

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23612006

研究課題名(和文)染色体分配を司る有糸分裂後期紡錘体の伸長メカニズム：紡錘体の発生力の定量的解析

研究課題名(英文) Mechanisms of spindle elongation controlling the chromosome segregation during anaphase: quantitative measurement of forces generated by the mitotic spindle

研究代表者

板橋 岳志 (Itabashi, Takeshi)

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：20434384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂の際、娘細胞へと染色体を分配する過程は、適当な大きさや形状を持つ両極性紡錘体によって行われる。本研究では、定量的な力測定法を用いて、紡錘体伸長機構の基盤をなすメカニズムの解明を試みた。主な成果を以下に記す：(1)染色体を輸送するモータータンパク質の運動を紡錘体内でリアルタイム観察する実験系を構築した。(2)紡錘体の大きさを決めるパラメータが分かった。(3)紡錘体の極間軸方向の力学特性を明らかにした。(4)分裂後期細胞が発生する力の定量化に成功した。

研究成果の概要(英文)：The process of partitioning chromosomes into daughter cells during cell division is mediated by a bipolar spindle of proper size and shape. We planned to investigate the underlying mechanisms of spindle elongation machinery by quantitative force measurements. The main results of this project are summarized as follows: (1) We developed the technique for real-time observation to analyze dynamics of chromokinesin within meiotic spindle. (2) Using micromanipulation technique, we found the parameters controlling the size of vertebrate meiotic spindle. (3) We revealed the micromechanics of meiotic spindle along the pole-to-pole axis. (4) We succeeded in quantitatively measuring forces generated by anaphase cells.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：細胞骨格 紡錘体 染色体分配

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報を集約する染色体は、細胞分裂のたびに娘細胞へと正確に受け継がれる。秩序だった細胞分裂を遂行する上で、染色体を正確に均等に分配させるタンパク質集合体が、染色体分配装置“紡錘体”である。近年の遺伝子操作技術や細胞生物学的手法の発展により、紡錘体の形成に重要なタンパク質が数多く報告され、染色体分配や紡錘体形成のメカニズムの本質的な部分は急速に明らかにされつつある (Goshima et al., *Science*, 2007)。しかしながら、紡錘体が発生する力に関する定量的な先行研究は乏しい。唯一あげられるのは、微小ガラス針を使って、昆虫細胞内の単一染色体を顕微操作し、染色体が中心体へと牽引される力を測定した Nicklas の研究である (*J. Cell Biol.*, 1983)。

これまで紡錘体の動態についての研究は、分子生物学的または細胞生物学的に盛んに研究されてきた。酵母やヒト培養細胞における遺伝学的機能阻害実験によって、力発生するモータータンパク質群や微小管の動的機能は、巨視的に解明されてきた。一方、一分子解析法など生物物理学的に、それらモータータンパク質群の微視的な分子特性が明らかにされてきた。このように、紡錘体のメカニクスについて、その間をつなぎ合わせるメゾスコピックな観点から紡錘体の発生する力にアプローチする研究の重要性が示唆されていた。しかし、実際どの程度の力を紡錘体が発生しているのか? というような本質に立ち入った力制御の研究は行われていなかった。

これまで、研究代表者は、MEMS 力センサーを用いて定量的顕微操作及び力測定を可能とする実験系を構築し、試験管内で形成させた紡錘体を直接顕微操作することによって、紡錘体の力学特性及び外部負荷に対する応答性を明らかにしてきた (Itabashi et al., *Nat. Methods*, 2009)。このシステムを有糸分裂中期の培養細胞に導入することで、外部刺激によって、染色体分配開始のタイミングを加速・減速させることが可能であることを発見した (Itabashi et al., *PNAS*, 2012)。このような研究状況を踏まえ、これまでの生体運動系の研究で培ってきた力計測・分子操作法を活用し、染色体を娘細胞へ正確に分配させる過程 (染色体整列～細胞質分裂) における“染色体分配装置と分裂期細胞が発生する力”の役割の解明に迫ることを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、染色体分配機構における“紡錘体が発生する力”や“分裂期細胞が発生する力”を、生物物理学的手法を加味することによって定量化し、時間的・空間的に解析する。これにより、一分子解析法など生物物理学的に明らかにされた微視的な分子の特徴と、分子細胞生物学的に明らかにされた巨視

的な分子振る舞いを本研究によってつなぎ合わせ、染色体分配機構における“物理的な力”の働きを明らかにし、本研究完了時に、“力”の役割を反映した独創的な染色体分配制御モデルを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

アフリカツメガエル卵抽出液 (Desai et al., *Methods Cell Biol.*, 1999) 中に、*in vitro* 紡錘体を形成させ、微小ガラス針を用いて顕微操作及び力測定を行う。アフリカツメガエル卵抽出液系を用いた研究は、(a) 高等生物の紡錘体一般の性質を持ち合わせている、(b) 細胞膜がないため、阻害剤やタンパク質の添加除去、ガラス針を用いて紡錘体を直接的に顕微操作可能である、(c) 細胞周期の進行 (分裂中期から後期への移行) が、 Ca^{2+} の添加のみによって外部から任意にコントロールできる、などの有用な特徴を持ち合わせている。

また、細胞分裂期の哺乳動物培養細胞を対象に、MEMS 力センサーを用いた力制御解析システム (Itabashi et al., *Nat. Methods*, 2009) による顕微操作及び力測定を行う。蛍光タンパク質 (GFP 等) とのキメラタンパク質として、主に、細胞骨格 (微小管、アクチン線維)、染色体や中心体の構成タンパク質類を恒常的に発現させた癌細胞 (HeLa 細胞) 及び正常細胞 (RPE1 細胞) を用いる。

4. 研究成果

(1) 紡錘体形成や染色体分配に寄与するモータータンパク質 (キネシン、細胞質ダイニン) は、数多く報告されている。それらは、一分子実験を中心に、*in vitro* で運動特性が調べられてきた。しかしながら、どのように、それらモータータンパク質が紡錘体内で配向した微小管上を運動しているのかは、未だ不明な点が多い。そこで、染色体を赤道面 (紡錘体中央) へと輸送するモータータンパク質 (クロモキネシン Xkid) に着目した。Xkid は、染色体整列を担っているプラス端指向性のキネシンである。GFP タグ付き Xkid タンパク質は、鋳型となる mRNA を *in vitro* で作製し、ツメガエル卵抽出液に添加することで発現させた。抗 GFP 抗体を結合させた量子ドットと共に、形成させた紡錘体を含む卵抽出液に添加したところ、Xkid の運動を蛍光顕微鏡下で直接観察することに成功した。その結果、Xkid が最大 4 分子結合した量子ドット (Qdot) は、疑似染色体のように運動することが分かった (図 1) : 紡錘体内の微小管上を、乗り換えながら長い距離 (平均 5 μm 、最大 17 μm) を運動し、赤道面付近に集積する。また、Xkid の運動方向は、紡錘体中の微小管の方向性分布を反映していることが示唆された。つまり、染色体に結合し輸送する Xkid と、その染色体輸送に最適化されている紡錘体内の微小

管配向によって、染色体整列は正確かつ効率的に遂行されていることが、分子レベルで明らかになった (Takagi et al., *Sci. Rep.*, 2013)。

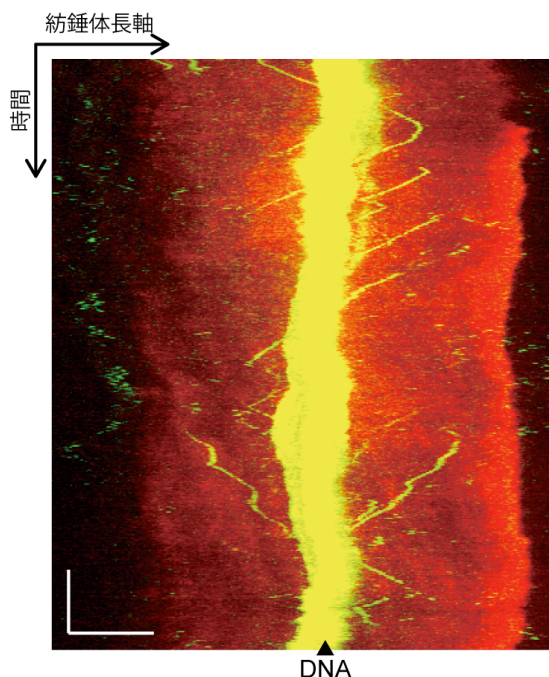


図1. 紡錘体内の微小管(赤)上を運動するXkid-Qdot(黄)。横軸、縦軸のスケールバーは、それぞれ10 μm 、100秒。

(2) 紡錘体内の微小管量、その密度や配向方向は、紡錘体の機能発現のために最適化されていると予測される。そのような紡錘体の力学特性は、上述(1)の染色体整列のみならず、その後の染色体分配過程においても重要であると考えられる。分裂中期において、紡錘体は一定の形状と大きさを維持していることが知られている。しかしながら、微小管量と、紡錘体の形状や大きさにどのような関係があるのかという基本的な制御メカニズムは明らかとなっていなかった。そこで、共焦点顕微鏡を用いた三次元観察法と、微小ガラス針を用いた顕微操作手法(紡錘体の切断と融合)を併用し、微小管と、紡錘体の形状と大きさの関係を定量的に測定した。

卵抽出液中で形成させた分裂中期の紡錘体は、紡錘体の大きさによらず同じ形、微小管密度をしており、紡錘体の大きさは構成する微小管量と相関があることが分かった。そして、形や微小管密度などの定義から、これらのパラメータ同士の関係を示す1つの関係式を導出した。この関係式では、紡錘体の大きさは、微小管量と、大きさに依存しないパラメータ(紡錘体の形、微小管密度)で表される。

この関係式の確からしさを評価するため、顕微操作によって紡錘体を2つの断片に切断する(=微小管量を半減させる)と、切り離された各断片は、5分以内に元の形、微小管

密度になった。これは、紡錘体の形と微小管密度は、確かに紡錘体の大きさに依存しないことを示している。また、各断片中の微小管量は、切断前の紡錘体の微小管量の半分以下となり、各断片の大きさも小さくなった。この結果は、関係式が示す通り、紡錘体の大きさと微小管量は相関することを示している。さらに、2つの紡錘体断片を融合させた場合(=微小管量を倍加させる)においても、この関係式は保持されることも分かった。つまり、これらの結果は、紡錘体周りの力学的、生化学的環境変化に対して、紡錘体は、その形や微小管密度をダイナミックに維持し、大きさと微小管量を相関させることによって適応する機構を備えていることが示唆された (Takagi et al., *Cell Rep.*, 2013)。

(3) 紡錘体内では、モータータンパク質の発生する外向きの力とそれに拮抗する張力が、中心体を介してバランスされることによって、紡錘体の形状と大きさは安定に保たれていると示唆されている。加えて、細胞環境を考えてみると、周りの細胞などからの外力や、細胞膜と連結する極微小管を介した圧縮力や引っ張り力が、中心体に加わっていると考えられ、紡錘体の大きさや形状は、メカノケミカルにコントロールされていると捉えることができる。細胞内で紡錘体は、このような中心体にかかる様々な力に対して、いかに安定なのか、ということは、染色体分配機構を理解する上で重要なポイントである。これまでに、極間軸方向への圧縮力に対する紡錘体の応答性については明らかにしている (Itabashi et al., *Nat. Methods*, 2009)。そこで、染色体を分配する方向へ、つまり中心体に引っ張り力が働く条件において、どのように紡錘体が応答するのか、を明らかにすることを目的とした。

2本の微小ガラス針を紡錘体に挿入し、一方の針を極間軸方向へ動かすことで、紡錘体を伸長させた。この時、一瞬の引っ張り力に対しては、5分以内に元の形状と大きさを取り戻した。一方、引っ張り力を持続させた時、数分後、定常状態に達した紡錘体は、元の形状(長さとの比)に戻らなかった。そこで上述(2)で用いた三次元的観察を行い、紡錘体の体積と微小管量を定量的に測定した。微小管量は、引っ張り直後も、定常状態においてもほぼ一定であった。一方で、紡錘体の体積は、引っ張り直後に減少し、数分後に元に戻ることが分かった。これは、長さや幅は元の値と異なるが、大きさを表す体積は回復していることを示している。また、微小管密度は引っ張り直後に増加し、数分後に回復していた。これらの結果は、分裂期細胞内において、細胞膜から中心体にかかる引っ張り力に対し、紡錘体は形状を柔軟に変化させ、微小管量と微小管密度を一定に保つことによって、安定な大きさ(体積)を動的に維持して

いと考えられる (Takagi et al., *Biophys. J.*, 2014)。

(4)染色体分配が開始されると、姉妹染色分体が両極の中心体へと牽引された後、主にモータータンパク質であるキネシンの発生する押し出し力に加え、細胞膜に局在する細胞質ダイニンが微小管をたぐり寄せる力によって、後期紡錘体は両極に伸長していく(中心体間距離が増加する)。そこで、有糸分裂後期に紡錘体が発生する力の測定を試みた。有糸分裂中期の癌細胞(HeLa細胞)の紡錘体の極間方向に、板状の力計測用MEMS力センサーと細胞保持用MEMSカンチレバーを配置させた。染色体分配を開始した後、紡錘体の伸長に同期した細胞の伸長変形に伴った発生力の測定に成功した(図2)。計測された力(細胞伸長力)の大きさは、正常細胞(RPE1)と同程度であった。この時、分裂期細胞が伸長すればするほど、紡錘体の極間軸方向へ応力がかかることになる。そこで、染色体分配動態、紡錘体伸長動態と細胞質分裂動態を詳細に解析してみると、染色体分配動態(牽引スピード等)や紡錘体伸長動態(伸長速度等)には影響がなかった。これらの結果などから、紡錘体の発生する伸長力は、測定された細胞伸長力に、ほとんど寄与していないと考えられた。一方、このようなカンチレバーによる細胞伸長の抑制は、細胞質分裂に伴う分裂溝陥入を減速させていることがわかった。また、細胞質分裂の主役であるミオシンやアクチンなどの細胞骨格動態に対する種々阻害剤存在下において、発生力と細胞分裂動態の関係を定量化した(投稿論文準備中)。

細胞分裂時に働く力は、細胞の運命決定、組織の形態形成など生物の形作りに必須の役割を果たすことが明らかになりつつある。力を直接操作した本研究結果は、卵細胞から組織への階層構造の構築過程における細胞

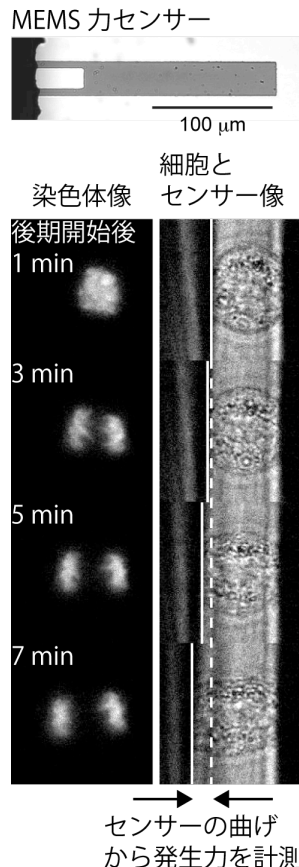


図2. MEMS力センサーを用いた、有糸分裂後期における細胞の発生力測定。

分裂機構の安定性が、細胞内外や細胞間で様々な方向及び幅広い時間スケールで作用する力に対し、どのように維持されるのかについて洞察を与えるものとする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki, Yuta Shimamoto, Tarun M. Kapoor and Shin'ichi Ishiwata. Micromechanics of the vertebrate meiotic spindle examined by stretching along the pole-to-pole axis. *Biophysical Journal* 106(3), 735-740 (2014). 査読有
DOI: 10.1016/j.bpj.2013.12.033
- ② Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki, Tarun M. Kapoor, Yuta Shimamoto and Shin'ichi Ishiwata. Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size. *Cell Reports* 5(1), 44-50 (2013). 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.021
- ③ Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki and Shin'ichi Ishiwata. Chromosome position at the spindle equator is regulated by chromokinesin and a bipolar microtubule array. *Scientific Reports* 3, 2808 (2013). 査読有
DOI: 10.1038/srep02808
- ④ Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Kazuya Suzuki and Shin'ichi Ishiwata. Responses of chromosome segregation machinery to mechanical perturbations. *BIOPHYSICS* 9, 73-78 (2013). 査読有
DOI: 10.2142/biophysics.9.73
- ⑤ 板橋岳志, 石渡信一. 染色体分配装置の構造と機能の力学応答. 実験医学増刊号 31(2), 193-198 (2013). 査読無

[学会発表] (計10件)

- ① Takeshi Itabashi, Jun Takagi and Shin'ichi Ishiwata. Using micromanipulation to analyze control of cell division machinery. International Symposium on the Diversity of Cell Division System in Eukaryotes. 2014年3月25日. 東京.
- ② 板橋岳志, 高木潤, 鈴木和也, 石渡信一. 紡錘体の構造ダイナミクスを探る. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月6日. 神戸.
- ③ 板橋岳志, 石渡信一. 顕微操作によってわかる紡錘体の力学特性. 日本動物学会関東支部第65回大会. 2013年3月16日. 東京.

- ④ 板橋岳志. 紡錘体の力学応答. 第2回分子モーター討論会. 2012年6月7日. 東京.

[その他]

ホームページ等

雑誌論文②についてのプレスリリース

http://www.waseda.jp/jp/news13/131014_i_shiwata.html

雑誌論文③についてのプレスリリース

http://www.waseda.jp/jp/news13/131001_c_hromosome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板橋 岳志 (ITABASHI, Takeshi)

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：2034384

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし