

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19362

研究課題名(和文) 分裂期染色体のマイクロメカニクス

研究課題名(英文) Micromechanics of the mitotic chromosome

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞分裂時の遺伝的フィデリティを保證するメカニズムを、染色体の力学特性に着眼して解明することを目的とした。染色体に生じる数的・構造的異常は、細胞のがん化と関連する重要な形質である。これら異常の多くが染色体に作用する力と関係すると考えられているが、力が染色体の構造と機能に及ぼす影響を及ぼすかについての定量的知見は乏しかった。そこで、分裂期染色体の標的部位に力を与えてその影響を解析できる顕微鏡システムを開発し、染色体が持つ構造力学特性を蛍光可視化解析した。その結果、動原体(染色体上の重要な力点構造)が持つ弾性的で柔軟な変形特性と、より遠位の部位が持つ堅牢な性質を示す結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報のキャリアである染色体に生じる機械的欠陥は、がんなどの重要な疾患と関連する。本研究で開発した分裂期ヒト染色体の顕微力学計測・操作システムは、染色体が持つ機械的性質を単一オルガネラレベルで直接、定量的に解析評価することを可能にしたものである。染色体が分裂期の細胞内で機械的なシグナルや摂動を受けながらそのインテグリティを維持するための物理的・分子的基盤が明らかになることで、遺伝的フィデリティの維持メカニズムについての根本的な理解が可能となり、得られた知見は新たな疾患治療戦略創出の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanical properties of the human mitotic chromosome, in the light of elucidating the physical and molecular basis ensuring the genomic fidelity in cell division. Instabilities in chromosome number or structure are linked to life-threatening diseases such as cancer. We know that these instabilities are related to physical force that acts on chromosomes in cell division, but how force indeed impacts the chromosome dynamics remains poorly understood. We address this issue by developing a microneedle-based quantitative micromanipulation setup that allowed us to apply controlled force to specific loci on chromosomes. Our data suggest that the region around the kinetochore, which is the structural hub connecting the spindle apparatus with the chromosome, is soft and elastic, being easily deformable against a pulling force but restoring its original shape upon removal of the force. We also observed a robust deformation mechanics at a site distant to the kinetochore.

研究分野：生物物理学

キーワード：染色体 紡錘体 動原体 細胞分裂 力計測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

染色体に生じる数的・構造的異常は細胞のがん化と関連する重要な形質であり、その多くが細胞分裂期に生じる染色体の不等分配や断片化に起因すると考えられている。特に興味深いのが、これらの異常は染色体の周囲ではたらく細胞内の力と強く関係していることである。例えば染色体の数的異常は紡錘体の発生力を利用したエラー検知メカニズム(紡錘体チェックポイント)の破綻によって生じ、これは染色体の動原体部位周辺に生じる変形が基礎となっている。また、染色体構造の断片化は chromothripsis として知られ、細胞質分裂時に染色体に掛かる過剰な負荷に起因することが報告されている。しかしながら、これまで行われてきた解析のほとんどが形態観察による間接的アプローチに依存しており、染色体に掛かる力がその構造と機能にいかなる帰結をもたらすかはわかっていなかった。

研究代表者はこれまで、マイクロニードルを基礎とした顕微力学操作システムを開発し、有糸分裂紡錘体が持つ力学特性を定量的に明らかにしてきた(Shimamoto et al., Cell 2011, Shimamoto et al., Nat Protoc 2012; Takagi et al., Dev Cell 2019)。この顕微操作法を応用した予備実験から、染色体の動原体部位は紡錘体微小管を介して与えた外側方向の力に対して 30%ほど伸長するが、過度の力を与えてもそれ以上は伸長しないことが観察された。また DNA などの生体ポリマーは、非線形な力学応答を示すことが広く知られていた。以上の背景から、染色体は紡錘体チェックポイントを駆動するのに十分な柔らかさを持ちながらも、極度に大きな力に対しては非線形的に硬化してその構造を堅牢に保つしくみを備えていることを仮説に持つに至った。染色体が力の摂動にさらされながら遺伝的 fidelity を安定に維持するメカニズムを解明するためには、染色体物性の直接計測が必須であると結論し、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の研究背景を鑑みて、分裂期における細胞の遺伝的 fidelity が染色体の力学特性によっていかに保証されているかを解明することを目的とした。

分裂期の染色体が力に対して柔軟に応答し、かつその構造を堅牢に保持するしくみを理解するためには、これまでの構造・生化学的アプローチを中心とした解析に加えて、染色体のメカニクスを定量的に明らかにする必要がある。そこで本研究は、研究代表者が以前に開発したオルガナレベルの顕微力計測・操作手法(Shimamoto et al., Cell, 2011)を発展させた新たな解析技術を開発し、分裂期染色体の力学応答特性を定量解析することを目指した。これにより染色体の物性的理解を確立し、その構造・機能的インテグリティがいかに保持されているかを明らかにするための基盤技術を確立することを目指した。

## 3. 研究の方法

単一染色体の定量的な力学マニピュレーションを行うため、細胞から染色体を単離精製する方法を確立した。その後、染色体上の着目する部位(動原体等)をマイクロニードルの力計測プローブで特異的に捕捉し、力を作用させることで生じる染色体の変形応答を蛍光ライブイメージングにより観察した。アッセイの概略を図 1 に示す。

染色体の精製は、確立されたショ糖勾配密度遠心を用いた方法で行うことを初めに検討した。しかしながら、採取される染色体の数がマニピュレーション実験を行うのに十分でな

いことが分かった。また、当研究室で汎用しているツメガエル卵の細胞質エクストラクト内で染色体を紡錘体から単離する方法も試みたが、タンパク質の非特異吸着によってマイクロニードルと染色体の安定な結合を達成することが困難であることが分かった。そこでいくつかの代替法を模索し、最終的に、細胞を低張状態にして膨潤させた後に遠心によってスライドガラス上に押し付けて破碎する Chromosome spread 法を採用した。分裂期の染色体を効率的に採取するため、対象とする細胞をコルセミド存在下で4時間培養し、その後シャーレをタップしてM期の細胞を浮遊させて回収した(Mitotic shake-off)。単離精製した染色体の特定部位の標識は、動原体の最外構造を構成する Hec1 にクロスする蛍光標識抗体 (Alexa488) を使って行った。さらにマイクロニードル先端を Alexa488 抗体でコートすることで、動原体に対する力計測プローブの特異結合を達成した。使用する顕微鏡力計測・操作システムは、研究代表者が以前に開発した方法 (Shimamoto et al., Cell 2011) をベースに構築した。

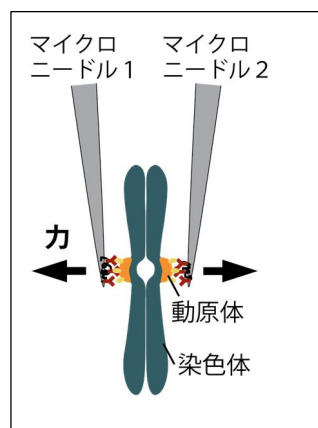


図1 アッセイデザイン

ガラスを微細加工して作成したマイクロニードルの力計測プローブ先端を染色体の特定部位(例:動原体)に結合させ、外力を作用させたときの染色体の変形ダイナミクスをイメージング解析する。プローブと染色体部位の結合は、抗体を介して達成される。作用させる力は、分裂期に染色体にはたらく力(紡錘体微小管の伸長力など)を想定する。

#### 4. 研究成果

単離精製した分裂期染色体の特定部位に力を作用させることができる顕微鏡システムを開発し、染色体構造の変形ダイナミクスを蛍光顕微イメージングすることに成功した。具体的には、ヒト培養細胞 (HeLa 株、HCT116 株) から精製した染色体の動原体部位にマイクロニードルの力計測プローブを使って伸長力を作用させ、動原体部位の位置変化と染色体の変形をスピニングディスク式共焦点装置と CMOS カメラによって捉えた(図2)。その結果、動原体部位近傍の染色体構造は伸長力に対して軟らかく、動原体が引っ張られるのに応じて可視レベルで大きな局所変形を起こすことがわかった。一方で、動原体からより遠位の染色体碗部等は動原体に作用させた力に対して堅牢であり、有意な変形は示さなかった。さらに、動原体部位を伸長後に力を開放すると、動原体近傍の染色体構造は元の構造へと素早く形態を回復した。また、この変形応答は繰り返しの伸長刺激に対して毎回同様の応答を示すことがわかった。以上の結果から、染色体の動原体部位近傍は柔軟かつ弾性的で、作用する力に対して大きく変形するもののその構造は安定に保たれることが示された。

以上の実験は水溶液中で行ったものであるが、より細胞内に近い環境での力学計測を達成するため、アフリカツメガエル卵から精製した無希釈の細胞質エクストラクトを水溶液と置換し、同様に染色体の変形応答の解析を試みた。この方法は、マイクロニードル表面にエクストラクト中のタンパク質が非特異的吸着することでプローブ先端と染色体の結合を

阻害することがわかった。今後、プローブへの非特異吸着を低減するポリマーコーティング法等を確立し、より細胞質に近い環境における解析についても研究を進める予定である。また、培養細胞に対する分子摂動実験と組み合わせることで、染色体の力学特性を制御する分子要素の同定についても探索を進める予定である。

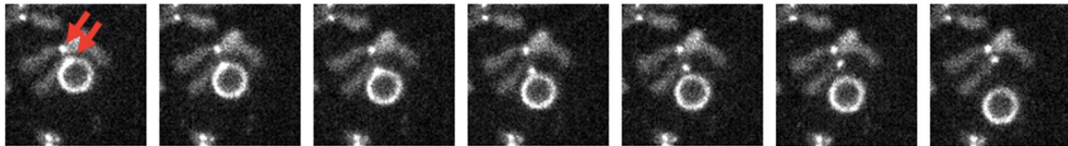


図2 単離した単一染色体の動原体部位を Hec1 の蛍光抗体で標識し(赤矢印)、マイクロニードルの力計測プローブ(中央の円状構造; 蛍光抗体コート済)を使って写真の右下に向かって力を作用させている様子。動原体部位の位置変化に伴ってその近傍の染色体構造が局所に変形し、その後のプローブからの解離に伴って弾性的に元の構造へと形態を回復する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takagi Jun, Sakamoto Ryota, Shiratsuchi Gen, Maeda Yusuke T., Shimamoto Yuta	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.e5
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件/うち国際学会 6件）

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

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 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata, Yuta Shimamoto
2. 発表標題 MICRO-MANIPULATING 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 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----