

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840063

研究課題名(和文) 染色体派生シグナルによる分裂期の紡錘体配置と細胞膜伸長の協調的制御

研究課題名(英文) Coordinated regulation of spindle positioning and membrane elongation by chromosome-derived signals

研究代表者

清光 智美 (Kiyomitsu, Tomomi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10503443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含む多細胞生物において、対称分裂による細胞コピーの増加は多細胞体構築の基礎となる。本研究では、対称分裂の鍵となる、染色体派生のRan-GTP勾配による細胞表層タンパク質(NuMA、Anillin)の制御機構の理解を目指した。特に重要な成果として、NuMAのRan-GTP感受性ドメインの同定、新規Anillin結合タンパク質の同定、分裂期特異的にRan-GTP勾配を破壊するヒト細胞株の樹立が挙げられる。これらを含む新規の知見やツールはヒト対称分裂の仕組みの理解に重要な貢献となる。

研究成果の概要(英文)：Clonal expansion by symmetric cell division is a basis of multi-cellular organisms including humans. In this proposed research, we have studied how chromosome-derived Ran-GTP signals control cortical proteins, NuMA and Anillin, and achieve symmetric cell division in human cells. Importantly, we identified essential domain on NuMA required for Ran-GTP-based regulation, and novel Anillin binding proteins. In addition, we established a human cell line in which chromosome-derived Ran-GTP signals are disrupted during mitosis. These original results will be powerful tools for understanding the mechanisms of symmetric cell division in human cells.

研究分野：細胞分裂

キーワード：細胞分裂 紡錘体配置 染色体派生シグナル Ran-GTP

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む多細胞体の構築には、細胞数を増やす「対称分裂」と細胞種を増やす「非対称分裂」の正確な制御が必須となる。これまで非対称分裂は盛んに研究されてきたが、対称分裂が如何に達成されるのかその分子メカニズムはほとんど理解されていなかった。

細胞が対称分裂するためには、染色体分配装置である紡錘体が細胞の中央に正確に配置されることが必須となる。申請者はこれまで、紡錘体の細胞中央配置には、細胞表層「ダイニン」依存的な紡錘体の牽引、および細胞表層「ミオシン」依存的な細胞膜の伸長が重要であることを見出してきた(Kiyomitsu and Cheeseman, *NCB* 2012, *Cell* 2013)。またこれら2つの現象は、染色体派生の Ran-GTP が染色体近傍の細胞表層からダイニンとミオシンを局所的に排除することで誘導されることも発見した。しかし、染色体派生の Ran-GTP が如何にダイニンおよびミオシンの局在を協調的に制御するのか、その分子メカニズムは不明であり、その解明が待たれていた。

2. 研究の目的

申請者はすでに染色体派生の Ran-GTP がダイニンの上流因子 NuMA、及びミオシンの上流因子 Anillin の細胞表層局在を負に制御することを見出している(Kiyomitsu and Cheeseman, *NCB* 2012, *Cell* 2013, 総説を Kiyomitsu *Trends in Cell Biology* 2015 にて発表した)。興味深いことに、NuMA と Anillin は共に Ran-GTP の結合相手である Importin の認識配列 NLS(Nuclear Localization Signal)を持つことが報告されている。

そこで本研究では、「Ran-GTP が NuMA と Anillin の局在制御を介して、下流のダイニンとミオシンを協調的に制御する」という仮説を検証することを目的とした。具体的には、NuMA とその細胞表層の結合相手である 4.1 タンパク質との相互作用が Ran-GTP シグナルによって如何に制御されるのか、また Anillin の細胞表層結合相手の同定を行うことにより、Ran-GTP による Anillin の細胞表層局在制御機構を理解することを目指した。

また、ヒト Ran-GTP 濃度勾配の分裂期での機能解析を進めるためには、Ran-GTP 濃度勾配を分裂期特異的に破壊することが必要となる。オーキシン誘導デグロン(Auxin Inducible Degron:以下 AID と略)を用いて Ran-GTP の生成に必要な RCC1 タンパク質の分解誘導細胞株の作成も目指した。

3. 研究の方法

2.の目的に沿って、NuMA および Anillin について、細胞生物学的、生化学的アプローチの2つの側面から検討した。主な方法としては、以下の8点が挙げられる。

(1) NuMA 変異体の作成、および細胞表層局在の動態観察: NSL 配列を欠損した変異体など、複数種類の NuMA の C 末断片(NuMA-C)の変異体を作成後、それらの分裂期での細胞内局在を観察し、染色体の位置に応じて NuMA 変異体の細胞表層局在が変化するかどうか解析した。

(2) NuMA の細胞表層局在、および染色体シグナル感受性に必要な最小領域の同定: NuMA-C をさらに短くした断片を作成し、細胞表層局在に十分な領域を同定した。また様々な NuMA の部分断片を用いて、染色体シグナル感受性に必要な領域を同定した。

(3) NuMA と 4.1 タンパク質の結合最小領域の同定: (2)で作成した各種断片が 4.1 タンパク質と直接結合するかどうか酵母ツーハイブリット法を用いて検討した。

(4) 染色体派生シグナル非感受性 NuMA 変異体の作成とその過剰発現時の表現型の解析: (2)の最小断片と NuMA の N 末端側のダイニン結合領域を含む NuMA 変異体を発現誘導できる細胞株を樹立し、その発現誘導後の分裂期表現型を解析した。

(5) CRISPR/Cas9 を用いたヒト NuMA および Anillin 遺伝子領域への蛍光タグのノックイン、およびこれら内在性タンパク質の分裂期での生細胞観察

(6) 質量分析を用いた Anillin の分裂期結合タンパク質の同定: 分裂期前中期の細胞抽出液(ノコダゾール停止抽出液)、および分裂期後期を模倣した細胞抽出液(ノコダゾール停止細胞に CDK 阻害剤を添加後、10分で回収した細胞抽出液)を用意し、それぞれの時期で GFP-Anillin に特異的に相互作用するタンパク質を同定した。

(7) AID 法を用いた RCC1 タンパク質の分裂期特異的分解: まず HCT116 細胞の RCC1 遺伝子領域に CRISPR/Cas9 法を用いて、蛍光タンパク質を融合した AID タグをノックインした。ノコダゾールで分裂期に停止させた状態で、オーキシンを添加し、RCC1 の蛍光が減少する様子を生細胞で観察した。

(8) RCC1 分解細胞での表現型の解析: (7)の方法で RCC1 タンパク質を分解誘導後、ノコダゾールを培地から除去し、再開した細胞分裂の様子を生細胞で観察した。また NuMA の

細胞内局在の様子を RCC1 タンパクの分解ありなしで比較観察した。

4. 研究成果

(1) NuMA の C 末端領域に存在する NLS 配列は細胞表層局在や、染色体派生シグナルによる NuMA の細胞表層制御に必要ではないことを明らかにした。このことから Ran-GTP による染色体近傍の細胞表層からの NuMA の排除には NuMA の NLS 配列に依存しない、新規のメカニズムが存在することが示唆された。

(2) NLS 配列を含まない NuMA の C 末端領域が細胞表層局在に十分であることを見出した。この領域は最近細胞膜との相互作用に必要なドメインとして報告されたことから、NuMA は 4.1 や LGN 以外にも細胞膜や未知の結合因子を介して細胞膜に局在する可能性が示唆された。また NLS 配列、細胞表層局在ドメインとは異なる領域が、NuMA 表層局在の染色体シグナルへの感受性に必要なことも明らかにした。

(3) NuMA の細胞表層局在ドメインは酵母ツーバイブリッド法では 4.1G-CTD と相互作用がみられなかった。一方、NuMA の染色体派生シグナル感受性ドメインを含む領域が 4.1G-CTD と相互作用することを見出した。(2), (3)の結果から、NuMA と 4.1 が結合することが染色体派生シグナルへの感受性に必要なことが示唆された。

(4) これまでの成果を元に、ダイニンとは結合でき、かつ細胞表層にも局在できるが、染色体派生シグナルに非感受性な NuMA 変異体プラスミドを作成し、293 Flip-in TRex 細胞を用いて、テトラサイクリン添加依存的に、発現誘導できる細胞株を樹立した。内在性の NuMA が存在する条件で、この変異体を過剰発現すると、一部の細胞において、分裂期後期に紡錘体の Rocking 現象が見られ、細胞質分裂が異常になり、多核細胞化する表現型が観察された。分裂期後期において、染色体近傍の細胞表層から NuMA を排除することは、紡錘体配置の安定性に重要であることが示唆された。また分裂期後期での異常な紡錘体の牽引力は不等分裂を誘導するというよりも、細胞膜の異常な動態制御を誘導することで細胞質分裂の異常につながることも示唆された。

(5) CRISPR/Cas9 法を用いて、HCT116 細胞で NuMA および Anillin の C 末遺伝子領域に GFP をノックインした細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株では、両アレルに GFP 遺伝子がノックインされていることを PCR 及び WB により明らかにした。さらに、これらの GFP ノックイン細胞株は親株同様の増殖を示したことから、GFP のノックインによる NuMA および Anillin の機能阻害はほとんどないと考

えられた。

ヒト細胞において、これらの内在性遺伝子産物の細胞内局在を可視化した報告はなく、より詳細な局在解析を可能にする有用なツールとして価値が高い。特に、分裂期後期において、紡錘体配置の偏りに応じた NuMA や Anillin の局在観察を進める上で極めて重要なツールとなる。実際に生細胞観察により、内在性のヒト NuMA および Anillin の局在をタイムラプス撮影すると、これまでの抗体を用いた固定サンプルの局在とほぼ同様の局在以外にも、分裂期侵入前後や分裂期においてこれまで十分に報告されていない新規の細胞内局在の様子を捉えることができた。

(6) NuMA は細胞表層において LGN、4.1 タンパク質に結合することをすでに明らかにしてきた。しかしながら、Anillin に関してはその細胞表層結合因子が十分に同定されていないため、染色体派生シグナルによる Anillin 局在制御の理解が進まない一因となっていた。そこで、質量分析を用いて分裂期での Anillin 結合因子の同定を試みた。その際、分裂期後期での Anillin の結合相手を同定するため、ノコダゾール停止後、CDK 阻害剤を加え、分裂期を脱出させた状態で細胞を回収し、それを分裂期後期の細胞抽出液とした。

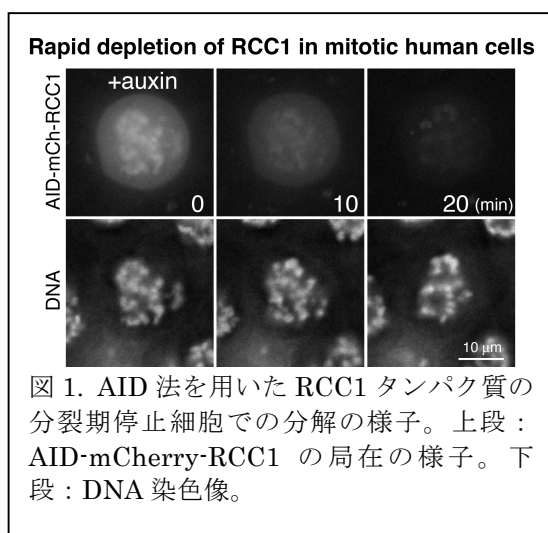
Anillin はこれまでミオシンなどと複合体を形成することが報告されていたが、新規に 20 種類以上の分裂期結合タンパク質を Anillin 結合タンパク質として同定することに成功した。また分裂期後期抽出液特異的に結合する因子も数種類同定された。これらの中で同定ペプチド数の多い数種類の新規 Anillin 結合タンパク質について、cDNA をクローニングし、それらの GFP 融合タンパク質の局在を観察すると、細胞表層に局在することが確認できた。

今後これらの因子群と Anillin の局在依存性や、両者の結合が染色体派生の Ran-GTP シグナルによって制御されるかどうかを検討することで、Anillin の局在制御の仕組み、および染色体派生シグナルによる細胞膜伸長の仕組みがより理解できると期待される。

(7) Ran-GTP は間期においても核-細胞質間輸送に関与するため、その分裂期機能を正確に理解するためには、分裂期特異的に Ran-GTP 濃度勾配を破壊することが必要となる。これまでヒトの細胞で分裂期特異的に Ran-GTP を阻害する方法として、Ran の dominant negative 変異体 (RanT24N) のマイクロインジェクションが用いられてきたが、温度感受性ハムスター細胞株 tsBN2 のように、Ran の GEF である RCC1 を分裂期で急速に分解することはヒト細胞では不可能だった。これまで tsBN2 細胞を用いて、NuMA の上流因子 LGN や Anillin の局在制御を検討してきたが、ヒト細胞で同様に RCC1 を分解することが、より

正確な制御機構の理解には欠かせない。

本研究の一部として、RCC1 タンパク質を分裂期特異的に分解するツールの開発にも着手した。上述したように、AID 法を利用することで RCC1 タンパク質をヒト細胞の分裂期において急速(30 分以内)に分解することに成功した(図 1. 遺伝学研究所鐘巻将人教授との共同研究)。また CRISPR/Cas9 法を用いることで、HCT116 細胞の RCC1 遺伝子領域両アレルに AID-mClover(蛍光タンパク質)をノックインした細胞株を樹立することに成功した。



このように分裂期停止期において 30 分以内で任意のタンパク質を分解誘導できる実験系はこれまでに報告がなく、RCC1(RanGTP の GEF)以外にも RanGAP1 や Importin など、Ran 関連因子の分裂期特異的分解も可能と考えられる。

(8) ヒト細胞において、RCC1 を分解誘導後、ノコダゾールを除去し、分裂期を再開させた際の表現型を観察した。最近ニワトリ細胞で報告された結果(Furuta et al., 2016)同様に、分裂期を脱出した後、細胞核の形態に顕著な異常が観察された。また分裂期中期において 2 極性の紡錘体もは形成されたが、分裂期脱出までにはやや遅延を示した。また通常、紡錘体は細胞接着面に対し水平に配向するが、その配向も異常になる様子が観察された。

我々はこれまでに、染色体派生の Ran-GTP シグナルが分裂期後期での細胞膜伸長や紡錘体牽引力を制御するために、紡錘体配置の偏りを修正するとのモデルを提唱している(Kiyomitsu, *Trends in Cell Biology* 2015)。興味深いことに、RCC1 を分解した細胞でも分裂期後期において、非対称な細胞膜伸長がみられ、紡錘体配置の偏りが修正される様子が観察された。これは Ran-GTP 以外の仕組みで Anillin やミオシンが染色体近傍の細胞表層から排除されていることを示唆する。(7) で作成した RCC1 デグロン細胞株に、さらに mCherry 等の蛍光タンパク質を Anillin 遺伝子領域にノックインし、内在性遺伝子産物の

動態をより詳細に検討することで、Ran-GTP 以外に Anillin 局在を制御するバックアップメカニズムがあるのか、あるとすればどのようなものか検討を進めたい。

また我々はこれまでに、分裂期中期においては染色体派生の Ran-GTP シグナルが染色体近傍の細胞表層から LGN を排除するため、LGN と結合する NuMA、ダイニンを同様に染色体近傍の細胞表層から排除し、紡錘体極側の細胞表層に限定的に局在させるというモデルを提唱している(Kiyomitsu and Cheeseman, *NCB* 2012)。このモデルを確かめる目的で、RCC1 デグロン細胞株の NuMA の遺伝子領域に mCherry をノックインした細胞株を樹立し、RCC1 の分解ありなしで内在性 NuMA の局在を観察した。これまでの報告通り、NuMA-mCherry は間期で細胞核に局在したが、このような NuMA の間期細胞核局在は RCC1 を分解することで阻害された。この結果は、NuMA の間期核局在が RCC1 に依存した核-細胞質間輸送によって制御されていることを示すと共に、確かにオーキシン依存的に RCC1 を分解することで Ran-GTP 勾配が阻害されていることを裏付けている。

我々のモデルでは、NuMA は LGN と分裂期中期で複合体を形成しているため、分裂期中期で RCC1 を分解すると NuMA は LGN 同様に染色体近傍の細胞表層にも局在すると予測された。しかしながら、興味深いことに、RCC1 を分解すると NuMA の細胞表層局在は全体的に減少し、予想とは違う挙動を示した。

最近、LGN と相互作用する新規タンパク質として Afadin が報告された(Carminati et al., 2016)。Afadin は NuMA と競合して LGN と結合する。これらの結果を総合すると、Ran-GTP は Afadin-LGN 複合体から NuMA-LGN 複合体を形成するために必要という新規の可能性が考えられる。今後は、本研究で作成した RCC1 デグロン株を元に、NuMA、LGN、afadin 等の動態や結合の様子を検討することで、染色体派生シグナルによる細胞表層タンパク質複合体の新規制御システムの理解につなげたい。

最後に、紡錘体配置の制御機構の理解を推進するためにはその方法論やコツを公表し、世界中の研究者とシェアすることが重要となる。我々がこれまで独自に編み出してきた紡錘体動態や細胞膜伸長を解析する方法をまとめた論文を、最近 on line に公表することができた(Kiyomitsu, *Methods in Molecular Biology* 2016)。

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 2 件)

① 清光智美、Analyzing Spindle Positioning Dynamics in Cultured Cells. *Methods in Molecular Biology* 誌、1413 巻、

239-252 項、2016 年、査読有、DOI
10.1007/978-1-4939-3542-0_15

② 清光智美、Mechanisms of daughter
cell-size control during cell division.
Trends in Cell Biology 誌、25 巻、286-295
項、2015 年、査読有り、DOI
10.1016/j.tcb.2014.12.003

[学会発表] (計 1 件)

① 清光智美、染色体派生シグナルによる紡
錘体配置の制御、新学術領域クロマチン動構
造若手の会、2015 年 7 月 29 日、早稲田大学
[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]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清光 智美 (KIYOMITSU, Tomomi)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10503443

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし