

博士論文概要

論文題目

紡錘体の構造制御機構の研究：
紡錘体形状の力学特性と染色体集積モーターの動態

A study on the regulatory mechanism of spindle structure:
Mechanical properties of the vertebrate meiotic spindle
and dynamic behavior of molecular motors
for chromosome congression

申請者

高木	潤
Jun	TAKAGI

物理学及応用物理学専攻 実験生物物理学研究

2013年11月

本研究の目的は、細胞分裂の際に染色体分配を担う、紡錘体と呼ばれる超分子構造体の構造が、どのように制御されているかを明らかにすることである。具体的には、紡錘体形状の力学特性の測定と、染色体を輸送する分子モーターXkidの紡錘体内における動態の観察を行った。

紡錘体は、微小管（チューブリンと呼ばれるタンパク質が重合してできた、線維状重合体）を骨格とし、そこに様々な種類の分子モーターや微小管結合タンパク質が介在することで自己組織的に形成される、大きさ 10-50 μm の超分子集合体である。細胞分裂期に入って核膜が崩壊すると、紡錘体の形成が始まる。分裂中期までに紡錘体はラグビーボール状の形状となり、複製された染色体は紡錘体の赤道面に整列する。分裂後期に入ると、複製された染色体は 2 等分されて 2 つの紡錘体極へ輸送される。染色体の紡錘体極への輸送が開始してからしばらくすると、紡錘体の長軸方向への伸長と、細胞膜上における収縮環の形成、細胞質分裂が起こり、2 つの娘細胞に分裂することによって細胞分裂が完了する。本研究では、分裂中期において紡錘体のラグビーボール状の形状がどのように制御されているか、染色体がどのような仕組みで紡錘体の赤道面に整列しているか、この 2 点に着目した。

これまでの研究により、微小管をはじめ、紡錘体の形成に関わる様々な分子が特定されてきた。紡錘体の構造は、紡錘体の長軸方向に伸びる多数の微小管が、様々な種類の分子モーターや微小管結合タンパク質により束ねられることでできている。紡錘体は、ビルなどの人工物とは異なり、非常に動的な構造物である。紡錘体の骨格である微小管は常に重合と脱重合（伸長と短縮）を繰り返している。また、キネシンやダイニンなどの分子モーターは微小管に結合し、微小管上を歩行することで、染色体やタンパク質を輸送する。またダイニンやある種のキネシンは 2 本の微小管を架橋し、さらに微小管上を歩行することで、微小管同士をスライドさせる。また、微小管を脱重合させるキネシンも知られている。このように、紡錘体の骨格である微小管や紡錘体の形成に関わる分子モーターの動的な性質により、紡錘体の構造も非常に動的なものとなっている。紡錘体の動的な性質の源となるのは、GTP や ATP などのヌクレオチドに蓄えられたエネルギーである。微小管は GTP のエネルギーを用いて重合し、分子モーターは ATP のエネルギーを用いて微小管上の歩行や微小管の脱重合などを行う。これらのエネルギー物質や、微小管を構成するチューブリン、分子モーターが細胞質中に数多く存在することで、紡錘体の動的な構造が形作られている。

申請者らのこれまでの研究により、紡錘体の形状は外部からの力により大きく変形を受けても、しばらくすると元通りの形に回復し安定化することが分かった。そこで本研究ではさらに、紡錘体の形状を制御するパラメータの導出、各パラメータの性質の評価、紡錘体の力学特性の測定を通して、紡錘体の形状安定性のメカニズムを調べた。

本研究では、まず中期紡錘体の形状パラメータの導出を行った。紡錘体を 3 次元的に観察することで、紡錘体の大きさ（長軸 (L)、短軸 (W)、体積 (V)）と微小管量 (M) を測定し、紡錘体の大きさと微小管量との間に相関があることを見出した。また、紡錘体ごとの大きさのばらつきが、個々の紡錘体の大きさの時間的なばらつきよりも大きいことから、個々の紡錘体がそれぞれ固有の大きさを持つことを発見した。また、形を表すパラメータ $\alpha (= W/L, \text{aspect ratio})$ と $\gamma (= V/LW^2)$ 、そして微小管密度 $D(M/V)$ はそれぞれ長軸 L によらないことが分かり、これらのパラメータと微小管量 M を用いることで、 $L^3 = M/D\alpha^2\gamma$ という関係式を導いた。この式中では α 、 γ 、 D が L によらないことから、微小管量 M を変化させると、長軸 L がそれに応じて変化することが示唆された。そこで、2 本の微小ガラス針を用いて紡錘体を長軸に沿って 2 つに切断することで、1 つの構造物あたりの微小管量を力学的に、しかも短時間の操作 (~ 10 s) で半分以下に減少させた。切断操作によって生じた 2 つの紡錘体断片は大きく変形するが、それぞれ 5 分以内に正常な形に回復した。断片 1 つあたりの微小管量は、切断前の紡錘体の微小管量の 3 分の 1 程度で、断片の大きさも切断前の紡錘体より小さくなり、切断後 20 分ほど観察し続けても小さいままであった。断片について、大きさと微小管量の関係を調べたところ、切断前の紡錘体における関係と同じ関係を持つことが分かった。次に 2 つの断片を、ガラス針を用いて移動して接触させると、2 つの断片は融合し、1 つの紡錘体となった。この紡錘体の微小管量は、各断片の微小管量よりも多く、それと同時に大きさも断片よりも大きくなった。切断・融合実験の結果を定量的に評価するため、形、微小管密度についても調べたところ、形や微小管密度は切断・融合の前後であまり変化しないことが分かった。つまり、紡錘体の大きさは、形や微小管密度でなく、微小管量と相関があり、切断後もその関係が成り立つということが分かった。

次に、個々の紡錘体の形状がどのように制御されているかを探るため、微小ガラス針を用いて紡錘体の力学特性を調べた。紡錘体に 2 本のガラス針を挿入し、片方のガラス針を紡錘体の長軸方向に沿って動かしていくと、ガラス針が紡錘体極付近で引っかかる。さらにガラス針を動かすと、紡錘体が長軸方向に伸長し、それと同時に短軸が短くなる。紡錘体の伸長に要する力を測定し弾性率を見積もったところ、ガラス針を比較的早く ($2 \mu\text{m/s}$) 動かしたときは $4 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 程度であった。また、紡錘体は粘弾性的な特性を持ち、伸長速度を変えて伸長に要する力を測定したところ、長軸方向についての粘弾性的特性は Zener モデルで表すことができた。ポアソン比は 2 程度となり (伸長により、体積が小さくなる)、ゴムなどの等方的な素材や、横紋筋などの細胞 (ポアソン比 ~ 0.5) とは大きく異なることが分かった。また、伸長後ガラス針を固定し、紡錘体を伸長した状態で保持しておく、徐々に体積が元の値に戻ることが観察された。ここで観察された、紡錘体の持つ粘弾性的な性質や、体積の回復といった機構が、紡錘体形状の安定性に寄与していることが考えられる。これらの結果について、2 次元的な粘弾性モデルを構築した。

本研究の2つ目のテーマとして、染色体の整列に関わる、染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における動態を観察した。Xkid は染色体に結合し、結合した状態で微小管上を歩行することで、染色体を紡錘体の赤道面に整列させると考えられている。これまでの研究により、Xkid を細胞質から除去すると、染色体の整列がうまくいかなることが知られている。また、溶液中で Xkid の運動が観察されており、1 分子では微小管上をほとんど動かないが、複数分子が一緒になると（たとえば1つのビーズ上に複数の分子が結合）微小管上を長い距離運動することが知られている。しかし、紡錘体内で Xkid がどのように運動しているかについては分かっていなかった。微小管には方向性があり、Xkid は微小管のプラス端に向かって運動する。紡錘体内では、微小管の方向性にある一定の分布があり、プラス端を紡錘体の赤道面方向に、マイナス端を紡錘体極方向に向けている微小管の割合が多い。つまり、紡錘体中の微小管の方向性の分布は赤道面を挟んで左右対称になっている。このシステムの持つ特徴が、紡錘体内を運動する Xkid の動態にどのような影響を与えるかを調べた。

本研究では、高輝度かつ退色の起こらない Qdot と呼ばれる蛍光微小粒子を Xkid に結合させることで、Xkid の運動を紡錘体内で長時間観察することに成功した。Xkid の結合した Qdot (Xkid-Qdot) は紡錘体中の微小管の配向（長軸方向）に沿って、時折向きを変えながら長い距離（平均で 5 μm 、最大で 17 μm ）運動した。運動の向きと、紡錘体内における Xkid-Qdot の位置の関係を調べたところ、紡錘体極付近では、赤道面へ向かって運動する Xkid-Qdot の割合が多いことが分かった。これに対し、赤道面付近の領域では、運動方向の割合はほぼ半々であった。極付近では、極から赤道面付近に延びる微小管の割合が多く、赤道面付近では、微小管の方向性がほぼ半々であることから、Xkid は紡錘体内で、紡錘体内の微小管方向性分布を反映した運動をしていることが推察された。このことを確かめるため、紡錘体形成の際にキネシン 5 の阻害剤である Monastrol を加えて、単極性の構造物を形成させた。この構造物中では1つの極から微小管が放射状に延びており、7・8割の微小管が極から外向きの方向に延びている。この単極性構造内で Xkid-Qdot の運動を観察したところ、微小管の方向性を反映するように、ほとんどの Xkid-Qdot が中心から外向きに運動した。これらの結果から、Xkid は紡錘体中の微小管の方向性分布を反映した運動をしていること、そして、その特性によって染色体は紡錘体の赤道面に輸送されていると結論された。言い換えると、赤道面を挟んで左右対称な微小管の方向性分布が、紡錘体内における染色体を初めとする物質の輸送の反応場として働いていることが示された。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 高木 潤



(2014 年 1 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文	<p>○<u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki, Tarun M. Kapoor, Yuta Shimamoto, and Shin'ichi Ishiwata. Micromechanics of the vertebrate meiotic spindle revealed by stretching along the long axis. <i>Biophysical Journal</i>, in press.</p> <p>○<u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki, Tarun M. Kapoor, Yuta Shimamoto, and Shin'ichi Ishiwata. Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size. <i>Cell Reports</i> 5:44-50. (2013).</p> <p>○<u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata. Chromosome position at the spindle equator is regulated by chromokinesin and a bipolar microtubule array. <i>Scientific Reports</i> 3, 2808. (2013).</p> <p>Takeshi Itabashi, <u>Jun Takagi</u>, Kazuya Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata. Responses of chromosome segregation machinery to mechanical perturbations. <i>BIOPHYSICS</i> 9:73-78. (2013).</p> <p>板橋 岳志, 鈴木 和也, <u>高木 潤</u>, 石渡 信一 紡錘体の力学計測 <i>生物物理</i>. 49:250-251. (2009).</p> <p>Takeshi Itabashi, <u>Jun Takagi</u>, Yuta Shimamoto, Hiroaki Onoe, Kenta Kuwana, Isao Shimoyama, Jedidiah Gaetz, Tarun M. Kapoor and Shin'ichi Ishiwata. Probing the mechanical architecture of the vertebrate meiotic spindle. <i>Nat Methods</i>. 6:167-72. (2009).</p>
講演 (国際学会)	<p>Kazuya Suzuki, <u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata. Symmetrical shape of the meiotic spindle is dynamically balanced. The Biophysical Society 57th Annual Meeting, Philadelphia, USA, Feb 2013, Poster.</p> <p><u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Yuta Shimamoto, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata. Parameters that regulate size and shape of the vertebrate meiotic spindle. The Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego, USA, Feb 2012, Poster.</p> <p><u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Yuta Shimamoto, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata. Probing the force-balancing mechanism of the meiotic spindle in <i>Xenopus</i> egg extracts. The Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA, Feb 2010, Poster.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演 （国内学 会）	<p>Shin'ichi Ishiwata, Yusuke Oguchi, Sergey V. Mikhailenko, Madoka Suzuki, Katsuhiko Sato, Masako Ohtaki, Yuta Shimamoto, Kazuya Suzuki, <u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi. Self-organization in biomotile systems - molecular motors, auto-oscillation (SPOC) in muscle and meiotic spindle - 1st POSTECH Workshop on Physics of Self-Organization in Bio/Nano-Systems, Korea, Jan 2010, Oral.</p> <p>Takeshi Itabashi, <u>Jun Takagi</u>, Yuta Shimamoto, Hiroaki Onoe, Kenta Kuwana, Isao Shimoyama, 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, San Francisco USA, Dec 2008, Poster.</p> <p><u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Yuta Shimamoto, Jedidiah Gaetz, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata. Direct observation of self-reorganization processes of the mitotic spindle. NTU-WU Joint Symposium 2008 on Bioscience and Biomedical Engineering, Nanyang Avenue, Singapore, Mar 2008, Oral & Poster.</p> <p><u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Yuta Shimamoto, Jedidiah Gaetz, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata. Micromanipulation techniques provide a new insight into self-organization mechanism of the mitotic spindle. Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting and 16th IUPAB International Biophysics Congress, Long Beach, USA, Feb 2008, Poster.</p> <p>Takeshi Itabashi, <u>Jun Takagi</u>, Yuta Shimamoto, Hiroaki Onoe, Kenta Kuwana, Isao Shimoyama, Jedidiah Gaetz, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata. Mechanical architecture of the mitotic spindle in <i>Xenopus</i> egg extracts. Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting and 16th IUPAB International Biophysics Congress, Long beach USA, Feb 2008, Oral.</p> <p><u>Jun Takagi</u>, Takeshi Itabashi, Yuta Shimamoto, Jedidiah Gaetz, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata. Real-time observation of self-organization processes in the mitotic spindle. The 5th 21st century COE symposium on Physics of Self-organization Systems, Tokyo, Japan, Sep 2007, Poster.</p> <p>Takeshi Itabashi, <u>Jun Takagi</u>, Yuta Shimamoto, Jedidiah Gaetz, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata. Effects of the external perturbation on the dynamic properties of the metaphase spindle. 7th HFSP Awardees Annual Meeting, Sunshine Coast, Australia, Jul 2007, Poster.</p> <p>高木潤、板橋岳志、鈴木和也、島本勇太、Tarun M. Kapoor、石渡信一 中期紡錘体の形状制御メカニズムの解明 2013年生体運動研究合同班会議、広島、2013年1月、口頭</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>鈴木和也、<u>高木潤</u>、板橋岳志、石渡信一 Meiotic spindles maintain the symmetrical shape by propagating structural changes to the opposite side. 第 50 回 日本生物物理学会、名古屋、2012 年 9 月、口頭</p> <p>谷田部聡、<u>高木潤</u>、鈴木和也、板橋岳志、石渡信一 Contribution of the microtubule dynamics to the robustness of the mitotic spindle. 第 48 回 日本生物物理学会、仙台、2010 年 9 月、ポスター</p> <p>鈴木和也、<u>高木潤</u>、板橋岳志、石渡信一 Probing the mechanical properties of spindle poles at metaphase. 第 48 回 日本生物物理学会、仙台、2010 年 9 月、口頭・ポスター</p> <p><u>高木潤</u>、板橋岳志、島本勇太、Tarun M. Kapoor、石渡信一 Regulatory mechanism of the shape and size of the vertebrate meiotic spindle. 第 48 回 日本生物物理学会、仙台、2010 年 9 月、口頭・ポスター</p> <p>鈴木 和也、<u>高木 潤</u>、板橋 岳志、石渡 信一 紡錘体形状の左右対称性について：非対称変形に対する応答性 2010 年 生体運動研究合同班会議、東京、2010 年 1 月、口頭</p> <p>鈴木 和也、<u>高木 潤</u>、板橋 岳志、石渡 信一 分裂中期にある紡錘体形状の左右相称制御 第 47 回 日本生物物理学会、徳島、2009 年 10 月、口頭・ポスター</p> <p><u>高木 潤</u>、板橋 岳志、Tarun M. Kapoor、石渡 信一 紡錘体の持つダイナミックな形状制御機構の解析 第 46 回 日本生物物理学会、福岡、2008 年 12 月、ポスター</p> <p><u>高木 潤</u>、板橋 岳志、阿部 祐大、島本 勇太、Tarun M. Kapoor、石渡 信一 紡錘体の力学特性 2008 年 生体運動研究合同班会議、仙台、2008 年 1 月、口頭</p> <p><u>高木 潤</u>、板橋 岳志、島本 勇太、Jedidiah Gaetz、Tarun M. Kapoor、石渡 信一 紡錘体における自己組織化の直接観察 第 45 回 日本生物物理学会、横浜、2007 年 12 月、口頭・ポスター</p> <p>他 3 件</p>