

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840070

研究課題名(和文) 微小管動態制御による分裂位置制御メカニズム

研究課題名(英文) Spatial control of cytokinesis through regulation of microtubule dynamics

研究代表者

上原 亮太 (Uehara, Ryota)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：20580020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂の正確な制御は、生命の継承および恒常性の維持に必須であるが、その分子機構は明らかでない。本研究では、細胞質分裂が起こる細胞内位置の制御機構を明らかにするために、ヒト培養細胞を用いて、微小管形成因子をRNAi法によって特異的に機能阻害し、それにより生じる分裂障害を詳細に調べた。その結果、微小管脱重合因子Kif2Aが中央紡錘体微小管の長さ制御を通して、分離染色体間距離を適正に保つ機能を有すること、また微小管重合因子オーグミンによる中央紡錘体微小管形成が、細胞のくびれ運動を司るアクチン細胞骨格制御因子の集積に必須の機能を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Precise control of cell division is essential for securing biological processes of heredity and homeostasis. However, molecular mechanisms of spatiotemporal regulation of cell division remain largely unknown. In this project, we looked into microtubule dynamics during cell division phase in human cultured cells, and aimed to elucidate their contributions to the determination of division sites within dividing cells. We found that Kif2A, a microtubule depolymerizing protein plays a pivotal role in microtubule length control within the central spindle, which segregates the two masses of the sister chromosomes in an appropriate distance. We also found that augmin, a regulator of central spindle microtubule generation mediates accumulation of cytokinesis regulators to the equatorial cortex, which is essential for efficient furrow ingression. Our results shed light on new mechanisms of cell division control through dynamic reorganizations of microtubules during cytokinesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質分裂 微小管 アクチン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂の異常は癌をはじめとする種々の重篤な疾病を引き起こすため、その分子制御機構の解明は生物学、医学の重要課題である。細胞を正しく二分するためには、分離した染色体を十分な距離に隔離しながら、それらの間で細胞膜を切り切る必要がある。これらの機能は、分離染色体間で、それらを隔てるように形成される微小管構造「中央紡錘体」によって担われると考えられるが、中央紡錘体が正しく機能する分子メカニズム、特に、機能的な中央紡錘体のサイズ、形態を実現する仕組み、および細胞質分裂誘導位置を決める仕組みは全く明らかでなかった。申請者はこれまでの研究で、中央紡錘体微小管が分離染色体間で起こる局所的な重合反応によって形成されることを見つけた。予備的観察により、中央紡錘体形成因子オグミンを阻害すると重篤な細胞膜収縮障害を引き起こされること、さらに、微小管の脱重合を薬剤で阻害し、中央紡錘体微小管の動的性質を抑制すると分裂位置制御に重篤な障害を引き起こされることを見出した。これらの観察から、中央紡錘体が細胞質分裂における細胞膜収縮制御に積極的な役割を果たすこと、さらに中央紡錘体微小管の動態制御がその機能に重要であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、染色体分離と細胞質分裂の連携を担う「中央紡錘体」の形態制御、機能メカニズムに関する以下の3点を明らかにすることを目指した。

(1) 分裂位置の決定に関わる微小管動態制御因子の同定

(2) 分裂位置決定因子の機能制御の仕組み

(3) 微小管の動態制御を通して分裂位置が決まる物理的メカニズム

## 3. 研究の方法

(1) 細胞、遺伝子阻害実験

本研究の実験にはすべてヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は DMEM に 10% 牛胎児血清および抗生物質を添加した培地で摂氏 37 度、5%CO<sub>2</sub> の環境で培養した。遺伝子阻害実験には RNAi 法を用いた。具体的には、各標的遺伝子をコードする siRNA を、Lipofectamin RNAiMAX (invitrogen) により細胞内に導入し、2-4 日間培養することで、遺伝子発現阻害を行って下記の実験に供した。各種外性遺伝子の導入には JetPEI (Polyplus science) を使用した。

(2) 間接蛍光抗体法

細胞内における中央紡錘体形成因子の局在を解析するために間接蛍光抗体法を行った。具体的には細胞を 3.2%もしくは 6.4%パラフォルムアルデヒド含有緩衝液で固定後、0.5%SDS もしくはトライトン X100 含有緩衝液で透過処理し、蛍光抗体法によって微小管およびその他の標的遺伝子産物を染色することで観察した。パラフォルムアルデヒドにより抗原性が失われてしまう標的を染色する際には 100%メタノールもしくは 10%トリクロロ酢酸を用いて細胞固定を行った。各種中央紡錘体形成因子の抗体は、メーカーから購入して用いた。

(3) 細胞観察

細胞観察は、60x および 100x 対物レンズを装着したスピニングディスク型コンフォーカル顕微鏡、もしくはスキャン型コンフォーカル顕微鏡によって行った。生細胞観察の場合、観察の数時間前に細胞培養液をフェノールレッド不含の培地に交換し、ステージインキュベーター内で、摂氏 37 度、5%CO<sub>2</sub> 環境の下で、細胞をカバーガラスボトムチャンバー内に培養した状態で蛍光タンパク質によってタグした標的因子の細胞内動態を観察した。

(4) 生化学実験

タンパク質リン酸化状態の解析は、下記の方法で行った。まず、分裂期同調細胞をトリプシン処理により回収し、電気泳動サンプルバッファーで溶解、ポイルしたのち、Phostag-アクリルアミドを含む SDS-PAGE ゲルにアプライして、電気泳動した。タンパク質の展開後、ゲルを PVDF 膜にトランスファーし、ウエスタンブロットにより標的タンパク質を検出した。細胞抽出液を泳動してバンドパターンが乱れる場合には、標的タンパク質を免疫沈降によって部分精製してから上記の解析にかけた。

(5) 数理解析

中央紡錘体の動態制御の数理解析は数値計算ソフトの MATLAB を使用して行った。コンピューター上に中央紡錘体を模した逆平行微小管束モデルを構築し、三次元仮想空間に複数本配置した微小管束について、各微小管の伸長、短縮および微小管間の滑り運動に関する関係式をたて、全体の構造の経時的な挙動をルンゲ=クッタ法を用いてシミュレートした。

## 4. 研究成果

(1) 中央紡錘体における微小管動態制御因子の発見

中央紡錘体の微小管動態制御を通して分裂位置の決定を行う因子を同定するために、

分裂位置特異的に集積する RacGAP1-GFP を発現する HeLa 細胞を生細胞観察し、分裂面の 3 次元的にモニターすることを可能にした。この観察系を用いて、微小管動態制御因子をターゲットにした RNAi スクリーニングを行った結果、分裂位置制御に必須の機能を果たす因子として、微小管モーター蛋白質のキネシン 13 の一種 Kif2A を特定した。Kif2A を阻害した細胞では中央紡錘体が異常伸長し、分裂位置制御異常が引き起こされた。一方で Kif2A の機能を異常亢進させた場合、中央紡錘体が異常短縮し、やはり分裂位置制御に異常が生じた。このことから Kif2A は中央紡錘体微小管の長さ制御を通して分裂位置制御に関与すること、またその制御のために Kif2A の活性状態が高すぎず低すぎず、適正なレベルに保たれることが重要であることが明らかとなった。

#### (2) 微小管動態制御因子の機能制御機構の解明

つぎに Kif2A の機能を適正に保つ仕組みを探るため、細胞質分裂期における Kif2A のリン酸化状態を phos-tag ウエスタンブロット法で解析した。これにより、Kif2A がこの時期特異的にリン酸化されていることを見出した。リン酸化は分裂期キナーゼの一種 Aurora B を阻害すると消失したことから、Aurora B 依存的に起こることがわかった。次に Kif2A における Aurora B 依存的な予想リン酸化サイトをアラニン置換する方法でリン酸化部位を探索し、スレオニン 97 がリン酸化サイトであることを見出した。スレオニン 97 をアラニンに置換した Kif2A 変異体は中央紡錘体に過剰集積して中央紡錘体の異常短縮を引き起こした。同様の異常が Aurora B を阻害した細胞においても観察された。

以上から、Aurora B は Kif2A のリン酸化を通してその機能を抑制的に制御し、中央紡錘体のサイズを適正に保つ機能を有することがわかった。

#### (3) 数理モデリングを用いた、微小管動態制御による分裂位置制御機構の解析

Aurora B は中央紡錘体の中央に位置して、リン酸化活性勾配の形成を通して、分裂細胞の空間制御に関与すると考えられてきたが、その制御の実態は明らかになっていない。そこで、本研究で見出した Aurora B 依存的な Kif2A 制御が分裂位置制御に及ぼす影響を、Aurora B の勾配形成による Kif2A 制御を反映した数理モデルを用いて検証した。数理モデルの結果、Aurora B は中央紡錘体の中央部分からの距離依存的に Kif2A 依存的微小管脱重合反応を抑制し、それによって中央紡錘体の適正なサイズと左右対象性が保証されることが示唆された。実験的に Aurora B の勾配形成を抑制すると、モデルの予想と一致して、中央紡錘体のサイズ制御および対象性異常が引き起こされた。

以上から、Kif2A は Aurora B 依存的リン酸化勾配による分裂細胞の空間制御における重要なターゲットの一つになっていることが明らかとなった。

#### (4) 中央紡錘体による膜収縮誘導の分子メカニズムの解析

次に中央紡錘体が細胞質分裂における膜変形を誘導する分子メカニズムを明らかにするために、中央紡錘体形成に必須の因子オグミンを RNAi により阻害することで中央紡錘体微小管を特異的に消失した細胞で、細胞質分裂制御因子の局在機能がどのように異常になるかを調べた。その結果、中央紡錘体欠損細胞においては、収縮環構成因子の一種アニリンの分裂位置への集積が劇的に減少していることが明らかとなった。この時膜変形に重篤な遅延および阻害が見られたが、外性のアニリンタンパク質を過剰発現すると、アニリンの分裂位置への集積が回復し、収縮異常も軽減することから、アニリンの集積異常が、中央紡錘体欠損細胞における分裂異常の主要因の一つとなっていることが示唆された。この際、その他の収縮環構成タンパク質の集積は比較的正常であったことから、中央紡錘体は新規の制御経路によってアニリン特異的にその集積を制御する機構が存在していることが示唆された。

#### 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) Uehara, R., Tsukada, Y., Kamasaki, T., Poser, I., Yoda, K., Gerlich, D.W., and Goshima, G.

Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase.

*Journal of Cell Biology* 202:623-636 (2013) (Article) 査読あり論文

(2) 釜崎とも子・上原亮太

紡錘体微小管の生成メカニズムに関する微細構造学的解析

*顕微鏡* 第 48 巻 2 号 90-93 (2013) 査読なし論文

(3) 中岡由貴・上原亮太

動物と植物におけるオグミンの分裂期スピンドル形成への寄与

*細胞工学* 32:263-268 (2013) 査読なし論文

[学会発表](計 3 件)

(1) 上原亮太・釜崎とも子・依田欣也・五島

剛太  
動物細胞における中央紡錘体の形成・形態制御機構  
第66回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 2014年6月11日～13日 奈良県新公会堂 奈良県奈良市  
招待講演

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号:

(2)上原亮太、塚田祐基  
細胞生物学的手法と数理モデルを用いた細胞質分裂制御の解析  
第6回 定量生物学会年会 2013年11月22日～24日 大阪大学銀杏会館 大阪府吹田市 招待講演

(3)上原亮太、塚田祐基、釜崎とも子、五島剛太  
Aurora BとKif2Aによる微小管の長さ制御を介した細胞質分裂制御の仕組み  
第65回 日本細胞生物学会大会 シンポジウム 2013年6月19日～21日 ウィンクあいち 愛知県名古屋市  
招待講演

〔図書〕(計 0 件)

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://tenure-track.cris.hokudai.ac.jp/lab/uehara/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
上原 亮太 (UEHARA, Ryota)  
北海道大学・創成研究機構・特任助教  
研究者番号: 20580020