

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05002

研究課題名(和文)最先端遺伝学・光遺伝学技術を駆使した哺乳類細胞の等分裂制御原理の追究

研究課題名(英文) Defining the mechanisms of equal-sized cell division using advanced genetic and optogenetic technologies

研究代表者

清光 智美 (Kiyomitsu, Tomomi)

沖縄科学技術大学院大学・細胞分裂動態ユニット・准教授

研究者番号：10503443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CRISPR/Cas9、オーキシン誘導デグロン(AID)、光操作という先端技術をヒト培養細胞に用い、等分裂の前提となる分裂期紡錘体の形成と配置制御の仕組みについて研究を行なった。光操作を用いて、紡錘体牽引装置の機能中枢を同定し、AIDを用いて、分裂期Ran-GTPの紡錘体形成機能について理解を進めた。それぞれの成果を、eLife誌とCurrent Biology誌に公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物の発生過程において、細胞は「紡錘体の細胞内配置」を巧みに制御することによって、細胞内外の極性因子の分配や娘細胞のサイズを決め、多様な組織を形成している。紡錘体の配置は、細胞表層に構成される紡錘体牽引装置によって制御されるが、本研究によって、その機能中枢は、Dynein-Dynactin-NuMAの集合体であることを明らかにした。また紡錘体の配置を光で操作することにも成功したため、今後、細胞分裂の対称性・非対称性制御の理解を進めることができる。またAID法を用いて、分裂期特異的に標的タンパクを分解する系の樹立にも成功した。本成果は、今後様々な紡錘体関連因子の機能の理解に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Mitotic spindle assembly and positioning are required for equal-sized division. In this study, we analyzed their mechanisms using CRISPR/Cas9, auxin-inducible degron (AID), and optogenetic technologies. Using optogenetic manipulation of NuMA, we identified the functional unit of the cortical force-generating machinery which controls spindle position in human cells. In addition, we improved our understanding of mitotic Ran-GTP functions for spindle assembly using AID. We published these studies in eLife and Current Biology, respectively.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞分裂 紡錘体 光操作 オーキシン誘導デグロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集がヒト培養細胞で可能になり、内在性のヒト遺伝子にタグ付けを行うことが可能となった。また標的タンパク質を条件的かつ短時間で分解誘導するオーキシン誘導デグロン(AID)法や、光照射依存的にヘテロ二量体化を誘導し、短時間で細胞内局在の操作を可能にする光操作ツール(iLID)も開発されていた。
- (2) 一方、私はこれまでヒト培養細胞を用いて、分裂期の細胞表層に局在するダイニン-NuMA 複合体が、紡錘体の配置制御を介して、対称な分裂に必要なことを見出していた。しかし、その複合体のどの部分が機能に十分なのかは不明であった。また非侵襲的に紡錘体配置を自在に操作し、対称分裂の意義を解析する方法もなかった。
- (3) さらにこれまでダイニン、NuMA、Ran を含む様々な因子が分裂期紡錘体形成に関与することも報告されていたが、これらの因子は間期にも機能するため、従来の DNA や mRNA を標的にした機能解析法では、これらの分裂期機能を正確に理解することができなかった。

2. 研究の目的

- (1) まず CRISPR/Cas9 と光操作ツール(iLID)、オーキシン誘導デグロン(AID)法をそれぞれ組み合わせ、ヒト培養細胞の分裂期において、内在性の標的タンパク質の局在や分解を自在に操作できる実験系の構築を目的とした。
- (2) 次に光操作の実験系を用いて、紡錘体配置を操作し、その仕組みを理解すること、および不等分裂を光で誘導することを目的とした。
- (3) また AID 法を用いて、分裂期の Ran やダイニン、NuMA の紡錘体構築機能を理解することを目指した。
- (4) 最後に、ヒト培養細胞で系を構築できれば、次にそれらを発生過程の細胞に応用することも目指した。

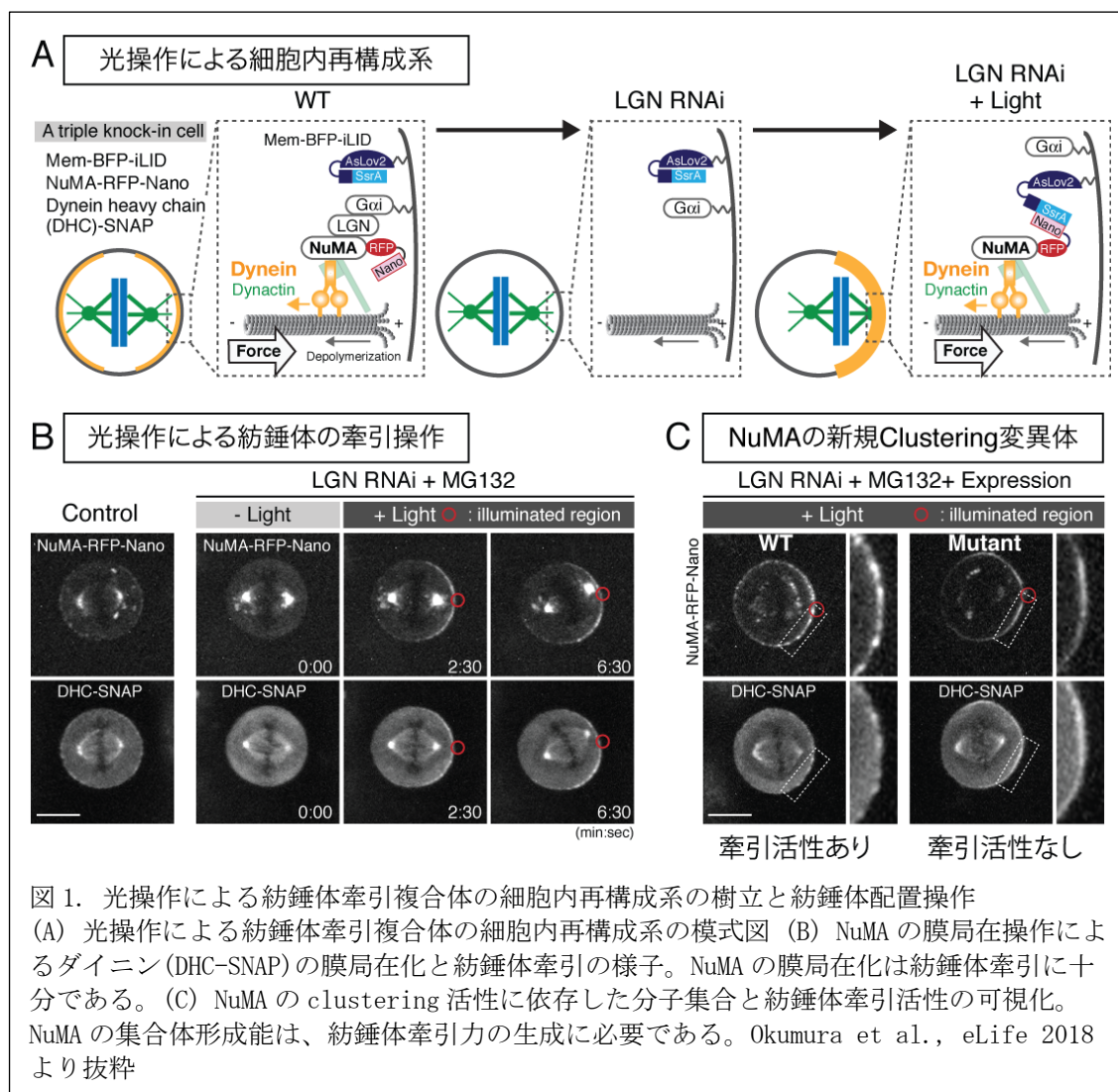
3. 研究の方法

- (1) 光依存的ヘテロ二量体化ツールとしては、Guntas et al., PNAS 2015 を用いた。ゲノム編集は Natsume et al., Cell Reports 2016 を参考にした。まず細胞膜に BFP-iLID を恒常発現する HCT116 細胞株を樹立し、その後、NuMA の C 末端、あるいはダイニン(DHC)の N 末端に RFP-Nano をノックインした。全ての内在性の NuMA あるいはダイニンを操作するため、タグがホモ接合型でノックインされた株を選択した。NuMA を光操作し、DHC を同時に観察する際には、DHC に SNAP タグをつけ、640nm レーザーで可視化した。光照射は 488 nm レーザーを用い、Mosaic 3(Andor)を用いて行なった。
- (2) AID 法は Natsume et al., Cell Reports 2016 に従った。分裂期特異的に標的タンパク質の分解を誘導するため、Nocodazole や APC/C 阻害剤を用いて、細胞を分裂期に停止させ、その間にオーキシンを添加して分解を誘導し、表現型をライブで観察した。また NuMA の細胞表層レセプターである LGN を RNAi で発現抑制した状態で、NuMA や DHC を細胞表層に局在化させることで、内在性の紡錘体牽引装置に依存せずに、光で局在誘導した分子複合体の機能を解析した。

4. 研究成果

- (1) 光による内在性タンパク質の局在操作
細胞膜に BFP-iLID を恒常発現する HCT116 細胞株を親株にして、NuMA に RFP-Nano をノックインした細胞株を樹立した。また Mosaic3 で局所光照射し、RFP 等のシグナルを高解像度で撮影できる顕微鏡システムを構築した。光照射依存的に NuMA を細胞表層に局在化させることに成功した。また同様に Nano-RFP-DHC 株も樹立し、ダイニンの局在を光操作することにも成功した。

- (2) 光操作による紡錘体牽引複合体の細胞内再構成系の樹立:
細胞表面に形成される紡錘体牽引複合体が、紡錘体を実際に牽引するかどうか検討するために、数百以上に上る全ての因子を試験管内再構成し、検討することは非現実的である。そこで、別の方法として、内在性の紡錘体牽引装置の上流因子(LGN)を欠損させた状態で、そこに紡錘体牽引装置の一部(NuMAあるいはDHC)を局在化させ、その局在化させた因子が、紡錘体牽引活性を示すかどうかを検討した(図1A)。まず、NuMAを非対称かつ局所的に光で細胞表面の片側に局在化させることができ、それがDHCを局在化させるのに十分であることも示した(図1B)。また光照射を連続して行い、NuMA-DHC複合体を局在化させ続けると、紡錘体がそちらに引き寄せられることも明らかにした(図1B)。一方、DHCを局在化させただけでは、紡錘体の運動には十分ではないことも分かった。
- (3) NuMAの集合体形成活性が紡錘体牽引に必要である
また私たちは、細胞表面に局在するNuMAが点状の局在パターンを示すことを見出し、その責任アミノ酸も同定することに成功した。重要なことに、点状局在を示さないNuMAの変異体は、野生型のNuMAとは異なり、DHCを同程度に局在化させる能力があるものの、紡錘体牽引活性を示さなかった(図1C)。
- (4) NuMAの細胞表面局在を操作することで、紡錘体の位置や向きを光で操作することにも成功した。ただ、NuMAの局在操作による紡錘体配置の非対称化のみでは、不等分裂の誘導に十分であることも分かった。



- (5) NuMAやDHC以外にも、細胞表面のミオシンによる収縮力を操作する目的で、その上流因子のEct2の局在を操作し、それが細胞表面の収縮力を生み出すことも見出した。
- (6) AID法と微小管重合阻害剤NocodazoleあるいはAPC/Cの阻害剤(Apcin & proTAME)を組み合わせ、細胞を分裂期に停止している間にオーキシンを添加し、mAIDが結合している標的因子を分解することに成功した。

- (7) GTP 結合型 Ran (Ran-GTP) は間期に様々な因子の核内外輸送に関与するため、その分裂期機能を正確に知るためには、分裂期特異的に Ran-GTP を欠損させる必要がある。Ran の GEF である RCC1、Ran の GAP である Ran-GAP1、Ran-GTP に結合する importin- β の mAID-mClover ノックイン細胞株を樹立し、NuMA の局在と表現型を観察した。すると、これまでの学説と異なり、RCC1 は分裂期に分解したとしても、NuMA の紡錘体極局在にはほとんど影響しなかった (図 2)。また同様に Ran-GAP1 や importin- β の分解もほとんど NuMA の紡錘体極局在には影響を与えなかった。

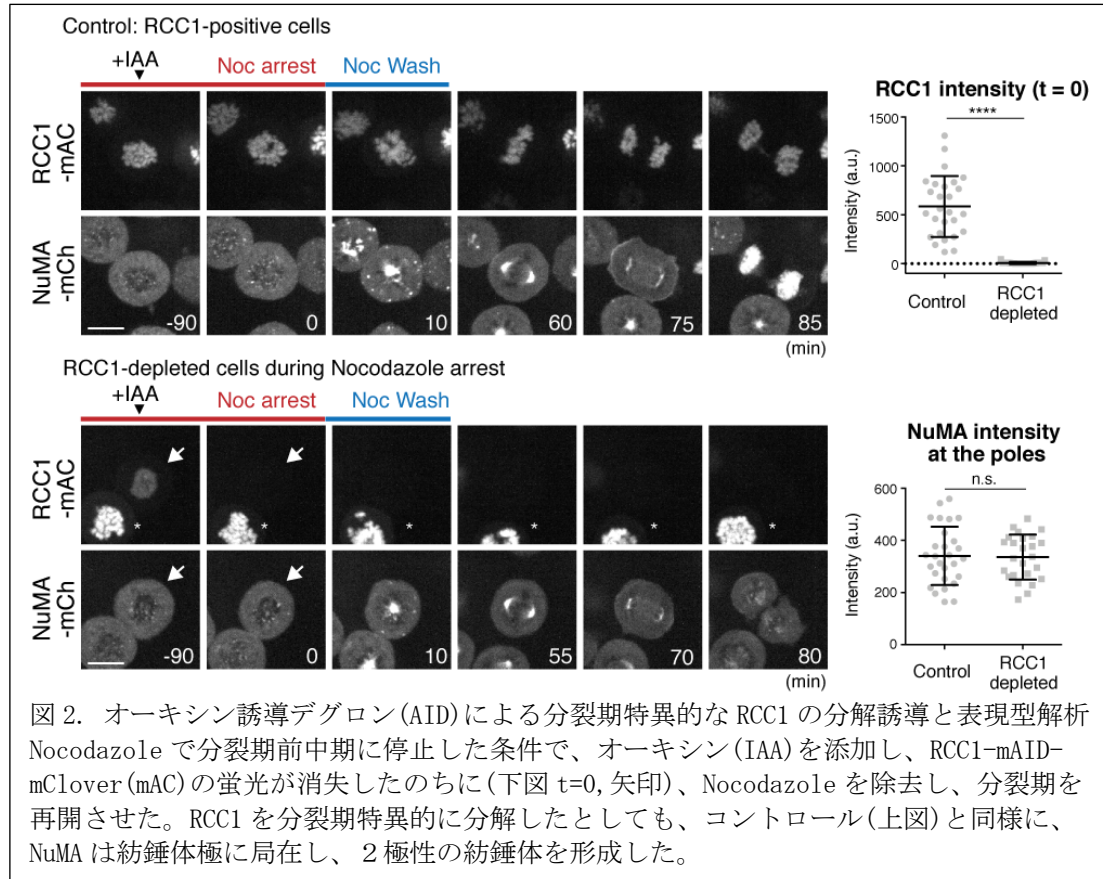


図 2. オーキシシン誘導デグロン (AID) による分裂期特異的な RCC1 の分解誘導と表現型解析
Nocodazole で分裂期前中期に停止した条件で、オーキシシン (IAA) を添加し、RCC1-mAID-mClover (mAC) の蛍光が消失したのちに (下図 t=0, 矢印)、Nocodazole を除去し、分裂期を再開させた。RCC1 を分裂期特異的に分解したとしても、コントロール (上図) と同様に、NuMA は紡錘体極に局在し、2 極性の紡錘体を形成した。

- (8) 一方、Ran-GTP の標的として知られている HURP について検討したところ、HURP の染色体近傍の動原体微小管局在は RCC1 の分解によって、顕著に影響を受けることが分かった。
- (9) 同様の分裂期中期特異的分解アッセイを用いて、DHC やダイナクチン構成因子を分裂期中期に破壊すると、紡錘体構造が壊れる様子が観察された。一方、NuMA を分裂期中期で破壊しても DHC ほど顕著な紡錘体構造の破壊の様子は観察されなかった。
- (10) 紡錘体配置制御の仕組みや意義を発生場で検討するために、メダカの初期胚を用いた系の樹立に着手した。メダカは、マウスに比べ扱いが簡単で、飼育費用も安くすみ、またその初期胚のイメージングは簡単で、ゲノム編集等の技術も使える。ヒトの遺伝子もよく保存されている上、哺乳類の枠よりも広い脊椎動物の範囲で保存性を理解できるため、マウスではなくメダカを選択した。基本的な飼育管理や、初期胚での紡錘体のライブ可視化に成功した。AID と光操作の技術をメダカに適用できるように、系統作成に取り掛かるところまで進めることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kenta Tsuchiya, Hisato Hayashi, Momoko Nishina, Masako Okumura, Yoshikatsu Sato, Masato T. Kanemaki, Gohta Goshima, Tomomi Kiyomitsu	4. 巻 1
2. 論文標題 Ran-GTP is non-essential to activate NuMA for spindle pole focusing, but dynamically polarizes HURP to control mitotic spindle length	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/473538	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okumura M, Natsume T, Kanemaki MT, Kiyomitsu T	4. 巻 7
2. 論文標題 Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.36559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya K, Hayashi H, Nishina M, Okumura M, Kanemaki MT, Goshima G, Kiyomitsu T	4. 巻 1
2. 論文標題 Importin- targets HURP to kinetochore-fibers in coordination with Ran-GTP in human mitotic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/473538	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya Kenta, Hayashi Hisato, Nishina Momoko, Okumura Masako, Sato Yoshikatsu, Kanemaki Masato T., Goshima Gohta, Kiyomitsu Tomomi	4. 巻 31
2. 論文標題 Ran-GTP Is Non-essential to Activate NuMA for Mitotic Spindle-Pole Focusing but Dynamically Polarizes HURP Near Chromosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 115 ~ 127.e3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.09.091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiyomitsu Tomomi	4. 巻 60
2. 論文標題 The cortical force-generating machinery: how cortical spindle-pulling forces are generated	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cecb.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 The development of mitosis-specific rapid protein-degradation assays in human cells
3. 学会等名 EMBO/EMBL symposium, Seeing is Believing (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清光智美
2. 発表標題 光操作と急速分解、二刀流でダイニンの分裂期機能に迫る
3. 学会等名 分子モーター討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyomitsu T
2. 発表標題 Mechanisms of dynein-based force generation at the cell cortex and spindle poles during metaphase
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyomitsu T
2. 発表標題 Optogenetic reconstitution reveals that Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble.
3. 学会等名 EMBO microtubule meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 Mechanisms of Ran-based mitotic spindle assembly revealed by auxin-mediated rapid protein knock-down
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 Optogenetic assemblies of cortical force-generating complexes during mitosis
3. 学会等名 The 12th Uehara International Symposium 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清光智美	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 435-439
3. 書名 実験医学-クローズアップ実験法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学理学研究科ホームページにて研究成果の紹介
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20180709_sci_1.pdf
沖縄科学技術大学院大学ホームページにて研究成果の紹介
<https://www.oist.jp/news-center/news/2021/2/5/cell-division-research-explores-questions-core-life>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	五島 剛太 (Goshima Gohta)		
研究協力者	鐘巻 将人 (Kanemaki Masato)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------