

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291041

研究課題名(和文) 微小管の形成メカニズムと細胞内新機能の発見

研究課題名(英文) Elucidating mechanisms for microtubule formation and new functions of microtubules

研究代表者

佐藤 政充 (Sato, Masamitsu)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：50447356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小管が細胞内で果たす新しい機能の発見とそのメカニズムの解明を目指した。その結果、分裂酵母の減数分裂において、微小管が核内の染色体の配置を転換させるという新機能が明らかになった。重要なことに、この染色体の配置転換は減数分裂の染色体分配が正しく起きるために必須であることがわかった。さらに、細胞内で微小管が形成される分子機構についても明らかにしたところ、Alp7-Alp14タンパク質複合体が微小管の形成に極めて重要な役割を担うことが分かった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to discover new cellular functions of the microtubule cytoskeleton in fission yeast. Our study discovered a new function of microtubules at the beginning of meiosis. The microtubule array interacts with kinetochores of chromosomes, thereby repositioning the arrangement of chromosomes in the nucleus after meiotic recombination. Importantly, the microtubule organization is essential for faithful chromosome segregation in meiosis. We also investigated molecular mechanisms as to how microtubules are organized in yeast cells. We found that the Alp7-Alp14 complex (MAPs) play pivotal roles in microtubule formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 細胞骨格 染色体 細胞分裂 減数分裂

1 . 研究開始当初の背景

微小管は細胞内に存在する「細胞骨格」のひとつであり、時には細胞内の物質輸送のためのレールとして、またあるときには染色体を捕まえて引っ張る系(紡錘系)として働き、細胞の多様な活動に不可欠の役割を担う。これらは高校生物の教科書にも書かれている微小管の有名な機能である。しかしながら、細胞質に敷かれたレールとしての微小管がどのようにして染色体を引っ張る紡錘系へと姿を変えるのか、その形態変化の分子メカニズムは不明のままであった。

微小管はその姿を劇的に変化させて各場面に適した機能を発揮する。このような微小管の性質は 60 種類以上知られる微小管制御因子によって生み出されるが、これらの因子の中で最も重要な因子は何か、これらがどのように連携して作用するのか、あるいは未知の因子は存在しないのか、生命システムとしての微小管の本質には未解明の部分が多く残っていた。

また、細胞には我々のまだ知らない微小管の形態や機能が存在している可能性がある。減数分裂における微小管の動態は未知の部分が多く、解明の必要性があった。

2 . 研究の目的

本研究はこれらの疑問に答えるべく、微小管を形成するために必要十分である究極因子を同定し、それがどのように微小管を作り出すのかを解明する。微小管はどのように形成されるのか、微小管の究極の原点に踏み込むことで、微小管が再編成されるメカニズムを探る。

さらに、我々が発見した減数分裂のみに現れる新規の微小管はどのように働くのか。本研究はこのような微小管の本質に迫ることで、がん・ダウン症候群などの原因をより深く追究する。

また、独自の生細胞観察システムを用いて未知の微小管制御因子や微小管構造を発見することで、微小管の新たな機能を明らかにする。本研究が同定する重要因子を人工的に利用することで、将来は微小管の異常が原因で起きる分裂異常や神経疾患の治療に繋がる。

3 . 研究の方法

本研究は、微小管を形成するための必要十分因子を決定して微小管の形成メカニズムの本質をあぶり出すことを第一の主目的とし、微小管の知られざる構造や動態、機能を発見することを第二の主目的として、以下のように 4 題のプロジェクトを編成して統合的な理解を目指す。

(1) 微小管形成の必要十分条件となる因子「微小管ジェネレーター」の機能解析

我々は既に、微小管結合タンパク質 Alp7-Alp14 複合体(ヒト TACC-TOG 相同物)と Pcp1(ヒト Pericentrin 相同物)の 2 因子が微小管を形成するために必要十分である可能性を見いだしている(Sato and Toda, *Nature* 2007; Fong, Sato and Toda. *EMBO J.* 2010)。以降これらを「微小管ジェネレーター」因子と呼ぶことにする。これらがどのような作用機序でチュープリンの重合を開始するのかを、分裂酵母での遺伝学・細胞生物学実験に加えて無細胞系実験を用いて調べる。

(2) 微小管ジェネレーターを適材適所に配置するメカニズムの解明

さらに我々は別の候補因子として Mto1(ヒト Cdk5Rap2 相同物)の重要性を指摘したい。Pcp1 と Mto1 の機能はよく似ているが、細胞内局在は相異なる。さらに Alp7-Alp14 は細胞周期の時期に応じてその細胞内局在を変化させる。従って、細胞は、Mto1 を含むこれら微小管ジェネレーター因子の細胞内配置をうまくオーガナイズすることで、場面に応じて適材適所に微小管を形成していると予想されるため、本研究ではこれを追究する。

(3) 減数分裂・配偶子形成における新規の微小管構造、知られざる動態を探る

減数分裂は配偶子を形成する特殊な分裂様式であるが、通常の体細胞分裂より微小管動態に関する知見が乏しい。そこで我々が既に導入している 3 色蛍光ライブセル・イメージング法を用いて、知られざる微小管動態を探索する。特に、減数分裂の特徴である減数分裂組換えや 2 連続の細胞分裂を遂行するために、微小管がどのような機能・挙動を示すのかを追究する。

(4) 微小管に異常を示す変異体のフェノーム・スクリーニングとデータマイニング

微小管が様々な機能を発揮するために多くの制御因子が存在する。しかし、現在知られている因子の他に、未知の制御因子が存在する可能性はこれまで積極的に追究されていなかった。そこで分裂酵母にランダム突然変異を導入し、微小管の動態に異常のある変異体を大規模に検索・単離する。得られた 2 千個の変異体を表現型(phenotype)に応じて分類し、フェノーム(phenome)ライブラリを作製する。

4. 研究成果

上記「3. 研究の方法」にて記載の各項目について、研究成果を下記に示す。本項の番号(1)~(4)は上記の番号・内容に連動している。

- (1) 微小管形成の必要十分条件となる因子「微小管ジェネレーター」の機能解析
- (2) 微小管ジェネレーターを適材適所に配置するメカニズムの解明

本2項目は成果内容が互いに連動しているため、まとめて記載する。分裂酵母の遺伝学・細胞生物学実験をおこなった結果、微小管に結合するタンパク質複合体 Alp7-Alp14 と Pcp1, Mto1 が重要な役割を担うことが明らかになった。

まず, Alp7 は分裂期に活性が上昇するサイクリン依存性キナーゼ (CDK; cyclin-dependent kinase) からリン酸化を受け, それにより分裂期に Alp7 の細胞内局在が細胞質から核に変化することが明らかになった。リン酸化を受けないような変異を導入した変異型 Alp7 タンパク質は核への蓄積が低下し, 逆にリン酸化模倣型の変異を導入した Alp7 変異型タンパク質は恒常的に核に蓄積した。すなわち, CDK は Alp7 をリン酸化基質とすることで, Alp7 の核輸送活性を調節し, 分裂期における紡錘体形成を促進することが分かった。

また, *pcp1* 変異体においては Alp7 の紡錘極体 (SPB) への局在が低下していたことから, Alp7 は Pcp1 と相互作用し, その結果紡錘極体に存在して微小管を形成することが分かった。

- (3) 減数分裂・配偶子形成における新規の微小管構造, 知られざる動態を探る

分裂酵母の減数分裂において, 微小管が核内の染色体の配置を転換させるという新機能が明らかになった。重要なことに, この染色体の配置転換は減数分裂の染色体分配が正しく起きるために必須であることがわかった。本件の成果は Nature Cell Biology に掲載された (Kakui et al.)。

- (4) 微小管に異常を示す変異体のフェノーム・スクリーニングとデータマイニング

本研究では微小管に異常を示す変異体を遺伝学的ビジュアル・スクリーニングにより集め, およそ 2,000 株の温度感受性変異体を単離した。これらを表現型ごとにまとめ, phenome ライブラリを作成中である。その過程は PLoS ONE 誌に掲載されている (Hirai et al.)。

これらの研究成果が示すように、本研究は概ね期待通りの成果を挙げることが出来た。微小管の動態は Alp7-Alp14 複合体により制御されること、減数分裂では微小管が未知の機能を発揮して染色体分配の安全性を保障していることなどが分かった。今後は、微小管の動態制御が酵母からヒトなどのほ乳類に至るまで高度に保存されているのかを追究する必要がある。微小管の形成の仕組みが分かることで、微小管の異常によって起きると考えられる疾患の治療や予防に一定の方針が見えてくると期待される。

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 16 件)

Mad1 promotes chromosome congression by anchoring a kinesin motor to the kinetochore

Takashi Akera, Yuhei Goto, Masamitsu Sato, Masayuki Yamamoto and Yoshinori Watanabe Nature Cell Biology, 2015;17(9):1124-33. DOI: 10.1038/ncb3219 (査読有)

Module-based construction of plasmids for chromosomal integration of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*

*Yasutaka Kakui, Tomonari Sunaga, Kunio Arai, James Dodgson, Liang Ji, Attila Attila Csikász-Nagy, Rafael Carazo-Salas and *Masamitsu Sato

Open Biology, 2015;5(6):150054.

DOI: 10.1098/rsob.150054 (査読有)

Cell cycle control of spindle pole body duplication and splitting by Sfi1 and Cdc31 in fission yeast

Bouhlel IB, Ohta M, Mayeux A, Bordes N, Dingli F, Boulanger J, Velve Casquillas G, Loew D, Tran PT, Masamitsu Sato and *Anne Paoletti

Journal of Cell Science, 2015;128(8):1481-1493.

DOI: 10.1242/jcs.159657 (査読有)

The Kinetochore Protein Kis1/Eic1/Mis19 Ensures the Integrity of Mitotic Spindles through Maintenance of Kinetochore Factors Mis6/CENP-1 and CENP-A

Hayato Hirai, Kunio Arai, Ryo Kariyazono, Masayuki Yamamoto and *Masamitsu Sato

PLoS ONE, 2014;9(11):e111905.

DOI: 10.1371/journal.pone.0111905 (査読有)

Optimization of the analogue-sensitive

Cdc2/Cdk1 mutant by in vivo selection eliminates physiological limitations to its use in cell cycle analysis

Yuki Aoi, Shigehiro A. Kawashima, Viesturs Simanis, Masayuki Yamamoto, *Masamitsu Sato

Open Biology, 2014;4(7):140063.

DOI: 10.1098/rsob.140063 (査読有)

CDK-dependent phosphorylation of Alp7-Alp14 (TACC-TOG) promotes its nuclear accumulation and spindle microtubule assembly

Naoyuki Okada, Takashi Toda, Masayuki Yamamoto and *Masamitsu Sato

Molecular Biology of the Cell, 2014;25(13):1969-1982.

DOI: 10.1091/mbc.E13-11-0679 (査読有)

Dissecting the first and the second meiotic divisions using a marker-less drug-hypersensitive fission yeast

Yuki Aoi, Masamitsu Sato, Takashi Sutani, Katsuhiko Shirahige, Tarun M. Kapoor and *Shigehiro A. Kawashima

Cell Cycle, 2014;13(8):1327-1334.

DOI: 10.4161/cc.28294 (査読有)

The RNA-binding protein Spo5 promotes meiosis II by regulating cyclin Cdc13 in fission yeast

Mayumi Arata, Masamitsu Sato, Akira Yamashita and *Masayuki Yamamoto

Genes to Cells, 2014;19(3):225-238.

DOI: 10.1111/gtc.12133 (査読有)

A network approach to mixing delegates at meetings

Federico Vaggi, Tommaso Schiavinotto, Jonathan Ld Lawson, Anatole Chessel, James Dodgson, Marco Geymonat, Masamitsu Sato, Rafael Edgardo Carazo Salas and *Attila Csikász-Nagy

eLife, 2014;2014(3). (査読有)

Functional significance of nuclear export and mRNA binding of meiotic regulator Spo5 in fission yeast

Naoyuki Togashi, Akira Yamashita, Masamitsu Sato and *Masayuki Yamamoto

BMC Microbiology, 2014 Jul 15;14:188.

DOI: 10.1186/1471-2180-14-188 (査読有)

Targeting Alp7/TACC to the spindle pole body is essential for mitotic spindle assembly in fission yeast

Ngang Heok Tang, Naoyuki Okada, Chii Shyang Fong, Kunio Arai, Masamitsu Sato and *Takashi Toda

FEBS Letters, 2014 Aug

25;588(17):2814-21

DOI: 10.1016/j.febslet.2014.06.027 (査読有)

Microtubules and Alp7-Alp14 (TACC-TOG) reposition chromosomes before meiotic segregation

Yasutaka Kakui, *Masamitsu Sato, Naoyuki Okada, Takashi Toda and Masayuki Yamamoto

Nature Cell Biology, 2013;15(7):786-796.

DOI: 10.1038/ncb2782 (査読有)

Spatial segregation of polarity factors into distinct cortical clusters is required for cell polarity control

James Dodgson, Anatole Chessel, Miki Yamamoto, Federico Vaggi, Susan Cox, Edward Rosten, David Albrecht, Marco Geymonat, Attila Csikász-Nagy, Masamitsu Sato and *Rafael E. Carazo-Salas

Nature Communications, 2013;4.

DOI: 10.1038/ncomms2813 (査読有)

Cuf2 boosts the transcription of APC/C activator Fzr1 to terminate the meiotic division cycle

Yuki Aoi, Kunio Arai, Masaya Miyamoto, Yuji Katsuta, Akira Yamashita, *Masamitsu Sato and *Masayuki Yamamoto

EMBO Reports, 2013;14(6):553-560.

DOI: 10.1038/embor.2013.52 (査読有)

Dynamics of SIN asymmetry establishment

Archana Bajpai, Anna Feoktistova, Jun-Song Chen, Dannel McCollum, Masamitsu Sato, Rafael E. Carazo-Salas, Kathleen L. Gould and *Attila Csikász-Nagy

PLoS Computational Biology, 2013;9(7).

DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003147 (査読有)

Projecting cell polarity into the next decade

*Attila Csikász-Nagy, Masamitsu Sato and *Rafael E. Carazo Salas

Phil. Trans. Roy. Soc. B: Biological Sciences, 2013;368(1629). (査読無)

[学会発表](計 1 件)

佐藤政充「分裂酵母における動原体の構成と紡錘体制御の関連性」日本分子生物学会 2013年12月5日、兵庫県神戸市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 政充 (SATO, Masamitsu)
早稲田大学理工学術院・准教授
研究者番号：50447356

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし