

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06166

研究課題名（和文）微小管分子モーターの力学特性と有糸分裂メカニズム

研究課題名（英文）Mechanical properties of microtubule motors and the mechanisms of mitosis

研究代表者

島本 勇太 (Shimamoto, Yuta)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・准教授

研究者番号：80409656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,800,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物の染色体分配装置である紡錘体の形成メカニズムを、生物物理の力計測手法、高解像の蛍光イメージング、生化学的分子操作、物性解析法を融合したアプローチで明らかにした。特に、紡錘体を持つ力学的不均質性とその分子起源を実験的に示し、紡錘体が細胞内でそのサイズを制御しながら染色体分配の駆動力を安定に発生するしくみについて、定量解析にもとづいた新しいモデルを提唱した (Takagi et al., Dev Cell 2019)。また、アフリカツメガエル卵エクストラクトを紡錘体活性を維持したまま凍結保存可能な方法を新規開発した (Takagi et al., Mol Biol Cell 2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有糸分裂・減数分裂期における母細胞から娘細胞への遺伝情報の継承は、紡錘体と呼ばれるミクロンサイズの生体装置によって行われる。紡錘体に生じる欠陥はガンや不妊症と密接に関連する。本研究は、紡錘体が細胞内で正確に形成し機能を果たすしくみの一端を、その主骨格である微小管と、微小管を組み上げるモータータンパク質に着眼することで明らかにしたものである。本研究の成果は、紡錘体が自らのサイズを柔軟に調節しながら染色体を安定に分配するための物理的基礎と分子基盤を示唆するものであり、この細胞装置の動作原理の定量的理解に根ざした新たな疾患治療戦略の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：We used a combination of biophysical force measurement, high-resolution imaging, biochemical perturbation, and materials science methods to elucidate the physical and molecular basis underlying the assembly of the metaphase spindle - the eukaryotic chromosome segregation machinery. We find that the spindle has a substantial mechanical heterogeneity along the axis to which chromosomes are segregated, and the heterogeneity is linked to two key microtubule-based motors, kinesin-5 and dynein (Takagi et al., Dev Cell 2019). Our data propose how the spindle exerts relevant forces for chromosome segregation while adapting to perturbations for error-free cell division. We have also developed a method to prepare a frozen stock of *Xenopus* egg extracts with retained spindle assembly activity (Takagi et al., Mol Biol Cell 2019). Together, our study should help advance our understanding of spindle micromechanics in a variety of cellular contexts, such as those during embryonic development.

研究分野：生物物理学

キーワード：有糸分裂 微小管 分子モーター 染色体分配 紡錘体 メカニクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

紡錘体は、真核生物が備えた遺伝情報の分配装置である。分裂期の細胞内に自己組織的に形成されるこの分配装置は、複製された染色体を2つの娘細胞へ均等に分配する(図1a)。紡錘体の形成異常はガンや不妊症と密接に関連し、メカニズムの解明は生命科学の最重要課題のひとつとなっている。この細胞装置の集合は、微小管細胞骨格とそれを架橋し運動させる分子モーター(キネシン・ダイニン等)の複雑な時空間相互作用によって行われる。出来上がった紡錘体のサイズは、その構造が細胞膜と物理的に干渉せず、かつ染色体を十分な距離に渡って分離できるよう、適切な大きさに制御される。このサイズ制御は特に胚発生において重要であり、分裂ごとに指数関数的に減少する細胞体積に応じて紡錘体のサイズは正確にスケールされる。重要なことに、このサイズ調節の柔軟性と相まって、発生ステージの各段階で大きさの異なる紡錘体は、どれも染色体分配に必要な十分な力を発生し、遺伝情報の忠実な継承を達成する(図1b)。これまで、遺伝的・生化学的アプローチを中心に、紡錘体の集合と機能を制御する多くの分子要素が同定されてきた。その一方で、紡錘体を持つ柔軟かつ堅牢な構造・力学特性がいかなる物理的・分子のメカニズムによって達成されているかは明らかでなかった。

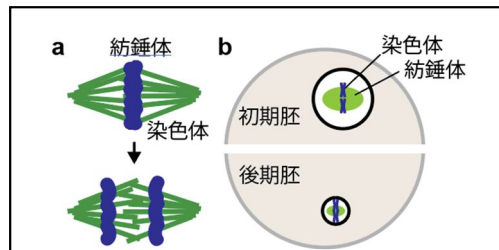


図1 紡錘体のロバストで柔軟な集合と機能 (a) 染色体分配は、微小管を基礎とした紡錘体の適切な集合と機能に依存する。(b) 初期胚発生において、細胞は紡錘体のサイズを自らにスケールしながら染色体分配を達成する。紡錘体の柔軟なサイズ調節と安定な機能発現を支える細胞骨格メカニズムは分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、この紡錘体のロバストで柔軟な集合と機能が生み出されるしくみを、研究代表者が持つ独自の力計測・操作手法を用いて明らかにすることを目的とした。特に、研究代表者の2つの先行研究(Shimamoto et al., Cell 2011; Shimamoto et al., Dev Cell 2015)から導き出された仮説「分子モーターキネシン5が紡錘体のサイズを制御するスケーリング因子として作用している」ことを中心に据え、紡錘体の力学特性を定量マイクロマンピュレーションと蛍光イメージングによって解析することでメカニズムの理解を進めることを目指した。

### 3. 研究の方法

紡錘体のロバストで柔軟な構造と機能が発現するしくみを分子レベル、細胞レベルで明らかにするために、以下の方法によって研究を推進した。

#### (1) 紡錘体のシステムメカニクスの解析

紡錘体の力学特性を高時空間分解能で決定するための顕微力学計測システムを開発した(図2)。このシステムは、力が校正されたガラス製ファイバー(直径 $\sim 1\mu\text{m}$ )とスピニングディスク式共焦点イメージング装置を組み合わせたものであり、紡錘体各部の微小管動態を可視化しながら局所の発生力を定量することができる。力の大きさは、ファイバー先端の屈曲変位とあらかじめ校正された弾性定数から Hooke の法則によって計算される。微小管動態は、蛍光チューブリンを微小管一本当たり最大で一分子が取り込まれる量を添加し、輝点の運動をタイムラプス追跡することで解析できる。紡錘体は、アフリカツメガエル卵から調製される細胞質エクストラクト内で Cell-free 形成することで、計測プローブと細胞膜の間に生じる物理的干渉を排除した。計測は、紡錘体の注目する部位(赤道面、極など)にマイクロニードル先端を挿入し、材料科学で用いられるレオロジー解析手法(動的粘弾性測定法)を応用して正弦波状に変動する力と微小管運動の時空間相関を解析することで、紡錘体を持つ局所の硬さと粘弾性を決定した。さらに紡錘体の局所物性を制御する分子要素を同定するため、小分子阻害剤やリコンビナントタン

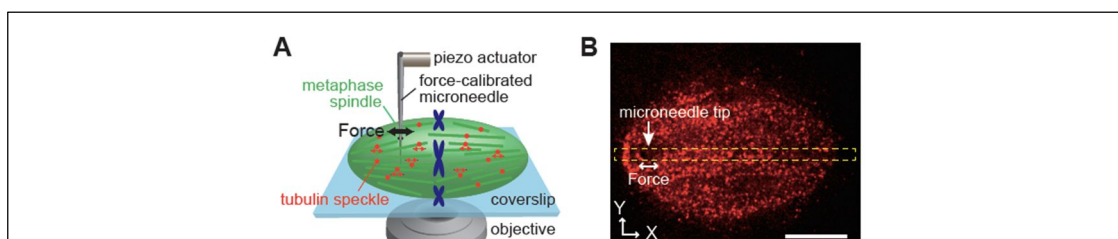


図2 紡錘体の局所力学特性を解析するための顕微力学計測装置

(A) 装置の模式図。細胞質エクストラクト内で形成した紡錘体にマイクロニードルの力計測プローブを挿入し、力に対する微小管ネットワークの運動性の変化を局所解析することができる。(B) 紡錘体の共焦点蛍光像。微小管に取り込ませたチューブリンサブユニットの蛍光輝点(赤)を追跡しながら、マイクロニードル先端(白矢印)で発生力を計測する。力と位置変化の時空間相関から、構造の硬さと粘弾性を決定することができる。

パク質による阻害実験を行った。特に注目するキネシン5の機能については、アロステリックにモーター活性を阻害する monastrol を用いてその効果を解析した。

## (2) キネシン5の分子メカニクス解析

本研究で着目するキネシン5の力学特性を分子レベル明らかにするため、精製したキネシン5と2本の微小管を用いて紡錘体の構造モジュール(赤道面付近の反平行微小管束など)を *in vitro* 再構成し、隣接する微小管の間に発生する力を光ピンセットを用いて計測する実験系を立ち上げた。このアッセイにおいて、一方の微小管はビオチン化チューブリンを共重合させ、アビジンを経由してガラス面に固定される。他方の微小管は、微小管結合タンパク質をコートしたマイクロビーズを経由して光ピンセットで捕捉される。これらの微小管は溶液中に共存させたキネシン5によって架橋され、モーター部位の力発生に伴って滑り運動を引き起こす。解析は、特に胚発生に伴って推移するキネシン5の個数に着目し、溶液中のキネシン5濃度に依存した微小管の運動駆動力の変化を解析した。

## (3) 初期胚発生における紡錘体の力学ステータスの解析

胚発生のステージ毎に紡錘体の力学特性がいかに推移するかを実験的に捉える研究を計画した。具体的には、アフリカツメガエルをモデルに、メスの未受精卵にオス精子を付着させることで胚発生を誘起し、発生の各ステージで細胞質エクストラクトを作製、紡錘体を形成させ、開発したマイクロニードルの顕微力学計測システム(図2)を使って紡錘体の力学特性を定量決定することを試みた。これにより、胚発生の進行に応じて紡錘体のサイズと力学特性がいかに関係して変化するかを定量的に捉えることを目指した。研究は、細胞質エクストラクトのバッチによって計測される紡錘体の力学特性にばらつきが生じることがわかったため、これを解決するためのサンプル凍結技術を新たに開発した(後述)。

## 4. 研究成果

### (1) 紡錘体が持つ力学的不均質性の発見とその分子起源の同定

マイクロニードルの力計測ツールに高解像の蛍光イメージングを融合し、紡錘体を形成する微小管の局所的な運動とその変動を単一ポリマーレベルで追跡することに成功した(Takagi et al., *Dev Cell* 2019)。この方法を用いて、紡錘体の極や赤道面付近の微小管ネットワークの硬さと粘弾性を定量計測し、紡錘体が染色体の運搬軸方向について高度の力学的不均質性を持つことを発見した(図3)。特に、紡錘体の硬さは、極、赤道面、極と赤道面の間領域、の順に高く、また構造の粘弾性は赤道面に近づくにつれてより粘性的、流体的になることがわかった。さらにマイクロニードルを用いた紡錘体全長の摂動実験系を確立し、紡錘体のサイズ変化と共役して、極と赤道面間の微小管アレイ(物性解析により最も軟らかな構造を持つことがわかった部位)が主体的に滑り運動することがわかった。この結果は、長年有力であった紡錘体モデルから予測される微小管運動、すなわち赤道面付近の微小管アレイが紡錘体全長の変化と共役して滑り運動するしくみ、とは質的に異なるものであった。さらに monastrol と p150-CC1 によるキネシン5とダイニンの分子阻害実験により、紡錘体が持つ局所の力学的不均質性はこの2種類の分子モーターによって生み出されていることが示唆された。以上の結果は、染色体の捕捉と牽引の足場となる赤道面付近の微小管ネットワークの力学的安定性を維持しながら極間距離を柔軟に調節する性質とその分子起源を明らかにしたものである。この研究により、紡錘体はその全長を環境に応じて柔軟に調節しながら染色体分配機能を堅牢に保つしくみを提唱した(Takagi et al., *Dev Cell* 2019)。

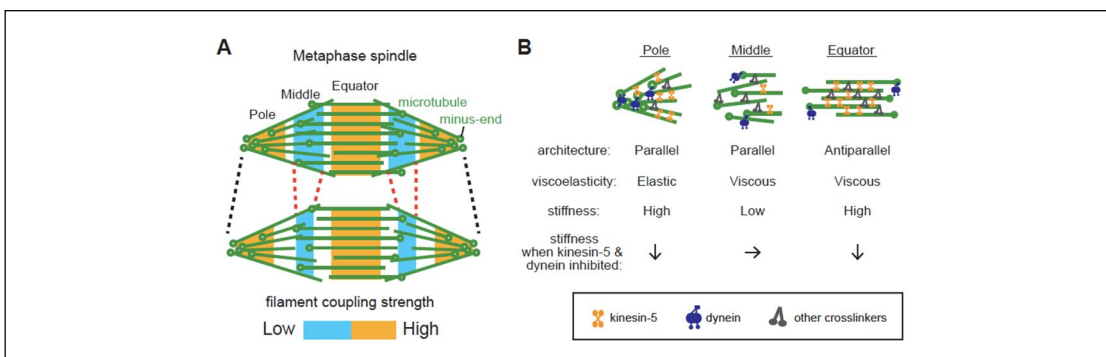


図3 紡錘体の局所力学アーキテクチャ

(A)長さ制御モデル。紡錘体は短い微小管がオーバーラップすることで形成され、赤道面と極付近の微小管アレイをそれぞれ安定に維持しながら(橙色)その中間の軟らかな微小管アレイ(水色)を滑り運動させることで全体の長さを調節する。

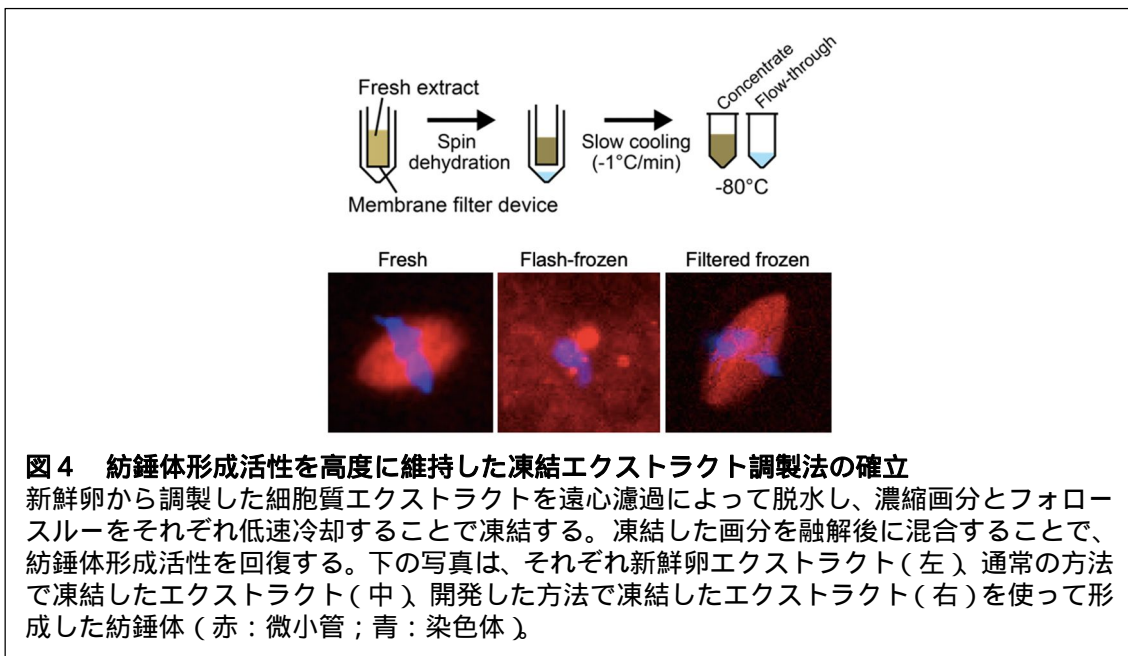
(B)紡錘体各所で形成される微小管ネットワークの構造アーキテクチャと物性。それぞれの微小管アレイはキネシン5(橙色)とダイニン(藍色)によって異なる様式で架橋され、特徴的な硬さと粘弾性を生み出す。

### (2) キネシン5の多分子化によって生まれる創発的力学特性の解析

開発した *in vitro* 再構成アッセイを使って取得したキネシン5の数密度依存的な発生力データの解析により、反平行に相互作用する2本の微小管を架橋しながらキネシン5が多分子で発生する力は、局在するキネシン5の密度に依らず同等の加算性を示すことがわかった(未発表)。この実験はキネシン5の液中濃度が0.1nM~1nMのレンジで行ったものであり、微小管に局在したときの平均の分子間距離は数100nmと見積もられた。より高い分子濃度領域については、微小管が観察フローセルのガラス面上にランディングする前に溶液中で凝集塊を形成し、力計測を行うことが困難であることがわかった。今後、観察と同時にバッファ交換が可能なフローセル等を用いて微小管構造の形成後にキネシン5濃度を変化させるなどの工夫をし、高いキネシン5濃度における力の加算性を検証する。また、特に研究成果(1)で示唆された平行微小管束におけるキネシン5の機能にも着目し、その力学特性の解析をさらに進める予定である。

### (3) 胚発生時の紡錘体力学計測データのばらつきを低減するためのサンプル凍結手法の開発

胚発生の各ステージにおける紡錘体の力学特性の定量化を進めるにあたり、同一の発生ステージにおいてもエクストラクト調製ごとに計測データのばらつきが大きく、ステージ間での比較を行うにあたり大きな障害となることがわかった。これを解決するため、調製した細胞質エクストラクトを高活性で凍結保存できる方法を開発した(図4)(Takagi et al., Mol Biol Cell 2017)。エクストラクトの凍結保存法はこれまでも存在していたが、紡錘体形成活性を維持可能な方法は皆無であった。生体サンプルを凍結保存する際に重要な点は、細胞内での水の結晶化を防ぐことにある。これは通常、サンプルを-1℃/分で低速冷却することで細胞を脱水し、細胞質をガラス化することによって達成される。これを細胞膜フリーのエクストラクト系で実現するため、(1)遠心濾過フィルタを使ったエクストラクトの脱水と、(2)その後の低速冷却、による2ステップの凍結方法を開発した。遠心速度、遠心時間、サンプル体積等を最適化することで、凍結・融解したエクストラクト内での紡錘体形成が、新鮮卵から調製したエクストラクトと同頻度で行えるようになった。さらにこの凍結エクストラクトを使用することで多数の紡錘体サンプルから力学計測データを取得できるようになり、データ間のばらつきに埋もれた紡錘体サイズと力学特性の特徴的な相関関係を見出した。今後、この方法を使って発生の各ステージにおける凍結エクストラクトを作製し、紡錘体の力学特性が発生に伴っていかに推移するかを詳細に解析評価していく予定である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kimura Kenji, Mamane Alexandre, Sasaki Tohru, Sato Kohta, Takagi Jun, Niwayama Ritsuya, Hufnagle Lars, Shimamoto Yuta, Joanny Jean-François, Uchida Seiichi, Kimura Akatsuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Endoplasmic-reticulum-mediated microtubule alignment governs cytoplasmic streaming	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 399 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncb3490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takagi Jun, Shimamoto Yuta	4. 巻 28
2. 論文標題 High-quality frozen extracts of <i>Xenopus laevis</i> eggs reveal size-dependent control of metaphase spindle micromechanics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2170 ~ 2177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E17-03-0174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chang Chih-Chia, Huang Tzu-Lun, Shimamoto Yuta, Tsai Su-Yi, Hsia Kuo-Chiang	4. 巻 216
2. 論文標題 Regulation of mitotic spindle assembly factor NuMA by Importin-	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3453 ~ 3462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201705168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yuta Shimamoto, Tarun M. Kapoor	4. 巻 145
2. 論文標題 Analyzing the micromechanics of the cell division apparatus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 173-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mcb.2018.03.022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jun Takagi, Ryota Sakamoto, Gen Shiratsuchi, Yusuke T. Maeda, Yuta Shimamoto	4. 巻 49
2. 論文標題 Mechanically Distinct Microtubule Arrays Determine the Length and Force Response of the Meiotic Spindle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 267-278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2019.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 8件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 有糸分裂モーターキネシン5の協同的な力発生と紡錘体サイズ制御のメカニズム
3. 学会等名 日本細胞生物学会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 有糸分裂紡錘体の集合と機能メカニクス
3. 学会等名 細胞を創る研究会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jun Takagi, Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Preparing frozen Xenopus egg extracts for the study of spindle assembly mechanisms
3. 学会等名 American Society for Cell Biology 2017 Annual Meeting(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata, Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Micromanipulating the spindle to study chromosome segregation in anaphase
3. 学会等名 Biophysical Society 62nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Micromechanics of cell division: Deciphering the forces that drive spindle assembly and function
3. 学会等名 UT Southwestern seminar (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jun Takagi, Yuta Shimamoto
2. 発表標題 In-situ force assay reveals mechanical heterogeneity and roles of parallel microtubule arrays in governing meiotic spindle length
3. 学会等名 American Society for Cell Biology 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 in-vitro再構成とin-situ計測が明らかにするメソスケールの紡錘体メカニクス
3. 学会等名 第8回分子モーター討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Mechanical design principles of the cell division apparatus
3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Probing the local mechanical architecture of the metaphase meiotic spindle
3. 学会等名 17th International Xenopus Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Examining the meiotic spindle micromechanics using cell-free extracts and quantitative micromanipulation
3. 学会等名 Japanese Biochemical Society 92nd Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Shimamoto
2. 発表標題 Probing the local mechanical architecture of the vertebrate metaphase spindle
3. 学会等名 American Society for Cell Biology 2019 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 島本勇太
2. 発表標題 紡錘体の構築原理と力学デザイン
3. 学会等名 第37回 染色体ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アフリカツメガエル卵抽出液の冷凍保存方法及び冷凍保存用キット、アフリカツメガエル卵濃縮抽出液、並びに細胞周期の分析方法	発明者 島本勇太、高木潤	権利者 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/002546	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アフリカツメガエル卵抽出液の冷凍保存方法及び冷凍保存用キット、アフリカツメガエル卵濃縮抽出液、並びに細胞周期の分析方法	発明者 島本勇太、高木潤	権利者 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、2018-564660	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----