

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570187

研究課題名 (和文) 微小管による細胞分裂面決定の分子機構

研究課題名 (英文) Determining the cleavage plane by microtubules

研究代表者

上条 桂樹 (KAMIJO KEIJU)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10252074

研究成果の概要：細胞質分裂では分離した染色体間の細胞表層に分裂面が決定され、収縮環が形成される。分裂後期の微小管が何らかのメカニズムで細胞表層に分裂面を決定し、収縮環形成に導くシグナルを伝えると考えられてきたが、シグナルの実体は不明のままだった。本研究課題では、Rho シグナルを指標として、分裂シグナルをライブセルイメージングにより可視化して動態を観察し、微小管による細胞分裂面決定の分子機構を解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞質分裂

1. 研究開始当初の背景

細胞質分裂は、細胞分裂の最後のステップで、染色体の分離後、細胞質およびオルガネラが娘細胞に分配される過程である。動物細胞の細胞質分裂では、細胞表層にアクチンとミオシンの線維がリング状に集積し、収縮環を形成する。収縮環の収縮により、細胞にくびれ（分裂溝）が生じ、それが深まって、2つの娘細胞が分離する。収縮環は分裂後期に分離しつつある染色体間に形成され、その位置が分裂面となる。分裂後期の微小管が分裂面を決定し、収縮環の形成を制御するシグナル（分裂シグナル）を供給すると考えられてきたが、その実体は不明のままだった。

私たちは、低分子量 G タンパク質 Rho の染色体間の細胞表層への局在が収縮環形成に

必須であることを明らかにした。Rho の局在は Rho 活性化因子 (RhoGEF) ECT2 によって制御されていた。ECT2 は Rho ファミリーの GAP MgcRacGAP およびキネシン MKLP1 と複合体を形成することで、分裂後期の微小管に局在化した。こうしたことから、“微小管→MKLP1・MgcRacGAP→ECT2→Rho” の Rho シグナル経路が、収縮環形成を導く分裂シグナルの実体として働くことが示唆された。しかし、分裂後期の微小管がどのようにして Rho シグナルを制御し、分裂面決定・収縮環形成を導くかについては多くが未解明のままである。そこで、Rho シグナルを指標としたライブセルイメージング観察を行うことで、微小管による分裂面決定機構について分子的解明が進むことが期待された。

2. 研究の目的

Rho シグナルを指標として、微小管による分裂面決定・収縮環形成機構の解明を目指す。

(1) 微小管による分裂シグナルの伝達機構

分裂後期の微小管のうち染色体間の微小管（中央紡錘体および星状体微小管の一部）が、分裂シグナルを供給すると考えられている。しかし、これらの微小管がなぜ、分裂シグナルの供給源となるのか、どのようにして分裂シグナルを細胞表層に伝えるのかは未解明のままである。本研究では、Rho シグナルのライブイメージングを通じて、分裂シグナルを可視化し、これを指標として、微小管から細胞表層への分裂シグナル伝達機構の分子的解明を行う。

(2) 中央紡錘体の形成機構

中央紡錘体は、哺乳動物細胞では、分裂シグナルの主要供給源として分裂面決定に重要な役割を担っている。しかし、中央紡錘体が染色体分離後、どのようにして形成されるのかよくわかっていない。そこで、中央紡錘体の形成過程をライブイメージングで解析するとともに、中央紡錘体形成にかかわる分子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 分裂シグナルのライブイメージング

微小管上で Rho シグナルを伝達するキネシン MKLP1 と GFP の融合タンパク質 (GFP-MKLP1) の発現ベクターを LLC-PK1 細胞にトランスフェクトし、安定発現細胞株を樹立した。この細胞に mCherry (赤色蛍光タンパク質の一つ) と α -tubulin の融合タンパク質 (mCherry- α -tubulin) を発現するベクターをトランスフェクトし MKLP1 と微小管を同時に蛍光観察できる安定発現細胞株を樹立した。

(2) 単極紡錘体を持つ細胞での細胞質分裂

細胞をキネシン Eg5 の阻害剤モナストロールで処理して星状体の分離を抑え、単極紡錘体を持つ細胞 (単極細胞) を得る。単極細胞は紡錘体チェックポイントの活性化により細胞周期の進行が抑えられているが、Cdk1 阻害剤処理することで分裂後期を模倣して細胞周期を進行させ、細胞質分裂を誘導した。

4. 研究成果

動物細胞では、分裂面は、分裂後期に染色体間の細胞表層に決定される。これは、染色体を正しく娘細胞に分配し、赤道面で細胞を 2 分する細胞質分裂の時間・空間的制御メカニズムとして重要である。分裂後期の微小管

が分裂面を決定し、細胞表層に収縮環形成を導く分裂シグナルを供給すると考えられている。正常の双極細胞での細胞質分裂では、染色体間の微小管 (中央紡錘体と星状体微小管の一部) が、分裂シグナルを供給するモデル (図 1 A) が有力である。一方、単極細胞を用いた実験から、染色体を越えて伸びる微小管が分裂シグナルを供給するモデルも提唱されている (図 1 B)。これらは、いずれも微小管と染色体の幾何学的位置関係によって分裂シグナルを伝える微小管および分裂シグナルの向きが決定されるモデルだが、分裂シグナルの実体は不明のままだった。

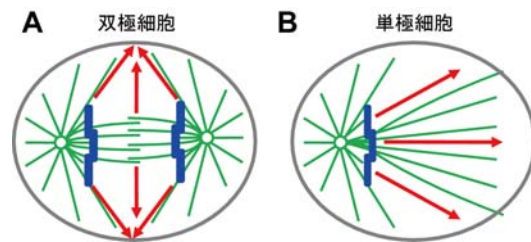


図 1 微小管が供給する分裂シグナルモデル
A 双極細胞, B 単極細胞.
赤矢印: 分裂シグナル,
緑: 微小管, 青: 染色体

(1) 分裂シグナルのライブイメージング

分裂面決定・収縮環の形成には、低分子重量タンパク質 Rho と、微小管上の Rho 活性化因子複合体 (ECT2, MgcRacGAP, MKLP1) の働きが必要である。分裂シグナルは微小管を介して伝達されるので、Rho 活性化因子複合体を指標とすれば、分裂シグナルを可視化することができるのではないかと考えられる。そこで、Rho 活性化因子複合体の分裂期キネシン MKLP1 と GFP の融合タンパク質 (GFP-MKLP1)、および mCherry-tubulin を同時に安定発現する細胞株を確立し、蛍光顕微鏡下でライブイメージング観察を行った (図 2)。

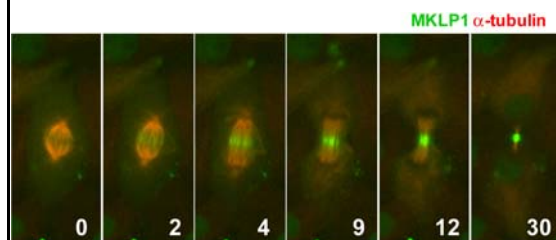


図 2 GFP-MKLP1 の動態
数字は分裂後期開始からの時間 (分)
MKLP1 は、染色体分離後、染色体間の微小管に集積する。

MKLP1 は分裂中期までは細胞質に局在する (図 2, 0 分). 分裂後期に入り, 染色体が分離した直後に, MKLP1 は染色体間の微小管 (中央紡錘体および染色体間の星状体微小管) に結合した (2 分). その後, 中央紡錘体の微小管のオーバーラップ域 (ミッドゾーン) に集積し (4-12 分), ミッドボディに濃縮した (30 分). 分裂溝は, ミッドゾーン (MKLP1 の集積部) の周囲に形成された (9 分). このように, GFP-MKLP1 の動態は, 図 1 A で想定される分裂シグナルモデルとよく一致する.

染色体間の微小管である中央紡錘体はミッドゾーンでプラス端がオーバーラップした特殊な構造をとる. このため, MKLP1 は, このオーバーラップ構造を認識して局在化している可能性が考えられた. 単極細胞はオーバーラップ構造を作れないので, 単極細胞で MKLP1-GFP の動態観察を行った (図 3).

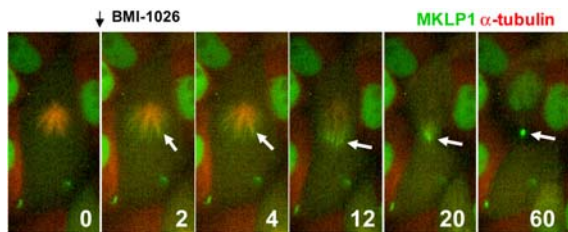


図 3 単極細胞での MKLP1 の動態
数字は Cdk1 阻害剤 BMI-1026 を添加して細胞質分裂を誘導してから時間 (分). 矢印は染色体を越えて伸びる微小管への MKLP1 の集積を示す.

GFP-MKLP1 安定発現細胞をモノストール処理で得た単極細胞に, Cdk1 阻害剤 BMI-1026 を作用させた. 単極細胞は紡錘体チェックポイントを乗り越えて分裂後期に入り, 分裂溝が誘導された. MKLP1 は, Cdk1 阻害剤を作用させた直後に, 染色体近傍で, 染色体を越えて伸びる微小管と結合し (2 分), 微小管の先端に集積した (4-12 分). 分裂溝は, MKLP1 が集積した微小管の先端付近に形成された (20 分). 以上より, MKLP1 は, 微小管のオーバーラップ構造ではなく, 染色体を越えて伸びる微小管に特異的に結合することが示された. さらに, 単極細胞での MKLP1 の動態も, 単極細胞での分裂シグナルモデル (図 1 B) とよく一致することが明らかになった.

双極細胞, 単極細胞のいずれにおいても, GFP-MKLP1 の動態は, 分裂シグナルの条件をよく満たしていた. こうしたことから, GFP-MKLP1 のライブイメージングにより, 今まで不明だった分裂シグナルの動態を可視化できることが示唆された.

(2) 微小管による分裂シグナル制御メカニズム

分裂溝を誘導する微小管および分裂シグナルの向きは, 染色体と微小管の幾何学的位置関係で決定される (図 1). 単極細胞では, 染色体が微小管に分裂シグナルを供給すると考えられてきた (図 1 B). しかし, MKLP1 は, 染色体が分離するまで細胞質に存在することから, 染色体に, MKLP1 の微小管への結合を制御する因子が存在することが推定された. 染色体には染色体パッセンジャータンパク質と呼ばれる細胞質分裂制御因子が存在する. このうち Aurora B キナーゼについて, MKLP1 の微小管への結合との関係を検討した. 単極細胞で分裂溝を誘導する際に, Cdk1 阻害剤と同時に Aurora キナーゼ阻害剤を作用させたところ, MKLP1 の微小管への結合が阻害されるとともに分裂溝の形成も抑えられた. 同様に, 単極細胞の Aurora B RNAi でも MKLP1 の微小管への結合と分裂溝の誘導が阻害された (図 4A). また, 双極細胞でも Aurora キナーゼ阻害剤処理または Aurora B RNAi (図 4B) により, MKLP1 の染色体間の微小管への集積が抑えられ, 分裂溝形成も阻害された. 以上の結果から, 分裂後期の Aurora B の活性が, MKLP1 の微小管 (双極細胞では染色体間, 単極細胞では染色体を越えて伸びる微小管) への結合を制御することが明らかになった.

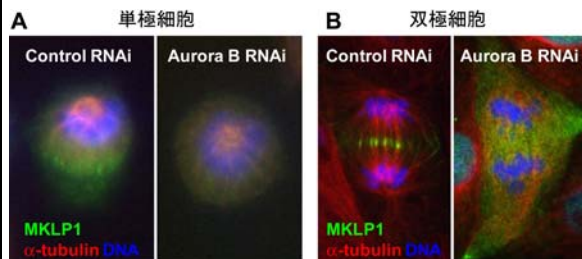


図 4 Aurora B による分裂シグナル制御
Aurora B RNAi 細胞での MKLP1 (緑) の局在.
A 単極細胞, B 双極細胞
Aurora B ノックダウンにより MKLP1 の微小管への結合が失われる.

(3) 細胞質分裂を制御する微小管の動態

染色体間の微小管 (中央紡錘体および星状体微小管の一部) は, 分裂シグナルを供給し, 分裂面決定・収縮環形成に重要である. しかし, 分裂後期には, 微小管の構造が大きく再編成されるため, 中央紡錘体をはじめとした細胞質分裂を制御する微小管の動態および形成機構については, これまでよくわかっていなかった. MKLP1 は, 分裂後期に細胞質分裂を制御する染色体間の微小管に分布する. このため, GFP-MKLP1 を指標として微小管を

追跡することにより、ライブイメージングで中央紡錘体および分裂シグナルを伝える星状体微小管を特定することが可能である(図1)。分裂中期では染色体近傍にMKLP1がわずかに存在する微小管が見られる(図1, 0分)。これは、極間を結ぶ微小管で、その先端にMKLP1が少量局在するためと考えられる。染色体が分離すると、MKLP1は中央紡錘体に集積する(2分)とともに、染色体間の星状体微小管の先端付近にも集積した(4分)。MKLP1の集積した星状体微小管の一部は中央紡錘体に取り込まれ、中央紡錘体の微小管の束化に寄与していた(4-9分)。これらの観察から、中央紡錘体は極間の微小管に加えて、星状体微小管の一部が、側方から取り込まれて、微小管の束化が進行することにより形成されると考えられる。

(4) 中央紡錘体の形成制御

中央紡錘体は分裂シグナルを供給するもっとも主要な微小管と考えられるので、その形成を制御する以下の候補分子をRNAiでノックダウンし、ライブイメージングで微小管の動態を観察した。

① MKLP1, MgcRacGAP

MKLP1, MgcRacGAPのノックダウンでは、オーバーラップ構造をとる中央紡錘体の形成そのものに大きな影響は観察されなかった。しかし、その後の微小管の束化の進行は阻害された。MKLP1・MgcRacGAPの複合体はcentralspindlinとも呼ばれ、中央紡錘体微小管のオーバーラップ構造形成への直接の関与が報告されているが、本観察結果はこれに否定的であった。

② PRC1

PRC1のノックダウンでは、中央紡錘体は形成されるが、中央のオーバーラップ構造を欠いており、PRC1が、オーバーラップ構造の形成に必須であることが追試された。PRC1ノックダウン細胞では、MKLP1は中央紡錘体には結合しなかった。オーバーラップ構造を持たない単極細胞でもMKLP1の集積が微小管先端に認められることから(図3)、双極細胞においてPRC1は、オーバーラップ構造の形成だけでなく、MKLP1の微小管への結合に関与していることが示唆された。

③ γ -tubulin

γ -tubulinノックダウンでは、中央紡錘体の微小管の形成阻害が観察された。中央紡錘体のマイナス端は、染色体分離後、星状体から離れ、そこに γ -tubulinが集積することも観察された。従来、微小管は中心体(星状体)から重合が始まると考えられていたが、中央紡錘体の微小管は中心体に依存せずに両端

の γ -tubulinを起点として形成されることが示唆された。

以上より、中央紡錘体の微小管の形成には γ -tubulinが、オーバーラップ構造をとるためにはPRC1が、それぞれ必要であることが示唆された。また、PRC1はMKLP1の染色体間の微小管への局在にも必要であることが明らかになった。

(5) 本研究の成果の位置づけ・インパクト、今後の展望

本研究課題の成果として、これまで実体が謎のままだった分裂シグナルをライブイメージング観察することが可能となった点があげられる。さらに、この分裂シグナルのライブイメージング系を用いることで、Aurora Bキナーゼの活性が、分裂シグナルとして働くMKLP1の微小管への結合を制御するのに必須であることも明らかになった。今後、私たちの確立した分裂シグナルのライブイメージング系は、細胞質分裂の分子機構の解明のための強力なツールとなることが期待される。

また、分裂シグナルを制御する微小管の動態を明らかにし、中央紡錘体の形成に γ -tubulinが重要であることを示すとともに、中央紡錘体の微小管の形成は中心体に依存しないことを示唆する結果を得た。これらは、分裂面を決定する微小管の形成機構の解明の端緒となると考えられる。

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)

1) 上条 桂樹 細胞分裂面決定機構と分裂シグナルのライブイメージング. 顕微鏡 (査読有) 2009年発行決定 (44巻 (2号))

[学会発表] (計 9 件)

1) 上条桂樹, ライブイメージングによる細胞質分裂シグナルの解析. 2009 生体運動研究合同班会議, 2009年1月11日, 東京都目黒区

2) 上条桂樹, 分裂面決定シグナルのライブイメージング. 日本顕微鏡学会 第52回シンポジウム, 2008年10月18日, 千葉市

3) 上条桂樹, Determining the cell division plane by Rho-mediated signaling in mammalian cells. 第60回日本細胞生物学会大会 Satellite meeting: From mitosis to cytokinesis, 2008年6月29日, 横浜市

4) Kamijo, K., Abe, M., Kobayashi, T., Nishimura, Y., Yonemura, S., and Lee, K. S., Determining the furrow-inducing microtubules by Aurora B in cells with a monopolar spindle. Cold Spring Harbor Meeting on the Cell Cycle, 2008年5月15日, アメリカ合衆国・ニューヨーク州・Cold Spring Harbor Laboratory

5) 上条桂樹, 阿部充宏, 小林俊秀, 西村由香子, 米村重信, Aurora Bによる分裂溝を誘導する微小管の決定機構. 第113回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008年3月29日, 大分県由布市

6) 上条桂樹, 単極紡錘体細胞を用いた分裂面決定機構の解析. 2008 生体運動研究合同班会議, 2008年1月9日, 宮城県仙台市

7) 上条桂樹, 阿部充宏, 小林俊秀, 西村由香子, 米村重信, 単極紡錘体細胞における分裂期微小管の非対称性と分裂面決定機構. 第30回 日本分子生物学会年会・第80回 日本生化学会大会合同大会, 2007年12月11日, 神奈川県横浜市

8) Kamijo, K., Abe, M., Kobayashi, T., Nishimura, Y., Yonemura, S., The Plus Ends of Microtubules Determine the Cell Division Plane through Rho-mediated Signaling. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting (第47回 米国細胞生物学会年会), 2007年12月2日, アメリカ合衆国・カリフォルニア州・サンフランシスコ

9) 上条桂樹, 微小管プラス端による分裂面決定機構. 第67回 日本解剖学会中部支部学術集会, 2007年10月13日, 愛知県長久手町

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上条 桂樹 (KAMIJO KEIJU)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 10252074

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

研究協力者

Kyung S. Lee

National Cancer Institute/NIH

(米国国立がん研究所)・Senior Investigator