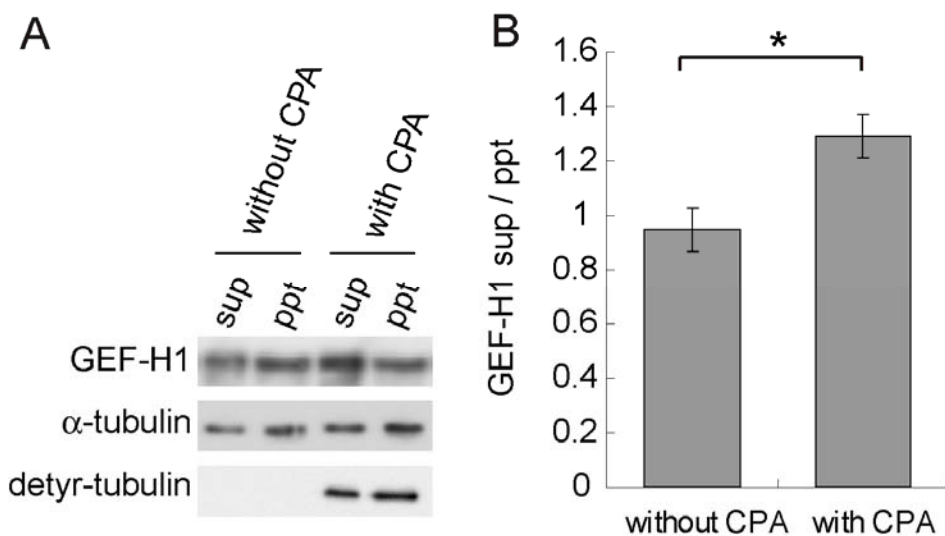


図 2 - 23 CPA 処理による GEF-H1 と微小管の結合の変化

(A) HeLa 細胞の抽出液を CPA で処理し、微小管沈降アッセイによって微小管を含む画分 (ppt) と遊離している画分 (sup) に分画し、ウェスタンブロッティングによってそれぞれの画分に含まれる GEF-H1、 α -チューブリン、脱チロシン化チューブリン (detyr-tubulin) の量を検出した。(B) sup、ppt の画分に含まれる GEF-H1 の量の比を、CPA で処理しなかった時および処理した時で計算し、棒グラフを描いた。グラフの高さは 5 回の実験の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。CPA で処理しなかった時に比べ、処理した時では遊離した GEF-H1 が有意に増えていた (*, $p < 0.05$)。

以上の結果より、前述したモデルを修正した (図 2 - 24)。HeLa細胞には中心体由来の微小管と非中心体微小管の両方が存在しているが、CAMSAP3 は非中心体微小管のマイナス端に結合し、その微小管を安定化している。CAMSAP3 の結合した非中心体微小管は、中心体微小管に比べて脱チロシン化されていない。GEF-H1 は脱チロシン化された微小管にはあまり結合しないため、GEF-H1 は非中心体微小管の方に、より効率的に捕獲される。

微小管に結合した GEF-H1 は不活性状態であり、RhoA を活性化することはできない。そのため野生型の HeLa 細胞では RhoA の活性が低く保たれ、ストレスファイバーの形成はあまり起こっていない。

CAMSAP3 をノックダウンすることで非中心体微小管が不安定化し、分解される。それにともなって、微小管の構成要素であるチューブリンと、その微小管に結合していた GEF-H1 が遊離する。遊離したチューブリンは中心体微小管に組み込まれるため、微小管の総量はあまり変化しない (図 2 - 16) が、非中心体微小管に比べて中心体微小管の割合は高くなる (図 2 - 5、図 2 - 6)。しかし中心体微小管は脱チロシン化されやすく、脱チロシン化された微小管の量が増える。そのため、遊離した GEF-H1 は、新しく形成された脱チロシン化されている中心体微小管とは結合しにくく、遊離したままになる。そのため、遊離した GEF-H1 の量が増加し (図 2 - 16)、その GEF-H1 が RhoA を活性化し (図 2 - 11)、ストレスファイバーが形成される (図 2 - 10、図 2 - 13)

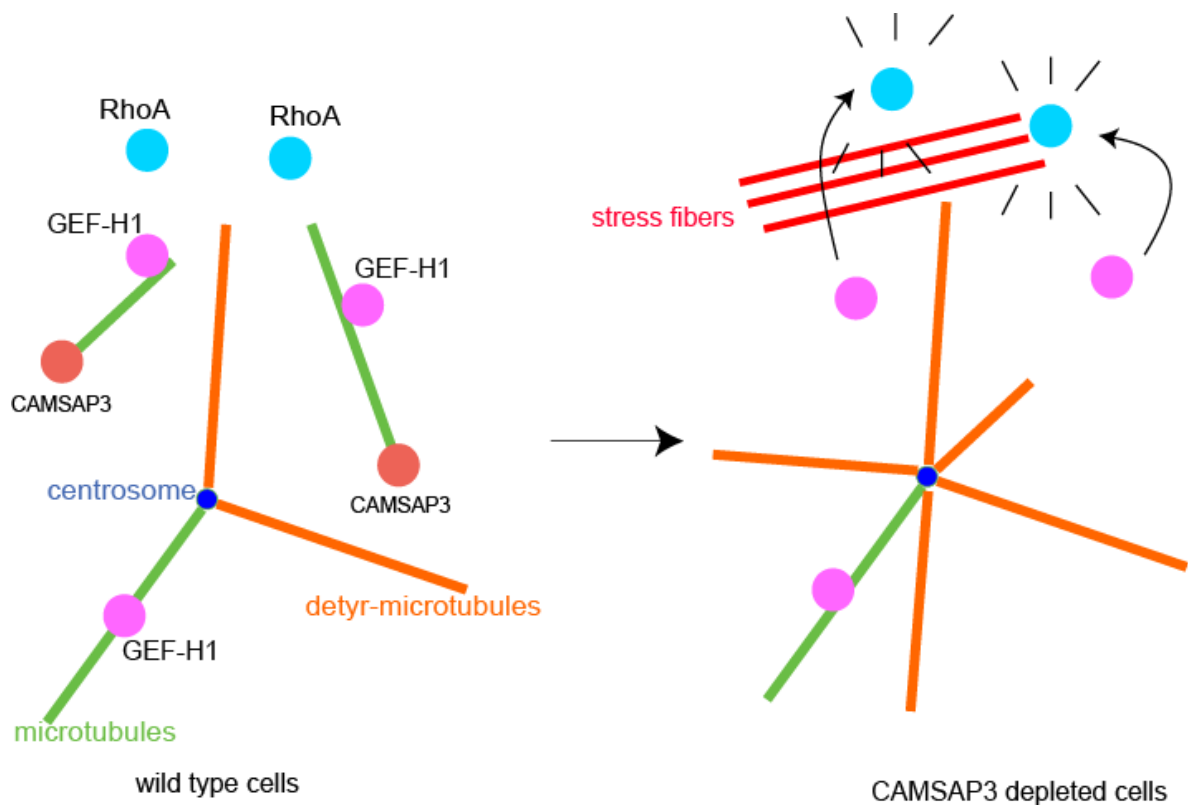


図 2 - 24 CAMSAP3 による RhoA 活性調節のモデル(2)

(左) 野生型の HeLa 細胞には中心体由来の微小管と、非中心体微小管が混在している。CAMSAP3 は非中心体微小管に結合しており、これらの微小管は中心体由来の微小管に比べてよりチロシン化されている。GEF-H1 は脱チロシン化された微小管には結合せず、その結果、非中心体微小管のほうにより多くの GEF-H1 が結合している。(右) CAMSAP3 のノックダウンにより、非中心体微小管が不安定化し、分解される。それとともに GEF-H1 も微小管から解離する。非中心体微小管の分解によって生じたチューブリンは中心体微小管に組み込まれ、全体として微小管の量は変わらない。しかし中心体微小管は脱チロシン化されやすく、GEF-H1 が結合しにくい。そのため遊離した GEF-H1 は中心体微小管に再回収されることなく、RhoA を活性化し、ストレスファイバーが形成される。

第三章

考察

3-1 CAMSAP3 と微小管の制御

微小管は少なくとも二つの種類に分けられる。すなわち、中心体由来のものと、非中心体由来のものである。この比率は細胞種によって異なっており、上皮細胞やニューロンでは非中心体微小管が多く、線維芽細胞などでは中心体微小管が多いことが昔から知られていた (Bartolini and Gundersen, 2006) しかし、この二種類の微小管の間にどのような機能的差異があるのかについては、あまりよく調べられていなかった。本研究では非中心体微小管に結合し、安定化する CAMSAP3 をノックダウンすることにより、HeLa 細胞において中心体性の微小管と非中心体微小管の割合を変化させ、この二種類の微小管の間に機能的差異があることを明らかにした。

まず HeLa 細胞において、CAMSAP3 が非中心体微小管のマイナス端に結合し、微小管のふるまいを制御する機能を持っているかどうかを調べた。特に、CAMSAP3 の Caco-2 細胞におけるはたらきがよく調べられていた (Tanaka et al., 2012) ため、Caco-2 細胞におけるものと同じような機能を持つのかどうかを検討した。その結果、Caco-2 細胞と同じように、CAMSAP3 が細胞質全体に分布し、非中心体性の微小管のマイナス端に結合していることを示した。また CAMSAP3 のノックダウンを行い、中心体からの微小管の増加や伸長速度の増加、そして脱チロシン化チューブリンの増加など、本質的に Tanaka らが Caco-2 細胞で得たものと同じ結果を得た。このことは、CAMSAP3 が持つ微小管の配向やダイナミクスを制御する機能が、細胞種によらない普遍的なものであることを示唆している。

Caco-2 細胞においても HeLa 細胞においても、CAMSAP3 (もしくは CAMSAP2) のノックダウンは中心体からの微小管を増加させる。これはいったいどのような機構によって起こっているのだろうか？ 本研究ではその詳細に立ち入ることはできなかったが、一つの可能性として、CAMSAP3 が微小管を安定化し、その分解を防いでいるというものがある。

中心体微小管も非中心体微小管も、その伸長には同じチューブリンを用いているので、細胞質内に遊離しているチューブリンの利用に競合が発生する。仮に CAMSAP3 が非中心体微小管を安定化する作用があるとすると、CAMSAP3 がノックダウンされることによって、非中心体性の微小管の一部が不安定化し、脱重合する。すると細胞質には遊離したチューブリンが増え、同時に非中心体性の微小管の数が減る。その結果として中心体由来の微小管が非中心体微小管より多くの遊離チューブリンを獲得し、微小管を重合できるようになる。

この可能性を支持する報告として、ショウジョウバエにおける CAMSAP ファミリーのホモログである Patronin (ssp4) という遺伝子がある (Goodwin and Vale, 2010; Goshima et al., 2007)。Patronin はショウジョウバエの S2 細胞において微小管のマイナス端に結合していることが示されており、Patronin が微小管のマイナス端に結合することで Kinesin-13 による微小管のマイナス端からの分解を防いでいることが示されている (Goodwin and Vale, 2010)。このことから、哺乳類においても CAMSAP3 が微小管のマイナス端を安定化する機能を持っている可能性がある。

微小管は細胞分裂においても中心的な役割を果たしていることが知られている。前述したショウジョウバエの Patronin をノックダウンすると、S2 細胞において紡錘体の長さが短くなることが知られている (Goshima et al., 2007)。本研究では間期におけるアクチンに対する影響に注目していたため、CAMSAP3 の細胞分裂に対する影響は見えていなかったが、哺乳類細胞においても CAMSAP3 が Patronin のように紡錘体の形成に関与しているのかどうか、また細胞分裂に対してどのように影響しているのかを明らかにすることは今後の重要な課題であろう。

3-2 RhoA、GEF-H1 に対する CAMSAP3 の影響

本研究では、CAMSAP3 が微小管のみならずストレスファイバーの形成制御にも関与しているということが明らかになった。阻害剤と生化学的な実験により、このストレスファイバーの形成には RhoA が必要であり、CAMSAP3 のノックダウンによって RhoA の活性が上昇していることを示した。

また、この RhoA の活性化には Rho に対する GEF である GEF-H1 が必要であることを発見した。GEF-H1 は微小管に結合することで活性が抑制されることが知られており (Birkenfeld et al., 2008)、CAMSAP3 ノックダウン細胞において、微小管から遊離して GEF-H1 の割合が増えていたこと、さらに GEF-H1 が RhoA と結合する活性が上昇していることを明らかにした。これは、CAMSAP3 のノックダウンによって GEF-H1 の GEF 活性が上昇したことを示唆している。

そこで CAMSAP3 ノックダウンによって GEF-H1 が微小管から解離するメカニズムを検討した。その結果、CAMSAP3 のノックダウンにより脱チロシン化された微小管が増えること、および GEF-H1 は脱チロシン化されていない微小

管の上に分布していることを発見した。このことから、**GEF-H1** は脱チロシン化されていない微小管に、より効果的に結合するのではないかという仮説を立てた。その仮説を検証するため、**CPA** 処理によって人為的に脱チロシン化チューブリンの量を増やすことで、実際に **GEF-H1** がこの脱チロシン化チューブリンに対して親和性が低いことを確認した。

このことから、**CAMSAP3** が結合している非中心体微小管は中心体微小管に比べて脱チロシン化されておらず、**GEF-H1** とより強く結合できるのではないかと、というモデルを立てた。

このモデルでは、野生型の **HeLa** 細胞において、脱チロシン化されていない非中心体微小管（このマイナス端に **CAMSAP3** が結合している）が **GEF-H1** を捕捉することで **GEF-H1** の活性を抑え、それによって **RhoA** の活性が低く保たれている。**CAMSAP3** をノックダウンすると、**CAMSAP3** が結合している非中心体微小管が不安定化し、脱重合が起こる。その結果、微小管の構成要素であるチューブリンとそれに結合していた **GEF-H1** が遊離する。発生した遊離チューブリンは中心体微小管に組み込まれるため、全体として微小管の量は変わらないが、中心体微小管は脱チロシン化されやすいため、脱チロシン化された微小管の割合が増える。**GEF-H1** は脱チロシン化された微小管には結合しにくいため、遊離 **GEF-H1** は中心体微小管とは結合せず、活性化状態となり、**RhoA** を活性化し、ストレスファイバーが形成される。

上記のモデルが本研究の結果から予想されるが、本研究ではこのモデルを完全には証明できていない。

まず、上記のモデルでは **CAMSAP3** のノックダウンによって脱チロシン化微小管が増える理由について、**CAMSAP3** が結合している非中心体微小管が脱チロシン化されにくいためであると考えている。だが、本当に中心体からの微小管が、**CAMSAP3** が結合している非中心体微小管と比べて、より脱チロシン化されているのかは調べられていない。このためには、**HeLa** 細胞において脱チロシン化されている微小管が、中心体から発生しているか否かを免疫染色で確認すればよい。しかし、野生型の **HeLa** 細胞ではそもそも脱チロシン化されている微小管が極めて少ない上に、微小管全体が脱チロシン化されているわけではないため、脱チロシン化されている微小管が中心体由来であるかどうかを確かめるのはかなり困難である。そのため、本研究ではこのことを確かめることができなかった。

また、GEF-H1 の脱チロシン化されている微小管に対する親和性が低いということも、まだ十分に検討されていない。CPA 処理による微小管沈降アッセイでは、細胞抽出液を直接 CPA 処理しているため、 α -チューブリン以外のタンパク質が CPA による影響を受け、その結果 GEF-H1 の微小管との結合力が変化している可能性もある。その可能性を排除するためには、精製チューブリンにおいて沈降アッセイをする必要がある。

上記のモデルが正しいとして、なぜ GEF-H1 は脱チロシン化微小管に結合しないのだろうか？ 脱チロシン化微小管は、アセチル化微小管とともに、安定な微小管の指標として知られている (Wloga and Gaertig, 2010)。そして Yoshimura らは GEF-H1 はアセチル化微小管にも結合しないと報告している (Yoshimura and Miki, 2011)。このことから、GEF-H1 は脱チロシン化、アセチル化されている安定な微小管に結合しないということが予想される。

しかし、タキソールによって微小管を安定化しても、GEF-H1 の活性は変化しないことが知られている (Guilluy et al., 2011)。本研究においても、タキソール処理によって脱チロシン化微小管の割合が増え、ストレスファイバーの形成が若干亢進するが、それは GEF-H1 非依存の現象であることを確認した (データ示さず)。このことに対する可能性の一つとして、タキソールで無理やり安定化させられた微小管と、生理的条件下で形成された脱チロシン化微小管の間に何らかの差があるのかもしれない。

GEF-H1 はストレスファイバーの形成以外にも、細胞接着の維持 (Samarin et al., 2007)、樹状突起のスパイン形成 (Ryan et al., 2005)、細胞分裂時の分裂溝の形成 (Birkenfeld et al., 2007) など、様々な場面で働いていることが知られている。このような場面において、CAMSAP3 が GEF-H1 の活性調節に関与しているのかどうかを調べることも、今後の重要な課題である。

3-3 他の CAMSAP ファミリータンパク質との関連

CAMSAP3 は CAMSAP ファミリーの一つであり、哺乳類においては CAMSAP1, CAMSAP2 (CAMSAP1L1) という相同遺伝子が同定されている。これらの遺伝子は構造が非常に似通っているが、それぞれの機能的差異についてはまだ明らかになっていない。

Tanaka らの実験により、CAMSAP2 と CAMSAP3 はどちらも微小管のマイナス端に局在するが、片方だけのノックダウンでも微小管のダイナミクスが変

化することから、微小管の維持には両方のタンパク質が必要であることがわかった (Tanaka et al., 2012)。しかし CAMSAP2 と 3 の間にどのような違いがあるのか、もしくはどの程度互いの機能を補償できるのかといったことはまだよくわかっていない。

さらに CAMSAP1 については小脳顆粒細胞において微小管全体と結合しているという報告 (Baines et al., 2009) や、アストロサイトで中間径フィラメントである vimentin に結合するという報告もあり、その機能はまだ明らかになっていない。特に Baines らの報告では CAMSAP1 は微小管全体に分布しており (Baines et al., 2009)、微小管の一端に局在する CAMSAP2、3 とは対照的である。これらの中でどのように役割分担がなされているのかを知ることは今後の研究にとって非常に重要である。

3-4 今後の展望

本研究によって、中心体由来の微小管と CAMSAP3 の結合している非中心体微小管には機能的な差異があることが示唆された。

ニューロンにおいては、中心体から伸びた微小管が katanin などの微小管切断酵素によって切断され、その断片が神経線維に運ばれるため、神経繊維中の微小管のほぼ全てが非中心体性である (Sharp and Ross, 2012)。

Katanin を過剰発現、もしくはノックダウンするとニューロンの形態形成が異常になる (Karabay et al., 2004)。また微小管切断酵素の Spastin は遺伝性の痙性麻痺の原因遺伝子として知られており、ゼブラフィッシュにおいてノックダウンすると神経回路形成に異常をきたすことが報告されている (Butler et al., 2010)。従って、ニューロンにとって正しい微小管の構造を維持することは非常に重要である。

興味深いことに、CAMSAP3 は海馬ニューロンを含む神経組織で発現し、軸索のみに点状に分布している (未発表)。CAMSAP3 ノックアウトマウスを用いて神経線維の投射やニューロンの軸索の伸長に影響がないかどうかを調べたが、特に差を見つけれなかった (未発表)。このことについては、他の CAMSAP ファミリーが同じくニューロンに発現していて、CAMSAP3 の機能を代替しているのかもしれない。CAMSAP1 についてはアストロサイトと小脳顆粒細胞に

発現しているという報告があるが (Baines et al., 2009; Yoshioka et al., 2012)、CAM SAP2 の神経系における発現についてはまだ知られていない。CAM SAP1、2、3 が神経系のどの細胞に発現をしていて、どういう機能を持っているのか、今後調べていきたいと考えている。

第四章

材料と方法

4-1 試薬の組成

実験で使用した試薬の組成は以下の通りである。

- PHEM buffer

PIPES (pH 6.8)	60 mM
HEPES	25 mM
EGTA	10 mM
MgCl ₂	2 mM
tri-sodium citrate	0.3 M

- 5x SDS sample buffer

Tris-HCl (pH6.8)	312.5 mM
sodium lauryl sulfate	10%
glycerol	50%
Bromophenol Blue	0.005%
β-mercaptoethanol	25% (使用直前に添加する)

- lysis Buffer

Tris-HCl(pH7.5)	50 mM
TritonX-100	1%
NaCl	500 mM
MgCl ₂	10 mM

- PBS

NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	8.10 mM
KCl	2.68 mM
KH ₂ PO ₄	1.47 mM

- wash buffer

Tris-HCl (pH 7.5)	25 mM
MgCl ₂	30 mM
NaCl	40 mM

- microtubule stabilizing buffer

PIPES (pH 6.8)	100 mM
----------------	--------

Glycerol	2 M
MgCl ₂	5 mM
EGTA	2 mM
NaF	100 mM
NP-40	0.1 %

• SDS lysis buffer

Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
EDTA	2 mM
SDS	1 %

• TBST

Tris-HCl(pH7.5)	20 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0.05 %

• LB 培地

Bacto tryptone	5 g
Yeast extract	2.5 g
NaCl	2.5 g
DW	500 ml

4-2 使用した抗体と薬剤

使用した抗体は以下の通りである。

一次抗体

Mouse anti-HA	Covance # MMS-101R
Rabbit anti-GFP	MBL # 598
Mouse anti- α -tubulin	Sigma # T9026
Mouse anti-acetylated tubulin	Sigma # T6793
Rabbit anti-detyrosinated tubulin	Millipore # AB3201
Rabbit anti-phospho Paxillin	Cell Signalling # 2541S
Mouse anti-vinculin	Sigma # V9131
Rabbit anti-Ninein	Biologend # 602802
Mouse anti-RhoA	Santa Cruz # sc-418

Mouse anti-MAP-2	Sigma Aldrich # M-4403
Mouse anti-Tau-1	Chemicon # MAB3420
Rabbit anti-GEF-H1	三木先生より分与 (Yoshimura and Miki, 2011)
Mouse anti- β -catenin	Dr. M.J.Wheelock (University of Nebraska) より分与
Rabbit anti-CAMSAP3	作製 (Tanaka et al., 2012)
Rat anti-cadherin 10	作製 (抗原はマウス cadherin 10 の細胞内領域 (635-788 a.a))

二次抗体

anti-rabbit IgG (Alexa 標識)	Invitrogen
anti-mouse IgG (Alexa 標識)	Invitrogen

アクチンフィラメントの染色には Alexa Fluor で標識された phalloidin (Molecular Probes) を用いた。

使用した薬剤は以下の通り。

Y-27632	Merck
Cytochalasin D	Sigma
Carboxypeptidase A (PMSF 処理済み)	Sigma

4-3 培養細胞の免疫染色

アクチン及びアクチン関連タンパク質を染色する場合、カバーガラス上で培養した細胞を、2% PFA/PBS で室温で 10 分間固定し、0.2% TritonX-100/PBS で室温で 10 分間浸透化した。微小管を染色する場合、細胞を 4% PFA, 0.1% glutaraldehyde, 0.1% TritonX-100/PHEM で室温で 10 分間固定、浸透化した。その他の場合は Methanol で -20°C で 5 分間固定、浸透化した。その後、ブロッキング、一次抗体処理、二次抗体処理、洗浄操作、包埋は免疫組織染色と同様に行った。

4-4 ウェスタンブロッティング

細胞を PBS で洗浄後、lysis buffer を培養皿全面に行き渡らせ、セルスクレイパーで細胞をはがした。超音波処理後、SDS sample buffer に懸濁し、95°C

で 5 分間処理した。

lysate はアクリルアミドゲル中での電気泳動法により展開し、Immun-Blot PVDF Membrane (BIO-RAD) へのブロッティングを行った。その後、5%スキムミルク/PBS で室温で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体は 5%スキムミルク/PBS で希釈し、4°C で 18 時間反応させた。一次抗体処理後、TBST で 3 回洗浄し、5%スキムミルク/PBS で希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。二次抗体処理後、TBST で 3 回洗浄し、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) を用いて検出した。

4-5 細胞の培養と遺伝子導入

HeLa 細胞の培養には DH10 培地 (DMEM 培地とハムの F12 培地を 1:1 で混合したものにウシ胎児血清を 10% 添加したもの) を用いた。

遺伝子導入には、X-tremeGENE HP (Roche) を用いた。Stealth siRNA を細胞にトランスフェクションする場合は、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いた。

4-6 大腸菌からのタンパク質精製

Mouse Rhotekin の Rho 結合ドメイン (Ren and Schwartz, 2000) の N 末端に glutathione S-transferase (以下 GST と呼ぶ) を結合させたもの (以下 GST-Rhotekin RBD と呼ぶ) を、以下のようにして大腸菌に発現させ、精製した。

まず、pGEX 4T-1 ベクターに Mouse Rhotekin の Rho 結合ドメインの DNA 配列を挿入し、大腸菌に形質転換した。その大腸菌を、アンピシリンを添加した LB 培地 700 ml 中で、37°C で O.D. 0.6 になるまで培養し、その後 20°C まで冷却した。100 μ M IPTG を添加した後、20°C で 3 時間、200 rpm で振とうした。その後 5500 rpm で 15 分間遠心して培地を除き、4°C に冷却した PBS で洗った。再び 5500 rpm で 15 分間遠心して PBS を除いた後、氷上で suspend buffer に懸濁し、液体窒素中で急速に凍結させた。その後、37°C で振とうしながら解凍し、氷上で 30 秒間の超音波処理を 3 回繰り返した。14000 rpm で 30 分遠心し、上清を 0.45 μ m 径のフィルターでろ過した。これを、コールドルームにて Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア) を充填したカラムに通し、結合させた。TBS をカラムに流して洗った後、elution buffer 1 ml 流し、タンパク質を回収した。これを 20 mM Tris-HCl (pH7.5) に、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (Pierce) を用いて透析した。

精製したタンパク質は液体窒素で急速に凍結させた後、 -80°C で保存した。

4-7 微小管の配向の測定

微小管の配向の測定は、Uyttewaal らによる方法 (Uyttewaal et al., 2012) を改変したものをを用いた。LSM 710 もしくは 780 コンフォーカル顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて撮影した Ninein と α -tubulin のコンフォーカル染色像を maximum projection によって XY 平面に投射したものを原画像として用いた。

微小管の配向の測定方法について、以下に示す。画像上の座標を (x,y) で表し、 α -tubulin の輝度を $I(x,y)$ とする。微小管の接線ベクトルを以下の手順で計算した。まず「接線ベクトル」を

$$\vec{T}(x,y) = (t_x, t_y) = (-dI/dy, dI/dx) / \sqrt{(dI/dx)^2 + (dI/dy)^2}$$

として定義した。計算は、Region of Interest (ROI) 領域内で、輝度 $I(x,y)$ があるしきい値以上になった点全てに対して行った (ROI は細胞一つを囲むように指定した)。このしきい値は ROI 内の輝度の平均 - 標準偏差 * 0.5 として定義した。

接線ベクトル $\vec{T}(x,y)$ は画像に存在するノイズのため、正確に微小管の接線ベクトルにはなっていない。したがって、ある種の平均化によってノイズの影響を軽減しなければならないが、単純に近隣ピクセルの接線ベクトルを平均化するだけでは正しい結果が出ない可能性がある。このため、まず「local nematic

tensor」を $\vec{T}(x,y)$ のテンソル積、すなわち、 $N_L = \begin{pmatrix} t_x^2 & t_x t_y \\ t_x t_y & t_y^2 \end{pmatrix}$ と定義し、接線

ベクトルを計算したピクセル全てに対して計算した。この local nematic tensor を近隣の 5×5 ピクセルについて平均したものを average nematic tensor とし、average nematic tensor の最大固有値に対応する固有ベクトルを、微小管の「平均化された」接線ベクトルとして定義した。

次に、微小管がどれだけ放射状に伸びているのかを定量するために、中心体から、接線ベクトルを計算した各点までのベクトルと、接線ベクトルとのなす角度を計算した。中心体の位置は ninein のシグナルが最も強い場所を選んだ。中心体から接線ベクトルの始点までのベクトルを \mathbf{v} 、接線ベクトルを \mathbf{t} とすると、なす角 θ は $\theta = \cos^{-1}(|\mathbf{v} \cdot \mathbf{t}| / (|\mathbf{v}| |\mathbf{t}|))$ として計算した。 $|\mathbf{v}|$ 、 $|\mathbf{t}|$ はそれぞれのベクトルの長さである。

解析は ImageJ と自作のプラグインを用いて行った。

4-8 EB1 コメットの方向の測定

EB1 コメットの動く方向を定量化するため、HeLa 細胞に EGFP-EB1 を遺伝子導入し、2 秒間隔で 1 分間、DeltaVision 顕微鏡(Olympus) を用いてタイムラプス撮影した。直線状に動いている EGFP-EB1 を手動で追跡し、追跡開始点から追跡終了点へのベクトルを EB1 の「速度ベクトル」とする。この速度ベクトルと、「細胞の中心」から追跡開始点へのベクトルとのなす角を「EB1 コメットの動く方向」として計算した。「細胞の中心」の座標は以下のように計算した。まず動画の各フレームにおいて、ROI 内の EGFP-EB1 の輝度の重心を計算し、その重心を動画の全フレームにわたって平均したものを「細胞の中心」の座標とした。ROI は細胞一つを囲むように指定した。解析は ImageJ と自作のプラグインを用いて行った。

4-9 RhoA の活性測定

Cytoskeleton 社の Rho activation assay キットに従って行った。まずマウス Rhotekin の RBD (7-89 a.a.) を前述のようにして精製した。細胞を氷冷 PBS で一度洗い、Complete プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche) を添加した lysis buffer をかけ、セルスクレイパーで細胞を掻き取った。4°C、8,000rpm で 5 分間遠心したあと、GST-Rhotekin と GST-Accept ビーズ (ナカライテスク) を入れたチューブに上清を加え、4°C で 1 時間振盪した。このとき、上清の一部はビーズに加えずに input として SDS サンプル処理した。その後 4°C、4,000rpm で 1 分間遠心して上清を除き、500 μ l lysis buffer で洗い、再び遠心して 500 μ l wash buffer で洗った。遠心して上清を丁寧に除き、SDS サンプルバッファーに懸濁して 95°C で 5 分間処理した。Total RhoA、活性化 RhoA の量は Western blotting によって検出し、ImageJ を用いてバンドの濃さを定量した。two-tailed, unpaired Student's t-test (Excel) によって有意差を検定した。

4-10 微小管沈降アッセイ

微小管の沈降実験は、Chang らの報告に従って行った(Chang et al., 2006)。細胞を 37°C に温めた PBS で 1 回洗い、37°C に温めた microtubule stabilizing buffer に Complete プロテアーゼインヒビターカクテルを添加したものを 500 μ l 加えて 37°C で 15 分間振盪した。その後セルスクレイパーで掻き取り、室温、1000g で 5 分間遠心した。上清は SDS サンプルバッファーを加えて 95°C 5 分加熱処理した。沈殿は SDS lysis buffer で溶解させたあと、SDS サンプルバッ

アールを加えて 95°C 5 分加熱処理した。CPA 処理の際は microtubule stabilizing buffer に CPA を 200 μ g/ml になるように入れ、Complete は添加しなかった。 α -tubulin, GEF-H1 の量を Western blotting によって検出し、ImageJ を用いてバンドの濃さを定量した。two-tailed, unpaired Student's t-test (Excel) によって有意差を検定した。

4-11 顕微鏡観察とライブイメージング

レーザー・スキャニング・コンフォーカル顕微鏡は LSM710 もしくは LSM780 システムを用いた。レンズは Plan-Apochromat 63x/1.40 NA oil-immersion objective lens (Carl Zeiss) を使い、ZEN2009 ソフトウェアで撮影した。位相差像の撮影には、IX81-ZDC 顕微鏡 (Olympus) を使い、レンズは LUCPLFLN 20xPH /0.45 NA objective lens (Olympus) を用いた。撮影は Metamorph ソフトウェア上で行った。タイムラプス画像は Deltavision システム (Applied Precision) を使い、レンズは UplanApo 100x/1.35 NA oil-immersion objective lens (Olympus) を使用した。SoftWoRx ソフトウェア (Applied Precision) で撮影、デコンボリューションを行った。

文献

Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:309-322.

Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci.* 123:3415-3419.

Austin, B.P., J. Tozser, P. Bagossi, J.E. Tropea, and D.S. Waugh. 2011. The substrate specificity of *Metarhizium anisopliae* and *Bos taurus* carboxypeptidases A: insights into their use as tools for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif.* 77:53-61.

Bacallao, R., C. Antony, C. Dotti, E. Karsenti, E.H. Stelzer, and K. Simons. 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol.* 109:2817-2832.

Baines, A.J., M.J. Allen, P.A. Bignone, E.C. Coates, M.D.A. King, G.W. Phillips, and J.C. Pinder. 2008. The CAMSAPs: a family of membrane-skeleton proteins essential for the life of animals. Swedish Association for Cytoskeletal Research.

Baines, A.J., P.A. Bignone, M.D. King, A.M. Maggs, P.M. Bennett, J.C. Pinder, and G.W. Phillips. 2009. The CKK domain (DUF1781) binds microtubules and defines the CAMSAP/ssp4 family of animal proteins. *Mol Biol Evol.* 26:2005-2014.

Bartolini, F., and G.G. Gundersen. 2006. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci.* 119:4155-4163.

Birkenfeld, J., P. Nalbant, B.P. Bohl, O. Pertz, K.M. Hahn, and G.M. Bokoch. 2007. GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev Cell.* 12:699-712.

Birkenfeld, J., P. Nalbant, S.H. Yoon, and G.M. Bokoch. 2008. Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol.*

18:210-219.

Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 14:25-34.

Butler, R., J.D. Wood, J.A. Landers, and V.T. Cunliffe. 2010. Genetic and chemical modulation of spastin-dependent axon outgrowth in zebrafish embryos indicates a role for impaired microtubule dynamics in hereditary spastic paraplegia. *Dis Model Mech.* 3:743-751.

Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand, and C. Pous. 2001. The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell.* 12:2047-2060.

Chang, Y.C., H.H. Lee, Y.J. Chen, G.M. Bokoch, and Z.F. Chang. 2006. Contribution of guanine exchange factor H1 in phorbol ester-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 13:2023-2032.

Chang, Y.C., P. Nalbant, J. Birkenfeld, Z.F. Chang, and G.M. Bokoch. 2008. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell.* 19:2147-2153.

Cherfils, J., and M. Zeghouf. 2013. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev.* 93:269-309.

Chretien, D., and R.H. Wade. 1991. New data on the microtubule surface lattice. *Biol Cell.* 71:161-174.

Dammermann, A., A. Desai, and K. Oegema. 2003. The minus end in sight. *Curr Biol.* 13:R614-624.

DerMardirossian, C., and G.M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15:356-363.

Desai, A., and T.J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:83-117.

Galjart, N. 2010. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol.* 20:R528-537.

Garcia-Mata, R., K. Wennerberg, W.T. Arthur, N.K. Noren, S.M. Ellerbroek, and K. Burridge. 2006. Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol.* 406:425-437.

Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, W.J. Kranewitter, and S.J. Winder. 2002. Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett.* 513:98-106.

Goodwin, S.S., and R.D. Vale. 2010. Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell.* 143:263-274.

Goshima, G., R. Wollman, S.S. Goodwin, N. Zhang, J.M. Scholey, R.D. Vale, and N. Stuurman. 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science.* 316:417-421.

Guilluy, C., V. Swaminathan, R. Garcia-Mata, E.T. O'Brien, R. Superfine, and K. Burridge. 2011. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol.* 13:722-727.

Hagan, I.M. 1998. The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci.* 111 (Pt 12):1603-1612.

Heald, R., R. Tournebise, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature.* 382:420-425.

Karabay, A., W. Yu, J.M. Solowska, D.H. Baird, and P.W. Baas. 2004. Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. *J Neurosci.* 24:5778-5788.

Krendel, M., F.T. Zenke, and G.M. Bokoch. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin

cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 4:294-301.

Lafanechere, L., and D. Job. 2011. Preparation of pure tyrosinated or detyrosinated tubulin isoforms. *Methods Mol Biol.* 777:71-86.

Ledbetter, M.C., and K.R. Porter. 1964. Morphology of Microtubules of Plant Cell. *Science.* 144:872-874.

Leinweber, B.D., P.C. Leavis, Z. Grabarek, C.L. Wang, and K.G. Morgan. 1999. Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins. *Biochem J.* 344 Pt 1:117-123.

Lloyd, C., and J. Chan. 2004. Microtubules and the shape of plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:13-22.

Maia, A.R., X. Zhu, P. Miller, G. Gu, H. Maiato, and I. Kaverina. 2013. Modulation of Golgi-associated microtubule nucleation throughout the cell cycle. *Cytoskeleton (Hoboken).* 70:32-43.

Meng, W., Y. Mushika, T. Ichii, and M. Takeichi. 2008. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell.* 135:948-959.

Miller, P.M., A.W. Folkmann, A.R. Maia, N. Efimova, A. Efimov, and I. Kaverina. 2009. Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol.* 11:1069-1080.

Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol.* 10:865-868.

Nagae, S., W. Meng, and M. Takeichi. 2013. Non-centrosomal microtubules regulate F-actin organization through the suppression of GEF-H1 activity. *Genes To Cells.* 18:387-396.

Narumiya, S., M. Tanji, and T. Ishizaki. 2009. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28:65-76.

Reid, T., T. Furuyashiki, T. Ishizaki, G. Watanabe, N. Watanabe, K. Fujisawa, N. Morii, P. Madaule, and S. Narumiya. 1996. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem.* 271:13556-13560.

Ren, X.D., and M.A. Schwartz. 2000. Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol.* 325:264-272.

Rice, L.M., E.A. Montabana, and D.A. Agard. 2008. The lattice as allosteric effector: structural studies of alpha-beta- and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:5378-5383.

Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:167-180.

Ryan, X.P., J. Alldritt, P. Svenningsson, P.B. Allen, G.Y. Wu, A.C. Nairn, and P. Greengard. 2005. The Rho-specific GEF Lfc interacts with neurabin and spinophilin to regulate dendritic spine morphology. *Neuron.* 47:85-100.

Samarin, S.N., A.I. Ivanov, G. Flatau, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2007. Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell.* 18:3429-3439.

Sharp, D.J., and J.L. Ross. 2012. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci.* 125:2561-2569.

Slep, K.C., and R.D. Vale. 2007. Structural basis of microtubule plus end tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Mol Cell.* 27:976-991.

Tanaka, N., W. Meng, S. Nagae, and M. Takeichi. 2012. Nezha/CAMSAP3

and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:20029-20034.

Tassin, A.M., B. Maro, and M. Bornens. 1985. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 100:35-46.

Tilney, L.G., J. Bryan, D.J. Bush, K. Fujiwara, M.S. Mooseker, D.B. Murphy, and D.H. Snyder. 1973. Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol.* 59:267-275.

Uyttewaal, M., A. Burian, K. Alim, B. Landrein, D. Borowska-Wykret, A. Dedieu, A. Peaucelle, M. Ludynia, J. Traas, A. Boudaoud, D. Kwiatkowska, and O. Hamant. 2012. Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in *Arabidopsis*. *Cell.* 149:439-451.

Walker, R.A., E.T. O'Brien, N.K. Pryer, M.F. Soboeiro, W.A. Voter, H.P. Erickson, and E.D. Salmon. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol.* 107:1437-1448.

Wloga, D., and J. Gaertig. 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci.* 123:3447-3455.

Yoshimura, Y., and H. Miki. 2011. Dynamic regulation of GEF-H1 localization at microtubules by Par1b/MARK2. *Biochem Biophys Res Commun.* 408:322-328.

Yoshioka, N., H. Asou, S. Hisanaga, and H. Kawano. 2012. The astrocytic lineage marker calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1): phenotypic heterogeneity of newly born Camsap1-expressing cells in injured mouse brain. *J Comp Neurol.* 520:1301-1317.

Zhang, H., and R.K. Dawe. 2011. Mechanisms of plant spindle formation. *Chromosome Res.* 19:335-344.

謝辞

修士から竹市研に入って8年間、長いようで短いような研究生活でした。この間、たくさんの人にお世話になりました。

竹市先生、長い間ご指導賜り、ありがとうございます。多忙の身であるにも関わらず、何時間もサンプルを見ていただいたこともよくありました。前回のプログレスレポートからあまり進んでいなかったり、方向性を見失って迷走していたこともあり、多分にご迷惑をおかけしたかと思います。それでも辛抱強く指導を続けていただき、なんとか博士論文を出すまでに至れたこと、本当に感謝しています。

田ノ上拓自さんには修士から博士3年までの4年間、実験方法から研究の考え方まで、本当に色々なことを教えて頂きました。私の力不足により、博士の2年間で大した結果を残せず、別のテーマに変えることになりました。その節は大変ご迷惑をおかけして、申し訳ありませんでした。私の持っているプロトコールはほとんど田ノ上さんに教えていただいたものです。かなり色々なことを経験させて頂き、そのたびにご迷惑をかけていました。本当にありがとうございました。

孟文翔さんは CAMSAP3 をやることになった博士3年から3年間、お世話になりました。研究をよりよいものにするために常に邁進するその姿勢には、強く感銘を受けました。北京に移られてからも度々連絡をとることがありましたが、そのたびに心配して頂き、ありがとうございます。

それから指導教官を引き受けてくださった松崎文雄先生、他研究室の人間であるにも関わらず、わざわざ時間を割いてお話を聞いていただき、ありがとうございました。

竹市研究室の皆様には、研究についての愚痴や他愛ない世間話から、研究についてのサポートやアドバイスなど、様々なものを頂きました。長い間研究をやってこれたのも、皆様のおかげだと思っています。

清末優子先生からは、EB1-EGFP のコンストラクトを頂いた他、光学イメー

ジング解析ユニットとして顕微鏡の保守をしていただきました。また、大阪大学の三木裕明先生からは **GEF-H1** の素晴らしい抗体を頂きました。あの抗体がなければ、おそらく研究は成り立っていなかったでしょう。京都大学の松田先生からは各種 **Raichu** のコンストラクトを頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。

最後に、大学院を卒業しても実家に居座っている息子を見守り、支えてくれた両親に感謝します。

2013年2月15日
長江 成典