

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26711012

研究課題名(和文) 中心体に依存しない微小管生成機構

研究課題名(英文) Microtubule generation independent of centrosomes

研究代表者

五島 剛太 (Goshima, Gohta)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：20447840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が中心体に依存せずに微小管を生成する機構についての理解を深めることを目標とした。主要成果は以下のとおりである。(1) 動物細胞の分裂期における中心体非依存的な微小管生成に必須の「オーグミン複合体」を糸状菌で同定し、オーグミンの進化的保存性を示した。(2) オーグミン複合体の必須サブユニットのロックアウトマウスを作成し、初期胚の分裂時、微小管形成中心をクラスター化することにオーグミンが必要であることを見出した。(3) ヒメツリガネゴケ細胞において、オーグミンにも中心体にも依存しない新たな微小管生成機構を見出した。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to understand the mechanism of centrosome-independent microtubule generation. The major outcomes are as follows: (1) The augmin complex has been shown required for centrosome-independent microtubule nucleation within the mitotic spindle in animal and plant cells. Here, we identified augmin in the filamentous fungus, elucidating the evolutionary conservation of this protein complex. (2) We generated knockout mice of a critical augmin subunit, and identified a defect in MTOC clustering during early embryonic division. (3) Microtubule nucleation independent of centrosomes or augmin was identified in the moss *Physcomitrella patens*.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管 オーグミン

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 微小管はチューブリンの重合により生まれる重合体であり、細胞分裂、細胞内輸送、細胞運動など、さまざまな細胞機能に必須の役割を果たす。たとえば、分裂期に形成されるスピンドルは微小管を主体とする構造体であり、スピンドル微小管の形成異常は染色体分配エラーを引き起こし、これが癌や初期流産の要因となる。長らく、動物のスピンドル微小管の生成に最も重要な構造体は中心体であるとされてきた。

(2) しかし近年、我々は、「オーグミン」と名付けた Aug1-Aug8 よりなるタンパク質複合体が動物細胞のスピンドル形成において、中心体と同等に微小管生成に重要な役割を果たすことを発見した。また、中心体を持たない陸上植物では、オーグミンが中心体に代わって必須の役割を果たしていることも示した。

(3) オーグミンは微小管重合核形成因子 $\gamma$ チューブリン複合体をスピンドル上に局在化させ活性化する。さらに最近、オーグミンが微小管上で新たな微小管を生成する様子の微細レベル可視化に成功し、カエル抽出液を用いた再構成実験の結果と合わせ、オーグミン依存性の微小管増幅がスピンドル微小管形成に重要であるという概念は確立された。

### 2. 研究の目的

細胞が中心体に依存せずに微小管を生成する機構についての理解を深めることを目的とした。我々は 2008 年に 8 つのサブユニットからなる「オーグミン複合体」を発見して以来、動植物細胞の分裂期におけるオーグミン依存性・中心体非依存性の微小管生成の役割を明らかにしてきた。しかし、オーグミンについて、

- (1) 機能の進化上の保存性
- (2) 哺乳類の発生や成体での役割
- (3) 各サブユニットの役割

は未だ解明されておらず、糸状菌やマウス、ヒト培養細胞を用いた研究でこれらを明らかにすることを目指した。さらに、

(4) 中心体にもオーグミンにも依存しない新しいタイプの微小管生成機構にも着目し、コケ植物およびマウスを材料に、その実体を明らかにすべく研究を進めた。

### 3. 研究の方法

本研究の主要な方法は、以下の 4 つである。

(1) 糸状菌 *Aspergillus nidulans* においてオーグミン複合体を同定し機能を明らかにする。

(2) オーグミンのコアサブユニット Aug6 のノックアウト (KO) マウスの表現型の解析。

(3) ヒトのオーグミンの 8 つのサブユニッ

ト間、あるいは各サブユニットと微小管、 $\gamma$ チューブリン複合体との相互作用を検証し、さらに、その相互作用に関わるドメインを同定・機能解析する。

(4) 中心体を持たないヒメツリガネゴケの細胞において、中心体にもオーグミンにも依存しない微小管生成過程を可視化するとともに、その過程に必要な遺伝子を探索する。

### 4. 研究成果

主要成果は以下のとおりである。

(1) 動植物細胞の分裂期における中心体非依存性の微小管生成に必須の「オーグミン複合体」を糸状菌で同定した。

微小管増幅因子・オーグミン複合体を、存在が想定されていなかった菌類で同定した。オーグミンはスピンドル極体とスピンドル微小管上に局在したが、これまで動植物での結果とは異なり、欠損させても微小管重合核形成因子・ $\gamma$ チューブリンの局在には異常が生じなかった。この知見を基にオーグミン複合体の進化上の保存性と多様性を論じた論文を PLoS ONE 誌に発表した (Edzuka et al. 2014)。

(2) オーグミン複合体の必須サブユニットのノックアウトマウスを作出し、初期胚の分裂時、微小管形成中心をクラスター化することにオーグミンが必要であることを見出した。

微小管増幅因子・オーグミン複合体の哺乳類における生理的役割を明らかにするため、オーグミンの構成因子 HAUS6 (Aug6/Dgt6) のノックアウトマウスを作成した。ノックアウトマウスは以下のような表現型を示した。

- 1) 初期胚段階で致死となった。
- 2) 初期胚発生の細胞分裂時にスピンドル形成に異常をきたした。
- 3) ノックアウトマウスでは、初期胚の細胞分裂時に現れる複数の微小管形成中心 (microtubule organising centre; MTOC) のクラスター化がうまくいかなかった。
- 4) その結果、多極性のスピンドルが頻繁に認められ、染色体分配が異常となった。
- 5) 中心体の数を人為的に増やした培養細胞においても、オーグミンをノックダウンすると上記のような表現型が現れた。
- 6) 中心体を増やした培養細胞において、オーグミンを欠失させる以外の方法で微小管増幅を阻害したところ、オーグミン欠失と同様の表現型が現れた。

以上の結果は、微小管増幅が 3 つ以上の MTOC を 2 つにまとめるのに必要であることを示唆した。微小管増幅の哺乳類生体内での機能を初めて明らかにしたこの研究成果は Cell Reports 誌に発表された (Watanabe et al. 2016) (図 1)。

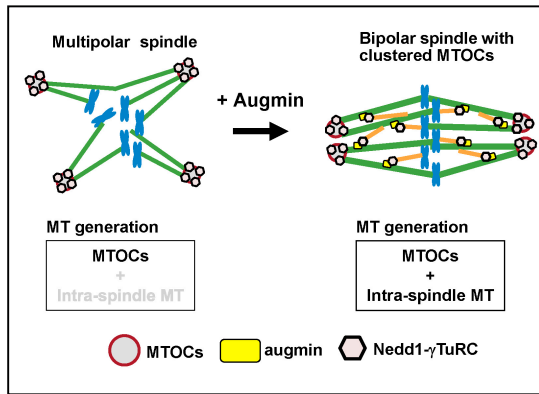


図 1: オーグミンによるマウス初期胚の分裂期スピンドル制御

(3) 微小管形成、動態制御の機構についての分子細胞生物学的に解析した。

まず、ショウジョウバエS2培養細胞の間期細胞質における微小管生成アッセイを立ち上げた。具体的には、

1) 微小管及び微小管上で機能するショウジョウバエタンパク質を蛍光標識してあるS2細胞をカバーガラス状でspreadし、微小管の生成、重合・脱重合を可視化できる条件を作った。

2) 細胞を氷冷し、細胞質の微小管を脱重合した。

3) 細胞を室温に戻し、微小管が生成される様子を共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。観察をはじめてまもなく、微小管結合タンパク質の点シグナルが数十観察され、そこから微小管が生える様子が認められた。この microtubule depolymerisation & regrowthアッセイにおいて微小管増幅因子であるオーグミン複合体が関わっているか調べたが、関わりを示唆するデータは得られなかった。すなわち、オーグミンにも中心体にも依存しない、新たな微小管生成機構の存在が強く示唆された。

これと並行して、オーグミン複合体の作用機序を解明するための分子生物学的実験も行った。オーグミンは微小管重合核形成因子であるγチューブリン複合体と相互作用することが示唆されているが、具体的にどのサブユニット同士が結合するのかは明らかになっていない。いくつかの部分欠失断片を作成し、相互作用実験を試みたが、現在のところ、結合部位を1箇所特定するには至っていない。

(4) ヒメツリガネゴケ細胞において、オーグミンにも中心体にも依存しない新たな微小管生成機構を見出した。

ヒメツリガネゴケ細胞質内で偶発的に微小管が生まれる様子の撮影に成功した。約8割のケースでは、微小管重合核形成因子であるγチューブリンの局在化が認められたことから、γチューブリンに依存した微小管生成である

ことが強く示唆されたが、残りの2割のケースでは局在が認められず、γチューブリンに依存しない新規の微小管生成機構が存在することが示唆された。この成果を含めたコケ細胞質微小管生成機構についての詳細な観察結果は、Plant Cell誌に発表された (Nakaoka et al. 2015)。

さらに、この未知の機構の解明に向けた実験を進め、植物での中心体に依存しない微小管生成機構について、新たな知見をもたらすことを期待させる基盤を確立した。具体的には、従来の細胞調整法では生きた細胞を顕微鏡視野に入れることが容易ではなかったが、微細流路を持つ細胞観察用の容器であるマイクロデバイス内での観察法を導入し、微小管生成イベントの検出頻度を飛躍的に高めることに成功した。マイクロデバイス内では細胞は高い生存率を保ったままであり、かつ、従来法と同様の微小管動態が観察された (観察には斜光照明蛍光顕微鏡を用いた)。

(5) 以上、中心体に依存しない微小管形成機構について、オーグミン依存性経路の役割について理解が深まるとともに、オーグミンに依存しない微小管生成経路を同定することができた。今後、後者について、分子メカニズムの解明に向けた研究が精力的に進められるはずである。

## 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 9 件)

①Watanabe S, Shioi G, Furuta Y, Goshima G. (2016)

Intra-spindle Microtubule Assembly Regulates Clustering of Microtubule-Organizing Centers during Early Mouse Development. 査読有  
Cell Rep. 15(1):54-60

DOI:10.1016/j.celrep.2016.02.087

②Uehara R, Kamasaki T, Hiruma S, Poser I, Yoda K, Yajima J, Gerlich DW, Goshima G. (2016)

Augmin shapes the anaphase spindle for efficient cytokinetic furrow ingression and abscission. 査読有  
Mol. Biol. Cell. 27(5):812-827

DOI:10.1091/mbc.E15-02-0101

③Miki T\*, Nakaoka Y\*, Goshima G. (2016)

Live cell microscopy-based RNAi screening in the moss Physcomitrella patens. 査読有  
Methods Mol Biol. 1470:225-246

\*equal contribution

DOI:10.1007/978-1-4939-6337-9\_18

④Nakaoka Y, Kimura A, Tani T, Goshima G.

(2015)

Cytoplasmic nucleation and atypical branching nucleation generate endoplasmic microtubules in *Physcomitrella patens*. 査読有

Plant Cell. 27(1):228-242

DOI:<https://doi.org/10.1105/tpc.114.134817>

⑤Edzuka T, Yamada L, Kanamaru K, Sawada H, Goshima G. (2014)

Identification of the augmin complex in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. 査読有

PLoS One. 9(7):e101471

DOI:10.1371/journal.pone.0101471

[学会発表] (計 13 件)

①五島剛太 (2017)

Microtubules and motors in moss.

The 1st IROAST Symposium 「Plant Cell and Developmental Biology: Approaches to Multiscale Biosystems」

②渡邊定則 (2015)

Augmin is required for MTOC clustering during mouse early development.

FASEB Science Research Conference Series "Mitosis: Spindle Assembly and Function"

③五島剛太 (2014)

Microtubules in the Moss *Physcomitrella patens*.

Gordon Research Conference "Plant & Microbial Cytoskeleton"

④五島剛太 (2014)

植物細胞における微小管生成機構

第 66 回日本細胞生物学会大会

⑤五島剛太 (2014)

ヒメツリガネゴケ原糸体細胞における微小管生成機構

2014 年度細胞周期合同セミナー

[その他]

ホームページ等

五島研究室ホームページ

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五島 剛太 (GOSHIMA, Gohta)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 20447840

### (2) 研究協力者

渡邊 定則 (WATANABE, Sadanori)