

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770164

研究課題名 (和文) 核-細胞質間輸送を介した微小管制御機構の解明

研究課題名 (英文) Regulatory role of nucleo-cytoplasmic transport in microtubule network organization

研究代表者

荒井 律子 (ARAI RITSUKO)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：10342742

研究成果の概要 (和文)：分裂酵母では、多くの真核生物の場合と同様に、細胞周期の切り替わりに応じた大規模な微小管構造変化が生じることが知られている。しかしながら、この微小管制御メカニズムの全貌は未だ明らかにされていない。本研究では、分裂酵母細胞において、紡錘体形成に関わる微小管結合タンパク質およびチューブリンが、細胞周期の切り替わりに応じて核内外の適切な方向へと分配されるように調節されており、間期にはチューブリンの核外輸送および核外表面に点在する‘間期細胞質微小管形成中心’の機能が協調して働くことにより、細胞質微小管の重合伸長が効率的に行われ、分裂期にはチューブリンの核内蓄積および活性化された中心体の存在によって紡錘体形成が促進されるというモデルを提唱した。

研究成果の概要 (英文)：In fission yeast cells as well as almost all eukaryotic cells, dynamic rearrangement of microtubule structure occurs at the cell cycle transition. I proposed that nucleo-cytoplasmic transport plays a central role in spatio-temporally regulated microtubule network organization. In this model, tubulin and tubulin-associated proteins are actively exported toward outside of the nucleus during interphase, and cytoplasmic microtubule formation is promoted by ‘interphase microtubule organizing center’, while they imported into the nucleus and mitotic spindle formation is promoted by mitotically activated spindle pole bodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：微小管、核-細胞質間輸送、レプトマイシンB、Crm1、importin

## 1. 研究開始当初の背景

(1) チューブリンの重合・脱重合を通して構築される微小管は、細胞の状態や環境にตอบสนองして構造を変えることにより、細胞内における機能的役割も変化させている。例えば、細胞分裂周期の間期には、細胞質微小管が形成されて、細胞形態、細胞極性、細胞内膜輸送などを維持するが、分裂期に入ると脱重合した後、再重合して染色体を分配するための紡錘体を構築する。このような時間的空間的に制御された動的な微小管構造変化のメカニズムの全貌を明らかにしようとする研究は古くから行われているが、未だ不明な点が多く残されている。

(2) 分裂酵母では、間期には核外表面に点状の複数の iMTOCs (interphase microtubule organization centers: 間期微小管形成中心) および動物細胞の中心体に相当する SPB (spindle pole body) を基部とした数本の細胞質微小管の伸縮が繰り返されている。そして分裂期が開始すると細胞質微小管が消失すると共に、成熟した分裂期 SPB を両極にもつ紡錘体が形成される。様々な生物種において細胞質微小管および紡錘体の形成に必要なタンパク質や、微小管の重合・脱重合あるいは安定化・不安定化に関与するタンパク質は多数報告されているが、なぜ分裂期に突入すると細胞質微小管が消失し、替わって紡錘体形成が進行するのかという疑問に答える研究はほとんど成されていない。

(3) 過去の研究において、タンパク質核外輸送担体 Crm1 の阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) の作用により、間期であるにも関わらず細胞質微小管が消失し、核内に異常な微小管束が形成されるという意外な現象を見出していた。

## 2. 研究の目的

(1) タンパク質核外輸送の阻害により、異常な核内微小管構造が形成されるという過去の発見から、分裂酵母のように分裂期に核膜が崩壊せず、核内に紡錘体が形成されるような closed mitosis を行う生物では、間期の間は細胞質での微小管重合を促進するために Crm1 による核外輸送が積極的に行われるが、分裂期に入るとチューブリンの核内移行が優先して行われるように調節されているという仮説を立てた。このような研究経緯および独創的な着想に基づき、本研究では、核-細胞質間輸送の重要性という新たな側面から、微小管制御メカニズムを解明することを目指す。

(2) 一方、核-細胞質間輸送を介した微小管制御が closed mitosis を行う生物種のみ

特殊化して存在するものではないと発想することも重要である。近年、動物細胞において、分裂期になると Crm1 がキネトコア形成因子として機能する可能性や、アフリカツメガエル卵抽出液中で核輸送担体 importin- $\alpha$ ,  $-\beta$  が、紡錘体形成因子を紡錘体構築現場へとターゲティングさせていることが報告されている。本研究では、分裂酵母の生細胞系を用いたシンプルな解析を通して、真核細胞における微小管制御機構の普遍性についても探求する。

(3) いくつかの微小管結合タンパク質 (MAPs: microtubule-associated proteins) および核-細胞質間輸送関連因子に着目し、それらの細胞分裂周期に伴う局在あるいは機能の変化と微小管構造変化との関係について、細胞生物学的に明らかにすることを具体的な目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 微小管は、チューブリンの重合・脱重合を伴った動的な構造体であり、細胞周期の進行や LMB 処理後の時間経過によって微小管ネットワーク全体に大規模な変動がもたらされることから、本計画では、生細胞内ダイナミクスを検証しようとする研究には欠くことのできない三次元蛍光顕微鏡システムを主要な解析手段として活用する。

(2) 微小管 (チューブリン)、核膜、SPB、MAPs を、CFP、GFP、RFP 等の蛍光タンパク質と融合させたものを分裂酵母細胞内において発現させることによって、それらの局在を可視化し、詳細なライブイメージング解析を進める。また、MAPs および核-細胞質間輸送関連タンパク質の遺伝子破壊を行い、微小管制御における構成的役割について解析する。

(3) 通常の細胞周期および LMB 処理後における微小管構造変化の時空間的特徴について明確に示し、両者の比較を行う。またこの時、細胞質微小管および紡錘体のそれぞれの形成過程に関与することが知られているいくつかの MAPs が、核-細胞質間輸送を介した微小管構造変化において、どのような挙動を示すかということについて観察する。

(4) チューブリンおよび MAPs の核輸送に関与する因子の探索を行い、Crm1 および同定された核輸送因子の働きが微小管構造変化に与える影響について解析する。

(5) 以上のようにして、細胞周期特異的に、細胞質および核内という異なる空間を区別しながら機能的な微小管構造が正確に構築されるメカニズムについて段階的に検証す

る。

#### 4. 研究成果

(1) LMB 処理により、間期の細胞の細胞質微小管が徐々に消失するとともに、間期 SPB を起点とした核内微小管が形成された。最終的に、間期の細胞質微小管は、ほぼ完全に消失した状態に陥り、核内微小管は、核膜を引き伸ばしながら伸長し続けることが分かった。さらに、分裂期紡錘体の構造と機能は LMB の影響を受けないが、有糸分裂終了後の細胞質微小管の再生は、LMB によって阻害されることが明らかとなった。(図 1 および 2)

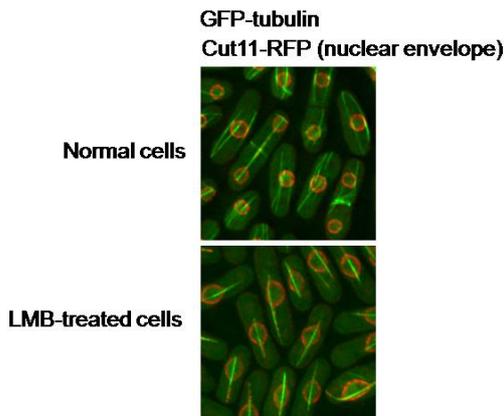


図 1 LMB 処理による細胞質微小管の消失と核内微小管の形成

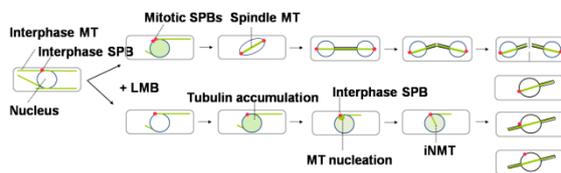


図 2 LMB 処理による微小管構造変化  
MT; 微小管 iNMT; 核内微小管

(2) 分裂期紡錘体における特徴的な構成として、キネトコア-微小管結合の確立および SPB の両極配置が挙げられる。このような構築の有無について比較解析を行った結果、LMB 処理後に形成される核内微小管は、秩序だった分裂期紡錘体構造とは異なることが分かった。

(3) 氷冷温処理による微小管の脱重合および温度上昇による微小管の再重合を利用した観察を行った結果、LMB 処理後の細胞では、チューブリンが核内に蓄積しており、核内において再重合し、微小管が伸長していることが確かめられた。一方、LMB 処理を施していない細胞では、温度上昇処理によって、速やかに核外表面での微小管の再重合が生じていることが明らかとなった。

(4) 間期の細胞質微小管特異的な MAPs は、LMB 処理後に形成される核内微小管構造上に局在化せず、細胞質に取り残されることが分かった。一方、間期の細胞質微小管および分裂期の紡錘体の両者の形成と機能に関わる MAPs は、LMB 処理後に形成される核内微小管構造上に局在化することを明らかにした (図 3)。

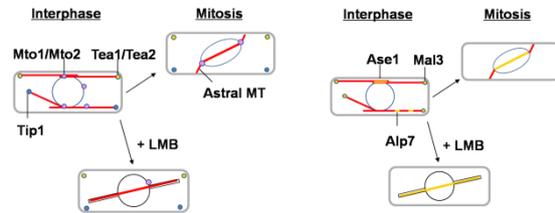


図 3 LMB 処理による MAPs の局在変化 MT; 微小管

(5) 間期の細胞質微小管特異的な MAPs のうち、iMTOCs を構成するタンパク質を欠損すると、LMB 処理後の核内微小管形成が非常に速やかに進行することが分かった。

(6) (1) ~ (5) の事実から、間期および核分裂終了後の分裂酵母細胞では、チューブリンおよび MAPs が核外に排出され、同時に核外表面の iMTOCs にチューブリンが速やかに捉えられることによって細胞質微小管の形成が効率的に促進されていると考えられた。一方、分裂期にはチューブリンおよび紡錘体形成に関わる MAPs が核内に移行する制御が働くことにより、分裂期の SPB 活性化に伴う紡錘体形成が進行する可能性が示された。

(7) 分裂期突入に伴い、すべての Crm1 依存的な核外輸送が停止するのかどうかを調べるために、GST-NES-GFP 発現株を用いた解析を行った。その結果、LMB 処理後の細胞では、通常の分裂期では、同流入が認められなかった。このことから、分裂期に一斉に核外輸送が停止することによってチューブリンや MAPs が核内に移行するのではなく、選択的なそれらの核内移行あるいは核外輸送の停止が生じていることが分かった。

(8) チューブリンおよび MAPs の核内移行に関わる因子を探索した結果、タンパク質の核内輸送担体である importin-alpha を欠損した分裂酵母細胞では、LMB 処理後の核内微小管形成効率が著しく低下することを見出した。また、この欠損によって、紡錘体の形成と崩壊のサイクルの効率が低下していることが示唆された。このことから、チューブリンおよび MAPs の核内移行の制御が実際に存在することが明らかとなり、分裂期紡錘体形成の際には、この機構が働いている可能性が

示された。

(9) 以上の結果を統合して、closed mitosis を行う分裂酵母細胞の微小管ネットワーク形成機構において、核-細胞質間輸送が中心的な役割を果たしているというモデルを提唱した (図 4)。

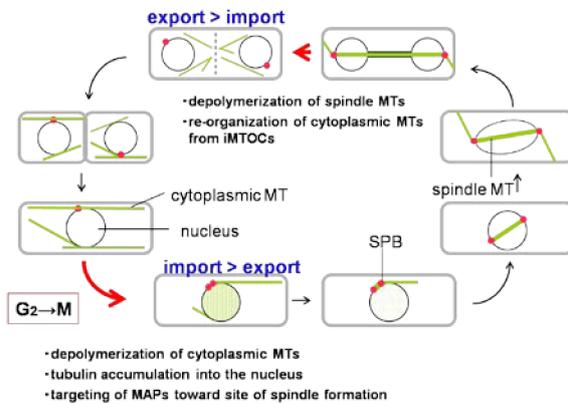


図 4 核-細胞質間輸送による微小管制御機構: モデル図  
MT: 微小管

(10) 分裂酵母は、高等真核細胞の特徴を多く有していることが知られていることから、有用なモデル生物として数々の研究に用いられている。本研究によって提唱されたモデルは、closed mitosis を行う生物種で見られる特殊化された微小管制御機構であると考えられる一方で、多くの真核細胞の微小管制御機構における根源的なところ、あるいは部分的なところにおいて利用されているのではないかと予想できる。近年、closed mitosis と open mitosis の中間的な有糸分裂の形態をとる生物種の存在が報告されていることから、核-細胞質間輸送関連因子を介した微小管制御メカニズムにおける普遍性や、進化による多様性について、深く洞察しうる成果を本研究から得ることができた。

## 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 3 件)

① Arai S., Kawarai T., Arai R., Yoshida M., Furukawa S., Ogihara H. and Yamasaki M. Cell-cycle independent chromosome condensation in *Schizosaccharomyces pombe* induced by high hydrostatic pressure treatment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有り, 73(9), 1956-1961, 2009

② Shirai A., Matsuyama A., Yashiroda Y., Hashimoto A., Kawamura Y., Arai R.,

Komatsu Y., Horinouchi S. and Yoshida M. Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有り, 283(16), 10745-10752, 2008

③ Arai S., Kawarai T., Arai R., Yoshida M., Furukawa S., Ogihara H. and Yamasaki M. Cessation of cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe* during growth after release from high hydrostatic pressure treatment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有り, 72 (1), 88-93, 2008

[学会発表] (計 5 件)

① 荒井律子、鎌田綾子、佐藤政充、登田隆、吉田稔: 分裂酵母の微小管ネットワーク形成機構における核-細胞質間輸送の役割. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (神戸、2008. 12)

② 荒井律子、吉田稔: 分裂酵母ローカリゾームを用いた化合物スクリーニング: レプトマイシン B が細胞機能およびタンパク質局在に与える影響. 第 1 回理研ケミカルバイオリジー研究領域国際シンポジウム (熱海、2008. 9)

③ 荒井律子、鎌田綾子、佐藤政充、登田隆、吉田稔: 核-細胞質間輸送を介した微小管ネットワーク制御機構. 第 41 回酵母遺伝学フォーラム (札幌、2008. 9)

④ Arai R., Matsuyama A., Yashiroda Y., Kamata A., Horinouchi S. and Yoshida M. Chemical genetic approach using *S. pombe* localizome: effects of Leptomycin B on protein localization and cellular function. The 4<sup>th</sup> Korea-Japan Chemical Biology Symposium (Nikko, 2008. 5)

⑤ 荒井律子、松山晃久、八代田陽子、吉田稔: 分裂酵母ローカリゾームを用いた化合物スクリーニング. 第 4 回ケミカルバイオリジーシンポジウム (熱海、2008. 2)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 律子 (ARAI RITSUKO)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号: 10342742