

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16094

研究課題名（和文）細胞サイズ変化に依存した核配置メカニズム変化の解明

研究課題名（英文）Cell size change-dependent changes in the mechanism of nuclear positioning

研究代表者

鳥澤 嵩征（Torisawa, Takayuki）

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教

研究者番号：60749406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞サイズに依存した細胞内環境の変化を調べるため、線虫の生殖腺に対するインジェクションを通して、初期胚への微小粒子や精製タンパク質を導入する技術を確立した。この技術を用いて蛍光微小粒子を初期胚に導入し、運動を観察することで、初期胚の細胞質における易動度が細胞のサイズおよび発生の段階に応じて減少していくことを明らかとすることができた。

また、ゲノム編集による内在性タンパク質に対するタグ付けを行うことで、細胞内で核や紡錘体の配置に関与する力発生因子である細胞質ダイニンを線虫個体から精製することに成功した。精製したダイニンの運動計測を通じて、分子モーターの種間での性質の違いが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞動物の発生では卵割によって細胞サイズが大きく変化し、細胞質の物理的性質や核と細胞のサイズ比なども変化していくことが想定される。本研究によって明らかとなった細胞サイズに依存した細胞質の易動度変化は、細胞サイズが変化していく際に細胞内プロセスが受ける影響を考える上で、基礎的な知見として資するものである。また、今回確立した簡易なタンパク質インジェクション法は、多細胞のモデル生物であり発生過程が安定している線虫を用いて、様々なタンパク質に対して遺伝的操作よりも大きな変化を与えた条件下での観察を可能とする応用可能性を有している。

研究成果の概要（英文）： To investigate cell size-dependent changes in the intracellular environment, we established a technique for introducing microparticles and purified proteins into early embryos through injection into the gonads of *Caenorhabditis elegans*. Using this technique, we introduced fluorescent microparticles into early embryos and observed their movement. We found that the mobility in the cytoplasm of early embryos decreases with cell size and developmental stage.

In addition, by tagging endogenous proteins with genome editing, we purified cytoplasmic dynein, a force-generating factor involved in positioning nuclei and spindles in cells, from worm culture. Through measuring the motility of the purified dynein, we revealed differences in the properties of molecular motors between species.

研究分野：生物物理

キーワード：分子モーター 細胞質ダイニン 微小管 *C. elegans*

1. 研究開始当初の背景

細胞の中には、その駆動に力が必要となるプロセスが多く存在する。その中の代表的なものの一つが、細胞分裂に伴って起こる染色体分配である。このプロセスにおいては、2つの娘細胞に染色体を等しく引き渡すための装置である紡錘体という細胞骨格を中心とする高次の細胞内分子構造が形成され、その中で染色体を引き離す力が及ぼされることが、正常な分裂プロセスにとって重要である。このプロセスにおいては、そもそも紡錘体という構造の形成や維持、また細胞内での位置の調整など、適切な力がおよぼされることでなされる要素がいたるところに存在する。このような場面において、力発生因子としてはたらいっているのが、分子モーターと呼ばれる一群のタンパク質酵素である。紡錘体に関連する種々のプロセスにおいては、微小管上を運動するモーターであるキネシンと細胞質ダイニン (ダイニン) が重要である。そのうえで、ダイニンは紡錘体中や細胞表層などの各所に局在することによって、ほとんど全てのプロセスに関与していることが知られている。

特に、細胞内での核配置については、ダイニンは複数の形で寄与することによって達成される力のバランスに重要である。細胞膜表層にアンカーされたダイニンは微小管を引くことによって力をおよぼし (cortical pulling force)、微小管上で輸送を行うダイニンは輸送にともなう反作用を通じて力をおよぼす (cytoplasmic pulling force)。これに微小管が細胞膜表層を押し力 (cortical pushing force) が合わさることで、細胞内の適切な核配置が達成されている。

2. 研究の目的

細胞核の配置という複数の力発生プロセスが協同的にはたらいっている現象に着目し、力のバランスの細胞サイズに依存した制御メカニズムの変化の解明を目指した。その上で、細胞細胞分裂で生ずる紡錘体による染色体分配では、紡錘体の形成や維持、位置の調整、また染色体の引き離しなど、力の発生を必要とする様々なプロセス細胞のサイズが変化したときに力のバランスがどうなるかを解明することを目指した。

3. 研究の方法

細胞質の粘性と細胞サイズへの依存性の計測

微小蛍光ビーズを線虫の初期胚 (1細胞期~) に導入し、その運動を観察することで細胞質の物性に関する情報を得ることを試みた。ビーズの導入は線虫の生殖腺に対するインジェクションを通して行った。線虫の生殖腺は多核になっており、将来の胚の細胞質が共有されている。ここに物質を導入することで、胚自体を傷つけることなく、胚形成を通じて物質を導入することができる。細胞サイズが変化したときに生じる細胞質の物理的性質の変化を調べるために、微小ビーズを導入し、その運動の解析を行った。

内在性のダイニンおよび関連タンパク質の動態観察

細胞内での力のバランスを考えるためには、力を生じる分子が細胞内でどのように分布し、その分布がどのように時間変化するかを観察することが重要である。さらに、生体内の平時における力のバランスを考察するためには、発現量などの量的性質に影響が少ない条件で観察を行うことが望ましい。そこで、内在性のダイニンとその関連タンパク質に蛍光タグが付加された線虫株を用意して生細胞観察を行い、細胞周期に応じた輝度分布の時間変化を定量的に解析した。また、タンパク質集積動態のメカニズムについて新たな知見を得るため、精製タンパク質を生殖腺インジェクションを通じて胚に導入し、その動態を観察するという技術を確立した。

線虫細胞質ダイニンの精製と特徴づけ

線虫の初期胚での力のバランスを考える以上、細胞内で実際に使われている分子の性質を知ることが重要である。そこで、線虫のダイニンを精製し、その性質を測定することを試みた。ダイニンは複数のサブユニットから構成されているタンパク質複合体なので、昆虫細胞や哺乳類培養細胞などの発現系で精製を行おうとする場合、線虫のサブユニットを全て発現させる必要があり、発現量バランスの考慮や、サブユニット構成が完全であることの確認の困難さなどの問題がある。これらの問題を解決するために、線虫の内在性のサブユニットの一つに精製タグを付加することで、線虫個体から細胞質ダイニン複合体を精製することを試みた。まずゲノム編集技術を用いて、内在性のダイニン重鎖 (ATPの加水分解や微小管と結合を行うサブユニット) に精製用のタグを付加した線虫株の樹立を行い、次いで液体培養技術を用いて、この線虫株の大量培養を行った。大量培養を行ったのは、精製タンパク質を用いて活性測定などの実験を行うことを想定していたためである。

4. 研究成果

細胞サイズに応じた細胞質内での易動度の減少

線虫初期胚に取り込まれた微小蛍光ビーズ (40 nm 径) の運動を撮影し、解析したところ、1細胞、2細胞、4細胞と発生が進んで細胞サイズが小さくなるにつれて、蛍光ビーズの易動度が低下するという結果が得られた。なお、細胞質内での部域間で易動度の大きな変化はみられず、細胞核や中心体周辺といった明らかな構造体の周辺以外は、少なくとも今回計測に用いたビーズのサイズ程度のサイズスケールにおいては、細胞質は比較的均質な性質を有している可能性が示唆された。このビーズ導入とその易動度の観察による細胞質内の性質の計測技術は、RNAi などの遺伝的技術と併用することによって、細胞質内の物性に影響する因子の探索や、それら因子の細胞内でのカバランスに対する影響を研究する際に有用である。

ダイニンと関連タンパク質の集積現象

線虫初期胚を用いてダイニンと関連タンパク質の動態観察を行ったところ、分裂期の核膜崩壊にともなって旧核内領域に対する特異的な集積を示すことが見いだされた。この現象を解析したところ、i) 集積には特異性があり、核膜崩壊前に細胞質に存在するタンパク質ならばどれでも集積するというわけではない、ii) 集積には順序があり、核膜崩壊を境としてすべてが同時に集積するわけではない、ということが明らかとなった。集積の順序に関しては、精製タンパク質を用いた研究を中心に明らかとなっていたダイニンの制御メカニズムと整合的なものであることも明らかとなった (図1)。具体的には、まず今回ダイニンとともに集積を確認したタンパク質には NUD-2、LIS-1、ダイナクチンという制御タンパク質が含まれており、集積はこの順序で生じていた。このうちダイナクチンがダイニンと複合体を形成することが、ダイニンの自己阻害状態の解除に重要であることが知られている。ただ、遊離のダイニンはダイナクチンと複合体を形成しづらく、LIS-1 との結合を経ることで生じるダイニンの構造変化が複合体形成の促進に重要である。さらに、この LIS-1 のダイニンへの結合を NUD-2 がサポートすることが知られており、上記の NUD-2 LIS-1 ダイナクチンという集積順序は、ダイニンが自己阻害状態から解放されて活性化することを整合的に説明できる。また、NUD-2 は核膜崩壊に先立って集積を示すという、他と異なった動態を示すが、生殖腺を通じたタンパク質インジェクション法を用いることで、核膜崩壊前集積に必要な機能領域を同定することができた。

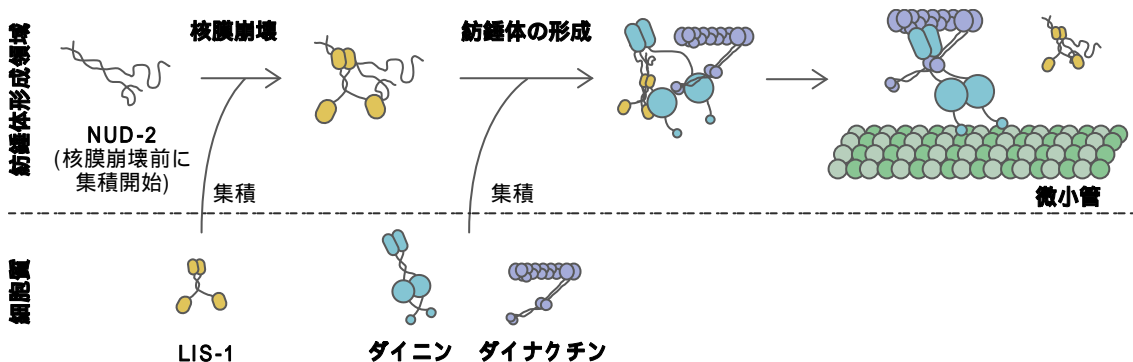


図1. 集積順序とダイニン制御との関係

核膜崩壊にともなって紡錘体形成領域にダイニンと関連タンパク質が集積する順序と制御メカニズムの関係。はじめに NUD-2 というタンパク質の集積が生じるが、これは核膜崩壊前から起こっており、核膜崩壊の後に LIS-1 が集積する。NUD-2 と LIS-1 は互いに結合することが知られており、この複合体の形成が、紡錘体の形成に伴って集積してくるダイニンとの相互作用をサポートしている。LIS-1 の結合はダイニンの構造変化を誘起し、この変化によって生じる構造ではダイナクチンとの結合親和性が高まる。ダイナクチンと複合体を形成したダイニンは活性化することが知られているので、集積順序から最終的な活性化に対して整合的な説明を与えることができる。

線虫細胞質ダイニンの精製

線虫内からの活性を持つ細胞質ダイニンの精製に関しては、液体培養を用いた大量培養と、凍結ミルによる極低温下での破碎を行うことによって、一段階のアフィニティタグ精製によって、運動活性を有する細胞質ダイニン複合体を精製することができた。精製したダイニンは、透過型電子顕微鏡によるネガティブ染色観察によって、これまで報告されてきた他の種と同様の構造を有していることを確認することができた。また、ガラス表面上に固定したモーターによって生じる微小管の滑り運動を観察する *in vitro* motility assay を行ったところ、滑らかな微小管の滑り運動を観察することができ、その平均速度は約 1.5 $\mu\text{m}/\text{s}$ であった。この値は、過去に計測されたヒト細胞質ダイニンによる滑り運動速度と比較すると、約 1.5 倍の値であり、種による運動性質の違いと、細胞内現象を考える際にそれも考慮する必要があることを示していた。

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 Takayuki Torisawa, Akatsuki Kimura | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 The Generation of Dynein Networks by Multi-Layered Regulation and Their Implication in Cell Division | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.00022 | 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 Torisawa Takayuki, Kimura Akatsuki | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Sequential accumulation of dynein and its regulatory proteins at the spindle region in the <i>Caenorhabditis elegans</i> embryo | 5. 発行年 2021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） 10.1101/2021.09.14.460385 | 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 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 鳥澤 高征 |
| 2. 発表標題 Genetic and biochemical perturbations of cytoskeletal dynamics in <i>C. elegans</i> embryos |
| 3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会 2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 鳥澤 高征 |
| 2. 発表標題 細胞骨格と分子モーターによる自己組織化構造 |
| 3. 学会等名 第40回日本動物行動学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takayuki Torisawa, Akatsuki Kimura |
| 2. 発表標題 Spatiotemporal quantification of mitotic accumulation of cytoplasmic dynein I and its regulators at the spindle region |
| 3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takayuki Torisawa, Akatsuki Kimura |
| 2. 発表標題 Quantifying compartmentalized accumulations of cytoplasmic dynein I and its regulators during mitotic division in <i>C. elegans</i> early embryos |
| 3. 学会等名 Dynein 2021 International Workshop (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 鳥澤 高征 |
| 2. 発表標題 微小管によって構成される マクロな構造体の動態と制御 |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演) |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|