

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02471

研究課題名(和文)細胞分裂における染色体-微小管相互作用の新機構の解明

研究課題名(英文) Novel mechanism of microtubule-chromosome interaction in cell division

研究代表者

村田 隆 (murata, takashi)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：00242024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞では中心体なしに紡錘体ができるが、どのようにして微小管が生じ染色体が捕捉され配列するかはわかっていない。本研究ではライブイメージングにより核膜、微小管、染色体の挙動、微小管と染色体の相互作用を可視化することに成功した。さらに、微小管をmScarlet-iとmsGFPで2重標識して光退色実験を行い、微小管の重合脱重合の頻度を解析したところ、核膜の内側で微小管重合が促進されるため微小管分布が核膜内側に移行することが分かった。動原体周囲から生じる微小管は検出できなかったため、重合促進には染色体による微小管誘導は関与していないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紡錘体は細胞分裂の時に出現する構造で、遺伝情報を娘細胞に伝える染色体を2つに分配する。生きている植物細胞で紡錘体、染色体、核膜、動原体を蛍光標識して通常の共焦点顕微鏡および共同研究で開発した2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡で観察することにより、紡錘体が作られる仕組みと染色体と紡錘体が結合するしくみを明らかにした。この研究は植物の細胞分裂の仕組みがどのように進化してきたかの理解に貢献するとともに、植物細胞の増殖機構を研究するために役に立つ。

研究成果の概要(英文)：Centrosomes form spindle microtubules and the centrosomal microtubules plays in role of chromosome capture and alignment in animal cells. The centrosomes are lost in plant cells, and how spindle microtubules are formed and how chromosomes are captured by them are unknown. In this study, we visualize behavior of the nuclear envelope, microtubules, and chromosomes, and the interaction between microtubules and chromosomes by live imaging. Furthermore, microtubules were double-labeled with mScarlet-i and msGFP, and photobleaching experiments were performed to analyze rates of microtubule polymerization and depolymerization. It was found that microtubule polymerization shifts to the inside of the fragmented nuclear envelope. Since microtubules originating from the centromere could not be detected, it was considered that induction of microtubules by chromosomes is not involved in microtubule polymerization.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 紡錘体 植物細胞 核膜 液液相分離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

紡錘体は真核生物細胞に共通に見られる構造で、細胞分裂において染色体の分配に働くため、真核生物の増殖に必須の構造と言える。動物細胞では中心体が紡錘体の極を誘導し、染色体が赤道面に並ぶ過程に働く。動物細胞は中心体による微小管形成に加えて染色体による微小管形成経路も持ち、中心体を欠いてもモータータンパク質と微小管の相互作用により紡錘体は形成される。このことから、中心体を欠く植物細胞でも同様に染色体による微小管形成と微小管の自己組織化により紡錘体が形成されると考えられてきた。

染色体が赤道面に並ぶ過程は中心体を持つ動物細胞において研究されてきた。有力なモデルとして、中心体から伸びる微小管と動原体が相互作用する "search and capture" により染色体が赤道面に配列する機構が提唱されている。しかしながら、中心体を欠く植物細胞で染色体がどのようにして赤道面に配列するかわかっていない。植物細胞を解析することにより染色体配列の新しい過程が明らかになることが期待された。

植物と動物は核膜消失型の細胞分裂を独立に獲得したので、核膜の役割に注目することで新規の染色体配列機構が見つかる着想した。予備的実験の結果から、植物細胞の細胞分裂では染色体と核膜が相互作用することが示唆された。そこで、核膜の挙動に着目し、植物細胞の紡錘体形成と染色体配列の過程を解析した。

2. 研究の目的

植物の紡錘体を構成する微小管がどのように形成され、どのように染色体と相互作用するかを解析し、紡錘体と染色体の相互作用の新しい原理を見いだすことを目標とする。特に核膜の関与に着目して調べる。

3. 研究の方法

従来用いられていなかった新しい顕微鏡法を用いて微小管、染色体、核膜の相互作用を解析した。研究開始当初は、関与するタンパク質因子の機能阻害を計画していたが、後述の通り予想外の現象が見つかったため、顕微鏡による解析を重点的に進めた。

1) 微小管、核膜、動原体、染色体のマーカーラインの作出

高解像度のイメージングに耐えるように、赤色系蛍光タンパク質を用いた微小管標識コンストラクトを改善した。mScarlet-i, mScarlet-H, mRuby3, mCardinalなどを検討し、従来用いていたmCherry-タバコ チュープリン8をmScarlet-i-タバコ チュープリン8に変更した。蛍光タンパク質の輝度上昇により励起光を減らすことが可能となり、従来問題だった高発現時の細胞形態異常も見られなくなった。この標識コンストラクトの発現株を用いて名大ITbMの植田美那子特任講師(2021年度より東北大学教授)と共同研究を行い、新規な微小管阻害剤のスクリーニングの論文を共著で発表した(Kimata et al. 2022)。

さらに、微小管、核膜、動原体、染色体の多重蛍光標識細胞も作製した。微小管はタバコ チュープリン8のcDNA、核膜はタバコのSUNゲノムDNA、動原体はタバコのCenH3cDNA、染色体はヒストンH2BのゲノムDNAに蛍光タンパク質遺伝子を融合させたものを用いた。微小管と染色体の2重標識細胞については、H2B-mCherry発現カセットと標識 チュープリン8の発現カセットを並列に並べると標識 チュープリン8の発現阻害が起こったが、2つの発現カセットの間にヒメツリガネゴケの遺伝子間配列を挿入することで安定発現可能になった。作製したmCitrine- チュープリン8とH2B-mCherryの二重標識ラインも共同研究で用いた(Kimata et al. 2022)。

2) 2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡による紡錘体全域の3Dタイムラプス解析

北大・電子研の根本教授(2019年度より自然科学研究機構ExCELLSに異動)との共同研究により、2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた紡錘体形成の3Dライブイメージングを行った。この顕微鏡を用いると約20 μ mの厚みの紡錘体の上から下までを約1分間隔で撮影可能である。従来のシステムでは1波長励起、2波長画像取得が限界だったが、2波長切り替え励起と計算によるアンミキシングを組み合わせることによりGFP, mCitrine, mCherryの3標識細胞を観察できるようになった。システム開発は共同研究として行い、共著論文を発表した(Kamada et al. 2022)。

3) 超解像顕微鏡法による動原体と微小管の相互作用の解析

共焦点顕微鏡のピンホールを絞った超解像ライブイメージングを行うことにより、微小管と動原体の動きを調べた。従来の蛍光標識マーカーでは光褪色により画像取得が難しかったが、微小管をmEGFP、動原体をmScarlet-Hで標識することにより撮影が可能になった。

4. 研究成果

1) 動原体の動きの解析

核膜、動原体の2標識細胞を二光子共焦点スピニングディスク顕微鏡で3D タイムラプス観察することにより、染色体の配列過程の段階分けに成功した。核膜と動原体の両方をmCitrineで標識したタバコ培養細胞を2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡で観察することにより、染色体形成過程における核膜と動原体の挙動を可視化することに成功した。動原体の動きは3段階に分けられた。核膜崩壊直前に核は膨潤し、動原体は膨潤した核の表層に向かって動いた。核膜に穴が空くと、断片化した核膜と動原体はいっしょに発達中の紡錘体中央に向かって動いた。その後で核膜は外側に動き、動原体は赤道面に配列した。次に微小管、動原体の2標識細胞で動原体の赤道面配列過程を観察したところ、対になっている動原体の片側に微小管が結合し、微小管と動原体がともに赤道面に向けて動いているようだった。そこで標識を変更し超解像顕微鏡で動原体移動の高解像度観察を行った。動原体-微小管複合体は隣接する微小管の上を滑るように動いていた(図1)。これは、一对の動原体の両側に微小管が結合して、両側の力のバランスにより染色体が配列するという従来の配列原理を覆すものであった。当初の研究計画では核膜の関与を仮定し、核膜の裏打ちタンパク質のクローニングと機能阻害を計画していたが、核膜の関与は考えられなかったためクローニングは行わなかった。

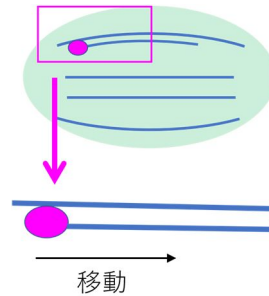


図1 染色体配列時の動原体の動きのモデル。

2) 微小管重合機構の解析

核膜をmCitrine、染色体をmCherry、微小管をmEGFPで標識したタバコ培養細胞を作成し、2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡とアンミキシングを組み合わせて紡錘体形成時の動態を調べたところ、断片化した核膜は動原体から離れた後も紡錘体領域を取り囲んでいることがわかった。さらに、微小管阻害剤の存在下で同様の観察を行った結果、微小管をオリザリンで破壊しても断片化した核膜は分散せずに、本来紡錘体が形成される領域を取り囲んでいた。この領域は時間とともに不定形に変形したが、分散することはなかった(図2)。

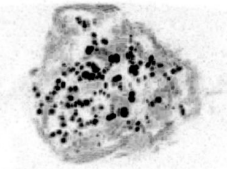


図2 オリザリン処理したタバコ培養細胞の紡錘体形成時の核膜と動原体。構造を見やすくするため白黒反転像で示す。不定形の領域が動原体(黒いドット)を取り囲んでいた。

本研究計画がスタートしたのと同時期に動物細胞の紡錘体形成に新しい概念が導入された。紡錘体形成は中心体、微小管、染色体の相互作用で説明されていたが、"spindle matrix"の概念が導入され、紡錘体領域に液液相分離により単量体チューブリンが濃縮されると考えられるようになった。動物と植物は独立に開放型核分裂(核膜が崩壊する核分裂)を進化させたため、植物にも類似のチューブリン濃縮が起こるかどうか新たな疑問になった。この結果は植物でも紡錘体領域の性質は細胞質と異なることを示している。

次に、微小管をmScarlet-iとmEGFPで2重標識し、核膜をmCherryで標識した3重標識細胞を用いて光退色実験を行い、微小管の重合脱重合の頻度を核膜の中と外で比較した。微小管を2重標識することにより、微小管の安定性と新規重合の微小管の量を評価できる。解析の結果、微小管の安定性は核膜の内外で目立った違いはないのに対し、微小管の重合は核膜の内側が速かった。このため、断片化した核膜の内側で微小管重合が促進されるため微小管分布が核膜内側に移行することが分かった。さらに、動原体と微小管の2重標識細胞で紡錘体形成時に微小管阻害剤プロピザミドで微小管を脱重合させ、薬剤除去により微小管の形成部位を調べたところ、断片化した核膜内のランダムな場所から微小管は出現した。このため、微小管形成においては動物細胞と同様な染色体依存の微小管形成経路は働いていないと考えられた。植物の紡錘体は従来の想定と全く異なる機構で形成されると思われる。

断片化した核膜の内部でチューブリンが重合促進される機構を明らかにするため、自然科学研究機構ExCELLSの堤特任助教および根本教授と単量体チューブリンの動きの蛍光相関解析を行った。断片化した核膜内部では外部よりチューブリンの拡散が遅い領域が存在するようだった。この点は今後のさらなる検証が必要である。

以上の結果から、植物細胞の紡錘体形成と染色体配列は従来の推測とは全く異なる機構で起こっていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kimata Yusuke, Yamada Moe, Murata Takashi, Kuwata Keiko, Sato Ayato, Suzuki Takamasa, Kurihara Daisuke, Hasebe Mitsuyasu, Higashiyama Tetsuya, Ueda Minako | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Chemical screen of Arabidopsis zygote and proteomics in tobacco BY-2 cells identify general plant cell division inhibitors | 5. 発行年 2022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） 10.1101/2022.04.28.489799 | 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 Kamada Takafumi, Otomo Kohei, Murata Takashi, Nakata Kaito, Hiruma Shota, Uehara Ryota, Hasebe Mitsuyasu, Nemoto Tomomi | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Low-invasive 5D visualization of mitotic progression by two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 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） 10.1038/s41598-021-04543-7 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 村田隆、大友康平、根本知己、長谷部光泰 |
| 2. 発表標題 植物の紡錘体形成における微小管の起源 |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 発表者名 村田隆、大友康平、加藤輝、根本知己、長谷部光泰 |
| 2. 発表標題 植物の細胞分裂は独自の染色体配列機構を持つ |
| 3. 学会等名 日本植物学会第83回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 村田隆 |
| 2. 発表標題 2光子スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた3Dマルチカラー生細胞イメージング |
| 3. 学会等名 定量生物学の会 北海道キャラバン 2019 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村田隆、大友康平、根本知己、長谷部光泰 |
| 2. 発表標題 動原体片側への微小管結合による染色体の赤道面への配列運動 |
| 3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2020 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Murata Takashi, Otomo Kohei, Kato Kagayaki, Nemoto Tomomi, Hasebe Mitsuyasu |
| 2. 発表標題 Two-photon spinning disk microscopy reveals steps of chromosome alignment during mitotic spindle formation in plant cells |
| 3. 学会等名 The 66th NIBB Conference / ABiS International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 村田 隆、大友 康平、加藤 輝、根本 知己、長谷部 光泰 |
| 2. 発表標題 植物紡錘体における染色体の配列運動は3つの過程に分けられる |
| 3. 学会等名 2019年生体運動研究合同班会議 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|