

令和元年6月11日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04787

研究課題名(和文) 微小管の機能発見および人工制御：細胞から組織まで

研究課題名(英文) Controlling Microtubules: from cells to tissues

研究代表者

佐藤 政充 (SATO, MASAMITSU)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：50447356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小管が細胞のなかでどのように形成されるのか、分子レベル・細胞レベル・組織レベルの各階層にわたり解明することを目指している。これまでに、分裂酵母・ヒト培養細胞を用いて微小管形成機構を調べており、さらにマウス組織での実験をおこなうための飼育・実験の基盤作りをおこなった。その結果、Alp7/TACCが微小管形成においてガンマ・チューブリン複合体と協調して微小管の形成を促進すること、さらにAlp7が存在しない細胞でも微小管を形成するシステムの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管は細胞の中で様々な機能を発揮することが知られている。細胞が分裂していない時期には、微小管は細胞質に網目状に存在して物質輸送のレールとして働く。これに対して分裂する際には、微小管は紡錘体をつくり、染色体を2つの細胞に分配する機能を担う。すなわち、正しい時期に紡錘体が正しく形成されないと、染色体の分配に異常が起き、がん化や細胞死の原因となる。そこで本研究では微小管が時期によってかたちを変化させる仕組みを調べた結果、Alp7/TACCタンパク質が時期により制御を受けることで、微小管が適切な時期に適切な場所で形成されることを解明した。現在は酵母に加えてヒトなどの高等生物でも研究を続けている。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate how microtubule is assembled in cells: the analyses include those at molecular level, cell level and tissue level. We used fission yeast and human cultured cells to analyze how microtubules are formed, and we have been establishing systems for animal experiments. As a result, we found that Alp7/TACC accelerate microtubule nucleation in cooperation with the gamma-tubulin complex. In addition, our results indicate that there may be Alp7-independent microtubule nucleation system operating in fission yeast cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞骨格 細胞周期 細胞分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体分配は 1880 年代に W. Flemming によって、染色体が糸のような物質によって引っ張られる「有糸分裂 mitosis」として発見され、後にその糸はチューブ状の「微小管 microtubule」であることが解明された。微小管は分裂期では紡錘体となり染色体を分配するが、分裂していない時期(間期)では細胞質に網目状に形成されて物質輸送のレールとして機能する。このように、微小管は細胞周期の時期に応じてその姿を変えることで、適材適所に配置され、多様な機能を発揮している。このような各時期の微小管の働きや制御は多くの研究から解明されてきたが、間期から分裂期、あるいは分裂期から間期における微小管「再編成」のメカニズムは不明の部分が多い。微小管に結合して微小管のダイナミクス・形成に影響を与える因子は多く知られるものの、それらのなかでどの因子が微小管の「再編成」のメカニズムを司るのかを調べる必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母からヒト細胞、マウス組織などの多階層レベルにおける微小管の動態を調べることにより、微小管が細胞周期の適切な時期に適切な場所に形成される仕組みを解明することを目的としたものである。我々は、すでに分裂酵母 Alp7/TACC タンパク質が分裂期の紡錘体微小管を形成するために極めて重要な因子であることをつきとめていた。このタンパク質が分裂期に核に局在することが、分裂期に紡錘体微小管を形成することを促進するため、おそらく Alp7 を制御することにより、細胞周期の間期には細胞質に、分裂期には核に紡錘体を形成するのだろうと着想した。

3. 研究の方法

本研究では、第一に分裂酵母の細胞において、次にヒト細胞において微小管が適切に形成されるメカニズムを探った。さらに、マウス組織における微小管の特徴的な配置について調べることによって、様々な真核細胞における微小管形成の普遍的な部分と、細胞種により異なる部分の両方を追究することを目指した。

分裂酵母における微小管形成のメカニズム

分裂酵母においては、Alp7/TACC の局在が微小管形成の場所を決めることが示唆されていた。そこで本研究では、微小管形成を起こす γ -チューブリン複合体と Alp7/TACC が協調的に働くことで、微小管形成を促進する可能性を検証する。

本研究でさらに、間期において細胞質に微小管が形成される際に、Alp7/TACC が作用するという証拠を得れば、間期と分裂期の両方の微小管形成を司ることを実証できる。

ヒト細胞への応用

分裂酵母において Alp7/TACC は微小管の形成を促進する因子であるが、ヒト細胞においても同様の因子・機構が進化的に保存されているのだろうか。ヒトにおける Alp7 のオースログである TACC3 が微小管を形成誘導できるかを検証する。あるいは、分裂酵母 Alp7 そのものをヒト細胞に発現させることで、微小管の形成を誘導できないか、検証する。

マウス上皮細胞における微小管配向性の研究と、その研究基盤のセットアップ

哺乳類の上皮組織においては、上皮細胞が単層に整列した細胞シート構造をとっており、頂端面と基底面の「上下」の方向性をもって整列している。その上皮細胞において、間期の微小管は網目状には存在せず、頂端面から基底面に向けて特徴的な配向性を持って整列している。この微小管はどのように形成され、どのような意義をもつのか。これまでに CAMSAP3 タンパク質が頂端面に局在して微小管をつなぎとめることで微小管の配向性を持った配列に貢献することがわかっていたが、本研究ではさらにこれを追究し、CAMSAP3 がどのように微小管の配向性を作り出すのか、その作用機序の解明を目指す。

その過程では動物実験設備が必要となるが、当研究室はこれまで動物実験の設備を用いて実験をおこなっていなかったため、その飼育・実験系の確立を目指した。

4. 研究成果

分裂酵母における微小管形成のメカニズム

我々は、分裂酵母の遺伝学とライブセルイメージングを駆使して、微小管形成の分子メカニズムに迫った。現在までのところ、Alp7/TACC が γ -チューブリン複合体と連携し、微小管形成を促進することがわかった。間期の細胞では、細胞質のなかの核膜周辺から微小管が形成されるが、そこに γ -チューブリン複合体に加えて Alp7/TACC が局在することが微小管形成を誘導することを確認した。Alp7/TACC は、微小管結合タンパク質として微小管を安定化する (Sato et al. 2004) のみならず、微小管形成を誘導し (Sato and Toda, 2007; Sato et al. 2009)、さらに微小管の重合核形成に機能を果たすことが明らかになりつつある (本研究の未発表データ)。

ヒト細胞への応用

さらに我々は、Alp7/TACC による微小管形成のメカニズムが高等生物においても保存されているかどうかを検証するために、ヒト培養細胞での実験をおこなった。ヒト Alp7 オートログである TACC3 をヒトがん細胞 HeLa に発現させたところ、細胞株においては微小管形成を誘導できることが示された。しかし、その後、別の由来をもつ HeLa 細胞、ならびにその他の培養細胞系列を用いて同様の試験をおこなったところ、微小管の形成誘導の程度は細胞の種類・由来によって表現型が異なることも明らかになった (本研究の未発表データ)。これは、微小管形成のメカニズムが、がん化や細胞の分化状態によって異なるシステムを採用していることを高く示唆しており、今後研究を継続することによって、そのメカニズムを解明したい。

マウス上皮細胞における微小管配向性の研究と、その研究基盤のセットアップ

マウス小腸上皮組織を構成する上皮細胞においては、CAMSAP3 が微小管の末端を細胞の頂端部につなぎとめることで微小管の特徴的な配向性を作り出している (Toya et al. 2016)。その分子メカニズムを追究するために、まず当研究室で動物実験を開始するための設備をセットアップし、動物実験ならびに遺伝子組換え実験に関する倫理を遵守しながら実験をおこなった。野生型のマウスと、CAMSAP3 変異型マウスを用いて小腸の腸陰窩から絨毛先端部にかけての上皮細胞において、微小管の形態を確認した。その結果、腸の部位によって微小管の形態が一樣ではなく、部位によって異なることがわかった。今後は、CAMSAP3 のみならず、

他の微小管結合タンパク質もこの微小管配置に影響を与える可能性を検討し、この微小管配置の違いがどのような生理的意義を有するのか研究を継続する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Keita Kiriya, Hayato Tsuyuzaki, Masamitsu Sato
Module-based systematic construction of plasmids for episomal gene expression in fission yeast
Gene 637:14-24 (2017)

〔学会発表〕(計 12 件)

Yutaka Shirasugi, Masamitsu Sato
CDK-dependent nuclear accumulation of Alp7/TACC promotes the assembly of the radial array of microtubules in meiosis I.
第 70 回細胞生物学会第 51 回日本発生生物学会合同大会

Hirohisa Ebina, Liang Ji, Masamitsu Sato
Functional analysis of fission yeast CLASP in assembling pre-anaphase spindle
第 70 回細胞生物学会第 51 回日本発生生物学会合同大会

Mana Katsuyama, Tomonari Sunaga, Masamitsu Sato
Functional linkage between the γ -tubulin ring complex and Alp7/TACC in microtubule nucleation
第 70 回細胞生物学会第 51 回日本発生生物学会合同大会

Yuto Mitsuhashi, Mika Toya, Masatoshi Takeichi, Masamitsu Sato
Organization of microtubules in small intestinal crypt cells
第 70 回細胞生物学会第 51 回日本発生生物学会合同大会

露崎隼, 岡田直幸, 佐藤政充
分裂酵母胞子の 1 細胞 RNA-seq による細胞周期始動時の発現変動プロファイリング
酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会

Hayato Tsuyuzaki, Naoyuki Okada, Masamitsu Sato
Temporal Change of Single-Cell Transcriptome Reveals a “Wake-Up” Signal of Yeast Cells upon Nutrition Change
Core-to-core symposium Biotechnology Towards Next Generation Single Cell Analysis

平井隼人、佐藤政充
Mis6/CENP-I はセントロメアからノンコーディング RNA が転写される際に CENP-A を維持する
第 41 回日本分子生物学会

片山研太, 浜田道昭, 佐藤政充
機能性 non-coding RNA の二次構造に基づく探索 Structure-based screening for functional non-coding RNA
第 41 回日本分子生物学会

Yuichi Murase, Takahiro Hamada, Masamitsu Sato
An Unconventional Function of Dis1 as a Microtubule Depolymerizer
5th Core-to-Core International Symposium "3D Lab-Exchange Program"

Mika Toya
Microtubules in Epithelial Cells
5th Core-to-Core International Symposium "3D Lab-Exchange Program"

Naoko Nishizawa, Mika Toya, Masatoshi Takeichi, Masamitsu Sato
Functional analysis for the microtubule minus-end binding protein CAMSAP2 in spindle assembly
5th Core-to-Core International Symposium "3D Lab-Exchange Program"

Masamitsu Sato
Temporal Change of Single-Cell Transcriptome Reveals a "Wake-Up" Signal of Yeast Cells upon Nutrition Change
5th Core-to-Core International Symposium "3D Lab-Exchange Program"

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
www.sato.biomed.sci.waseda.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：戸谷 美夏
ローマ字氏名：TOYA, Mika

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。