

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 27 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：2015～2016

課題番号：15H06270

研究課題名(和文) 微小管形成中心のダイナミクス制御機構とその生理的役割の解明

研究課題名(英文) Regulation of the dynamics of microtubule organizing centers and its physiological function

研究代表者

渡邊 定則 (Watanabe, Sadanori)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：00754417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：2つの中心体で制御される体細胞分裂と異なり、減数分裂や癌細胞等では、微小管形成中心が多く存在しながらも、統御された微小管増幅により二極性紡錘体が構築される。この多くの微小管形成中心を制御し紡錘体へ組み込む機構や重要性は不明な部分が多い。本研究は、複数の微小管形成中心をもつマウス初期胚の細胞分裂に着目し、この過程を効率的に観察するイメージング方法を開発するとともに、その機構や分子の重要性を、欠損マウスと中心体数を操作する細胞実験系により検証した。その結果、オーグミンを中心とする分子経路が、複数の微小管形成中心を収束させ二極性細胞分裂を誘導するのに必須なこと、さらに初期胚の発生に必須な事を発見した。

研究成果の概要(英文)：Unlike normal somatic cell division, oocytes or some types of cancer cells employ an atypical mechanism for mitotic spindle assembly, in which more than 3 acentriolar microtubule-organizing centers (MTOCs) are initially formed and are then clustered into two spindle poles by poorly understood mechanisms. Herein, by construction of a knockout mouse and a new imaging system for efficiently observing many cell divisions in embryos, we demonstrate that MTOC clustering and the cell division during the blastocyst stage requires augmin, a critical factor for MT-dependent MT nucleation within the spindle. A similar clustering defect was induced in cultured cells with artificially controlled numbers of centrosomes when augmin pathway was inhibited. These data suggest that the unique onset of mitosis with numerical MTOCs is turned into a typical bipolar division through augmin-dependent intra-spindle MT assembly, and that augmin is essential for mouse embryonic development.

研究分野：細胞生物学、発生学

キーワード：微小管 微小管形成中心 細胞分裂 紡錘体 初期発生

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂では、微小管からなる紡錘体が二極性に形成されることで、染色体の正確な分離が保障されている。この二極性の確立は分裂成功に必須なもので、通常、体細胞分裂では2つある中心体がそれぞれ両極に位置し、微小管形成中心として働くことで、二極性が確保される。しかしながら、この例にもれるケースが存在する。哺乳類の減数分裂や初期発生の際には中心体が存在せず、代わりに多数の点在する微小管形成中心がクラスター化され、最終的に二極化される。また、多くが染色体異数性の肝細胞(多倍体)や、咽頭・乳癌等の癌細胞では、同様に複数の中心体がそれぞれ2極に集極する形式で分裂し細胞生存が可能となるだけでなく、さらには染色体対合異常を介し、染色体不安定性にもつながる原因とも考えられている。二極性紡錘体構成のための微小管形成の経路としては、これまで、上述の中心体を介する経路がよく研究されてきたが、近年、8つのサブユニットからなるオーグミン複合体によって制御される中心体非依存的な微小管形成経路の重要性が明らかになってきた。しかしながら、そのメカニズムはいまだに不明な部分が多く、哺乳類における中心体非依存的な微小管形成経路の生理的な重要性も検証が十分なされていない。また、減数分裂や初期発生時の分裂の様式やその分子メカニズムについても、未だ多くが不明なままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、複数の微小管形成中心から駆動されるマウス初期胚の細胞分裂に着目するとともに、培養細胞及びインビトロの実験と組み合わせた新たな実験系を構築することで、1)微小管形成中心の動態の可視化、2)微小管増幅の調節メカニズムの解明、3)微小管形成中心の動態制御の初期発生での役割の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)マウス

微小管可視化レポーターマウス(R26 EGFP-Tuba)、微小管依存的微小管増幅の因子オーグミンのコアサブユニット(aug6/Haus6)のエクソン1領域の相同組み換えを行ったHaus6(loxP)マウス、また同領域に挿入したNeo耐性遺伝子の除去のためのCAG-Flpeマウス、上記2つの交配により得られたHaus6<sup>Flox</sup>マウス、さらにEIIA-Creとの交配により得られた全身性欠損のHaus6<sup>KO</sup>マウスを用いた。

### (2)細胞及び初期胚への遺伝子導入

NIH3T3, HeLa, RPE1の細胞を用いた。細胞への遺伝子導入のためには、Lipofectamine

RNAiMAX, Lipofectamine 3000 (Invitrogen) 及びNucleofectorII (Lonza)を用いた。

初期胚への遺伝子導入は、交配及びIVFにより得た初期胚とInVitro合成精製したmRNAを用い、NEPA21エレクトロポレーター(ネッパジーン)に接続したマイクロチャンバー内のマイクロドロップ上にて行った。

### (3)ゲノム編集

細胞のゲノム編集は、px459v2(Addgene)のプラスミド上に、標的遺伝子にデザインしたsgRNA配列を組み込み、Cas9と同時にsgRNAを発現する方法、もしくはエレクトロポレーションにより、合成したsgRNAとCas9のmRNA、また別法としてRNAとタンパク質の複合体を導入する方法によって行った。

### (4)細胞及びマウス初期胚のイメージング

細胞及び初期胚の観察は37°C、5%CO<sub>2</sub>の環境下で40x, 60x, 100x対物レンズを装着したスピニングディスク型共焦点顕微鏡、スキャン型共焦点顕微鏡によって行った。

初期胚の観察のためには、ガラスボトムディッシュ上パラフィンオイル内に作った培養液のマイクロドロップに胚を移して観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1)微小管増幅の調節メカニズムの解明

中心体非依存的な微小管生成のメカニズムを調べるため、UCSDとの共同研究によりPlk4特異的阻害薬(Centrinone)により中心体を可逆的に消失させるシステムを導入した。これにより中心体消失細胞を誘導し、RNAiにより中心体をもたない細胞の細胞分裂に重要な役割候補因子の探索を行った。その結果、いくつかの細胞骨格制御因子の枯渇の場合には正常細胞及び中心体消失細胞のどちらでも細胞分裂失敗の表現型を呈するのに対し、中心体マトリックス(PCM)の因子のCDK5RAP2及びPCNTの場合には、中心体消失細胞の細胞分裂にのみ、特に顕著な表現型を示した。さらに、上記2因子を欠損する細胞を樹立して、中心体消失の誘導を行ったところ、増殖の著しい低下を認めた。また中心体消失細胞では、上記2因子の阻害により、二極性紡錘体形成及び分裂期微小管生成が阻害された。現在、これらの因子に着目しつつ、さらに他の重要な因子についても探索・解析を進めている。

### (2)微小管形成中心の動態の可視化

中心体マテリアル(PCM)の因子CEP192に内在性に蛍光タンパク質を融合させた細胞を用いて観察を行ったところ、通常の細胞では、予想通り、間期から中心体上にシグナルが継続的に観察されたのに対し、中心体消失細胞の細胞分裂時には、間期では見られないクラスター化がおり、かつ紡錘体極へと

集まる様子が観察された。そこで、中心体消失細胞での分裂期での各種分子の局在を検討したところ、PCM の他の多くの因子や微小管形成中心の因子も共局在していた。また、上述の2因子を阻害するとこれら分子群のクラスター化がみられなくなることから、PCM の因子群が、中心体構造非依存的に微小管形成中心を誘導する因子と考えられ、現在この詳しい性状・機構について解析を進めている。

また、中心体が存在せず、微小管形成中心が多く存在するマウス発生初期の細胞分裂に着目した。GFP-tubulin レポーターマウスの初期胚を微小管重合阻害及び低温処理することで、細胞分裂が同調した形で微小管が再重合しスピンドル構築を誘導し観察できる「同調初期胚スピンドル微小管再重合アッセイ」を確立した。これをスピニングディスク共焦点顕微鏡で三次元観察することにより、初期胚の様々な位置にある細胞の分裂期の微小管やスピンドル動態を一挙に観察し定量的解析を行うことが可能になった (Fig.1)。

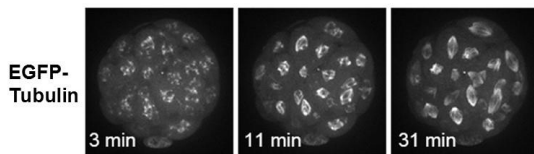


Fig.1 同調初期胚スピンドル微小管再重合アッセイにより複数の同調的に進行する細胞分裂の様子

### (3) 微小管形成中心の動態制御の発生での役割の解明

既に樹立していたオーグミン欠損 (Haus6 KO) マウスや各種阻害薬を上述のアッセイに供することで、発生におけるオーグミン経路の重要性を検証した。その結果、オーグミンがマウス初期胚の発生に重要であること、また初期胚のスピンドルの微小管生成及び微小管形成中心のクラスター化に重要であること (Fig.2)、スピンドルが二極化する途中にできる中間体の複数の「ミニスピンドル」がキネシン Eg5 のモーター活性を介して集極化することが明らかになった。

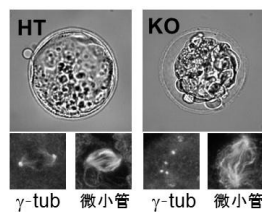


Fig.2 オーグミン欠損による初期発生の異常と胚内部の細胞分裂時の微小管形成中心配置異常

さらに、PLK4 を強制発現し微小管形成中心 (中心小体/中心体) を増幅した培養細胞を用いて上記と同様のアッセイを行うことにより、微小管形成中心が複数存在する状況でも、

オーグミンを介するスピンドル内微小管生成及び Eg5 が微小管形成中心の集極化に重要であること、また一方で、オーグミンの阻害によっておこる微小管形成中心の散乱が、微小管形成中心での微小管生成の阻害により抑制できることも明らかになった。またγチューブリンやNEDD1の阻害による全体的な微小管生成の抑制では、微小管形成中心の阻害散乱は起こらなかった。以上のことから、オーグミンにより、微小管生成が微小管形成中心の部位だけでなく、スピンドル内部でも起こることにより、微小管形成中心が集極され、そして二極性のスピンドル形成が誘導されることが示唆された。これらの知見とモデルを論文として発表した (Fig.3)。

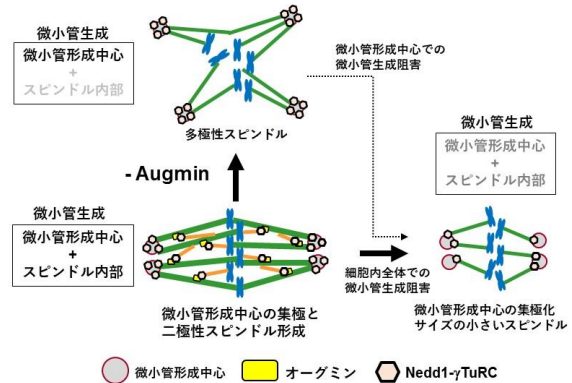


Fig.3 複数の微小管形成中心が集極化する機構のモデル

また、微小管形成中心制御因子の生理的意義の検討のため、Haus6 ターゲットマウスとCAG-FLPe マウスを交配することで、オーグミン (Haus6) の条件欠損マウスを構築した。HAUS6 条件欠損マウス (Haus6 Flox) が、見かけ上正常に生育し妊孕性を確認したため、HAUS6 KO マウスとともに、活用可能なバイオリソースとして国内機関に登録した (登録済バイオリソース)。このオーグミン (Haus6) の条件欠損マウスを用いて、共同研究により組織特異的オーグミン欠損マウスを作出した。現在ホモ交配を行い表現型の詳細な検討を進めている。

### 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 1件)

Watanabe S\*, Shioi G, Furuta Y, and Goshima G\* Intra-spindle microtubule assembly regulates clustering of microtubule-organizing centers during early mouse development

Cell Reports (2016) 15, 54-60 査読有

\*責任著者

〔学会発表〕（計 0件）

〔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>

〔登録済バイオリソース〕

(1) Haus6 KO マウス : CDB1355K

<http://www2.clst.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html>

(2) Haus6 (LoxP) マウス : CDB1218K

[http://www2.clst.riken.jp/arg/mutant\\_list\\_file/CDB1218K.html](http://www2.clst.riken.jp/arg/mutant_list_file/CDB1218K.html)

(3) Haus6 Flox マウス : RBRC09630

[http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?reg\\_no=RBRC09630](http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?reg_no=RBRC09630)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 定則 (Watanabe Sadanori)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号 : 00754417

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )