

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870013

研究課題名（和文）

細胞質分裂期の中央紡錘体形成機構の研究

研究課題名（英文）

Molecular mechanism of the central spindle formation during cytokinesis.

研究代表者

上原 亮太 (Uehara Ryota)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：20580020

研究成果の概要（和文）：

染色体分配と細胞質分裂の正確な時空間的連携は分裂期後期に形成される「中央紡錘体」によって制御されるが、その形成メカニズムは未解明であった。

本研究では分裂細胞内の微小管の形成過程を可視化するアッセイを開発し、中央紡錘体微小管形成が主に分離した染色体の間の領域の染色体近傍で行われることを突き止めた。分子細胞生物学的解析によって、該当領域に新規の微小管形成中心が存在することを明らかにし、その形成に携わる機能分子として、微小管制御因子のオーグミンおよびHURPを同定した。この新規の微小管重合経路を特異的に阻害すると中央紡錘体形成および細胞質分裂の完了における架橋切断反応が阻害されたことから、今回発見した微小管形成経路が機能的な中央紡錘体の形成に必須の役割を果たすことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

The central spindle forms between segregating chromosomes during anaphase and is required for proper coupling of karyokinesis and cytokinesis. It remains largely unknown how this microtubule-based structure is prepared during anaphase. Using live imaging of MT plus ends and a MT depolymerization and regrowth assay, we show that *de novo* MT generation in the interchromosomal region during anaphase is important for central spindle formation in human cells. Generation of interchromosomal MTs and subsequent formation of the central spindle require augmin, a protein complex implicated in nucleation of noncentrosomal MTs during pre-anaphase. MTs generated in an HURP-dependent manner during anaphase also contribute to central spindle MT formation redundantly with pre-anaphase MTs. Based upon these results, I could established a new model for central spindle assembly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞分裂、細胞質分裂、紡錘体、微小管、生細胞観察

1. 研究開始当初の背景

| 細胞分裂期に核分裂ののちに細胞を二つの

独立した娘細胞に分離する細胞質分裂は、遺伝情報の継承のために必須の現象である。細胞質分裂の制御異常は細胞の癌化の原因になることも示唆されており、その制御機構を分子レベルで明らかにすることは生物学、医学の重要課題である。

分裂期後期に分離した染色体の間に一過的に形成される「中央紡錘体」は、細胞質分裂開始のシグナル伝達経路の足場を提供することで、核分裂と連携した細胞質分裂の開始、完了の制御を可能にしている。中央紡錘体微小管は平行に配向し、高度に束化されている点で分裂期中期までの紡錘体微小管とは性質が大きく異なる。現在までに同定されている中央紡錘体形成因子はほとんどが微小管の束化に関するものであり、束化の仕組みの理解が進む一方で、それらの微小管がいつどこで用意されるかに関する知見の蓄積が著しく乏しかった。最近、申請者はヒト培養細胞において、中心体に依存しないスピンドル微小管形成に関与する新規タンパク質複合体オーグミンを同定した。さらにオーグミンに依存した微小管形成が、中央紡錘体形成に必要であることを世界に先駆けて明らかにした。これは微小管形成因子が中央紡錘体形成に関与することを示した初めての例で、分裂期後期以降にオーグミンに依存して起こる微小管重合が中央紡錘体形成の重要なステップになっている可能性が示唆された。オーグミンが分裂期後期の細胞内においてどのように微小管を生み出すかを調べることで、中央紡錘体の形成過程全容の分子基盤を明らかにできると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、分裂期細胞内の微小管形成過程の可視化アッセイ、およびオーグミンを始めとする細胞質分裂関連因子の機能解析を通じて、以下の3点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 中央紡錘体微小管が形成される過程の詳細かつ正確な記述
- (2) 中央紡錘体を構成する微小管が生成される分子機構の解明
- (2) 中央紡錘体微小管形成の時空間制御機構の解明

## 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 HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は DME 培地中で摂氏 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。

(2) 中央紡錘体微小管形成過程の可視化実験  
GFP-チューブリン発現 HeLa 細胞が分裂期後期にはいるタイミングで、細胞培養液に 100 ng/ml ノコダゾールを添加し、20 分間氷冷することで、細胞内の微小管をすべて脱重合した。その後ノコダゾール不含の 37 度に暖めた DME 培地によって細胞を洗浄し、再び微小管を重合させた。微小管の再重合過程は下記の方法により、生細胞観察もしくは固定試料観察を行った。

### (3) 抗体

中央紡錘体形成に関わる標的遺伝子産物について蛍光抗体法を用いた細胞内局在およびウェスタンブロット解析を用いた発現量解析のために、標的遺伝子産物を認識する抗体を作成した。標的遺伝子産物を大腸菌を用いて大量発現、精製し、ウサギに免疫することで、抗血清（抗オーグミン抗体三種類）を得た。

### (4) 細胞観察

細胞観察は、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 GFP-チューブリンの挙動を観察することにより行った。固定観察の場合は、細胞を 3.2%もしくは 6.4%パラホルムアルデヒド含有緩衝液で固定後、0.5%SDS もしくは 100 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。

## 4. 研究成果

### (1) 中央紡錘体微小管形成過程の発見

生細胞観察と、微小管脱重合再重合アッセイを組み合わせ（図 1）、分裂細胞内の微小管の形成過程を可視化することで、中央紡錘体微小管形成は主に分離した染色体に挟まれ



図1. 微小管再重合アッセイ

た領域の染色体近傍で行われることを突き止めた (図 2)。微小管形成因子の  $\gamma$ -チュー

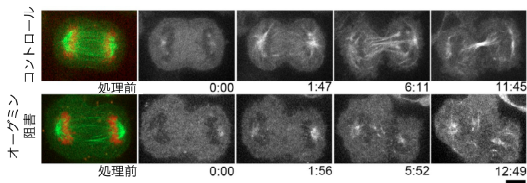


図2. 中央紡錘体微小管は分離染色体間で形成される。右下：再重合時間。バーは5  $\mu$ m。

ブルインがこの領域に濃縮することを見出し、該当領域に新規の微小管形成中心が存在することが明らかになった。また、この新規の微小管重合経路を特異的に阻害すると中央紡錘体形成および細胞質分裂が阻害されたことから (図 2)、今回発見した微小管形成経路が機能的な中央紡錘体の形成に必須の役割を果たすことが分かった。これは、中央紡錘体が分裂期後期以前に作られた微小管がそのまま使い回しにされて作られるとする従来の定説と全く異なるものであり、中央紡錘体形成機構に関して重要で新しい知見を得ることができた。

### (2) 中心体、ゴルジ体の関与に関して

中心体およびゴルジ体は微小管形成因子として微小管構造の形成に重要な寄与をすることが知られている。本研究では遺伝子阻害実験により、両細胞構造の中央紡錘体形成への寄与を調べた。中心体機能に必須の因子 PLK1 の機能を阻害剤を用いて阻害した場合に微小管脱重合再重合アッセイを行うと、PLK1 阻害条件においても中央紡錘体形成が起こることが明らかになった。またゴルジ体からの微小管形成に必要な因子である GCC185 を RNAi で阻害した場合でも微小管脱重合再重合アッセイで中央紡錘体微小管が形成された。これらの結果から中心体およびゴルジ体の中央紡錘体微小管形成への寄与は限定的であることが示唆された。

### (3) 新規中央紡錘体微小管形成因子の同定

上記の分裂後期細胞を用いた微小管脱重合再重合アッセイに RNAi による遺伝子阻害実験を組み合わせて、新規中央紡錘体微小管形成に関わる因子の同定を試みた。その結果、微小管形成因子のオーグミンおよび HURP が後期に起こる中央紡錘体微小管の形成に重要な役割を果たすことが明らかになった (図 2 および図 3)。具体的にはオーグミンを阻害すると、染色体近傍における  $\gamma$ -チューブリンの特異的濃縮が消失し、中央紡錘体微小管の形成が抑制された。HURP を阻害した場合には細胞分裂後期以前に形成された微小管を人為的に一旦脱重合した条件でのみ中央紡

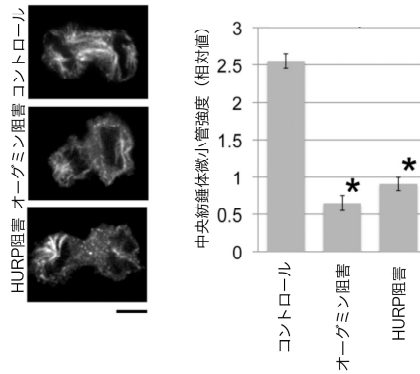


図3. 新規中央紡錘体微小管形成へのオーグミン、HURPの関与  
左：微小管脱重合再重合アッセイ後に細胞を固定し、微小管を染色した。RNAiによりオーグミンもしくはHURPを阻害した場合細胞中央部、染色体近傍における微小管形成が著しく阻害された。  
右：微小管重合の程度を定量化した。中央部と極における微小管量の比をあらわす。アスタリスクはコントロールとの有意差を示す。バーは5  $\mu$ m。

錘体形成が阻害されることが分かった。このことから、HURP 依存的な染色体近傍の微小管重合と分裂期後期以前に形成された微小管がリダンダントな経路を形成して中央紡錘体形成に寄与していることが明らかになった。これらの発見をもとに中央紡錘体形成に関する新しい分子メカニズムのモデルを提唱した (図 4)。

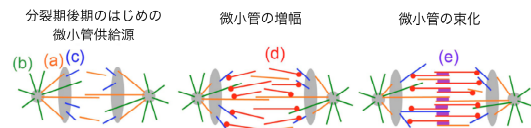


図4. 今回の研究をもとに提唱した中央紡錘体形成モデル  
中央紡錘体形成時、細胞には分裂後期までに形成された微小管(a)、中心体依存的に形成される微小管(b)、および染色体近傍で形成される微小管(c)が存在する。オーグミンは既存の微小管に依存して微小管を増幅すると考えられ、aからcの微小管を鋳型にして中央紡錘体微小管の増幅を行う(d)。これらの過程により用意された微小管は既知の微小管束化過程を経て高度に束化された微小管バンドルとなり細胞質分裂制御機能を発揮する。

さらに、今回発見した新規の微小管重合系に依存した中央紡錘体形成経路が、どのように細胞質分裂の制御に関わるかを明らかにするために、長時間生細胞観察を行ったところ、新規の微小管重合系によって分裂細胞中央に形成される機能的な微小管構造が、収縮運動後の細胞架橋の切断反応に必要であることを見出した。さらに細胞質分裂を制御する種々の因子の細胞内局在を間接蛍光抗体法により調べたところ、新規の微小管重合系の機能を阻害した場合、細胞架橋切断反応の足場を提供する微小管結合タンパク質の分裂期キネシンの集積に顕著な異常が生じることがわかった。以上の結果から細胞質分裂の終了の制御に特化した微小管構造による足場因子の局在制御が細胞質分裂の完了に必須の役割を果たすことが明らかになった。

### 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2件)

① 上原亮太、五島剛太

Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase.

Journal of Cell Biology 査読有 191 巻、2010、259-267

② 上原亮太、五島剛太

分裂期スピンドル形成における微小管生成機構 細胞工学 査読なし 29 巻、2010、885-889

〔学会発表〕(計1件)

① 上原亮太、五島剛太

De novo central spindle microtubule generation for cytokinesis.

第50回 米国細胞生物学会年会、2010、12月11日から15日 米国 フィラデルフィアコンベンションセンター

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://bunshi4.bio.nagoya-u.ac.jp/~tenure2/goshima.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原亮太 ( Uehara Ryota )

名古屋大学 理学研究科・助教

研究者番号: 20580020

(2) 研究分担者なし

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者なし

( )

研究者番号: