

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840071

研究課題名(和文)細胞分裂のミクロ力学：分裂後期紡錘体の構造と機能の力学計測

研究課題名(英文) Micromechanics of cell division: mechanical measurement of the structure and feature of anaphase spindle

研究代表者

高木 潤 (Takagi, Jun)

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：40632196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂時に染色体の分配を担う紡錘体と呼ばれる構造物の力学的性質を、分裂中期と分裂後期において測定した。その結果、分裂後期に起こる紡錘体の伸長と同方向の外力に対し、後期紡錘体は中期紡錘体に比べ柔らかく、伸長しやすい力学特性を持つことが分かった。また、紡錘体極と染色体間は柔らかい構造でつながれていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We measured the mechanical properties of the spindle, which is the structure for chromosome segregation during cell division. We found that the anaphase spindle is more flexible than the metaphase spindle against the external force along the spindle's long axis, and that the link between chromosome and the spindle pole is mechanically flexible.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞分裂 紡錘体

### 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂において、間期に複製された染色体は、2つの娘細胞へ均等に分配される。染色体分配の異常は、細胞の癌化や出生異常につながるため、染色体分配の機構の解明に向けた研究が盛んに行われている。

染色体分配は、紡錘体と呼ばれる、多くの種類のタンパク質から構成されるタンパク質複合体が行う。染色体分配の駆動力は、紡錘体を構成する、微小管と呼ばれる繊維状のタンパク質重合体や、分子モータータンパク質が発生し、細胞分裂中期における染色体の紡錘体赤道面への整列と、細胞分裂後期における染色体の紡錘体極への移動を行う。これまで染色体分配の機構について、このような染色体分配を駆動する個々の分子の生化学的・力学的性質や、これらの分子の細胞周期依存的な制御の重要性について数多くの報告がなされてきた。

一方、個々の分子の性質だけでなく、紡錘体の構造全体に目を向けると、紡錘体の大きさは、分裂中期を通してほぼ一定であるが、分裂後期になると紡錘体の長軸方向に伸長するなど、紡錘体構造もまた細胞周期依存的な変化をすることが観察される。しかし、これまでこの紡錘体の構造全体の変化の、染色体分配に対する寄与についてはほとんど報告されていなかった。また、紡錘体の伸長方向は、染色体分配の方向と同方向であるため、紡錘体伸長が染色体分配へ寄与しているのではないかと考え、本研究の実施に思い至った。

紡錘体の大きさは、紡錘体内外で発生する力によって制御されていると考えられている。研究代表者らによるこれまでの研究により、分裂中期において紡錘体は復元力をもつバネのような力学特性をもち、その力学特性が、分裂中期における紡錘体の大きさの安定性に寄与していることが示されている (Takagi et al., Biophys. J., 2014)。一方、分裂後期における紡錘体の伸長が、紡錘体のどのような力学特性を反映しているのかは明らかとなっていない。このよう背景から、紡錘体の力学特性と紡錘体の大きさの安定性との関係を明らかにし、さらに紡錘体の伸長の染色体分配への寄与を解明することで、染色体分配の“ミクロ力学”を明らかにすることとした。

### 2. 研究の目的

紡錘体の細胞周期依存的な形態安定性の変化のメカニズムの解明と、分裂後期における紡錘体伸長の、染色体分配への寄与を解明することを研究の目的とする。

具体的には、紡錘体構造の力学特性が細胞周期依存的にどのように変化するかについて、微小ガラス針を用いた力学測定手法を用いて明らかにし、さらに染色体動態のライブイメージングを行うことで、その力学特性

の変化の染色体分配動態への作用を検証する。

### 3. 研究の方法

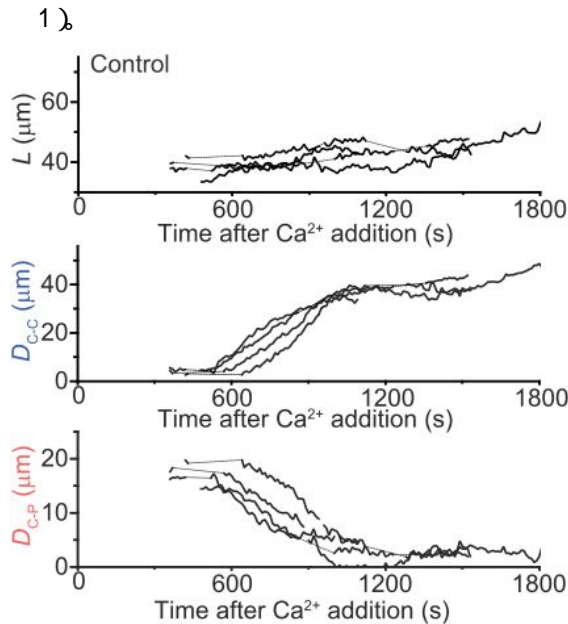
紡錘体はアフリカツメガエル卵の抽出液 (Desai et al., Methods Cell Biol., 1999) 中で形成させた。この系では細胞膜がないため、後述するように微小ガラス針を用いて紡錘体を直接操作できる他、分裂中期から後期への移行を抽出液への  $\text{Ca}^{2+}$  の添加によって人為的に開始することができるため、この実験系を採用することとした。紡錘体の形態の観察は、蛍光ラベルしたチューブリンを、卵抽出液中に内在する微小管に取り込ませ、紡錘体の骨格である微小管を蛍光観察することで行った。また、染色体の観察は Sytox-green と呼ばれる蛍光試薬を用いて行った。

本研究では、まず2本の微小ガラス針を用いて紡錘体を伸長し、染色体動態への作用を調べることで、紡錘体伸長の染色体分配への寄与を検証する。また、紡錘体の伸長に要する力を計測することで、紡錘体構造の力学特性の、細胞周期依存的な変化を検証する。

紡錘体の伸長には2種類の微小ガラス針 (紡錘体の硬さに比べ十分に硬いガラス針と、紡錘体と同程度の硬さで弾性定数既知の微小ガラス針) を用いる。微小ガラス針の操作はピエゾ素子を用いることで、数百 nm の精度で操作することが可能である。研究代表者のこれまでの研究によって、中期紡錘体に2本の微小ガラス針の先端を挿入し、片方の微小ガラス針を紡錘体の長軸に沿って動かすことで、紡錘体極付近にガラス針の先端が引っ掛かり、微小ガラス針をさらに動かすことで紡錘体を長軸方向に伸長できることが明らかとなっている。この手法を、後期紡錘体での計測に応用することで、実験を行う。また、硬い微小ガラス針を動かすことで中期紡錘体の伸長が引き起こされるが、伸長と同時に生じる、弾性定数既知の柔らかい微小ガラス針の曲げを顕微鏡で同時観察することで、紡錘体の伸長に要する力を算出できる (伸長に要する力 = 柔らかい微小ガラス針の弾性定数 × 柔らかい微小ガラス針の曲げ)。この力学計測手法を後期紡錘体の力学特性の計測に応用することで、実験を行う。

### 4. 研究成果

まず、微小ガラス針を用いて紡錘体に力を負荷する実験に対するコントロール実験として、力を負荷しない条件における、分裂後期の染色体動態の観察を行った。染色体動態の観察では、姉妹染色体間の距離と、染色体とその染色体と近接する紡錘体極間の距離に着目した。分裂中期にある卵抽出液に  $\text{Ca}^{2+}$  を加えると、 $\text{Ca}^{2+}$  添加後 10 分程度で染色体の分配が開始し、姉妹染色体間の距離は増大し、染色体-紡錘体間の距離は減少した (図

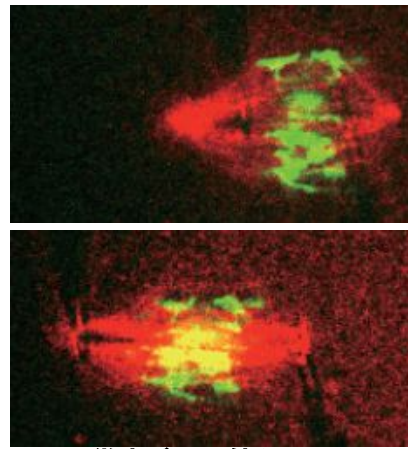


**図1：分裂後期における染色体動態**

分裂中期の卵抽出液に  $\text{Ca}^{2+}$  を加えると、加えてから 10 分後程度から染色体の分配が開始する。紡錘体の大きさ ( $L$ ) は緩やかに増加し、姉妹染色体間の距離 ( $D_{c-c}$ ) と染色体-紡錘体極間の距離 ( $D_{c-p}$ ) はそれぞれ増大・減少し、 $\text{Ca}^{2+}$  添加の 20 分後程度に染色体分配は終了する。グラフは 4 つの異なる紡錘体について示した。

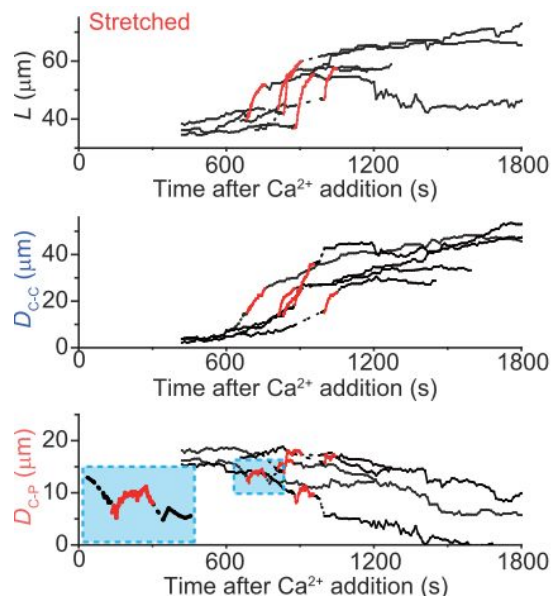
次に、分裂後期で観察された染色体動態に対する、微小ガラス針からの力学負荷の作用を検証した。2 本の微小ガラス針の先端を後期紡錘体の 2 つの紡錘体極付近に挿入し、片方の微小ガラス針を紡錘体の長軸方向外向きに、分裂後期における紡錘体伸長の速さより十分に速い速さで動かした。すると、微小ガラス針の先端が紡錘体極付近に引っかかり、後期紡錘体全体を、中期紡錘体と同様に長軸方向に伸長できることが分かった (図 2)。また、中期紡錘体の場合、伸長途中に紡錘体極が微小ガラス針によって切断されてしまう頻度が高かったが、後期紡錘体の場合にはその頻度が有意に低かった。このことから、後期紡錘体の紡錘体極は中期紡錘体に比べより壊れにくい力学特性を持つことが示された。

次に、力学負荷による紡錘体伸長の、染色体動態への作用を調べると、紡錘体の伸長によって、姉妹染色体間距離の増大が促進し、また、染色体-紡錘体極間距離の変化が一時的に増加に転じることが分かった (図 3)。これらの結果から、微小ガラス針による力の負荷により起こる紡錘体の伸長が、分裂後期における染色体動態を変調させることが明らかとなった。一方、染色体分配後の核形成は通常通り行われたことから、外部負荷により染色体分配の速度等の変化は起こるが、分配と核形成の結果には影響を与えないことが分かった。



**図2：微小ガラス針を用いた後期紡錘体の伸長**

2 本の微小ガラス針を用いて後期紡錘体 (赤: 微小管、緑: 染色体) の伸長を行った。左側の硬い微小ガラス針を左方向へ等速で動かすと、ガラス針の先端が紡錘体極付近に引っかかることで、紡錘体が伸長される。右側の微小ガラス針は弾性定数既知であり、ガラス針先端位置の変化 (微小ガラス針の曲げ) から、紡錘体に対し負荷した力の大きさを算出できる。



**図3：分裂後期の染色体動態に対する外部負荷の作用**

4 つの異なる紡錘体に対して、微小ガラス針を用いて紡錘体の伸長方向に負荷を与えた (図中赤色の線で示した時間において)。負荷により、紡錘体の大きさ ( $L$ ) と姉妹染色体間の距離 ( $D_{c-c}$ ) の増加が促進され、染色体-紡錘体極間の距離 ( $D_{c-p}$ ) は一時的に増加に転じる (下段拡大図) など、外部負荷により染色体動態が変調した。

次に、観察された染色体動態の変化が、細胞周期依存的であるのかを調べるために、中期紡錘体に対して同様の実験を行い、比較した。その結果、後期紡錘体では力の負荷により姉妹染色体間の距離と、染色体-紡錘体

極間の距離が同程度伸びるのに対し、中期紡錘体では姉妹染色体間距離の伸びが染色体-紡錘体極間の伸びに比べて小さくなることが分かった。これらの結果から、姉妹染色体間と、染色体-紡錘体極間の力学的特性が細胞周期依存的に変化している可能性が示唆された。そこで、紡錘体に加えた力の大きさと、姉妹染色体間、染色体-紡錘体極間のそれぞれ伸びから、それぞれの領域の硬さを算出した。すると、染色体-紡錘体極間の硬さは分裂中期と分裂後期で変わらないのに対し、姉妹染色体間の硬さは分裂後期になると柔らかくなることがわかった。つまり後期紡錘体は中期紡錘体に比べ、紡錘体極への力の負荷に対して姉妹染色体間の距離が伸びやすい力学特性を持つことが分かった。分裂中期において、姉妹染色体同士はコヒーシと呼ばれるタンパク質によって結合され、分裂後期になるとその結合がなくなることはこれまでも知られていたが、姉妹染色体間の結合力が分裂後期に実際に変化することを本実験により直接示すことができた。

また、本研究結果は、後期紡錘体における染色体と紡錘体極との結合様式に対しても新たな示唆を与えた。これまで、分裂後期においては、染色体は近接する紡錘体極とのみ、動原体微小管を介して結合しているという考えが一般的であった。一方、本研究で、微小ガラス針による紡錘体の伸長が染色体-紡錘体極間の距離を増大させたことから、染色体は近接する紡錘体極からの力と反対方向の力も受けていることが示唆された。現在までに、反対方向の力を何が生み出しているかについては分かっていないが、姉妹染色体同士の力学的な相互作用や、遠い方の紡錘体極から伸びる微小管との相互作用などではないかと推察している。今後、伸長時の染色体と微小管動態の高解像度観察により、これらの相互作用の有無を確認する予定である。また、染色体-紡錘体極間の結合はこれまで、動原体微小管によって強固に結合されほとんど伸びることはないと考えられていたが、本研究結果では、染色体-紡錘体極間の伸びが観察され、比較的柔らかく結合されていることが分かった。微小管自体は繊維長方向に非常に硬い性質を持つことから、染色体-紡錘体極間を微小管が直接つないでいるのではなく、複数本の微小管が、それらを束ねる分子が介在することでつないでいると推察している。そして、力の負荷によりそれらの分子による結合が壊れたものと推察し、現在その分子の同定を行っている。

本研究の成果をまとめると、紡錘体の力学特性は細胞周期依存的に変化し、分裂中期に比べ、分裂後期では姉妹染色体間が柔らかくなる、紡錘体極と染色体間の結合は微小管の繊維長方向の硬さに比べ柔らかい、紡錘体の伸長は染色体分配を促進する、ことが分かった。今後の展望としては、の力学特性の変化の分子機構を明らかにすること

と、の紡錘体極-染色体間の結合の分子機構を明らかにすることがあげられる。

本研究成果は国内学会にて発表を行い、の分子機構の解明を行った後論文として発表する予定である。

## 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. Jun Takagi, Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata, "Micromanipulation of the anaphase spindle assembled in *Xenopus* egg extracts using a pair of glass microneedles", 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
2. Jun Takagi, Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata, "Mechanical transition of the vertebrate meiotic spindle facilitating chromosome segregation", 日本生物物理学会 第 52 回年会、2014 年 9 月 27 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/7000001681/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 潤 (TAKAGI, Jun)

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：40632196