様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年　5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19770173
研究課題名（和文）　細胞周期における微小管動態制御の分子機構

研究課題名（英文）　Molecular mechanism of regulation of microtubule dynamics during the cell cycle

研究代表者
木下　和久（KINOSHITA KAZUHISA）
独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・専任研究員
研究者番号：60447886

研究成果の概要：

細胞周期における微小管動態の制御は染色体の分配をはじめとする様々な細胞機能に必須である。本研究では進化的に保存された微小管結合タンパク質ファミリーXMAP215/TOG が微小管の伸長・縮小反応を触媒する「微小管ポリメラーゼ」として機能すること、そしてその活性が時空間特異的に相互作用因子 TACC ファミリータンパク質および M 期キナーゼ Aurora A に制御されることによって、細胞周期特異的な微小管動態が生み出されることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：細胞生物学
科研費の分科・細目：生物学・細胞生物学
キーワード：細胞周期　細胞分裂　細胞骨格　微小管　染色体

１．研究開始当初の背景

細胞周期 M 期（分裂期）はその直前の間期において複製した染色体や細胞質の要素を 2 つの娘細胞に分配するステップである。とりわけ染色体を正確に二分するプロセスは特に重要であり、このプロセスは M 期において形成される分裂装置スピンドル（紡錘体）によって行われる。スピンドルの主要構成因子である微小管は、M 期において遺伝情報の子孫細胞への継承という重大な役割を果たす一方で、細胞周期間期の細胞あるいは分化した細胞においては細胞質微小管ネットワークを構成し細胞内輸送、極性の確立・維持および細胞の形態形成に寄与する。これら M 期と M 期以外で全く異なる細胞機能を果たすために、微小管は細胞周期の進行に伴ってダイナミックな構造変換を遂げることが知られていたが、その分子メカニズムは長年にわたり細胞生物学分野での大きな question であった。

微小管はαβチューブリンからなる二量

体サブユニットが重合、脱重合することにより伸縮する中空のポリマーであり、「動的不安定性」と呼ばれる性質によってダイナミックに変化することが可能である(Mitchison & Kirschner, Nature 1984)。研究代表者らはアフリカツメガエル卵抽出液の実験系を用いたアプローチにより、生理的条件下の速い伸長と高頻度のカタストロフ（伸長状態から縮小状態への遷移）を示すダイナミックな微小管のふるまいに、進化的に保存された微小管結合タンパク質ファミリーXMAP215/TOG と、微小管不安定化活性をもつキネシンモーター様タンパク質ファミリーMCAK/kinesin-13 の二つの微小管動態制御因子が必須であることを明らかにした。さらに *in vitro* においてこの二つの因子の精製タンパク質と精製チューブリンを組み合わせることによって生理的微小管動態の再構成に初めて成功し、細胞内で見られるダイナミックな微小管のふるまいの分子的基盤を解明した(Kinoshita et al., Science 2001)。以上の研究成果は、細胞周期進行ならびにさまざまな細胞機能における微小管の構造と機能の変化が、XMAP215/TOG と MCAK/kinesin-13 の活性の変動によってもたらされていることを示唆しており、二つの因子の活性制御の分子機構を明らかにすることが微小管動態の制御の理解に不可欠であることを示していた。特に M 期のスピンドルにおいては、正確に姉妹染色体を二つの娘細胞に分配するために、XMAP215/TOG と MCAK/kinesin-13 の活性が時空間特異的に厳密に制御されていることが予想されていた。

２．研究の目的

本研究では、細胞周期における時空間特異的な微小管動態制御の分子メカニズムを解明することを主たる目的とした。

研究代表者は本研究を開始する直前、間期から M 期への進入時の中心体周辺領域において XMAP215/TOG が、その相互作用タンパク質である TACC3 と M 期特異的タンパク質キナーゼ Aurora A のはたらきによって活性化され、時空間特異的な微小管形成を促進していることを明らかにしていた(Kinoshita et al., J. Cell Biol. 2005)。また MCAK/kinesin-13 についてもほぼ同じ時期に他の研究グループにより、M 期スピンドル形成時に染色体腕部周辺において別の M 期特異的キナーゼ Aurora B のはたらきによってその活性が抑制されていることが報告された。これらの結果は、当初予想されていた XMAP215/TOG と MCAK/kinesin-13 の時空間特異的活性制御の存在を実際に証明したものであり、この二つの分子の活性制御機構を明らかにすることが、細胞周期における時空間特異的な微小管動態制御の分子メカニズムの解明に直接結びつくであろうことを強く示唆するもので、本研究を提案・開始する動機づけとなった。

以上のような経緯により、本研究では特に進化的に保存された微小管結合タンパク質ファミリーXMAP215/TOG に注目して、この分子およびその相互作用因子の機能と時空間特異的な制御機構について分子レベルで明らかにすることをより具体的な目的として位置づけた。

３．研究の方法

前述の目的を達成するため、以下の(1)から(3)までの三つのアプローチによって研究を進めた。

(1) 精製タンパク質を用いた XMAP215 と相互作用因子の生化学的解析

バキュロウイルスを用いた昆虫細胞のタンパク質発現系において大量発現・精製した XMAP215 と TACC3 および精製チューブリンを用いて、pure system における XMAP215 と相互作用因子の微小管伸長亢進反応の作用機序について探索・解析をおこなった。

(2) XMAP215 制御因子 TACC3 および Aurora A の機能解析

研究代表者はこれまでアフリカツメガエル卵細胞抽出液の *in vitro* 実験系を主に用いて、M 期中心体依存的な微小管伸長反応における TACC3 と Aurora A の XMAP215 活性化の役割を明らかにしてきた。本研究ではこのカエル卵細胞抽出液のアプローチと並行して、マウス卵細胞を用いて *in vivo* の減数分裂期における TACC3 と Aurora A の機能の解析をおこなった。

(3) 質量分析による新規XMAP215/TOG相互作用因子の探索

ヒト培養細胞の系において、LAP (Localization and Affinity Purification) タグ標識したXMAP215/TOGを安定に発現させる細胞株を作成し、この細胞株の抽出液を用いて免疫沈降とその沈降物の質量分析をおこなうことによって、新たな XMAP215/TOG の相互作用因子の探索をおこなった。

４．研究成果

(1) チューブリン二量体と XMAP215 の相互作用による微小管伸長反応のメカニズムの解明

精製タンパク質を用いた生化学的解析では、微小管をすばやく伸長させながら同時に高頻度のカタストロフをもたらすことができるという XMAP215/TOG に特異的な性質に特に注目して研究をおこなった。研究代表者は XMAP215 と相互作用する因子群との関係について調べている過程で、XMAP215 が *in vitro* において free のチューブリン二量体と一対一の割合で直接結合できることを見出した（図１）。また XMAP215 に GFP（緑色蛍光タンパク質）タグで標識した融合タンパク質を昆虫細胞の系で発現・精製し、ダイナミックな微小管と相互作用する XMAP215 を直接可視化する一分子アッセイ系を開発した。このアッセイ系を用いた解析によって、XMAP215 が微小管上を拡散しながら移動し、微小管の末端にまで到達することが明らかにされた。また XMAP215 は伸長している微小管においてプラス端に存在し続ける“tip tracking”の性質を示し、そこで微小管の伸長すなわちチューブリン二量体のプラス端への取り込みを亢進していることを明らかにした。さらに、XMAP215 は縮小している微小管のプラス端においてもその末端に存在し続け、伸長時とは逆の反応すなわちプラス端におけるチューブリン二量体の解離をも促進できることを明らかにした。以上の結果から、XMAP215 が微小管プラス端において微小管の伸長と縮小の両方の反応を processive に触媒することができる「微小管ポリメラーゼ」としての分子機能を持つことが示された（図２）。この研究成果は、微小管のダイナミックなふるまいの根幹のメカニズムを分子レベルで解明した点できわめて重要であり米国の専門誌 Cell に発表された (Brouhard et al., 2008)。

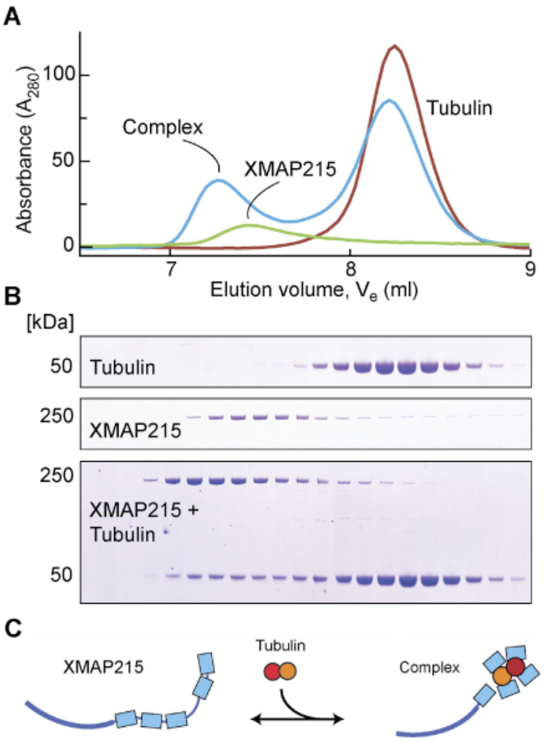

図１　XMAP215 はチューブリン二量体と複合体を形成する

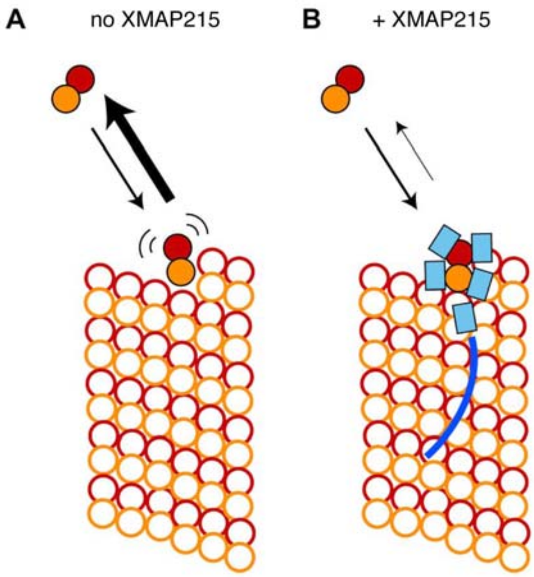

図２　XMAP215 は微小管プラス端でチューブリンの取り込みと解離を触媒する微小管ポリメラーゼとして機能する

(2) XMAP215 相互作用因子 TACC3 の減数分裂における新たな制御機構の解明

細胞周期 M 期特異的な微小管動態を生み出す XMAP215/TOG とその制御因子 TACC3 および Aurora A の機能と制御機構を中心に解析をおこなった結果、以下に述べるような新たな分子機構が見出された。まず TACC3 を M 期特異的にリン酸化し活性化する Aurora A が、低分子量 G タンパク質 Ran の標的として知られていた TPX2 (Targeting Protein for the *Xenopus* Kinesin xklp2) によって活性化され、Aurora A によってリン酸化された TACC3 の機能を通して微小管重合を促進し減数分裂時の M 期スピンドルを形成することがマウス受精卵における解析によって明らかになった。この結果は、中心体に依存しない減数分裂時のスピンドル形成においても、XMAP215-TACC3 複合体の活性が必要であることを示した最初の例であり、減数分裂と有糸分裂に共通するスピンドル形成時の微小管重合のメカニズムを明らかにした点で重要である。この研究成果の一部は、米国の専門誌 PLoS ONE に発表された（Brunet et al., 2008）。

(3) XMAP215/TOG の新規相互作用因子の同

定

ヒト培養細胞 HeLa の系において、LAP タグ標識した XMAP215/TOG を安定に発現させる細胞株を用いて、タグ特異的な抗体で免疫沈降をおこない共沈降してくる相互作用因子を探索した。質量分析（LC-MS/MS）により共免疫沈降物の解析をおこなった結果、TACC3 と同じタンパク質ファミリーTACC（Transforming Acidic Coiled-Coil protein）に属する TACC1 と TACC2 が同定された。さらに部分欠失断片を *in vitro* で発現させた精製タンパク質を用いた解析から、XMAP215/TOG の微小管伸長活性の亢進には、TACC3 のカルボキシル末端に保存されたコイルドコイル領域のみで十分であることを明らかにした（論文投稿準備中）。このコイルドコイル領域は TACC ファミリーに属するタンパク質全てに共通して高く保存された領域である。これらの結果は TACC3 のみならず TACC ファミリータンパク質全体が XMAP215/TOG の活性化因子として働いている可能性を強く示唆しており、TACC ファミリーの機能の進化的な意義を考えるうえできわめて重要である。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Brunet, S., Dumont, J., Lee, K. W., Kinoshita, K., Hikal, P., Gruss, O. J., Maro, B. & Verlhac, M. -H. Meiotic regulation of TPX2 protein levels governs cell cycle progression in mouse oocytes. PLoS ONE 3, e3338（13 ページ）. (2008). 査読有り

② Brouhard, G. J., Stear, J. H., Noetzel, T. L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S. C., Howard, J. & Hyman, A. A. XMAP215 is a processive microtubule polymerase. Cell 132, 79-88. (2008). 査読有り

〔学会発表〕（計 1 件）

① 木下和久、染色体と微小管のダイナミクスの定量モデル化へのアプローチ、定量生物学の会第 1 回年会、2009 年 1 月 11-12 日、東京大学生産技術研究所（東京）

６．研究組織

(1)研究代表者

木下　和久（KINOSHITA KAZUHISA）
独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・専任研究員
研究者番号：60447886