

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H01431

研究課題名（和文）系統的破壊を通じた巨大有糸分裂装置・スピンドルの分子モデル構築

研究課題名（英文）Elucidating the mechanisms of spindle formation through systematic gene deletion

研究代表者

五島 剛太（Goshima, Gohta）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：20447840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞分裂装置・スピンドルは染色体の分配に必須である。スピンドルの形成には多くの遺伝子が冗長的に働くため、その分子機構の完全な理解には至っていない。本研究では、モデル細胞系でスピンドル制御因子候補を系統的に破壊していくことで、スピンドルの各パーツが形成される仕組みを追究した。形成機構の理解が深まったパーツとして、染色体とスピンドルの接点である動原体、スピンドルの主要構成因子たる微小管の末端、スピンドル極が挙げられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂装置・スピンドルの形成に必要なタンパク質は、代表的なモデル細胞系を用いて網羅的に明らかにされてきた。本研究では、これらのうちいくつかのタンパク質について分子活性や作用機序を解明するとともに、複数のタンパク質が協調して機能するケースをいくつか示すことができた。細胞分裂時の諸過程の制御に複数の機構が同時に関わりうることを明らかにしたことが、重要な成果のひとつである。

研究成果の概要（英文）：The spindle is essential for chromosome segregation. As many genes act redundantly, the molecular mechanisms of spindle formation are not fully understood. By systematically disrupting candidate spindle regulators in model cell systems, we studied the mechanism of spindle parts formation, including the kinetochore, which is the contact point between chromosome and spindle, the ends of microtubules, which are the main components of the spindle, and the spindle pole.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂時に遺伝情報を姉妹細胞へと均等に分配することはあらゆる生命体にとって根本的な事象のひとつである。真核細胞では細胞分裂期に入ると微小管細胞骨格を主体とする巨大分子装置・スピンドル(紡錘体)が形成され、染色体の分配に必須の役割を果たす。スピンドル欠損と疾患の因果関係も次々と明らかになっており、スピンドルの構築原理やメカニクスの解明は基本的な細胞活動の理解のみならず、人の病態の理解の点からも重要である。スピンドル構造の興味深さは、その形成に数多くの因子が関わり極めて複雑である点だけではなく、細胞種に応じて形や大きさが厳密に規定されているという点にある。実際、この2点は細胞分裂研究の長年の主要テーマであった。

スピンドルの形成過程は(1)微小管生成、(2)二極化、(3)極収束、(3)長さ調節、(4)染色体の捕捉・整列、に分けることができ、それぞれに多くの因子が関わっている。また各過程では複数の重要な機構が存在し、冗長的に働くことでロバストな進行に貢献していることがわかってきた。しかしながら、これまでの研究成果には以下のような問題点が挙げられる。

- (1) 不確実な遺伝子機能阻害法を用いた実験データが多く、主要機構を司る分子について矛盾する報告が多く出ている。
- (2) 分裂期に限定されず働く因子の分裂期機能は多くの場合不明である。
- (3) 主要ではないサブの機構の存在も示されてきたが、分子の実態はほぼ完全に未解明である。

このような状況で、数十の因子を対象に、新しい手法を用いてスピンドル形成因子をきっちりと同定し、また因子の機能を逐一明らかにすることで、スピンドル総体の分子モデル構築を目指すことを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝情報を姉妹細胞へ継承するのに必須の細胞分裂装置・スピンドル総体の分子モデルを構築することを目標に定めた。近年、多くのスピンドル形成因子が報告され、またスピンドル形成の各過程には複数の機構が存在することも示されたが、遺伝子解析法の不完全さにより相矛盾する報告も多く、分子モデルの構築には至っていない。本研究では、ロバストな遺伝子破壊法を用い、スピンドル形成因子候補の役割を逐一詳細に突き止めることを目的とした。

3. 研究の方法

約50のスピンドル形成因子候補に対し、CRISPRを用いた遺伝子完全破壊ラインの作成(細胞の増殖に必須ではない場合)および、オーキシン誘導型分解システムを用いた分裂期特異的タンパク質分解を行い、スピンドル形成因子の全貌を明らかにする。また、複数の遺伝子を欠失させることで最小限の機能を持つ「ミニマルスピンドル」をいくつか作成し、スピンドルの構築原理を解明する。モデル系としてハエおよびヒト培養細胞、ヒメツリガネゴケ幹細胞、分裂酵母を用い、各種蛍光スピンドルマーカーを高解像度顕微鏡でライブ観察する。

具体的には、

- (1) スピンドル形成機能が示唆されている因子を網羅的にCRISPR法(因子が細胞の増殖に必須でない場合)あるいは分裂期急速デグロン法を用いて欠失させた後、単細胞ライブ観察により表現型を精査し、各遺伝子のスピンドル機能を確実に明らかにする。
- (2) 遺伝子破壊により主要機構をひとつ、あるいは複数欠失させ、染色体分配の機能を最小限に持った「ミニマルスピンドル」を構築し、これを解析することでスピンドル形成の

仕組みや各因子の役割の詳細を明らかにする。たとえば、微小管生成にはオーグミン依存性機構を含め3つの主要機構が存在するが、そのうちの1つ2つをなくしてもなお最低限の機能を持ったスピンドルが形成されると予測している。こうして作られたミニマルスピンドルでどのように微小管が生え染色体と相互作用しているかを調べることで、各機構の役割を正確に捉えられる。

4. 研究成果

- (1) ヒト培養細胞を用いた研究では、まず、スピンドル極に局在する2因子が冗長的に働くことで、スピンドル微小管を極付近で収束させていることを見出した(Tungadi, Ito et al. 2017)。次に、ショウジョウバエ培養細胞およびヒト培養細胞を用いた研究では、動原体微小管の末端に局在するモータータンパク質が微小管動態を制御することで動原体と微小管の安定な結合に必要であることを示した(Edzuka and Goshima. 2019)。その後、ヒト HCT116 培養細胞を用い、スピンドル微小管が生成する仕組みに焦点を絞って研究した。微小管を生み出すには、構成タンパク質の重合を開始させる必要があり、この反応にはこれまで、gamma-チューブリンタンパク質が重要であることが知られていた。微小管生成因子である gamma-チューブリン遺伝子を欠失させると、細胞の分裂は異常になり、致死となる。本研究では、ヒト培養細胞において、gamma-チューブリンをほぼ完全になくした状態でも微小管が生み出される様子を観察することに成功した。実験に用いたのは CRISPR/Cas9 法とオーキシン誘導性デグロン(AID)法で、これにより、細胞分裂直前に急速に内在性の gamma-チューブリンの分解を誘導した。細胞内で gamma-チューブリンに依存しない微小管が生成されることを見出し、さらには、RNAi 法を用いて生成を促進する候補因子として、微小管結合タンパク質の CLASP1 と TPX2 を見出した(Tsuchiya and Goshima. 2021b)。
- (2) ヒメツリガネゴケを用いた実験では植物細胞の分裂に関して新しい知見を得た。まず、植物の動原体構成因子の動態の包括的に描写することに成功した。さらに、遺伝子破壊・ノックダウン実験を駆使し、動原体の欠損により染色体の分配異常だけでなく、細胞質分裂の阻害が引き起こされることを見出した(Kozgunova et al. 2019)。また、微小管脱重合型キネシン13モータータンパク質を完全に欠失させた細胞では、動物細胞でのこれまでの知見とは異なり、機能的なスピンドルは形成され、その長さは野生株に比べて短かった。タンパク質の生化学活性を調べたところ、動物のものとは異なり脱重合活性は認められなかった。植物スピンドルと動物スピンドルの動態制御機構の違いが明らかになった(Leong et al. 2020)。
- (3) ヒト培養細胞を用いた研究で、研究代表者と分担者の密な共同研究が発展し、共同執筆論文を発表した(Tsuchiya,Goshima & Kiyomitsu. 2021a)。この研究では、スピンドル微小管の束化因子が染色体上のシグナル伝達分子の制御下にあるのではないかとの仮説を立て、これを検証した。染色体由来の Ran-GTP 勾配は、染色体近くの抑制性インポーチンから NuMA や HURP などの紡錘体形成因子を解離させることにより、紡錘体形成を促進すると考えられてきた。オーキシン誘導性デグロン(AID)法を用いて、Ran の制御因子群を枯渇させたところ、NuMA のスピンドル極への局在や機能に影響を与えないことがわかった。対照的に、HURP の微小管への結合と解離のサイクルを局所的に促進し、動原体微小管の安定化に寄与することがわかった。すなわち、染色体因子による動原体微小管安定化因子制御様式について新しい知見を得た。
- (4) 酵母とヒト培養細胞を使った実験で、細胞分裂を司るスピンドル形成の新たな仕組みを発見した。スピンドルの形成には数十の遺伝子の働きが必要とされる。スピンドル形成に必要な遺伝子は、酵母から動物や植物に至るまで、広く共通していることが多いが、一方で、特定の遺伝子を持っていない生物種もある。この場合、その生物種は進化の過

程で、まだ我々が把握できていない遺伝子を使った機構を発達させたと考えられる。本研究では、生物進化実験と呼ばれる、実験室内で生物の遺伝子変異を蓄積していく方法により、酵母や動物でスピンドル形成に必須のタンパク質リン酸化酵素 Polo を欠失しながらスピンドルをなお形成できる、酵母の人為的作出に成功した。そのような酵母の多くはグルコース代謝経路に変化が生じていて、別のタンパク質リン酸化酵素 Casein kinase 1 (CK1) を介したスピンドル形成経路が働いていることがわかった。さらに、Polo と CK1 の同様の関係性は、ヒトの大腸癌患者由来の培養細胞においても確かめられた (Kim and Goshima, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Goshima Gohta	4. 巻 5
2. 論文標題 Further Reading Microtubule Nucleation Pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)	6. 最初と最後の頁 547 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-819460-7.00069-4	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 -

1. 著者名 Tsuchiya Kenta, Goshima Gohta	4. 巻 220
2. 論文標題 Microtubule-associated proteins promote microtubule generation in the absence of γ -tubulin in human colon cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202104114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202104114	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 -

1. 著者名 Kim Juyoung, Goshima Gohta	4. 巻 119
2. 論文標題 Mitotic spindle formation in the absence of Polo kinase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2114429119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2114429119	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 -

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 Kozgunova Elena, Nishina Momoko, Goshima Gohta	4. 巻 8
2. 論文標題 Kinetochores protein depletion underlies cytokinesis failure and somatic polyploidization in the moss <i>Physcomitrella patens</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 pii:e43652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.43652	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 Goshima Gohta, Bellaiche Yohanns	4. 巻 60
2. 論文標題 Editorial overview: Cell division - from molecules to tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 iii~v
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jceb.2019.06.006	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Edzuka Tomoya, Goshima Gohta	4. 巻 218
2. 論文標題 <i>Drosophila</i> kinesin-8 stabilizes the kinetochore-microtubule interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 474 ~ 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201807077	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 -

1. 著者名 Tsuchiya Kenta, Hayashi Hisato, Nishina Momoko, Okumura Masako, Kanemaki Masato T., Goshima Gohta, Kiyomitsu Tomomi	4. 巻 -
2. 論文標題 Acute degradation reveals that Ran-Importin network dynamically polarizes and maintains HURP, but not NuMA, on human mitotic spindle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
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 Beaven Robin, Bastos Ricardo Nunes, Spanos Christos, Rom? Pierre, Cullen C. Fiona, Rappsilber Juri, Giet R?gis, Goshima Gohta, Ohkura Hiroyuki	4. 巻 216
2. 論文標題 14-3-3 regulation of Ncd reveals a new mechanism for targeting proteins to the spindle in oocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3029 ~ 3039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201704120	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 該当する

1. 著者名 Tungadi Elsa A., Ito Ami, Kiyomitsu Tomomi, Goshima Gohta	4. 巻 130
2. 論文標題 Human microcephaly ASPM protein is a spindle pole-focusing factor that functions redundantly with CDK5RAP2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 3676 ~ 3684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.203703	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15件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 細胞分裂の宝探し
3. 学会等名 細胞分裂研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Cell division without a gene required for cell division
3. 学会等名 The Biochemical Society and the British Society for Cell Biology -Dynamic Cell IV- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Spindle formation without a gene required for spindle formation
3. 学会等名 Mitotic spindle: From living and synthetic systems to theory (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Consequences of chromosome mis-segregation in moss stem cell
3. 学会等名 International Symposium: Principles of pluripotent stem cells underlying plant vitality (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 多様な生命現象を司る微小管 -中心体集合システム-
3. 学会等名 第92回日本生化学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清光智美
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 - Imaging the Molecular Processes of Life (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Cell division in plants
3. 学会等名 植物研究発表会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Microtubules and cell division in plants
3. 学会等名 The 7th IMPRS-CMB Students' Symposium(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Mechanism of cell division in plants
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Mitosis in plants
3. 学会等名 HBIGS WINTER SCHOOL for PhD students 2019: Molecular mechanisms in mitosis(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Cell division in moss stem cells
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Tsuchiya, Hisato Hayashi, Momoko Nishina, Masako Okumura, Masato T. Kanemaki, Gohta Goshima, Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 Importin- recruits HURP to k-fibers in cooperation with Ran-GTP to form proper metaphase spindle
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Spindle pole organisation by the microcephaly protein ASPM
3. 学会等名 神経細胞シンポジウム「International Symposium on Neural Precursor Cell Fate Determination, Differentiation and Neuronal Circuit Formation」（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五島剛太
2. 発表標題 Spindle pole focusing by the microcephaly protein ASPM
3. 学会等名 CSH Asia 2017 Conference on Cilia & Centrosomes（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江塚智哉, 五島剛太
2. 発表標題 ショウジョウバエにおいて動原体と微小管の安定な結合にはキネシン8が必要である
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>五島研究室ホームページ http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~tenure2/goshima.html</p>

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
研究分担者	清光 智美 (Kiyomitsu Tomomi) (10503443)	沖縄科学技術大学院大学・細胞分裂動態ユニット・准教授 (38005)	

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
---------	---------