

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19770180

研究課題名（和文） 染色体分配ダイナミクスを制御するマイクロメカニクス

研究課題名（英文） Micromechanics regulating the dynamics of chromosome segregation

研究代表者

板橋 岳志（ITABASHI Takeshi）

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：20434384

研究成果の概要（和文）： 正確な染色体分配は、適当な大きさと形状を持つ両極性紡錘体によって行われる。本研究では、定量的な力測定法を用いて、染色体分配機構の基盤をなすメカニズムの解明を試みた。特に、アフリカツメガエル卵抽出液中で形成させた減数分裂紡錘体の構造を制御するメカニズムに注目した。主な成果を以下に記す：（1）紡錘体を直接顕微操作し、同時に力測定可能な新しい実験系を構築した。この技術によって、紡錘体の力学特性（変形や硬さ）を調べることが可能となった。（2）この力計測実験系を用いて、分裂中期の紡錘体は、外部負荷の程度に依存して、粘弾性的性質もしくは塑性的性質を示すことがわかった。（3）外部負荷を与えられた中期紡錘体は、様々な大きさへ再構成することを発見した。これは、紡錘体の大きさを制御する機構が外部負荷に応答し、調節されることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Accurate chromosome segregation during meiosis/mitosis critically requires the assembly of a bipolar spindle of proper shape and size. We planned to investigate the underlying mechanisms of chromosome segregation machinery with quantitative force measurements, focusing on the architectural regulatory mechanism of the vertebrate meiotic spindle self-assembled in *Xenopus* egg extracts. The main results of this project are summarized as follows: (1) We developed a new technique based on the force measurements to probe the mechanical framework of the *in vitro* assembled spindle. This technique makes it possible to examine the mechanical features of the spindle, such as its deformability and stiffness, with the application of nanonewton forces and micron-size perturbations. (2) Using the force measuring techniques, we found that the meiotic spindle at metaphase behaves like either a viscoelastic or a plastic structure depending on the extent of applied load. (3) Transformations between the metaphase spindles of different sizes can be induced by the applying controlled external force, which indicates that the size-control mechanisms respond to and can be modulated by mechanical perturbation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

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：細胞骨格 有糸分裂 紡錘体 染色体分配

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を集約する染色体は、細胞分裂のたびに1本たりとも間違えることなく娘細胞へ正確に受け継がれる。染色体の分配に狂いが生じると、重篤な疾患や癌など様々な病気の原因となる。秩序だった細胞分裂を遂行する上で、染色体を正確に均等に分配させるタンパク質集合体が染色体分配装置“紡錘体”である。紡錘体は配列した微小管からなる細胞骨格や、微小管の上を歩行する何種類ものモータータンパク質群、それらのタンパク質の活性を制御する多数の制御タンパク質群によって構成されている。近年の遺伝子操作技術や細胞生物学的手法の発展により、紡錘体の形成に重要なタンパク質が数多く同定され、染色体分配や紡錘体形成のメカニズムは急速に明らかにされつつある。

紡錘体は、細胞分裂の際に染色体を整列させ、分配するという機能を持つ。また、細胞周期が分裂中期から分裂後期へ移行するためには、染色体間に正常な張力がかかる必要があることが明らかにされており、この張力は紡錘体によりかけられる。つまり、紡錘体は染色体の整列と分配、分裂中期から分裂後期への移行において、染色体に力をかける装置としての働きを持つ。このような理由から、力発生装置としての紡錘体の力学特性を知ることが重要であるにもかかわらず、紡錘体内で発生する力に関する定量的な先行研究は乏しい。唯一挙げられるのは、微小ガラス針を使って、昆虫細胞内の単一染色体を顕微操作し、染色体が中心体へと牽引される力を測定したNicklasの研究である。

紡錘体内の力は主に微小管の重合・脱重合と、キネシン5 (Eg5) という+端方向キネシン4量体が2本の微小管をクロスリンクし、それぞれの微小管を歩くことで発生する。紡錘体中の微小管は染色体付近で重合、紡錘体極付近で脱重合しており、Eg5は微小管を極方向に押し出す力を発生させていることから、紡錘体微小管には染色体から極への流れがあることが知られている (Miyamoto, J. Cell Biol., 2004)。染色体の正常な分配には、紡錘体の形状が正常であることが必要であると考えられ、紡錘体形状がどのように制御されているか、を知ることは重要である。

2. 研究の目的

分子生物学や細胞生物学的な研究によって明らかとなっている、染色体分配機構における“染色体にかかる力”や“紡錘体が発生する力”を、生物物理学的手法を加味することによって定量化し、時間的・空間的に解析する。これにより、一分子解析法など生物物理学的に明らかにされた微視的な分子の特徴と、分子細胞生物学的に明らかにされた巨視的な分子の振る舞いを本研究によってつなぎ合わせ、染色体分配機構における“力”の本質を明らかにし、本研究完了時に、“力”の役割を反映した独創的な紡錘体形状制御モデルを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

紡錘体への直接顕微操作手法の確立、紡錘体の力学特性及び外部負荷に対する紡錘体内ダイナミクスの応答の定量的な解析を行う。本研究では、紡錘体の形成にアフリカツメガエル卵抽出液 (Murray, Methods Cell Biol., 1991) を用いた。この卵抽出液中では、長軸の長さが平均 37 μm の紡錘体がいくつも形成される。その上、細胞とは異なり、この実験系は細胞膜がないため、ガラス針などを用いて紡錘体を直接的に顕微操作可能であることが、大きな利点である。また、 Ca^{2+} の添加によって細胞周期を外から任意にコントロールすることが可能なため、分裂中期における紡錘体の力学特性を調べる研究に適している。

紡錘体の力学操作には、先端径が 1 μm 程度の微小ガラス針や、本研究課題で確立した MEMS 力センサー (詳細は、後述) を使った。微小ガラス針は、紡錘体に直接変形を加えるための硬い針と、応力測定を行うための弾性定数の小さい柔らかい針の2種類を用いた。微小ガラス針は、水圧式三次元マニピュレータに加え、ピエゾアクチュエータを用いることで、 μm オーダーでの精度で操作が可能になり、紡錘体の力学特性の定量的な解析が可能になった。微小管ダイナミクスの観察には FSM (Fluorescent Speckle Microscopy) 法 (Maddox, J. Cell Biol., 2003) 共焦点顕微鏡を用いた三次元観察手法を用いた。

4. 研究成果

(1) 紡錘体の直接顕微操作及び力測定法

紡錘体に様々な力学的負荷を加える顕微操作をすることによって、紡錘体の力学特性（硬さや変形）と形態制御メカニズム（負荷応答性）を物理的側面から解明することを試みた。

in vitro 紡錘体形成系を用いて、MEMS（MicroElectroMechanical Systems、微小電気機械素子）力センサー（東京大学下山勲教授提供）（Onoe, Langmuir, 2005）と蛍光顕微鏡を組み合わせることで、紡錘体を直接顕微操作し解析する実験系を構築した（図1）。

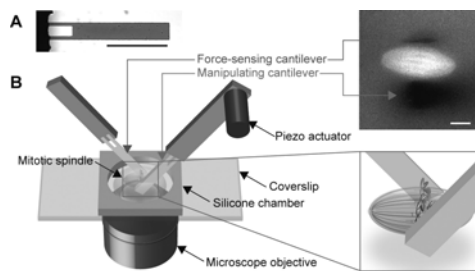


図1 MEMS力センサーによる紡錘体の直接顕微操作及び力測定系。

(a) MEMS力センサー。Bar = 100 μm 。
(b) MEMS力センサーおよびカンチレバーを用いた紡錘体顕微操作の概略図及び顕微操作図。Bar = 10 μm 。

このMEMS力センサーは、長さ200 μm 、幅30 μm 、高さ0.3 μm の薄膜構造のピエゾ抵抗型センサーである。顕微操作用カンチレバーを紡錘体に力が加わる方向へ動作させたとき、加わる力はセンサーのひずみにより生ずる電気抵抗の変化として計測され、紡錘体の変形の際の微小な力（サブnN）を自動計測することができる。

(2) 紡錘体の力学応答

紡錘体を極間軸（長軸）方向、及び幅（短軸）方向にそれぞれ圧縮し、紡錘体の力学特性と変形応答性を解析した。負荷を加える時間が短いと、紡錘体は粘弾性的な性質を示した。ヤング率は、細胞と同程度のオーダー（約数十kPa）であったが、極間軸方向のヤング率は、幅方向と比較して10倍ほど大きかった。このヤング率の異方性は、紡錘体の構造異方性、すなわち微小管の配向方向とそれに沿った分子モーターの発生力異方性を反映していると考えられる。また、紡錘体は、負荷が大きいと大変形して塑性的性質を示した。

(3) 紡錘体の自己組織化能

興味深いことに、一度塑性変形したのちに、元の形状と相似で安定な内部構造を持つ“小さな紡錘体”が自発的に再構築されることがわかった。

この現象は、上述のMEMS力センサー法だけでなく、2本のガラス微小針を用いた方法によっても再現された。紡錘体をラグビーボール型の安定な形状から極間軸方向に伸展させることによって不安定な形状へ変化させる。紡錘体はガラス針による変形を受けても、数分程度で元の形状に回復することができるという性質を持つことがわかった。伸展させる速度や、負荷を与え続ける時間などによって、紡錘体は様々な再構成過程を示す（図2）。

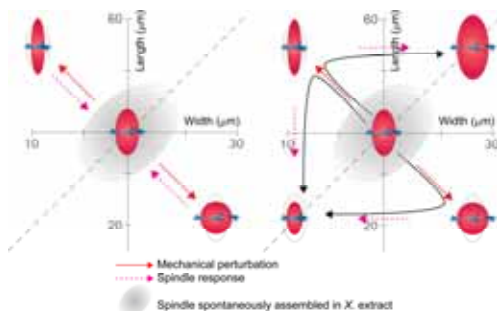


図2 紡錘体の力学応答。

（左）細胞質抽出液中に自然に形成される紡錘体の平均的な大きさを原点とする。紡錘体の長さとは幅には相関関係があり、サイズ分布は楕円領域（薄い鼠色）に広がる。紡錘体を極間軸（長軸）方向に伸長あるいは圧縮するか、幅（短軸）方向に圧縮すると、変形が短時間の場合、紡錘体は瞬時に元の形状と大きさに戻る。（右）同様の変形を長時間加え続けた場合の紡錘体の応答経路。

また、さまざまな顕微操作（紡錘体を2つの断片に切断したり、2つの紡錘体を接触させたり）を行った研究においても、紡錘体はゆっくりと、もとの形状を自己組織的に取り戻した（図3）。紡錘体を切断すると、数分後には、切断後の断片は切断前と同じ形に再構成され、その後その形状と大きさは維持される。さらに、再構成した紡錘体同士を近づけると、融合し切断前の形状になる。このような紡錘体の変形を受けても形状を回復するという性質と、力学計測で得られた紡錘体の粘弾性的性質は、紡錘体を構成する微小管が形状回復や負荷への適応の過程でダイナミックに変調し、制御されていることに起因すると考えられる。

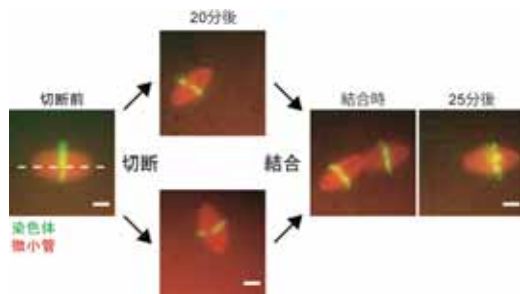


図3 紡錘体の自己組織化。

紡錘体を、ラグビーボール型の安定な形状から不安定な形状へ、2本のガラス微小針を用いて二つの断片に物理的に切断した。切断された二つの紡錘体断片は、少し小さいながら自発的に元の安定な形に再構築された。つぎに、この二つの紡錘体断片の中心体付近を、ガラス微小針を用いて結合させたところ、紡錘体はゆっくりと、ジャックナイフが折りたたまれるように、ひとつの安定した形を持つ紡錘体へと融合した。

(4) 紡錘体の形状制御メカニズム

紡錘体内の微小管ダイナミクスを観察するために、FSM法を用いた紡錘体内微小管の動態観察、三次元的に紡錘体を観察し紡錘体全体の微小管の量や密度を測定する手法をそれぞれ導入した。FSM法では、微小管を観察するために添加する蛍光標識されたチューブリン分子の量を低濃度にすることによって、紡錘体内微小管を斑状に染色することが可能であり、その輝点を追跡することで微小管1本の動態を解析することができる。微小ガラス針を用いた顕微操作系と組み合わせ、変形直後に微小管の流れの速度が上昇することを示唆するデータが得られている。また、共焦点顕微鏡を用いた紡錘体の三次元観察の手法により、顕微操作による変形によって、紡錘体全体の微小管量や微小管密度に大きな偏りが生じるが、しばらくすると元の状態に回復することが観察されている。これは、形状回復の過程において微小管の密度が紡錘体内でうまく制御されていることを示唆している。形状回復の過程で微小管密度の制御が行われていることを直接観察したのは初めての例であり、紡錘体の形状制御のメカニズムを解明する上で、生化学的手法を加味することによって、今後多くの知見が得られると期待される。

染色体と紡錘体の複雑かつ統制のとれた分裂期動態は、さまざまなタンパク質が協調的に働くことによって実現され、その本質的な部分は酵母からヒトにいたるまで真核生物

において広く保存されている。紡錘体は、構成タンパク質が時々刻々入れ替わるといって開放系であり、相互作用することによって構造自体がダイナミックに変化し、多分子が複雑に制御され、ATP加水分解のエネルギーを消費しつつ自己組織化する分子装置である。他のさまざまなオルガネラも、紡錘体に見られるように、外部から受ける物理的擾乱に対して、ダイナミックに応答し適応できるメカニズムを内包していると考えられる。今後、MEMS力センサーを含むさまざまなマイクロ力学操作・計測手法は、生体超分子集合体のみならず、細胞(オルガネラ)機能と力学の関係の研究する上で広く応用されるだろう。

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)

板橋岳志、鈴木和也、高木潤、石渡信一、紡錘体の力学計測、生物物理、査読有、Vol. 49, No.5, 2009, pp.250-251

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, Hiroaki Onoe, Kenta Kuwana, Isao Shimoyama, Jedidiah Gaetz, Tarun M Kapoor, Shin ichi Ishiwata, Probing the mechanical architecture of the vertebrate meiotic spindle, Nature methods, 査読有、Vol.6, No.2, 2009, pp.167-172

[学会発表](計14件)

Takeshi Itabashi, Mechano-sensing in the meiotic spindle: how is the mechanical perturbation sensed?、International Workshop "Chromosome Segregation Machinery"、2009年6月、東京

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, Hiroaki Onoe, Kenta Kuwana, Jedidiah Gaetz, Tarun M Kapoor, Shin ichi Ishiwata, The Size transition of the vertebrate meiotic spindle by mechanical perturbation, The American Society of Cell Biology 48th Annual Meeting, 2008年12月、San Francisco USA

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, Hiroaki Onoe, Kenta Kuwana, Jedidiah Gaetz, Tarun M Kapoor, Shin ichi Ishiwata, Mechanical architecture of the mitotic spindle in *Xenopus* egg extracts, Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting and 16th IUPAB International

Biophysics Congress、2008年2月、Long
Beach USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

板橋 岳志 (ITABASHI TAKESHI)

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号 : 2034384