

機関番号 : 13901

研究種目 : 若手研究 (A)

研究期間 : 2008~2011

課題番号 : 20687013

研究課題名 (和文)

細胞内における微小管生成機構とその役割の解明

研究課題名 (英文)

Mechanisms and roles of microtubule generation in cells

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

研究成果の概要 (和文) : 微小管は細胞分裂、細胞運動など、さまざまな細胞機能に必須の役割を果たす。我々は、動物培養細胞を用いた実験を通じて、分裂期の微小管を増幅するために必須のタンパク質複合体「オーグミン」を同定した。オーグミンの機能解析により、微小管増幅が染色体の整列、分配のみならず、細胞質分裂の完了に必要なことが明らかになった。さらに、生成した微小管を十分な長さにまで重合するのに必要な新規遺伝子「センティン」を発見した。

研究成果の概要 (英文) : Microtubules are dynamic polymers made from  $\alpha/\beta$ -tubulin dimers, and are crucial for various cellular events such as cell division, motility or organelle transport. Since the discovery of  $\gamma$ -tubulin, attention has been focused upon its role as a microtubule nucleator at the centrosome. However, recent observations revealed that spindle microtubules can also be generated by non-centrosomal pathways. A prior RNAi screen in *Drosophila* S2 cells identified 8 novel genes (Dgt2-9) that are required for localizing  $\gamma$ -tubulin to spindle microtubules. We showed that the Dgt proteins interact, forming a stable complex, which we named “augmin”. Reduced spindle microtubule generation after augmin RNAi, particularly in the absence of functional centrosomes, has dramatic consequence on mitotic spindle formation and function, causing reduced kinetochore-fiber formation, chromosome misalignment, and spindle bipolarity defects. We also identified the human augmin complex of 8 subunits and showed that it interacts with the  $\gamma$ -tubulin ring complex ( $\gamma$ -TuRC). A link between augmin and  $\gamma$ -TuRC is likely critical for these functions, since mutants of augmin or  $\gamma$ -TuRC that attenuate their interaction did not restore function *in vivo*. Our results suggested that  $\gamma$ -tubulin’s most important mitotic function may lie within the spindle, where augmin and  $\gamma$ -tubulin function cooperatively to amplify the number of microtubules. In human cells, we also showed that augmin-dependent *de novo* microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase is important for central spindle formation. Generation of interchromosomal microtubules and subsequent formation of the central spindle occurred independently of pre-anaphase microtubules or centrosomal microtubule nucleation. Based upon these results, a new model for central spindle assembly was proposed. Finally, we identified a novel protein “Sentin” that is localized at the growing end of microtubules via binding to EB1 protein. Sentin depletion in *Drosophila* S2 cells, similar to EB1 depletion, resulted in the increase in microtubule pausing and led to the formation of shorter spindles, without displacing EB1 from growing microtubules. We demonstrated that Sentin’s association with EB1 is critical for its plus-end localisation and function; furthermore, the EB1 phenotype was rescued by expressing an EBN-Sentin fusion protein in which the C-terminal cargo-binding region of EB1 was replaced with Sentin. These results indicated that EB1 promotes dynamic microtubule behavior by recruiting the cargo protein Sentin to the microtubule tip.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：細胞、組織

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む高等動物細胞においては、一般に微小管は主に中心体より生成される。一方で近年、中心体非依存的に、既存の微小管に依存して新たな微小管が生成されることが酵母、植物、動物細胞で報告された。この場合、微小管生成の核となる因子「 $\gamma$ チューブリン」複合体が既存の微小管上に局在し、ここで新たな微小管を生成する核として働くというモデルが立てられていた。この機構の動物細胞分裂での重要性は示唆されたが、詳細は明らかではなかった。また、 $\gamma$ チューブリンを微小管上に局在化させる分子メカニズムは何ら明らかにされていなかった。我々は、ショウジョウバエ培養細胞を用いて全ゲノムRNAiスクリーニングを行い、分裂期スピンドルの形態異常を引き起こす遺伝子を網羅的に205同定した (Goshima et al. 2007)。その中で、 $\gamma$ チューブリンのスピンドルへの局在化に異常を引き起こす8つの新規遺伝子「Dgt2-Dgt9」を発見した。Dgt 遺伝子の1つには明確なヒトホモログが存在した。Dgt 遺伝子の網羅的機能解析を通じて、微小管依存的微小管生成機構の分子メカニズム、さらにその細胞あるいは個体内での役割を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

微小管はチューブリンの重合により生まれ

る重合体であり、細胞分裂、細胞内輸送、細胞極性化、細胞運動など、さまざまな細胞機能に必須の役割を果たす。最近、動物細胞分裂期のスピンドル微小管が生まれるのに3つの異なる経路 - 中心体、染色体、および微小管依存性のもの - が存在することを明らかになった。しかしながらいずれの経路も分子レベルの理解には至っていない。特に「微小管依存性微小管生成機構」に関わるDgt2-Dgt9 遺伝子は最近、我々が発見し、命名した。そこで、高解像度イメージング、機能アッセイおよび生化学的解析をもとに、Dgt の分子機能および生体における役割の理解を目指した。これらの研究により、細胞内でいかにして微小管が生成されるのかという細胞生物学上の根本的な疑問の解明に貢献できるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

本研究で用いた細胞生物学的、生化学的方法を列挙する。

- ・ ショウジョウバエ S2 培養細胞を用いた RNAi、免疫染色、スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いた生細胞イメージング、免疫沈降
- ・ ヒト HeLa 培養細胞を用いた RNAi、免疫染色、生細胞イメージング、免疫沈降
- ・ 大腸菌、バキュロウイルス感染昆虫細胞におけるタンパク質発現とアフィニティー

精製

- ・ 免疫沈降物同定のための質量分析法 (LC/MS/MS)
- ・ 全反射顕微鏡を用いた in vitro 微小管重合アッセイ

#### 4. 研究成果

高解像度イメージング、機能アッセイをもとに、Dgt 遺伝子の生体における役割の理解を目指した。まず、Dgt2-9 タンパク質が安定した複合体（「オーグミン」と命名した）として分裂期の微小管増幅、染色体整列などに必須の役割を果たしていることを見出した。また、ヒト Dgt6 遺伝子を同定し、ヒト培養細胞において同様の機能を果たしていることを明らかにした (Goshima et al. 2008)。次に、ヒト Dgt 遺伝子の生化学的同定、機能解析をさらに進め、8つの Dgt タンパク質により構成されるヒトのオーグミン複合体の同定にも成功した。また、ヒトのオーグミンが分裂期に、 $\gamma$  チューブリン複合体と相互作用するという知見も得られた。これらの結果に基づき我々は、オーグミンと  $\gamma$  チューブリンが協調して分裂期微小管の増幅を担うというモデルを提唱した (Uehara et al. 2009)。

我々はまた、ヒト培養細胞においては、オーグミンを欠損させると細胞質分裂に顕著な異常が出ることを見つけた。そこで、この細胞質分裂異常の原因を調べるべく、細胞生物学的研究を展開した。微小管脱重合・再重合アッセイ、微小管先端のライブイメージング実験および定量的解析により、我々は、1) オーグミン複合体およびハープと呼ばれるタンパク質が、分裂後期に分配途上の染色体近傍で新たに微小管を生み出すのに必要であること、2) この後期に新たに生まれた微小管が中央スピンドルと呼ばれる構造体の構築に重要な貢献を果たすこと、3) 一方、中心体微小管の寄与は限定的であること、を

見出した。従来、中央スピンドルの構築過程において、染色体近傍で新たに微小管が生成されるということはほとんど想定されておらず、我々の発見は、細胞分裂後期の重要イベントに新たな知見をもたらした (Uehara and Goshima, 2010)。以上のように、オーグミンの機能解析を通じて、細胞内でいかにして微小管が生成されるのかという細胞生物学上の根本的な疑問の解明に貢献できたと考える。

次に我々は、生成した微小管を十分な長さにまで重合するのに必要な新規遺伝子に着目して研究を進めた。ショウジョウバエの培養細胞でこの遺伝子産物の細胞内局在を調べたところ、細胞周期を通じて、伸長する微小管の先端（プラス端）に局在していた（この因子を「センチン」と命名した）。センチンをノックダウンすると微小管のプラス端ダイナミクスは劇的に抑制された。細胞内での免疫沈降実験や精製タンパク質を用いた試験管内結合実験により、センチンが微小管の先端重合・脱重合のマスターレギュレーターである EB1 タンパク質と直接相互作用することを見出し、また、この結合がセンチンの機能に重要であることをキメラ遺伝子を用いた実験で明らかにした。EB1 はこれまで、微小管ダイナミクス制御の中心プレイヤーであることがわかっていたが、EB1 自体に強い微小管重合・脱重合活性は見出されておらず、実際にどのようなメカニズムで微小管の制御をしているかは不明であった。我々の研究結果は、EB1 がセンチンというこれまで未発見だったタンパク質を微小管先端にリクルートすることで微小管の制御を行っていることを示している。これらの結果から、微小管ダイナミクスの制御機構について新しい知見をもたらしたと考えている (Li et al. 論文印刷中)。

## 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9件)

- ① Goshima G, Mayer M, Zhang N, Stuurman, Vale RD, Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle, *J Cell Biol*, 査読有り, 5;181(3), 2008, 421-429
- ② Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, Wong JS, Vale RD, Walter P, Farese Jr RV, Functional genomic screen reveals genes involved in lipid droplet formation and utilization, *Nature*, 査読有り, 9;453(7195), 2008, 657-661
- ③ Uehara R, Nozawa R, Tomioka A, Petry S, Vale RD, Obuse C, Goshima G, The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有り, in press
- ④ Goshima G Kimura A, New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle, *Curr Opin Cell Biol*, 査読有り, 22(1), 2010, 44-49
- ⑤ R Uehara, R Nozawa, A Tomioka, S Petry, RD Vale, C Obuse, Goshima G, The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有り, 106 (17), 2009, 6998-7003
- ⑥ Uehara R, Goshima G, Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase, *J Cell Biol*, 査読有り, 191, 2010, 259-267
- ⑦ Goshima G, Scholley JM, Control of mitotic spindle length *Annu Rev Cell Dev Biol*, 査読有り, 26 巻, 2010, 21-57
- ⑧ Uehara R, Goshima G, Mabuchi I, Vale RD, Spudich JA, Griffis ER, Determinants of myosin II cortical localization during cytokinesis, *Curr Biol*, 査読有り, 20, 2010, 1080-1085
- ⑨ Li W, Watanabe T, Miki T, Kakeno M, Sugiyama I, Kaibuchi K, Goshima G, EB1 promotes microtubule dynamics by recruiting Sentin in *Drosophila* cells, *J Cell Biol*, 査読有り, 2011, 印刷中

[学会発表] (計12件)

- ① 第60回日本細胞生物学会, 2008, 横浜
- ② 第80回日本遺伝学会, 2008, 名古屋
- ③ 第79回日本動物学会, 2008, 福岡
- ④ 第2回国際「生体ナノシステムの制御」国際シンポジウム, 2008, 東京
- ⑤ 米国細胞生物学会, 2008, サンフランシスコ
- ⑥ The Ninth NIBB-EMBL Symposium, 2009, 愛知 (岡崎)
- ⑦ 2009 FASEB Summer Research Conference, 2009, イタリア (ルッカ)
- ⑧ 生化学若い研究者の会, 2009, 京都
- ⑨ THE AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY 49<sup>th</sup> Annual Meeting, 2009, アメリカ
- ⑩ 20<sup>th</sup> Hot Spring Harbor Symposium, 2010, 福岡
- ⑪ EMBO conference: Microtubules-structure, function, 2010, ドイツ (ハイデルベルグ)
- ⑫ 第62回日本細胞生物学会, 2010, 大阪

[図書] (計4件)

- ① Monica Bettencourt-Dias And Gohta Goshima, Humana Press, *Mitosis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 545 Chapter3: RNAi in *Drosophila* S2 Cells as a Tool for Studying Cell Cycle Progression, 2009, 39-62
- ② 五島剛太, 他, 共立出版, 蛋白質核酸酵素 11月号 Vol. 54 No. 14, 2009, 1850-5
- ③ Goshima G, *Methods in Cell Biology*, Elsevier, *Microtubules in vivo: Chapter 15 "Assessment of mitotic spindle phenotypes in Drosophila S2 cells."*, 2010, 17
- ④ 五島剛太, 他, 細胞工学 (学研メディカル秀潤社), 分裂期スピンドル形成における微小管生成機構, 2010, 5

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~tenure2/goshima.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五島 剛太 (GOSHIMA GOHTA)  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：20447840

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：