

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

平成 26 年（2014 年）2 月

高木 潤

Jun TAKAGI

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

平成 26 年（2014 年）2 月

早稲田大学 先進理工学研究科

物理学及応用物理学専攻 実験生物物理学研究

高木 潤

Jun TAKAGI

目次

1	序論	4
1.1	研究の背景	4
1.2	本研究の概要	9
1.3	図	13
2	実験材料と方法	18
2.1	序論	18
2.2	試料調製法	19
2.2.1	蛍光ラベル化チューブリンの調製	19
2.2.2	アフリカツメガエル脱膜精子の調製	29
2.2.3	アフリカツメガエルの飼育	31
2.2.4	アフリカツメガエル卵エクストラクトの調製	34
2.2.5	Xkid-GFP のエクストラクト中での発現	42
2.2.6	抗 GFP 抗体付 Qdot の作製	43
2.3	実験装置	44
2.3.1	光学系：落射蛍光顕微鏡	44
2.3.2	光学系：共焦点顕微鏡	45
2.3.3	力学操作系	45
2.3.4	微小ガラス針の作製	46
2.3.5	スライドガラスのコーティング	48
2.4	実験方法	51
2.4.1	紡錘体の形成と蛍光観察	51
2.4.2	紡錘体の力学顕微操作	54
2.4.3	紡錘体の粘弾性測定（1次元モデル）	55
2.4.4	紡錘体の粘弾性測定（2次元モデル）	56
2.4.5	エクストラクト中での阻害剤の使用	58
2.4.6	DMSO aster	61
2.4.7	FSM (Fluorescent Speckle Microscopy)を用いた微小管ダイナミクスの観察	62
2.4.8	紡錘体の3次元観察	65
2.4.9	Xkid-Qdot の観察	69
2.4.10	EB1を用いた微小管のプラス端の観察	72
2.4.11	検定方法	73
2.5	図	74
3	中期紡錘体の形状制御機構の解明	79
3.1	序論	79
3.2	中期紡錘体の形状パラメータ	81

3.2.1	実験結果.....	81
3.2.2	考察	83
3.3	中期紡錘体の切断と融合.....	85
3.3.1	実験結果.....	85
3.3.2	考察	87
3.4	中期紡錘体の力学特性.....	88
3.4.1.1	中期紡錘体の伸長.....	88
3.4.1.2	伸長に対する紡錘体形状の応答.....	89
3.4.1.3	伸長に要する力の測定.....	90
3.4.1.4	中期紡錘体の2次元粘弾性モデル.....	91
3.4.2	考察	94
3.5	本章のまとめ.....	98
3.6	図	100
4	染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察.....	126
4.1	序論	126
4.2	実験結果	127
4.2.1	紡錘体内での Xkid-Qdot の運動の観察	127
4.2.2	Xkid-Qdot の運動の領域依存性	130
4.2.3	Xkid-Qdot の微小管プラス端への集積	132
4.2.4	Hexylene glycol 存在下での Xkid-Qdot の運動	133
4.2.5	DMSO aster 内での Xkid-Qdot の運動	134
4.3	考察とまとめ.....	135
4.4	図	137
5	まとめ	158
5.1	本研究のまとめ.....	158
5.2	課題と今後の展望.....	158
	動画	160
	用語（英訳、和訳、正式名称、略称）	162
	参考文献	163
	研究業績	172
	謝辞	177

1 序論

1 序論

1.1 研究の背景

私たちの身体は 1 つの細胞（受精卵）が分裂することによって形作られる。細胞分裂では、遺伝情報が詰め込まれた染色体は複製され、2 つの娘細胞に均等に分配される。染色体の分配が正確に行われず、染色体の本数に過不足が生じると、細胞のガン化や出生異常などをもたらす。また、ガン細胞では正常な細胞に比べ細胞分裂が高い頻度で行われていることから、細胞分裂に関わる分子を標的にした薬剤がガンの治療に使われている。つまり細胞分裂、染色体分配の仕組みを解明することは、出生異常や日本人の死因の 3 割を占める癌の治療につながり、医学的に非常に重要な意味を持つ。

染色体の分配は、紡錘体と呼ばれる構造物によって行われる。紡錘体は大きさ 10-50 μm の超分子集合体であり、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、線維状の分子集合体）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（MAPs: Microtubule Associated Proteins）が介在することで形成される。細胞分裂期に入り、核膜が崩壊すると、紡錘体の形成が始まる（図 1-1）。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、間期で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、染色体は紡錘体の 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、細胞は 2 つの娘細胞に分裂し、細胞分裂が完了する。

これまでの、主に特定分子の機能を阻害する実験によって、細胞分裂に関わる様々な分子が特定されてきた。例えばタキソールと呼ばれる微小管を安定化する薬剤を細胞質中に加えると、細胞周期が途中で停止する(Schiff and Horwitz, 1980)。また、薬剤や抗体を用いて細胞質中のキネシン 5 やダイニンと呼ばれる分子モーターの機能を阻害すると、紡錘体形状は大きく変化する(Heald *et al.*, 1997; Mayer, 1999)。このような手法を用いた実験により、微小管をはじめ、紡錘体の形成に関わる分子モーター（キネシン 5、キネシン 13、ダイニ

ン等)、染色体の整列・輸送に関わる分子モーター (キネシン 10、キネシン 7 等)、MAPs など、数多くの分子が特定された。

紡錘体の構造について、詳しく述べる。紡錘体は、長軸方向に延びる多数の微小管と、微小管を束ねる様々な種類の分子モーターや MAPs によって構成される (図 1-2) (Walczak *et al.*, 1998; Loughlin *et al.*, 2008; Manning and Compton, 2008)。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、紡錘体上で染色体やタンパク質を輸送する。またある種のキネシンやダイニンは 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。微小管を脱重合させるキネシンも知られている (Moore and Wordeman, 2004)。このような微小管と分子モーターの動的性質により、紡錘体の構造は非常に動的なものとなっている。例えば、紡錘体内の微小管の半減期は 1 – 2 分程度である (Sawin and Mitchison, 1991a)。また、紡錘体内の微小管は分子モーターの働きにより、紡錘体の赤道面から紡錘体極の方向へ約 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ の速さで輸送されている (Sawin and Mitchison, 1991a)。

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。これらの化学物質や、微小管を構成するチューブリンや、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。

紡錘体の形成に関わる分子の性質は、精製した分子を主に溶液中で観察することで調べられてきた。例えば、キネシン 5 は 4 本の足 (モータードメイン) を持ち、2 本の微小管を架橋するとともに、それぞれの微小管上を歩行することで 2 本の微小管同士をスライドさせる (Kapitein *et al.*, 2005)。このような性質を持つことからキネシン 5 は、紡錘体内でも微小管同士を架橋し、スライドさせることで、紡錘体の 2 極性の構造の維持に寄与している

と考えられている。

紡錘体は非常に複雑なシステムであり、紡錘体を構成する分子同士は直接的または間接的に相互作用している。例えば、細胞質中には微小管の重合を促進する分子と、脱重合を促進する分子が共存しており、それらの濃度比や機能活性の違いによって微小管の重合・脱重合のバランスが決まる(Ohi *et al.*, 2007; Loughlin *et al.*, 2011; Petry *et al.*, 2013)。また、キネシン 5 は 1 本の微小管に結合した時と、2 本の微小管に同時に結合した時で運動の様子が変わる(Roostalu *et al.*, 2011)ことから、紡錘体内の微小管の密度によって、運動全体の様子がかなり変わってくると考えられる。また、キネシン 5 はダイニンによって紡錘体の赤道面から紡錘体極へ向かって輸送される(Uteng *et al.*, 2008)。このような相互作用の他、分子は他の分子が発生する力により機能を変調することが知られている。例えば、分子モーターの運動や微小管の重合・脱重合は、分子モーターや微小管が受けている力の大きさや向きに依存することが知られている(Svoboda and Block, 1994; Dogterom and Yurke, 1997; Oguchi *et al.*, 2011)。紡錘体内では様々な種類の分子モーターや微小管が共存しており、例えば微小管は分子モーターによって力を受けており、また分子モーターは微小管を介して他の分子モーターからの力を受ける。しかし、分子が発生するこれらの力がどのように紡錘体内でバランスされているか、またそのバランス作用が紡錘体全体、つまり紡錘体というシステムをどのように特徴づけているかについては、まだよく分かっていない。

それでは、このような複雑なシステムとしての紡錘体の性質を知るためにはどのような手法を用いて調べればよいだろうか。特定分子の機能を阻害するような実験では、その分子の果たす役割の一端を知ることができるが、標的とした分子以外の機能も直接的・間接的に変調してしまい、最終的にできた構造物は、正常な紡錘体とは全く異なるシステムである可能性がある。そのため、機能を阻害する前後の紡錘体の性質を比べることで紡錘体の持つ複雑なシステムを理解するのは難しい。また、溶液中で観察された分子の挙動からシステムを理解しようとしても、分子が細胞内（紡錘体内）でも溶液中と同じような挙

動をとっているとは限らない。というのも、細胞質中にはリン酸化酵素などのさまざまな制御タンパク質が存在する他、タンパク質が込み合った状態にあるため、溶液中とは全く異なる挙動を示す可能性があるためである。他の分子との相互作用によって、溶液中と異なる挙動を示す可能性もある。

そこで本研究では、(1) 複雑なシステムとしての紡錘体の性質を、分子機能を阻害することなく調べること、(2) 分子の挙動を紡錘体内で観察し、分子が複雑なシステムの中でどのように機能しているかを調べること、という2点を行った。

(1) について、紡錘体のシステムの持つバランスを外部からの力によって崩し、その後の紡錘体の応答、つまりシステムが回復されていく過程を観察するで、システムの特徴を明らかにすることを目指した。本研究ではまず分裂中期の紡錘体の形状に着目した。形状とは、紡錘体の大きさと形を意味する。分裂中期において、紡錘体の形状は長時間安定しており（たとえば紡錘体の長軸の長さは30分で4%程度しか変わらない）、外部からの力により変形させても、しばらくして元の形状に戻る(Itabashi *et al.*, 2009; Shimamoto *et al.*, 2011)ことから、紡錘体には形状を制御するような機構が備わっていることが考えられる。そこで、本研究ではこの機構を調べるため、紡錘体の形状を時空間的に詳細に調べること、形状に関わるパラメータ（形状、紡錘体内の微小管量、微小管密度等）を導出する(3.2)、導出した各パラメータを力学的に操作することで、各パラメータの性質とパラメータ間の関係を明らかにする(3.3)、形状の力学的特性（粘弾性的特性）を明らかにする(3.4)、ことを行った。

(1) について、少し異なる視点から述べる。分裂前中期から中期における染色体の赤道面への整列や、分裂後期における染色体の紡錘体極への輸送は、分子モーターや微小管の脱重合による力によって行われる。これらの力は、紡錘体の構造を足場とすることで生じる(図 1-3)。また、紡錘体は星状体微小管を介して細胞膜と相互作用しており、細胞外からの力も紡錘体に伝達されている。これらのことから、紡錘体の構造には、これらの力

に耐えうる強度がある必要がある。このような理由から、紡錘体の力学特性を測定することは重要であり、近年研究が盛んになってきている(Dumont and Mitchison, 2009; Itabashi *et al.*, 2009; Gatlin *et al.*, 2010; Shimamoto *et al.*, 2011)。本研究では、紡錘体の長軸方向、つまり染色体が分配される方向に力を加えた際の粘弾性的性質の測定を行った (3.4)。

(2) については、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 を細胞質から除去すると、染色体の整列がうまくいかなくなる (Antonio *et al.*, 2000; Funabiki and Murray, 2000)ことから、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。これまでの研究において、溶液中で Xkid の運動は観察されており、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 (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報告されている(Yajima *et al.*, 2003)。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まだ分かっていなかった。また、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(Yajima *et al.*, 2003)。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(Brugués *et al.*, 2012)。つまり、紡錘体内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 (図 1-4)。微小管の方向性の左右対称な分布という、システムの持つ特徴が、紡錘体内の分子 (本研究では Xkid) の働きにどのような影響を与えるかを調べるのが本研究の主な課題となる。また、Xkid がどのようにして紡錘体の赤道面を認識しているのか、という疑問についても、本研究により解答が得られた。

多くの分子によりシステムが組みあがり、さらにそのシステムの特徴を生かして分子が細胞分裂、染色体分配という仕事を行う。これまでの研究では、関わる分子は何か、ということに重きが置かれてきたが、本研究では、システムとしての特徴と機能に着目した。

1.2 本研究の概要

本研究のテーマは大きく分けて、紡錘体の形状制御機構の解明（第3章）、染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察（第4章）に分けられる。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、しばらくすると元のような形に回復し安定化する。そこで第3章では、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、形状安定性のメカニズムを調べた。次に、正常な形状をした紡錘体内では、微小管の方向性の分布が、紡錘体の赤道面を中心として左右対称となっている。また、染色体結合キネシン Xkid は微小管のプラス端に向かって運動することが知られている。そこで第4章では、Xkid の運動を紡錘体内で直接観察することにより、Xkid が紡錘体内の左右対称な微小管方向性分布を反映した運動をしていることを確認した。これら2つのテーマを言い換えると、第3章では染色体整列の反応場としての紡錘体形状の性質について調べ、第4章では Xkid が染色体整列の過程で反応場の性質をいかに利用しているかということ調べたことになる。次に各章の概要を述べる。

第1章では、本研究の背景と概要を述べる。

第2章では、本研究の実験材料と実験方法について述べる。本研究では、アフリカツメガエル卵エクストラクト系と呼ばれる、細胞膜のない卵抽出液中で紡錘体を形成させた。この系を用いることで、本来細胞の中にあり直接物理的な操作をすることができない紡錘体を、ガラス針等を用いて顕微鏡下で直接操作することが可能になる。本章ではまず、この卵抽出液の作製方法と、紡錘体の形成方法、紡錘体の観察方法について述べる。紡錘体は3次元的な構造物であり、顕微鏡の光軸方向に 10 - 20 μm 程度の厚みがあるため、紡錘体の構造を詳細に調べるためには、紡錘体を3次元的に観察する必要がある。そこで本研究では共焦点蛍光顕微鏡を用いた3次元スキニングの方法を用い、紡錘体の形状の他、紡錘体内の微小管量、微小管密度を定量的に評価する方法を確立した。続いて、ガラス針を用いた紡錘体の切断、融合、伸長、粘弾性測定などの力学操作の方法を述べる。また、本

研究では紡錘体内の染色体結合キネシン Xkid の挙動を、Qdot と呼ばれる蛍光色素を用いて観察した。本章で Xkid の発現方法、抗体付 Qdot の作製方法、紡錘体内での Qdot の観察方法、観察された Xkid の運動の解析方法について述べる。

第 3 章の概要を述べる。本章では、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 α ($= W/L$, aspect ratio) と γ ($= V/LW^2$)、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分かった。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 20% 程度小さくなり、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 本の微小ガラス針を挿入し、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、伸長後にガラス針を固定し、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。

第 4 章では、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の観察結果を述べる。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) は紡錘体内の微小管の配向 (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 $5 \mu\text{m}$ 、最大で $17 \mu\text{m}$) 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

1 序論

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。この構造物内では 1 つの極から微小管が放射状に伸びており、7・8 割の微小管が極から外向きの方向に伸びている。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 は紡錘体内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。

第 5 章では本研究のまとめを述べる。

以降、動画の説明、用語の説明、参考文献、研究業績、謝辞を述べる。

1.3 図

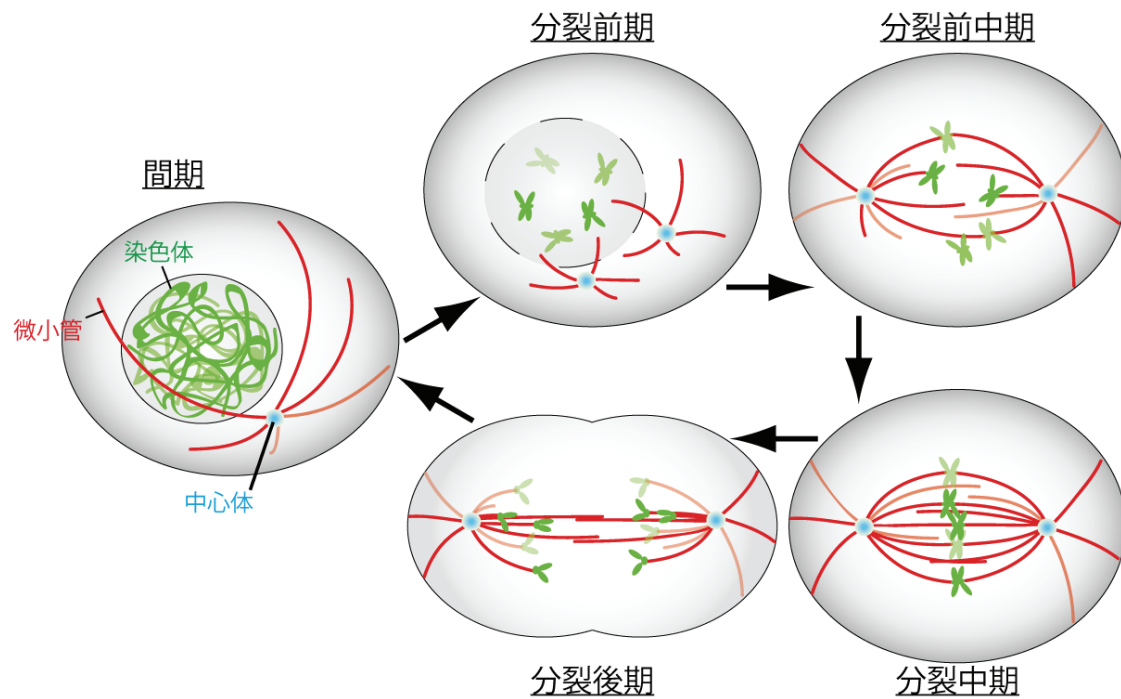


図 1-1 細胞周期と紡錘体の形成

染色体や中心体の複製は間期に行われる。分裂期に入ると核膜が崩壊し、複製された中心体同士の距離が離れていき、紡錘体の形成が始まる。分裂前中期から中期にかけて、微小管による動原体の捕捉、紡錘体の形成の完了、染色体の紡錘体赤道面への整列が起こる。すべての動原体が微小管に捕捉され、姉妹染色体の動原体間に正常な張力がかかると、分裂後期へ移行する。分裂後期に入ると、姉妹染色体間の結合の解離、微小管の脱重合による染色体の紡錘体極への移動、紡錘体の長軸方向への伸長が起こる。最終的に収縮環によって細胞自体が2つに分裂することで分裂期が終了する。

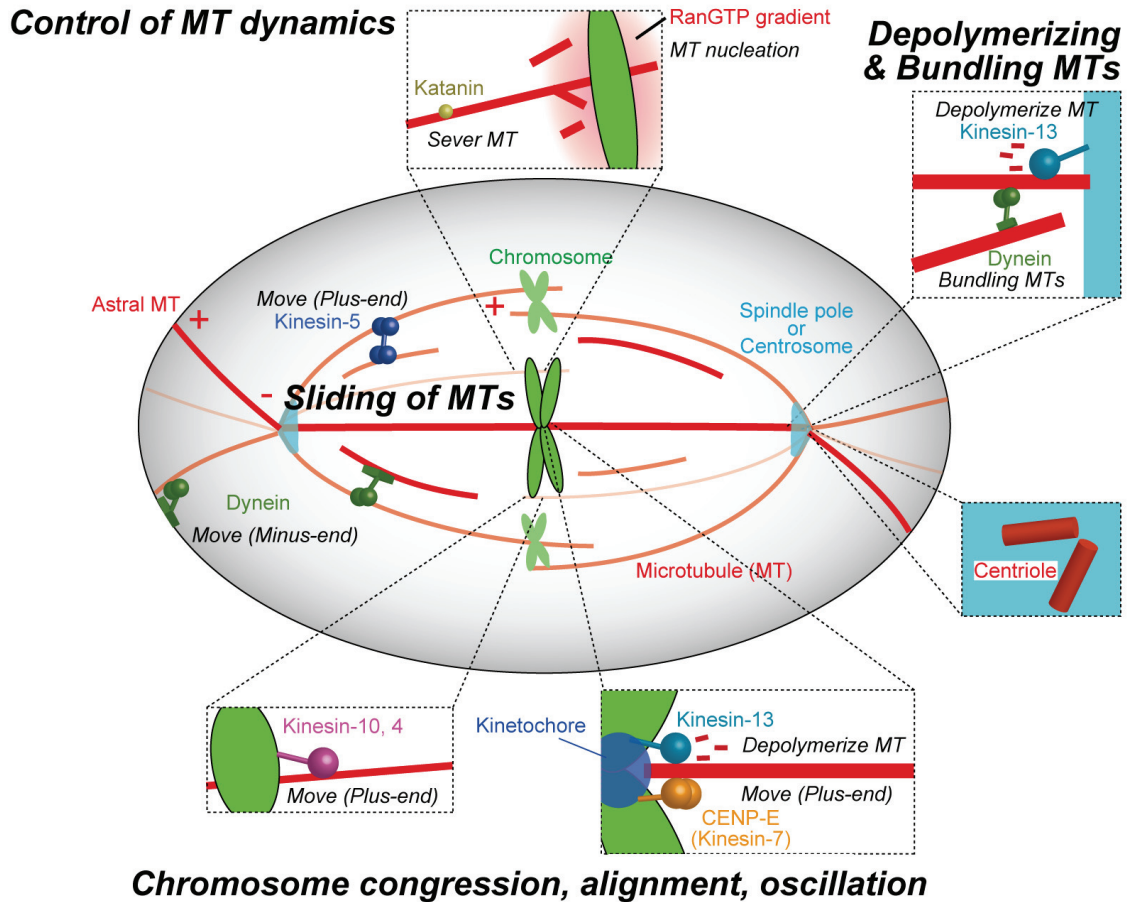


図 1-2 中期紡錘体の構成要素

染色体(chromosome)から RanGTP を介した微小管重合シグナルが出ており、染色体付近では微小管の核形成と重合が活発に起こっている。また、細胞質中には Katanin など、微小管を切断、脱重合、不安定化するタンパク質が存在している。紡錘体極(Spindle pole)には Kinesin-13 (アフリカツメガエルでは MCAK や XKIF2) や Dynein (Dynein-Dynactin complex)が集積しており、それぞれ、微小管を脱重合、微小管を束ねるといった役割を担う。Kinesin-5 (アフリカツメガエルでは Eg5) と Dynein は 2 本の微小管を架橋することで紡錘体の構造を保持し、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。紡錘体極から細胞膜へ延びる微小管は星状体微小管(astral microtubule)と呼ばれ、細胞膜に存在する Dynein などを通して細胞膜と相互作用する。染色体の集合(congression)、整列(alignment)、振動(oscillation)は、動原体(kinetochores)における、微小管の重合・脱重合、Kinesin-13 による

微小管の脱重合、CENP-E の微小管上の歩行、そして染色体腕における、Kinesin-10（アフリカツメガエルでは Xkid）や Kinesin-4（アフリカツメガエルでは Xklp1）の微小管上の歩行による力によって起きていると考えられる。

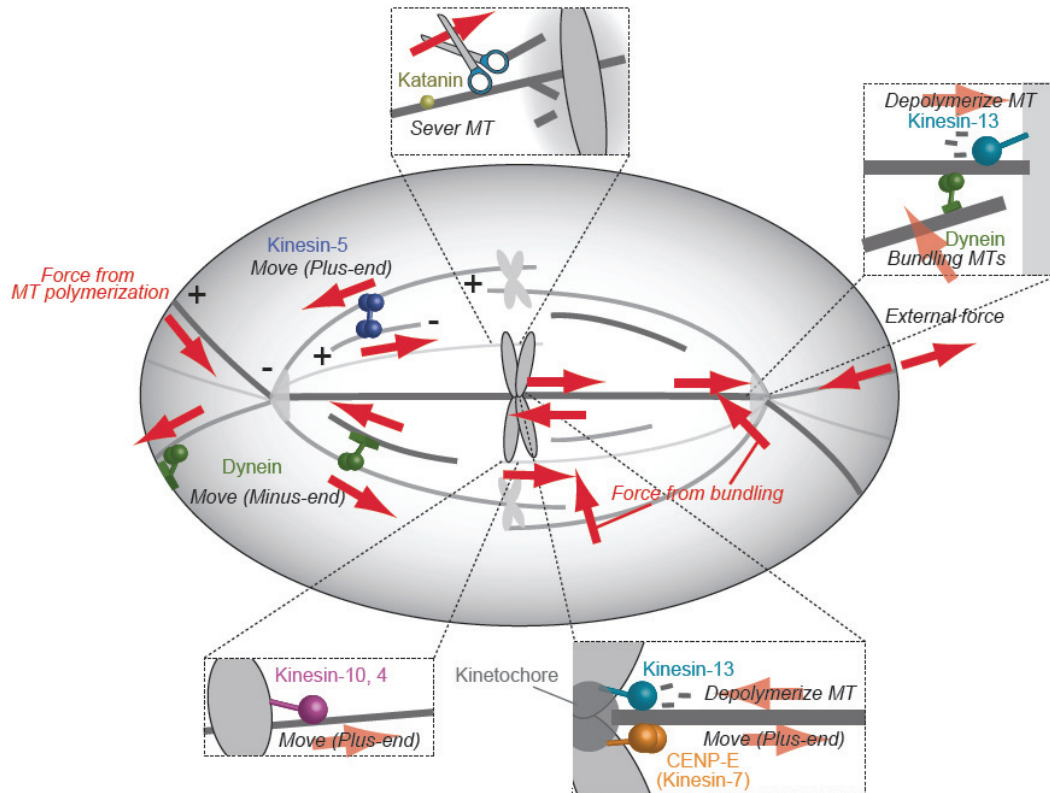


図 1-3 中期紡錘体内の力のバランス

紡錘体内の微小管にかかる力を図示した（赤矢印）。微小管には大きく分けて、分子モーターによる力（歩行、脱重合）、微小管の重合・脱重合による力、微小管や染色体などの弾性による力、外部からの力などの力が加わっている。紡錘体の形状が一定の時（分裂中期）は、これらの力が紡錘体全体でうまくバランスされていると考えられる。同様に、分裂中期においては染色体や紡錘体極においても微小管や分子モーターによる力がバランスされていると考えられる。分裂後期に入ると、姉妹染色体間の結合の解離、染色体結合キネシンの失活などにより全体の力のバランスが崩れることで、染色体の均等な分配、紡錘体の長軸方向への伸長が起これると考えられる。

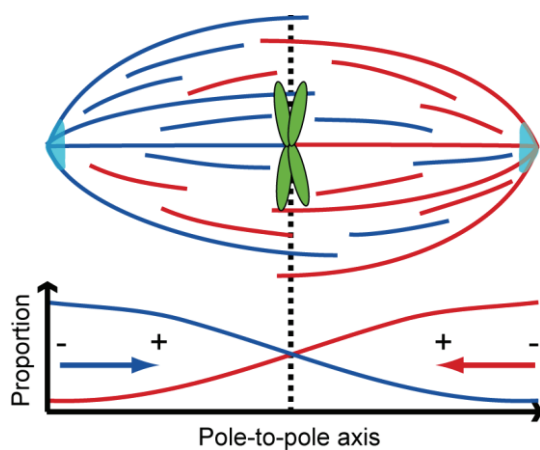


図 1-4 中期紡錘体内の微小管方向性分布

赤、青：微小管。緑：染色体。水色：紡錘体極。

中期紡錘体内の微小管方向性分布は赤道面を中心にして左右対称であることが知られている。赤道面付近では、右向きの微小管（模式図中で、マイナス端が左、プラス端が右にある微小管；青色）と左向きの微小管（赤色）の割合は同程度であり、左側（右側）の紡錘体極付近では右向き（左向き）の微小管が7割程度を占める。

2 実験材料と方法

2.1 序論

紡錘体は細胞膜に囲まれているため、直接物理的な操作をすることは難しい。しかし本研究では、アフリカツメガエル卵エクストラクト系という、細胞膜のない卵抽出液中で紡錘体を形成したことで、顕微鏡下で紡錘体を力学操作することが可能になった。またこの系は、カルシウム濃度を調整することで細胞周期を人為的に制御できる、といった利点がある。その反面、紡錘体の形成具合がカエルの卵の質や、卵抽出液作製の上手下手に大きく依存してしまうため、難しい実験系でもある。そこで、本章では作製法を細かいコツを含め述べる。

紡錘体の力学特性を調べるため、本研究では微小ガラス針を用いて紡錘体を顕微鏡下で直接操作した。具体的には紡錘体の切断、融合、伸長といった操作を行った。ピエゾアクチュエータを用いることで、精度よく微小ガラス針を操作することが可能となり、紡錘体の粘弾性的性質を定量的に調べることに成功した。本章では、微小ガラス針の作製方法、操作方法と、力学特性の解析方法についても述べる。

紡錘体は3次元的な構造物であり、顕微鏡の光軸方向にも10-20 μm 程度の厚みがあるため、紡錘体の構造を詳細に調べるためには紡錘体を3次元的に観察する必要がある。本研究では、共焦点蛍光顕微鏡と、デコンボリューションソフトを用いることで、紡錘体の構造を3次元的に定量的に測定することに成功した。本章ではこれらの測定方法について述べる。

本研究では染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内での挙動を、Qdot と呼ばれる微小蛍光粒子を介して観察、解析することに成功した。観察にはスライドガラスのコーティングや、背景光を可能な限り減らすための工夫をする必要があった。また、解析の際には Qdot の顕微鏡画像上での位置を紡錘体内の座標に変換するといった作業が必要であった。本章ではこれらの方法について述べる。

2.2 試料調製法

2.2.1 蛍光ラベル化チューブリンの調製

チューブリンは Hyman らの方法(Hyman *et al.*, 1991)に従って豚脳から精製した。以下に示す手順は、本研究室卒業生、上村想太郎博士の博士論文（2004年3月）を引用・一部改変したものである。

溶液

				備考
Stock	10mg/ml	Leupeptin	100μ l	
	0.2M	PMSF(MetOH)	1ml	
	0.1M	GTP	5ml	pH7.0 KOH
	0.1M	ATP	10ml	pH7.0 KOH
	1M	DTT	500μ l	
	2M	L-Glutamic Acid	50μ l	Sigma G1501
	100mM	TMR-SE(DMSO) C-1171(Invitrogen)	20μ l	DMSO 20μ lに対し1.06mg
	100mM	Alexa488(DMSO) A-20000(Invitrogen)	20μ l	1mgに対しDMSO15.5μ l
	0.1M	Na-Pi Buffer	50ml	以下2つを混ぜpH6.8にする
	0.1M	NaH ₂ PO ₄		
	0.1M	Na ₂ HPO ₄		
		Glycerol		
		MES	20g	
	溶液	0.5N	NaOH	500ml
0.5N		HCl	500ml	21.5mlを500mlでメス
1M		MgCl ₂	0.8ml	
0.5M		MgSO ₄	1ml	
0.05M		EGTA	40ml	0.7607gを40mlでメス
0.5M		HEPES (pH8.6 NaOH)	15ml	1.79gを15mlでメス
0.5M		PIPES (pH6.8 KOH)	10ml	1.51gを10mlでメス
Washing Buffer	500ml			
	240mM	Sucrose	41.1g	
	10mM	MgCl ₂	1M	5ml
	10mM	Na-Pi Buffer	0.1M	50ml
RB	500ml	pH6.8 NaOH		
	10mM	MES	1.07g	
	0.5mM	MgSO ₄	0.5M	500μ l
	100mM	KCl		3.73g
	1mM	EGTA	0.05M	10ml
	2μ g/ml	Leupeptin	10mg/ml	100μ l
	0.4mM	PMSF	0.2M	1ml
	1mM	DTT	1M	500μ l

ATP用300mlとGTP用200mlにわかる

2 実験材料と方法

Buffer A	500ml	pH6.8 NaOH		
	100mM	MES		10.7g
	0.5mM	MgCl ₂	1M	250μ l
	1mM	EGTA	0.05M	10ml
PC	600ml	pH6.8 NaOH		
	20mM	MES		2.57g
	0.5mM	MgCl ₂	1M	300μ l
	1mM	EGTA	0.05M	12ml
PC用300mlとGTP用300mlにわけける				
Buffer B	10ml	pH6.9 NaOH		
	0.9M	MES		1.919g
	11mM	MgSO ₄	0.5M	220μ l
	1mM	EGTA	0.05M	200μ l
H-pH Buffer	20ml	pH8.6 NaOH		
	100mM	HEPES	0.5M	4ml
	1mM	MgCl ₂	1M	20μ l
	1mM	EGTA	0.05M	400μ l
60% GlycerolH-pH Buffer	20ml	pH8.6 NaOH		
	100mM	HEPES	0.5M	4ml
	1mM	MgCl ₂	1M	20μ l
	1mM	EGTA	0.05M	400μ l
		60% Glycerol		12ml
40% GlycerolH-pH Buffer	20ml	pH8.6 NaOH		
	100mM	HEPES	0.5M	4ml
	1mM	MgCl ₂	1M	20μ l
	1mM	EGTA	0.05M	400μ l
		40% Glycerol		8ml
× 2 Glycerol PB	20ml	pH6.8 KOH		
	160mM	PIPES	0.5M	6.4ml
	10mM	MgCl ₂	1M	200μ l
	2mM	EGTA	0.05M	800μ l
	2mM	GTP	0.1M	400μ l
		66% Glycerol		13.2ml
× 4 BRB	1ml			
	320mM	PIPES(pH6.8 KOH)	0.5M	640μ l
	4mM	MgCl ₂	1M	4μ l
	4mM	EGTA	0.05M	80μ l
L-Glutamic acid	1ml			
	100mM	L-Glutamic Acid × 4BRB	2M	50μ l 500μ l
		40% Glycerol		400μ l

蛍光色素

蛍光試薬は以下のものを使用した（主に、TAMRA、Alexa 488 を使用した）。一級アミン基に結合する、Succinimidyl Ester (SE)を用いた。

名称	メーカー	型番
5(6)-TAMRA-SE	Molecular Probes	C-1171
Alexa Fluor 488-SE	Molecular Probes	A-20000
Oregon Green 488 carboxylic acid, SE 5-isomer	Molecular Probes	O-6147
CMNB-caged Carboxyfluorescein-SE	Molecular Probes	C-20050

手順

事前準備

- ・ 試薬等のストックの確認
- ・ 脳の注文（2 個、東京芝浦臓器（03-3471-3371）。注文の際、脳を受け取る時間をなるべく早くしてもらおう（10 時前）。新鮮な脳ほど、収量が多い。
- ・ 遠心機の予約（GRX220：2 日目の昼過ぎまで、CP70MX：2 日目全日、3 日目断続的に）

1 日目

- ・ カラムの準備
- ・ 溶液の準備
- ・ 場所の確保
- ・ まな板、包丁(2 本)、ミキサー、おたま、洗い用のビーカー(500 ml)2 つをそれぞれ洗う。
- ・ 新しい MQ 500 ml 程度を低温室で冷やしておく。
- ・ GRX220 に 500 ml チューブ用ローターをいれ 4°C で冷やす。
- ・ 75 ml チューブ用ローター、25 ml 用ローターを低温室へ移動し冷やしておく。
- ・ 低温室に全てのものを移動。

2 実験材料と方法

カラムの準備

- P11 ビーズ (Cellulose Phosphate 100 g Whatman)
 - ピペッター
 - NaOH、HCl、PC
 - 20の三角フラスコ、カラム、リトマス紙 (Whatman)
1. 三角フラスコに NaOH 500 ml、ビーズ 10 g を加え、プラスチックピペットなどを用いて攪拌したのち 5 分間放置する。
 2. 上澄みを捨てピペッターで混ぜながら MQ で数回洗う。リトマス紙で pH をはかり pH11 以下になるまで、沈殿と上澄み捨てを繰り返す。
 3. 上澄みを捨てたのち、HCl 500 ml を加え、ピペッターで混ぜ 5 分放置。
 4. 上澄みを捨てたのち、MQ で数回洗う。pH メータで pH が 3 以上になるまで沈殿と上澄み捨てを繰り返す。
 5. カラムを組み立て、上から MQ を流し、内部を洗浄する。
 6. 4 の上澄みを捨てたのち、Buffer A を加え、NaOH で pH 6.8 にあわせる。以降の作業は低温室で行う。
 7. ビーズ溶液をピペッターで攪拌しながら、カラムに数回に分けて流し込む。ビーズがカラムの 8-9 割くらいになるまで流し込む。
 8. カラムに PC 液をギリギリまで加え、チューブなどに空気が入らないように注意しながらふたをする。200 ml 位 PC 液を流し、カラムを平衡化する。1 秒 1 滴くらいの流速で行う。

注意点

- 冷えたローターは結露しやすいため、遠心機のある部屋を冷房でよく冷やしておく。遠心の際には結露をよく拭きとる。

2 日目

1. ビーカーを2つ用意し、cold MQ と Washing buffer を入れる。ATP、GTP、Leupeptin、PMSF、DTT を少し溶かしてから氷にいれ低温室に準備。ただし PMSF は on ice だと結晶が析出するので、室温に置いておく。
2. 注文した豚脳をもらいに行く。氷入りの Ice Box を持参。
3. カップ麺の空容器に氷を入れサランラップをかける。まな板、包丁、キムタオル、チップの用意。RB 500ml に、Leupeptin (10 mg/ml) 100 μ l、PMSF (0.2 M) 1 ml、DTT (1 M) 500 μ l 加える。RB 500 ml を 300 ml (+ATP 3 ml) と 200 ml(+ GTP 2 ml)にわけろ。おたまを使い脳を cold MQ で洗い、氷入り容器に置く。脳のひだに指を突っ込み迅速に皮と血管をはぐ。終わったら Washing buffer で洗い (よく水をきる)、包丁で細切れにしてからミキサーに入れる。RB-ATP 300ml を足し、泡立てないように最初は少しずつ混ぜ、その後 Low モードで 25 秒混ぜる。混ぜたのち、遠心用の 500 ml チューブ 2 本に移す。ミキサーに残ったものも残りの RB-ATP で洗い、チューブに移す。

ごみ落とし遠心 GRX220 500 ml2 本 6.3 K 2°C40' (8,900 g 40')

75 ml チューブ 4 本、500 ml ビーカー 1 個、小ピペッターを低温室に準備する。

遠心が終わったチューブを氷入りのアイスボックスにそっと入れ、低温室へ持って行く。上澄みを 500ml ビーカーに移し (沈殿を入れないように)、さらに上澄みを 75 ml チューブ 4 本に分け、バランスをあわせる。

ゴミ落とし遠心 CP70MX 75 ml4 本 36 K 2°C 50'

恒温槽の電源をつけ、37°C に設定する。

500 ml ビーカーを 1 つ準備。

脳の残りかすはキムタオルでこして密封しオレンジの袋に入れ後で捨てる。

4. 遠心後の上澄みを 500 ml ビーカーに移す。上澄み液をスターラーで混ぜながら 0.1 M ATP を 3 ml を加え、Glycerol を 1/3 volume 加える (全体量が 300ml 以上になるように)。

2 実験材料と方法

5. ラップをし、恒温槽で混ぜながら **37°C40 分放置**(重合具合による)。泡立たないように、注意する。

75 ml チューブ用ローターを 37°Cに暖める。

75 ml チューブ 6 本、天秤、小ピペッターを準備。

6. チューブリン溶液を 75ml チューブ 6 本に移しバランスをあわせる

微小管集め遠心 CP70MX 75 ml 6 本 36 K 37°C 60' (190,000 g 60')

ピペッター5 本、25 ml チューブ 2 本、上澄み捨て用ビーカー、天秤、チューブ冷却用の氷を低温室に準備。

7. 遠心後、上澄みを捨てる。各チューブに RB-GTP を 5 ml 程度加え、5 分くらい氷で冷やす。その後泡立たないようにピペッターでサスペンド。ピペッターの先でつついたりしてペレットをはがし、完全に溶かす。30 分くらいかける。5 分おきくらいにサスペンドを行う。
8. 1 本のチューブにまとめ、全量を 50 ml くらいにする（次に Glycerol を 1/3 量加えるので、入れすぎないように注意）。

ゴミ落とし超遠心 CP70MX 75 ml 2 本 36 K 2°C 50' (190,000 g 50')

75 ml チューブ用ローターを 37°Cに暖める。

75 ml チューブ 2 本、ATP、大小のピペッターを用意。

Glycerol を温める。

9. 上澄みを新しい 75 ml チューブ 1 本にピペッターを使い移し、0.1 M ATP を 750 μ l 加え、Glycerol を 75ml になるまで (1/3 vol) 加える。よく混ぜたら恒温槽で **37°C30 分**重合させる。ときどき混ぜる。

天秤を準備。

75 ml チューブ用ローターの温度の確認(37°C)。

25 ml チューブ用ローターを低温室で冷やしておく。

10. バランス用チューブに Glycerol と水を入れ、バランスをとる。

微小管集め超遠心 CP70MX 75 ml 2 本 40 K 37°C 60' (190,000 g 60')

25 ml チューブ 2 本、天秤、上澄みを捨てるビーカーを低温室に準備。

11. 上澄みを捨て、ペレットを 32 ml くらいの RB-GTP で冷しながらサスペンド。30 分くらいかけ脱重合させる。5分おきに混ぜる。完全に脱重合したら、液体窒素で凍らせ-80°C で保存。この状態だと、何年も保存可能。

3 日目

12. チューブリン溶液を解凍したのち、25 ml チューブ 2 本に移し、30 分ほど氷上放置。

ゴミ落とし超遠心 CP70MX 25 ml 2 本 43 K 2°C 40'

25 ml チューブ 2 本、大小のピペッター、ATP を準備。

13. 上澄みを用意した 25 ml チューブにピペッターを用いて移す。0.1 M ATP 0.25 ml を加えたのち、Glycerol をチューブいっぱいに加える。混ぜた後 **37°C 30 分** 放置。ときどき混ぜる。

25 ml チューブ用ローターを 37°C にする。

天秤を準備。

14. **微小管集め超遠心 CP70MX 25 ml 2 本 43 K 37°C 60' (190,000 g 60')**

上澄みを捨てるビーカーを準備。

PC 300 ml に 0.1 M GTP 1.5 ml を加える。

15. カラムを準備し、PC-GTP を 200 ml 程度流して平衡化（ポンプ：×15、2.2、R）。カラムに空気が入っていないかチェック。

ガラスチューブをナンバリングしセットする。70 本程度準備する。

濃度測定装置とポンプの設定を行う。

Channel speed 5, Range 10, Fraction 20.0,

Control Unit: 0.5 AU

2 実験材料と方法

PERISTA: ×15, 1, R

16. 上澄みを捨て、ペレットを PC+GTP 10 ml に溶かし、サスペンド。一度ポンプを止めてからチューブをチューブリン溶液に差し替え、再びポンプを動かす。チューブリン溶液がなくなる前にポンプを止め、PC-GTP にチューブを差し替え再びポンプを動かす。
ガラスチューブ立てを氷の中に用意

サンプルチューブに MQ795 μ l、Biorad 溶液 200 μ l を入れ何本か用意

濃縮用 Amicon 10 No.4321 を2つ用意。10ml のところに印をつけておく (MQ を用いて)。

MQのみ遠心 GRX220 Amicon2本 3000 g 4°C 20' (ローター: TA-22)

17. 溶出される液のタンパク濃度をモニターし、濃度が下がったら終了。途中でガラスチューブを加えるときは、一度装置を止めてから行う。それぞれのガラスチューブに Buffer B 100 μ l、0.1 M GTP 10 μ l を加え氷上のチューブ立てへさす。

18. Biorad の入った溶液にチューブリン溶液を 5 μ l ずつ加え、595 nm 固定波長で濃度測定を行う。大体の濃度、収量が分かればよい。

濃度(mg/ml) = 吸光度 × 3.55

Amicon1 本にチューブリン溶液を移す。MQ でバランスチューブを作る。

濃縮遠心 GRX220 amicon2本 3000 g 4°C 45'

9 ml チューブ用ローターを 37°C にする。

チューブリンの収量から染色の計算をする。

×2Gly-PB 20 ml に 0.1 M GTP 400 μ l を入れる。

19. 濃縮後、×2 Gly-PB-GTP を全量が 10 ml になるよう加え **37°C 30 分**重合させる

60% Gly H-pH buffer を恒温槽に移動する。

9 ml チューブ 2 本、天秤、大小ピペッターを準備する。

9ml チューブ用ローターの温度確認(37°C)。

20. 9 ml チューブ 2 本にクッション用の 60%Gly H-pH buffer 4 ml を加え、その上に重合し
-

た微小管を 5ml ずつピペッターでゆっくり乗せる（脱重合させないように）。

21. バランスを合わせる。

微小管落とし超遠心 CP70MX 9 ml 2 本 65 K 37°C 38'

40 % Gly H-pH buffer、H-pH buffer を恒温槽へ移動する。

100K チューブ用ローターを 37°Cにする。

100K チューブ 4 本と上澄みを捨てるビーカーを準備する。

蛍光色素を準備。

22. 遠心後、界面を H-pH buffer で洗い、上澄みをすてる。ペレットを 40 % Gly H-pH buffer100

~200 μ l で暖めながら懸濁する。

23. 蛍光色素を加え 37°Cでインキュベート（100 mM TMR-SE は 1/10 vol、10 分）。

ときどき混ぜる。

24. 100K チューブ用ローターの温度確認(37°C)。

25. 反応停止。L-Glutamic acid を等量加え、数分待つ。

26. 60%Gly H-pH buffer を 100K チューブ 2 本に適量（1.5-2.0 ml）入れ、その上にチューブ

リン溶液を乗せる。

27. 見た目でもバランスをとる。

遠心 CS120 100 K チューブ 2 本 70 K 37°C 30'ローターをねじ止めする。

界面洗い用に PC-GTP 10 ml 程度をビーカーに入れておく。

大小ピペッターを準備する。

28. PC-GTP で界面を洗ったあと、100 μ l の PC-GTP でサスペンド（Glycerol を残さない）。

29. **60 分氷上放置**。脱重合させる

PC-GTP を NAP5 の本数分に分ける。

NAP5 の平衡化。NAP5 を机にガムテープで貼り付け、元から入っている液を流し、な

くなりそうになったら PC-GTP を加え、流す。3 回くらい行う。

2 実験材料と方法

サンプルチューブを 8 個くらい用意、ナンバリング。

30. PC-GTP がなくなりそうになったら NAP5 の下にふたをし、チューブリン溶液をのせ、再びふたをとり 6 ドロップずつロードする。チューブリン溶液がなくなったら、PC-GTP を少しずつ加える。サンプルチューブ 7 個目くらいまでとる。Biorad でタンパク濃度を定量し、最適な濃度にする。
31. 分注後、液体窒素で凍結し、-80 °C で保存。染色後、一年以上たつと、凝集するものが出てくる。

2.2.2 アフリカツメガエル脱膜精子の調製

Murray の方法(Murray, 1991)に従って調製した。アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の精巢を取り出し切り刻んだのち、脱膜処理を行う。

溶液

NPB	250mM	Sucrose	
	15mM	HEPES pH7.4 KOH at 15mM	pH7.4 KOH
	1mM	EDTA pH8.0	pH8.0
	0.5mM	Spermidine trihydrochloride	Sigma S-2501
	0.2mM	Spermine tetrahydrochloride	Sigma S-1141
	1mM	Dithiothreitol	Sigma D-0632
	10µg/ml	Leupeptin	
	0.3mM	PMSF	Sigma P-7626
Lysolecithin	10mg/ml		Sigma L-4129 50µl
BSA	10%(w/v)	pH7.6 KOH (water)	Sigma A-7906(fraction V)

前日に×2のNPB(Sucrose, HEPES, EDTAのみ)を作っておく。25mlずつに分け、-80℃保存。

手順

1. 精子を採取するためのオス個体は、精子調製前に業者から購入。採精子 3 日前にオス 2 匹へ 0.25 ml(100 U/ml)の PMSG (Gonadotropin from pregnant mare serum) を投与し、採精子の前日に 0.125 ml(1000 U/ml) hCG (Chorionic gonadotropin human)を投与する。
2. 採精子当日、オス個体を氷水にいれ(約 20 min)、動きが止まったところで頭を落とし、精巢を取り出す。
3. 冷 MMR(50 mM Na-Hepes pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂)の入ったシャーレに精巢を移し、はさみとメスを用いて脂肪を取り除く。その後、冷 MMR で 3 回洗う。
4. NPB で 2 回洗う。NPB をアスピレータを用いて完全に取り除き、精巢をカミソリで切り刻む。
5. NPB 2 ml を加え、孔径 3 mm のプラスチックピペットで懸濁する。

2 実験材料と方法

6. 懸濁液をガーゼ（8枚重ね）でろ過する。NPB 8 ml で、シャーレを洗い、ガーゼでろ過する。ろ過した液を遠心(3000 rpm 10 min)する。
7. 上澄みを捨て、沈殿物を NPB 8 ml で懸濁し、遠心(3000 rpm 10 min)する。
8. 上澄みを捨て、沈殿物を NPB 1 ml（室温）で溶かす。Lyxolecithin (10 mg/ml) 50 μ l を加え、5分間室温で脱膜する。
9. 冷 NPB（+3% BSA）10 ml を加え、混ぜる。その後、遠心（3000 rpm 10 min）する。
10. 上澄みを捨て、沈殿物を NPB（+3% BSA）5 ml で懸濁し、遠心(3000 rpm 10 min)する。
11. 上澄みを捨て、沈殿物を NPB(- PMSF + 0.3% BSA + 30%(w/v) Glycerol) 1 ml で懸濁する。
顕微鏡で精子数を数え、適切な濃度にする。精子濃度は $(3-10) \times 10^7$ 個/ml 程度にする。
分注し、窒素凍結後、-80℃で保存する。2-3年は保存可能。

2.2.3 アフリカツメガエルの飼育

アフリカツメガエルの飼育は早稲田大学動物実験審査委員会の承認のもとに行った。アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)はカトーS カガク(<http://www.kiwi-us.com/~terema/>)、又はワタナベ増殖(<http://www5d.biglobe.ne.jp/~zoushoku/top.htm>)から購入した。採卵用のメスは90~120g 程度のカエルを購入し、飼育する。購入後すぐは採卵せず、2 週間程度休ませる。水槽の環境に慣れるまでは餌をあまり食べないので注意。また、購入後初めて採卵した卵は使用しない。採精子用のオスは採精子の 1 週間前に購入する。アフリカツメガエルはストレスに非常に弱く、ストレスを感じている状態だと卵を産まない、または質の悪い卵しか産まなくなるため、後述の対策をとることが重要である。

- ・飼育する水槽について

水槽工房(<http://www.suiso.jp/>) 特注のオーバーフロー水槽を使用した。濾過能力、水温維持性能は高いが、その反面水の流れと、下段の水槽に水が落ちる際の音がカエルのストレスになる可能性がある。パイプにスズランテープを通すことで、音の大きさを軽減した。カエルの糞をうまく取り除く機構を設置できれば濾過能力を多少下げても問題なくなるため、水流を弱くしカエルへのストレスを軽減できるであろう。また、カエルは非常に狭い隙間にも侵入するため、目張りを入念に行う必要がある。

- ・水質、水替えについて

水質が良いときと、悪いとき（ただし、濁ってはいるが水は腐ってはいない）でカエルの卵の質に特に差は見られなかった。水質を安定させることが重要であるようだ。水替えは週 2-3 回行なった。水質の急激な変化を避けるため、1 回の水替えの量はできるだけおさえる。また、病気やけがの悪化を防ぐために食塩を低濃度で加えていたことがあったが、カエルの飼育密度に注意すること、餌を適切な量与えること、けがをしたカエルはすぐに隔離することが重要であることが分かったため、最終的には食塩は加えずに飼育を行った。水槽中の食塩濃度を適切に管理することが難しいことも中止した理由として挙げら

2 実験材料と方法

れる。

・光について

アフリカツメガエルは薄暗い環境に生息するため、水槽にカーテンを設置してストレスを軽減させた。カーテンにより、人が水槽の近くを通ることによるカエルへのストレスも軽減できる。

・水温について

冷却装置を用いて1年を通して16°Cに維持した(20°Cで飼育しているラボもある)。水道から水を直接水槽に入れると、特に夏場は水温が急激に上がってしまい、カエルの体調が悪くなった。水替えをこまめに行い1回あたりの水替え量を減らすか、水替え用の水を保管し16°Cにするための水槽があるとよい。夏場にカエルの卵の質が大幅に悪化する(MMR中でも卵同士がひも状になってしまう)ことがあったが、水替え時の水温の急激な変化が主な原因であったと考えられる。

・餌について

餌はアフリカツメガエル飼育用(XL No. 3、オリエンタル酵母)を、週に2回、1度に食べきれぬ量を与えた。採卵中に糞をするのを防ぐため、採卵の1か月前からは餌を与えない。餌のにおいで、カエルがかなり興奮するため、採卵1か月前のカエル専用の水槽を作ること、においはすれども餌がない、といったストレスを抑えられると考えられる。

・採卵周期について

共同研究をしているロックフェラー大学 Kapoor 教授の研究室では、採卵を4ヶ月周期で行っている。また、カエル飼育業者(ワタナベ増殖)では2か月半周期で行っている。業者によると、周期が長くなると古い卵が体内に蓄積されるため、良くないらしい。採卵の際に2日連続でホルモン注射を行うことで、体内の卵をすべて排出させることも重要であるようだ。ただ、エクストラクト作成には新しい卵のみの方が良いか、古い卵も混ざっていた方が良いかについてはよくわからない。本研究では最初のうちは4ヶ月周期で行っ

ていたが、最終的に 2 カ月半周期を採用した。周期が短いと水槽の容量の割に多くのカエルを飼育できる（週あたりに使えるカエルの量が増える）という利点がある。その反面、採卵によるカエルへのストレスの増加や、カエルの購入数・処分数が増加するといった難点もある。

- ・カエルの処分について

7 回採卵したカエルについては、氷水に 20 分程度入れ冬眠状態にしたのち、包丁で断頭し処分した。

- ・怪我、病気について

怪我や病気のカエルは MMR (50 mM Na-Hepes pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂)の入ったバケツに治るまで隔離する。病気については北大のグループの HP に詳しい(<http://www.sci.hokudai.ac.jp/~st/shinka3/xenopus/disease.html>)。軽い怪我については 1-2 ヶ月ほどで治る場合が多いが、大きな怪我や病気（異常に痩せる、又は太る）についてはほとんど治らないため、数週間様子を見て改善がみられない場合は処分するのが良いであろう。

- ・ツボカビ病について

アフリカツメガエルはツボカビ病を保菌している可能性があるため、飼育水を排水する際にはキッチンハイター(花王、1/100 v/v)で 15 分殺菌したのち排水した。ツボカビ病対策については WWF の HP に詳しい(<http://www.wwf.or.jp/activities/2009/09/615914.html>)。

2 実験材料と方法

2.2.4 アフリカツメガエル卵エクストラクトの調製

Murray と Desai らの方法(Murray, 1991; Desai *et al.*, 1999)を用いた。アフリカツメガエルの未受精卵を遠心し、細胞質区画のみを取り出す。本研究室板橋岳志博士が作成したプロトコルを一部改変して掲載する。エクストラクトの調製については Hannak らのプロトコル (Hannak and Heald, 2006)にも詳しいため、そちらも参考にするとよい。

溶液

Stock Solution	final	volume	MW		sterilization	condition
	1M HEPES-KOH (pH7.7)	200ml	238.31	47.66g	sterile filter	4°C or -20°C
	0.5M EGTA-KOH (pH7.7)	100ml	380.35(2Na)	19.02g	sterile filter	RT
	0.5M CaCl ₂					4°C
	1M MgCl ₂	100ml	203.30(6H ₂ O)	20.33g	sterile filter	RT
	10N NaOH	100ml				RT
	10N KOH					RT
	100U/ml PMSG	10ml				-20°C
	1kU/ml hCG	10ml				4°C
	10mg/ml Cytochalasin B or D	100ul				-20°C
	5%(w/v) Gelatin	150ul			autoclave	-20°C
	0.5M PIPES-KOH (pH6.8)					4°C
	3M KCl					4°C
	0.1M ATP-KOH (pH7.0)					冷凍庫
	37% formaldehyde					

Buffer and Reagent Stocks

25x MMR

Total (ml)

MW

		2000		
	HEPES-NaOH (pH7.8)	125mM	238.31	59.58g
	EDTA	2.5mM	372.24	1.86g
	NaCl	2.5M	58.44	292.2g
	KCl	50mM	74.55	7.46g
	MgCl ₂	25mM	203.3	10.16g
	CaCl ₂	50mM	147.01	14.70g

Autoclave and store at RT.

20x XB salts

Total (ml)

MW

		1000		
	KCl	2M	74.55	149.1g
	MgCl ₂	20mM	203.3	4.06g
	CaCl ₂	2mM	147.01	0.3g

Sterile filter and store at 4°C

20x energy mix

Total (ml)

5

	creatine phosphate	150mM		
	0.1M ATP-KOH (pH7.0)	20mM		1ml
	1M MgCl ₂	20mM		0.1ml

Store in 100ul aliquots(100本) at -20°C

Protease inhibitors (LPG)

Total (ml)

10

DMSO

	leupeptin	10mg/ml		100mg
	pepstatin A	10mg/ml		100mg
	chymostatin	10mg/ml		100mg

100ul aliquots at -20°C

<u>Extract Preparation</u>		
<i>dejelling solution</i>		(ml)
	<u>Total</u>	<u>400</u>
20x XB salts	1x	20
cysteine	2%	8g
10N NaOH	<u>pH7.8</u>	1
<i>XB</i>		(ml)
	<u>Total</u>	<u>1000</u>
1M HEPES-KOH (pH7.7)	10mM	10
20x XB salts	1x	50
Sucrose	50mM	17.1g
10N KOH	<u>pH7.7</u>	0.1
<i>CSF-XB</i>		(ml)
	<u>Total</u>	<u>250</u>
XB		250
0.5M EGTA-KOH (pH7.7)	5mM	2.5
1M MgCl ₂	1mM	0.25
<i>CSF-XB + PIs</i>		(ml)
	<u>Total</u>	<u>90</u>
CSF-XB		90
10mg/ml LPC	10ug/ml	0.09
<u>Pelleting Spindles onto Coverslips</u>		
<i>5xBRB80</i>		(ml)
	<u>Total</u>	
0.5M PIPES-KOH (pH6.8)	400mM	
1M MgCl ₂	5mM	
0.5M EGTA-KOH (pH7.7)	5mM	
<i>Dilution buffer</i>		(ml)
	<u>Total</u>	
5x BRB80	1x	
glycerol	30%(v/v)	
Triton X-100	0.50%	
<i>Fixation buffer</i>		(ml)
	<u>Total</u>	
Dilution buffer		
37% formaldehyde	4%	
<i>Sperm dilution buffer (-Cytochalasin D)</i>		
	<u>Total</u>	
K-Hepes (pH7.7)	5 mM	
MgCl ₂	1 mM	
KCl	100 mM	
Sucrose	150 mM	
<i>Valap</i>	Vaseline, Lanolin, Paraffinを等量ずつ	
<u>Inhibitors</u>		
<i>AMPPNP</i>		
	<u>Total</u>	-80°C保存
AMPPNP (Sigma A2647)	50mg/ml	
Sperm dilution buffer		
新しいものを使う		
<i>Monastrol</i>		
	<u>Total</u>	-20°C保存
Monastrol (Sigma M8515)	10mM	
DMSO		
適宜Sperm dilution bufferで薄めて用いる		

手順

Xenopus Egg Extracts Preparation in Ishiwata Lab <Modified by Takeshi Itabashi>

① Priming

1. Injection with 0.5 ml of PMSG (100 U/ml stock at -20 °C freezer) on Day 1.
2. Injection with 0.25 ml of PMSG (100 U/ml stock at -20 °C freezer) on Day 3.

*Primed frogs can be induced to lay eggs for 1-2 weeks after the second priming.

② Day before Extract Preparation

1. One h before hCG injection, store 2 primed frogs in a 16 °C incubator.
2. Sixteen to 18 h before extract preparation, inject 0.5 ml of hCG (1000 U/ml stock at 4 °C freezer) into 2 frogs.
3. After hCG injection, store frogs in the 16 °C incubator for 2 h.
4. Prepare 2 new buckets for frogs, containing 2 liters MMR (80 ml of 25 × MMR stock at RT + Milli-Q water) at 16 °C.
5. Two h after hCG injection, put frogs individually into buckets (STEP 4), and store overnight in the 16 °C incubator.
6. Store rotor (P28S) and 4 liters of Milli-Q water in the 16 °C incubator.
7. Reserve Centrifuge (CP70MX). Make the Dicty room at 18 ~ 20 °C.

③ Setup for Extract Preparation

1. Rinse out 2 liters, 1 liter, 500 ml, 250 ml, and 100 ml cylinders with Milli-Q water.
2. Rinse out crystallization dish and 500 ml beaker with Milli-Q water.
3. Store 1 tube of Gelatin (150 µl, 100 µg/ml stock at -20 °C freezer) at 30 ~ 37 °C to thaw.
4. Make 2 liters MMR with the cool Milli-Q water (16 °C).
 - a) Add 80 ml of 25 × MMR stock.
 - b) Mess up to 2 liters with the cool Milli-Q water.

-
- c) Mix well.
5. Make 1 liter XB.
 - a) Add 50 ml of $20 \times$ XB stock salts (stock at 4°C room).
 - b) Add 17.1 g Sucrose.
 - c) Add 10 ml of 1 M K-Hepes (pH 7.7, stock at 4°C room).
 - d) Add ~ 100 μl of 10 N KOH (stock at RT) and adjust pH to 7.7.
 - e) Mess up to 1 liter with the cool Milli-Q water (16°C).
 - f) Mix well.
 6. After XB is made, make 250 ml of CSF-XB.
 - a) Add 2.5 ml of 0.5 M K-EGTA (stock at RT).
 - b) Add 0.25 ml of 1 M MgCl_2 (stock at RT).
 - c) Mess up to 250 ml with the XB (prepared at STEP 5).
 - d) Mix well.
 7. Transfer 90 ml of this CSF-XB to the 100 ml cylinder (CSF-XB+PI). Do not add PI to the CSF-XB+PI cylinder now.
 8. Coat crystallization dish and 500 ml beaker with Gelatin: Add ~ 20 ml of MMR to dish. Add 70 μl of Gelatin (STEP 3) and mix immediately. Coat all parts of the glassware (coat the bottom well).
 9. Repeat STEP 8.
 10. Rinse crystallization dish and 500 ml beaker once with 100 \sim 200 ml of MMR.
 11. Fill 500 ml beaker with 100 ml of MMR and crystallization dish with ~ 200 ml of XB.
 12. Make 400 ml of Cysteine (Dejellinging Sol.).
 - a) Add 20 ml of $20 \times$ XB stock salts.
 - b) Add 8 g of cysteine.
 - c) Add the cool Milli-Q water (16°C , adjust to 399 ml).
-

- d) Mix well until all cysteine is dissolved.
- e) Add ~ 1 ml of 10 N NaOH (stock at RT) to adjust pH to 7.7.
- f) Mix well.

13. Take a BREAK! Clear mind!!

④ Procedure for Extract Preparation

*Handle eggs gently and avoid mechanical shock to eggs during handling the eggs.

1. Bring following items to the Dicty room:
 - a) LPC (100 μ l, 10 mg/ml stock at -20 °C freezer). Cyto-D (50 μ l, 10 mg/ml stock at -20 °C freezer). Thaw.
 - b) Rack with 2 new centrifuge tubes.
 - c) Wide mouth pipettes with pipette bulb.
 - d) Pipetman: 20, 200, 1000 μ l. Tips
 - e) Falcon tubes and Forceps.
 - f) Stop watch.
 - g) Bucket for waste solution.
 2. Remove frogs from MMR buckets.
 3. Rinse eggs once with fresh cool MMR (STEP ③-4).
 4. Select, pick up poor eggs with wide mouth pipette, and rinse the best eggs with fresh MMR. Garden and clean all eggs carefully. Do not LOSS the eggs of good quality.
 5. Repeat STEP 3 5 ~ 6 times.
 6. Pool all eggs in 500 ml beaker (STEP ③-11).
 7. Rinse with the remaining MMR.
 8. Remove as much MMR as possible.
 9. Start Dejellying: 2 min \times 3 times; make sure total time has not exceeded 8 min
-

-
- a) 0 min: Add ~ 200 ml of Cysteine Sol.(STEP ③-12) and start TIMER.
 - b) 0 ~ 2 min: Add 90 μ l of LPC to 90 ml of CSF-XB+PI(STEP ③-7) and mix.
 - c) ~ 2 min: Remove 1st Cysteine Sol. and add new ~100 ml of Cysteine Sol.
 - d) 2 ~ 4 min: Add 1 ml of CSF-XB+PI(STEP b) to each centrifuge tube.
 - e) ~ 4min: Remove 2nd Cysteine Sol. and add remaining Cysteine Sol.
 - f) 4 ~ 6 min: Add 10 μ l of Cyto-D to each centrifuge tube (Swirl tube during addition and flick the tube).
 - g) 6 ~ 8 min : If eggs are completely dejellied, remove 3rd Cysteine Sol. as much as possible.
10. Transfer dejellied eggs GENTLY to the crystallization dish containing ~ 200 ml of XB (STEP ③-11).
 11. Immediately remove all buffer. Rinse 3 ~ 4 times with XB.
 12. Add ~ 50 ml of CSF-XB (STEP ③-6), wash and remove buffer.
 13. Repeat STEP 12 twice.
 14. Add 30 ml of CSF-XB+PI (STEP 9-b), wash and remove buffer.
 15. Repeat STEP 14 twice.
 16. Transfer the eggs to centrifuge tube (STEP 9-f) with wide mouth pipette.
 17. Aspirate excess bugger from the top of the eggs.
 18. Transfer each tube to Falcon tube for Clinical centrifugation with forceps.
 19. Spin at Speed 1,500 rpm for 1 min exactly.
 20. Aspirate off, very gently, all the buffer. Do NOT suck out the eggs.
 21. Spin at Speed 2,000 rpm for 1 min and then at 3,000 rpm for 30 sec.
 22. Aspirate off, very gently, all the buffer.
 23. Place in 16 °C rotor.
 24. Spin at 3,000 rpm for 3 min and then 10,000 rpm for 12 min at 16 °C (PROG# 01). Crush the eggs.
-

25. Prepare ice bucket, a 1 ml syringe, purple 16 G needle and 1 eppendorf tube.
26. Thaw 20 × Energy-MIX (stock at -20 °C freezer).
27. After 10k centrifugation, place tubes in ice bucket.
28. Wipe the wall of the tube with 70% ethanol.
29. Syringe out CSF-extract gently near the bottom of the middle layer with 16 G needle.
30. Estimate volume of extract, remove the needle off, and place extract in eppendorf tube.
31. Add 1/20 (v/v) Energy-MIX (STEP 26), 1/1000 (v/v) of LPC (STEP 9-b) and 1/1000 (v/v) of Cyto-D (STEP 9-f).
32. Mix gently and flick tube. Extract is now ready. Store at 0°C on ice.
33. Clean up and take care of frogs (typically, let them lay all eggs for at least 24 hrs post injection and then return them to the tanks).

⑤ CSF Spindle Assembly to test the quality of CSF-extract

1. Thaw Sperm (stock at -80°C freezer) and Rhodamine - Tubulin (stock at -80 °C freezer).
2. Remove 20 µl of CSF-extract to new eppendorf tube.
3. Add 0.5 µl of Sperm and 0.4 µl of Rhodamine - Tubulin. Mix.
4. Place this tube at 16 ~ 18°C (water bath).
5. Start TIMER.
6. At 30 min, fix 1 µl of extract with 3 µl of Fixation Buf. (Half spindles).
7. At 45 ~ 60 min, fix 1 µl of extract with 3 µl of Fixation Buf. (Half and bipolar spindles).

Bipolar spindles / the total structures:	~ 10 %	very poor CSF-extract
	40 ~ 60 %	typical CSF-extract
	90% ~	best CSF-extract

⑥ *Cycled Spindle Assembly*

1. Thaw Sperm (stock at -80 °C freezer), Rh-Tubulin (stock at -80°C freezer) and Ca²⁺ Sol. (stock at -20°C freezer).
2. Remove 20 µl of CSF-extract to new eppendorf tube.
3. Add 0.5 µl of Sperm and 0.4 µl of Rh-Tubulin. Mix.
4. Add 1.5 ~ 2.0 µl of Ca²⁺ Sol. (4 mM in Sperm dilution buf) to the eppendorf tube (final conc. ~ 0.4 mM Ca²⁺) and mix.
5. Place this tube at 16 ~ 18°C (water bath).
6. Start TIMER.
7. At 80 min, fix 1 µl of extract with 3 µl of Fixation Buf. (Nucleus in Interphase)
8. Add 20 µl of CSF-extract to an eppendorf tube (dilute calcium and proceed to Metaphase) and mix.
9. At 140 min, we will get cycled spindles! Fix 1 µl of extract with 3 µl of Fixation Buf. (Bipolar spindles).
10. Thaw DAPI (1 mg/ml stock at -20°C freezer) and dilute with Sperm Dilution Buf. (stock at -20°C freezer) to 1/20.
11. Add ~ 1 µl of diluted DAPI to ~ 50 µl of extract in metaphase.

2.2.5 Xkid-GFP のエクストラクト中での発現

Full length の Xkid-GFP (Xkid-GFP-FL)を含むプラスミドは船引宏則教授（ロックフェラー大学）から頂いた。DNA 結合ドメインを持たない Xkid-GFP (Xkid-GFP- Δ DB)および ATP 加水分解能を持たない T125N ミュータントは PCR mutagenesis (TOYOBO)を用いて、本研究室の板橋岳志博士が作製した。DNA 精製は PureLink HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogen, K2100-01)を用いて行った。mRNA 合成・精製は mMessage mMachine SP6 Kit (Ambion, AM1340)を用いて行った。

精製した mRNA を CSF エクストラクトに 1/10 量加え、16°C で 3 時間以上インキュベートすることで Xkid-GFP を発現させた(Funabiki and Murray, 2000)。発現させた Xkid-GFP は CSF エクストラクト中で凍結保存 (-20°C) が可能である。発現の確認は抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットで行った (図 4-1)。その際、抗体は Roche 社の物を使用した。

2.2.6 抗 GFP 抗体付 Qdot の作製

抗 GFP 抗体付 Qdot は Qdot Antibody Conjugation Kit (Q22021MP, Invitrogen)を用いて、Qdot から飛び出したアミン基に、SMCC と呼ばれるリンカーを介し、DTT で還元した抗 GFP 抗体を結合させることで作製した。作製はキットのプロトコルに沿って行った。ただし、作製後、Sodium azide を加えない (Sodium azide 存在下では、紡錘体が形成できない)。作製後は 4℃で 3 カ月程度保存可能 (凍結は不可)。3 カ月以上保存すると、Qdot の凝集が見られてくる。1 つの Qdot に対し、最大 4 つの抗 GFP 抗体が結合することができる。抗 GFP 抗体は Roche 社の抗体 (1814460) を用いた。抗 GFP 抗体付 Qdot の濃度測定は行っていないが、キットのプロトコルによると、1-2 μM 程度になる。

なお、Q22021MP は製造中止になり、代わりに SiteClick Qdot 655 Antibody Labeling Kit (S10453, Invitrogen)が販売されている。以下に Invitrogen の HP に掲載されている旧製品と新製品の違いについての記述を引用する。本研究では旧製品のみを使用した。

Create a perfectly labeled antibody with the SiteClick™ Qdot® 655 Antibody Labeling Kit. This kit replaces the conventional Qdot® 655 Antibody Conjugation Kit (Q22021MP). Unlike the conventional amine-thiol crosslinker method, SiteClick™ labeling specifically attaches the label to the heavy chains of an IgG antibody, ensuring that the antigen-binding domains remain available for binding to your antigen target. This site selectivity is achieved by targeting the carbohydrate domains present on essentially all IgG antibodies regardless of isotype and host species. In addition, no harsh reduction steps are required, and the labeling is consistent and reproducible each time it's performed. Depending upon the label, the resulting SiteClick™-labeled antibody can be used in flow cytometry, fluorescence imaging, or Western blot detection.

(<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/S10453?ICID=search-product>)

2.3 実験装置

2.3.1 光学系：落射蛍光顕微鏡

以下の2種類の光学系（図 2-1）で観察を行った。

1. IX 70（倒立顕微鏡、Olympus）

- 対物レンズ；40× UplanFLN lens (0.75NA, dry, Olympus)
- カメラ；Hamamatsu ORCA AG cooled charge-coupled device (CCD) camera (Hamamatsu Photonics K. K.)
- 画像取得ソフト；Metamorph (Molecular Devices)
- 水銀ランプ(USH 102D, USHIO)

2. IX 71（倒立顕微鏡、Olympus）

- 対物レンズ；40× UplanFLN lens (0.75NA, dry, Olympus)
- カメラ；Electron multiplying charge-coupled device (EM-CCD) camera (iXon EM+, Andor Technology)
- 画像取得ソフト；iQ (Andor Technology)
- 水銀ランプ(USH 102D, USHIO)

2.3.2 光学系：共焦点顕微鏡

以下の2種類の光学系（図 2-1）で観察を行った。

1. IX 70（倒立顕微鏡、Olympus）

- 対物レンズ；60× UPlanSApo (1.35NA, Oil, Olympus), 100× UplanFI (1.30NA, Oil, Olympus)
- カメラ；Hamamatsu ORCA AG cooled charge-coupled device (CCD) camera (Hamamatsu Photonics K. K.)
- 画像取得ソフト；Metamorph (Molecular Devices)
- 共焦点ユニット；CSU10 (YOKOGAWA)
- 光源；空冷 ArKr レーザー（488/568）(CSU10 用)

2. IX 71（倒立顕微鏡、Olympus）

- 対物レンズ；60× UPlanSApo (1.35NA, Oil, Olympus), 40× UPlanFLN (1.30NA, Oil, Olympus)
- カメラ；Electron multiplying charge-coupled device (EM-CCD) camera (iXon EM+, Andor Technology)
- 画像取得ソフト；iQ (Andor Technology)
- 共焦点ユニット；CSU10 (YOKOGAWA)
- 光源；空冷 ArKr レーザー（488/568）(CSU10 用)

2.3.3 力学操作系

微小ガラス針の操作には、三次元マニピュレーター（MC-35A, NARISHIGE）、三次元水圧マイクロマニピュレーター（MLW-3, NARISHIGE）、三次元電動マイクロマニピュレーター（EMM-3NV, NARISHIGE）、ピエゾアクチュエータ（P-841.20, PI Japan Co., Ltd.）を用いた。

2.3.4 微小ガラス針の作製

硬いガラス針は直径 1 mm のガラス棒(Narishige G-1000)を鉛直落下型プラー(PC-10、Narishige)で引くことで作製した。作製は 2 step で行い、1 step 目は 79.8°C、2 step 目は 75.1°C で、Step サイズは 9 mm で行った。また、ガラス棒を引く際には大きいおもりを 1 つ使用した。ガラス針の先端径は 1 μm 以下になる。

力測定用の柔らかい微小ガラス針は弾性定数 1 nN/ μm 程度のものを作製した。直径 1 mm のガラス棒(Narishige G-1000)を鉛直落下型プラー(PC-10、Narishige、1 step 目 : 86.8°C、2 Step 目 : 100.9°C (最高温度)、Step サイズ : 4.8 mm) で作製する。2 step でガラス棒を引き、1 step 目が終わったら一度電源を落とし、再びガラス針を付け直す。そして 1 step に設定し直し、ガラス棒を引く。ガラス棒を引く際には大きいおもりと小さいおもりを 1 つずつ使用した。その後、マイクロフォージ(Narishige MF-900)を用いて先端径を 1 μm 以下に加工する。中期紡錘体の長軸方向の弾性定数は数 nN/ μm 程度であり、ピエゾの可動域(最大 45 μm)を考慮するとガラス針の弾性定数は 1 nN/ μm 程度にすると良い。硬すぎると針の変位を観測できず、柔らかすぎるとノイズが大きくなってしまう。柔らかい微小ガラス針を作成する別の方法として、硬いガラス針の先端をマイクロフォージ(MF-900、Narishige)を用いて引き延ばして作製する方法もある。こちらの方法では、針の総延長を短くできるため空気の流れなどによる力測定のノイズを少なくすることができる。本研究で用いた柔らかい針は、全て前者の方法で作製したものである。

針の弾性定数の較正は、まず数十 nN/ μm の針 (マスター針) を作製し、先端を直角に曲げる。そこに重さ既知の金属線 (天秤で測る) をひっかけ、針の曲げからマスター針の弾性率を決定する。続いて、力測定用の微小ガラス針とマスター針同士を押し付けあい、その曲げから力測定用の微小ガラス針の弾性率を決定する。

ガラス針のコーティングは、Sigmacote (Sigma-Aldrich)にガラス針を数十秒ほど浸し、その後乾燥させることで、ガラス針をシランコートすることができる (詳細は Sigmacote の

プロトコルを参照)。また、シランコート後、スライドガラスのコーティング方法と同様の方法を用い、Pluronic F-127 でガラス針を親水化する方法もある。本研究ではガラス針のコーティングは行わなかった。

2.3.5 スライドガラスのコーティング

紡錘体の観察には NEO MICRO COVER GLASS (24 × 60 mm, Thickness No.1, 0.12-0.17 mm, MATSUNAMI)を用いた。スライドガラスのコーティングをせずにそのまま用いると紡錘体がガラス面にべったりとくっついてしまう。そのため、ガラス面を Pluronic F-127 で親水コーティングすることで、紡錘体のガラス面への付着を防いだ。また、Pluronic F-127 をコーティングする前に、前処理としてガラス面のシラン化を行うか、シリコンコート済みの特注ガラスを購入した。シラン化ガラスとシリコンコート済みガラスで、Pluronic F-127 のコーティング度合に違いは見られなかった。コーティング後、3 週間程度は性能が維持されるが、なるべく使用直前にコーティングを行う。ガラス面のシラン化には有機溶媒を大量に使い、また時間もかかるため、シリコンコート済みガラスを購入する方がよい。ただし、シリコンコート済みガラスは特注であるため、納品に 1-2 か月かかること、値段が 100 枚で 3 万円程度と高いこと（通常の 10 倍程度の価格）に留意する必要がある。以下で、スライドガラスのシラン化方法と、Pluronic F-127 のコーティング方法を述べる。

1. シランコート+Pluronic F-127

Gatlin らの方法(Gatlin *et al.*, 2010)を一部改変して行った。

試薬・溶液

ジクロロジメチルシラン (Fluka, 80430-500G-F、**危険物につき取扱注意**)

プルロニック® F-127 (Sigma Aldrich, P2443-250G)

トリクロロエチレン (Wako)

洗浄手順

Milli-Q water で洗浄

↓

0.5 N KOH 中で Sonication (15 分、30 分以上行わないこと)

↓

Milli-Q water で洗浄

↓

アセトン中で Sonication (15 分)

↓

エタノール中で Sonication (15 分)

↓

エタノールをしっかりと乾かす

↓

0.05 % ジクロロジメチルシラン (溶媒: トリクロロエチレン) 中でシラン化 (3 時間以上)

↓

メタノール中で Sonication (5 分を 3 回)

↓

Milli-Q water で Sonication (5 分を 3 回)

↓

良く乾かす

実験前

XB with 1% Pluronic F-127 中でインキュベート (20 分)

↓

Milli-Q water で洗浄 (入念に行う)

↓

乾かして、シリカゲルの入った容器に保存

2. シリコンコートガラス+Pluronic F-127

シリコンコートガラスを MATSUNAMI に特注する(24 × 60 mm, Thickness No.1, 0.12-0.17 mm)。Milli-Q water で洗浄→XB with 1 % Pluronic F-127 に 20 分浸す→Milli-Q water でよく洗浄→乾かした後、シリカゲルの入った容器に保存

2.4 実験方法

2.4.1 紡錘体の形成と蛍光観察

紡錘体の形成は以下の手順で行った。紡錘体微小管の観察には TMR-labeled tubulin または Alexa-488 labeled tubulin を用いた（最終濃度は約 200 nM。エクストラクト中のチューブリン濃度は 15-25 μM 程度(Verde *et al.*, 1992; Parsons and Salmon, 1997))。染色体の観察には DAPI または Sytox-Green を用いた。紡錘体の形成と観察の方法については Hannak らのプロトコル(Hannak and Heald, 2006)にも詳しいため、そちらも参考にするとよい。

紡錘体の形成手順

CSF エクストラクト(分裂中期) 20 μl に脱膜精子 0.3 μl 、
~3 mg/ml 蛍光ラベル化チューブリン 0.3 μl 、4 mM CaCl_2 1.0-1.5 μl を加える。

↓

16°C 80 min インキュベート。

間期へ移行する。

↓

CSF エクストラクト 20 μl を加え、16°C 60 min インキュベート。

エクストラクト中のカルシウム濃度が下がることで、分裂中期へ移行する。

↓

中期紡錘体形成。

↓

分裂後期の観察には、4 mM CaCl_2 1.5 μl を加える。

観察方法

以下の 3 つの方法で観察を行った。力学操作を行う実験ではカバーガラスを用いない Open chamber を、Xkid-Qdot の観察には背景光を減らすために Closed chamber を用いた。チャンパーにエクストラクトを入れてしばらくは、エクストラクト中の流れが速く、紡錘体が流されカメラの視野からすぐに外れてしまう。そのため、エクストラクトを入れてから 5 分程度待ってから観察を開始する。

市販のカバーガラスやスライドガラスは紡錘体がガラス面にべったりと張り付いてしまうため、すべての観察法において、「2.3.5 スライドガラスのコーティング」の方法を用いてガラス面をコーティングする必要がある。本研究では、コーティングを行ったガラスと、行っていないガラスの両方を用いた。コーティング作業を行っていないガラス面上にはダイニンなどの分子モーターが吸着し、ガラス面上で微小管の滑り運動が起きてしまう (Movie 1、阿部祐大 修士論文 (2007)) (Petry *et al.*, 2013)。ただし、コーティング作業を行うと、どの程度この滑り運動が抑えられるかの確認はしていない。紡錘体の形成率の良いエクストラクトで形成させた、きれいな形の紡錘体は、コーティングの作業を行わなくてもガラス面に張り付きにくい。Spindle matrix などの紡錘体周りの構造物が紡錘体微小管のガラス面への吸着を防ぐのかもしれない。

観察時の顕微鏡室の温度は $20 \pm 2^\circ\text{C}$ にした。 22°C を超えるとエクストラクト中のいたるところで微小管が重合し始め、紡錘体の構造にも影響を与えてしまうため、サンプルの温度管理は重要である。室温管理以外の温度管理の方法として、ステージを冷やす方法、対物レンズを冷やす方法 (レンズオイルを介して試料を冷やす) がある。ステージを冷やす方法では、スライドガラスの熱伝導を介して試料を冷やすため、エクストラクトを十分に冷やせない可能性がある。また、2 つの方法共に、結露の可能性もある。本研究では室温管理のみを行った。

1. Open chamber

本研究では、Xkid-Qdot の観察を除き、この観察方法を用いた。24 mm x 60 mm のカバーガラスにシリコンアイソレータ(Press-to-seal, Invitrogen)を接着させ、チャンバーを作る。チャンバーの内部にエクストラクト 5 μl を載せ、その上に乾燥防止のためのミネラルオイル(Simga-Aldrich, M-5310) 70 μl をそっと載せ、観察する。この観察法では、カバーガラスがないため、ガラス針等をエクストラクトに直接挿入することができる。

Open chamber ではカバーガラスを用いないため、試料の厚みを抑えきれず、後述の Closed chamber に比べ背景光が多くなり、画像のコントラストが悪くなる。エクストラクトをチャンバーに載せる際、エクストラクトをチップの先でチャンバー一杯に薄く延ばしておく、多少コントラストが良くなる。

2. Closed chamber

Xkid-Qdot の観察には、この観察方法を用いた。4 μl 程度のエクストラクトをスライドガラスに載せ、その上にカバーガラスを載せて、周りを Valap (Vaseline, Lanolin, Paraffin を等量ずつ混ぜる)で固定し、観察する。スライドガラスに載せるエクストラクトの量を調節することで、ガラス間の距離を調整することができる。たとえば、載せるエクストラクトの量が 4 μl で、8 mm 四方のカバーガラスを使用する場合、スライドガラスからカバーガラスまでの距離は約 12.3 μm となる。

Closed chamber では上下のガラス間の距離が短い場合、紡錘体の光軸方向の自由度が低くなり、Open chamber での観察結果と異なるデータが取得されることがある。例えば、キネシン 5 の機能阻害剤を加えると紡錘体の構造が壊れるが、Closed chamber を用いると構造の崩壊をガラス面によってある程度抑えられる(Miyamoto *et al.*, 2004)。このため、Open chamber のデータを Closed chamber のデータと比較する際には注意が必要である。

3. 固定サンプル

エクストラクト 1 μl と、Fixation buffer (60 % (v/v) Glycerol, 1 \times MMR, 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI, 10 % Paraformaldehyde) 3 μl をスライドガラスに載せ、その上にカバーガラスを載せて観察する。

2.4.2 紡錘体の力学顕微操作

本研究では、先端径 1 μm 未満の微小ガラス針を用いて顕微鏡下で紡錘体の力学操作を行った。ガラス針は明視野で観察した。まずガラス針の先端を粗動マニピュレーターまたは電動マニピュレーターの粗動モードを用いて顕微鏡に取り付けたカメラの視野に移動させる。次にガラス針を光軸方向 (z 方向) にステージから十分離し (xy 方向は動かさない)、エクストラクトを載せたチャンバーをステージに載せる。エクストラクト中の紡錘体を蛍光観察で探し出し、ガラス針を紡錘体の近くまで下ろして力学操作を行う。紡錘体への力学操作は、水圧式マイクロマニピュレーター、電動マニピュレーターの微動モード及びピエゾアクチュエータを用いて、ガラス針を動かすことで行った。ピエゾアクチュエータは、ガラス針を高精度、かつ様々な速度や波形で操作することができる。また、紡錘体の粘弾性測定では、較正済みの柔らかい針 (1 nN/ μm 程度、測定用) と、変形用の硬いガラス針 (1 $\mu\text{N}/\mu\text{m}$ 以上) の 2 種類のガラス針を用いた。ピエゾアクチュエータを用いて硬い針を動かし、紡錘体を変形させ、その際の柔らかい針の初期位置からのずれから変形に要する力を算出した。

紡錘体にガラス針を挿入する際には、ガラス針の向きとステージをなるべく垂直に近づけるようにする。角度が浅いと、挿入の際に紡錘体をガラス面に押しつけてしまい、紡錘体が大きく変形してしまう。ただし、垂直に近づけすぎるとガラス針先端の光軸方向の位置が分かりづらく、また 2 本のガラス針の根元がぶつかってしまうこともあるため、操作が難しい。本研究ではガラス針とステージの角度を 60 度程度にして実験を行った。紡錘体の伸長操作において、ガラス針の角度によって伸長操作ができる、できないといった違

いが出ることはなかった（図 2-2C）。また、ガラス針もカバーガラス同様コーティングを行っている論文(Gatlin *et al.*, 2010; Shimamoto *et al.*, 2011)もあるが、未コーティングのガラス針が紡錘体に接着することはない（図 2-3）、伸長操作への影響はほとんど見られなかった（図 2-2A-B）。しかも、ガラス針をコーティングしない方が長時間伸長できるようである(Gatlin *et al.*, 2010)。本研究では未コーティングのガラス針を用いた。

紡錘体の力学顕微操作の方法については、島本勇太博士らのプロトコル(Shimamoto and Kapoor, 2012)も本研究とほぼ同じ方法を用いているため、そちらも参考にするとよい。

2.4.3 紡錘体の粘弾性測定（1次元モデル）

紡錘体の長軸方向の粘弾性特性は、図 3-18D に示す Zener モデルで表されるとして（「3.4.1.3 伸長に要する力の測定」参照）、各素子の弾性定数、粘性係数を求めた。紡錘体を長軸方向に伸長する際、紡錘体の長軸（長さ L ）の伸長速度が一定の時（ $dL/dt = \text{一定}$ ）、伸長に要する力 F_{ex} と長軸の伸長度合（ $L-L_0$ ）の関係は以下のように表される。ただし、 L_0 は伸長前の長軸の長さ、 γ は粘性係数、 k_1 、 k_2 は弾性定数をそれぞれ表す。

$$F_{\text{ex}} = k_1(L - L_0) + \gamma \left(\frac{dL}{dt} \right) \left[1 - \exp \left(\frac{-k_2(L - L_0)}{\gamma \left(\frac{dL}{dt} \right)} \right) \right]$$

数式 1

伸長実験において、 dL/dt はほぼ一定であるので、3種類の伸長速度について測定された F_{ex} と $(L-L_0)$ の関係（図 3-18C）を数式 1 を用いてグローバルフィッティングすることで、粘性係数と弾性定数を求めた。

2.4.4 紡錘体の粘弾性測定 (2次元モデル)

紡錘体をひし形に近似し、ひし形の辺方向と短軸方向の粘弾性特性が Zener モデルで表せるとして計算を行った (図 3-22)。微小ガラス針による外力がないとき、全てのばねは自然長であるとした。

パラメータの定義

$$4S_i^2 = L_i^2 + W_i^2$$

F_{ex} : 外力 (微小ガラス針による力)

F_W : 外力により短軸方向に生じる力

F_S : 外力により辺方向に生じる力

β : 紡錘体の形を表すパラメータ (= 0.44 (実測値、n = 78 spindles))。 $V = \beta LW^2$ で定義され、回転楕円体の場合 $\beta = 0.52$ となる。

短軸方向の粘弾性測定

外部からの長軸方向に沿った力(F_{ex})がある場合、ひし形の角における力のつり合いの式は以下ようになる。

$$F_W = 2 F_S \left(\frac{W}{2S} \right)$$

$$F_{ex} = 2 F_S \left(\frac{L}{2S} \right)$$

よって、外力 F_{ex} は以下の式で与えられる。

$$F_{ex} = F_W \left(\frac{L}{W} \right)$$

F_{ex} 、 L 、 W はすべて測定可能であるため、この式から F_W を求めることができる。Zener モデルにおいて、 dW/dt が一定のとき、力と変形の関係は以下ようになる。

$$F_W = k_{W1}(W_0 - W) - \gamma_W \left(\frac{dW}{dt} \right) \left[1 - \exp \left(\frac{k_{W2}(W_0 - W)}{\gamma_W \left(\frac{dW}{dt} \right)} \right) \right]$$

数式 2

dW/dt はほぼ一定であることが実験的に確かめられた (図 3-20B)。この式を用いて測定結果 (図 3-22C) をグローバルフィッティングすることで、 $k_{W1} = 0.10 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $k_{W2} = 1.51 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $\gamma_W = 27 \text{ nN s}/\mu\text{m}$ が得られた。

辺方向の粘弾性測定

同様に、辺方向の力と変形の関係は dS/dt が一定の場合以下のように書ける。

$$F_S = k_{S1}(S - S_0) + \gamma_S \left(\frac{dS}{dt} \right) \left[1 - \exp \left(\frac{-k_{S2}(S - S_0)}{\gamma_S \left(\frac{dS}{dt} \right)} \right) \right]$$

dS/dt の値は実験的にはほぼ一定であることが確かめられた (図 3-20B)。力測定の結果 (図 3-22C) をグローバルフィッティングすることで、 $k_{S1} = 0.45 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $k_{S2} = 21.52 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $\gamma_S = 97 \text{ nN s}/\mu\text{m}$ が得られた。

シミュレーション

2次元粘弾性モデルを用いて、等速伸長実験のシミュレーションを行った。力のつり合いの式と、初期条件は以下で与えられる。ただし、 v は伸長速度 (dL/dt)。

$$F_W - k_{W1}(W_0 - W) = -\frac{\gamma_W}{k_{W2}} \left(\frac{dF_W}{dt} + (k_{W1} + k_{W2}) \frac{dW}{dt} \right)$$

$$F_S - k_{S1}(S - S_0) = \frac{\gamma_S}{k_{S2}} \left(\frac{dF_S}{dt} + (k_{S1} + k_{S2}) \frac{dS}{dt} \right)$$

$$F_W = F_S \frac{W}{S}$$

$$4S^2 = (L_0 + vt)^2 + W^2$$

$$F_W[0] = 0, F_S[0] = 0, S[0] = S_0, W[0] = W_0$$

次に、外力のある条件下におけるシミュレーションを行った。外力 F_{ex} が時刻ゼロで急激に増加して値 f ($= 0.5, 1.75, 5.0$ nN) に収束するとした。力のつり合いの式と初期条件は以下で与えられる。

$$F_W - k_{W1}(W_0 - W) = -\frac{\gamma_W}{k_{W2}} \left(\frac{dF_W}{dt} + (k_{W1} + k_{W2}) \frac{dW}{dt} \right)$$

$$F_S - k_{S1}(S - S_0) = \frac{\gamma_S}{k_{S2}} \left(\frac{dF_S}{dt} + (k_{S1} + k_{S2}) \frac{dS}{dt} \right)$$

$$F_W = F_S \frac{W}{S}$$

$$F_{ex} = F_S \frac{L}{S}$$

$$F_{ex} = f \exp\left(-\frac{10^{-5}}{t}\right)$$

$$4S^2 = L^2 + W^2$$

$$F_W[0] = 0, F_S[0] = 0, S[0] = S_0, W[0] = W_0$$

シミュレーションは全て Mathematica (Wolfram, version 8.0.4.0)を用いて行った。

2.4.5 エクストラクト中での阻害剤の使用

本研究では機能阻害剤として、Eg5 (キネシン 5)の阻害剤である Monastrol (Sigma-Aldrich)、加水分解されない ATP アナログである AMPPNP(Sigma-Aldrich)、微小管を安定化する Hexylene glycol ((±)-2-メチル-2,4-ペンタンジオール, Sigma-Aldrich)を使用した。

Monastrol

Monastrol は、細胞周期を有糸分裂状態で停止させ、Monopolar spindle (単極性紡錘体)を形成させる化合物としてスクリーニングにより発見された(Mayer, 1999)。Monastrol は紡錘体の構造形成を担う Eg5 (キネシン 5)の機能を特異的に阻害する。また、Eg5 を阻害することにより、紡錘体微小管の赤道面から紡錘体極への流れ (Polewards microtubule flux、2-3

$\mu\text{m}/\text{min}$ の速さが 0.5-1.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ 程度に低下する(Miyamoto *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008)。しかし、Eg5 の Monastrol 結合部位は、微小管結合部位や ATP 結合部位とは異なっており、Monastrol がどのようなメカニズムで Eg5 の阻害を行っているかについてはまだよく分かっていない(Crevel *et al.*, 2004; Krzysiak *et al.*, 2006; Kwok *et al.*, 2006; Lakämper *et al.*, 2010)。

Monastrol 存在下、エクストラクト中で紡錘体を形成させると、単極の微小管構造物、Monopolar spindle が形成される(Kapoor *et al.*, 2000)。本研究では Monastrol (10 mM in DMSO、 -20°C 保存)を終濃度 200 μM でエクストラクトに加えた (エクストラクト中の内在性 Eg5 の濃度は ~ 400 nM (モノマーの濃度) (Kapoor and Mitchison, 2001))。この Monastrol の濃度では、ほぼすべての紡錘体が単極となり、Polewards microtubule flux の速度は十分に低下する(Kapoor *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 2004)。また、この Monastrol の濃度では一端を極側に向ける (+端を外向き) 微小管の割合が微小管全体の約 80%を占める(Brugués *et al.*, 2012)。

Monastrol 存在下で形成された Monopolar spindle は 3 次元的な構造(ウニのような構造)をしているため、コーティング済みのスライドグラス上で観察すると、極の位置がガラス面からかなり遠くなり、極のある面を観察しようとする画像の解像度が悪くなる。3 次元的な構造にこだわらないのであれば、コーティング作業をしていないガラスを使い、ガラス面にべったりくっついた状態(半球状、極はガラス面近くにある)で観察するか、Closed chamber を用いて z 軸方向の距離を短くする。本研究 (Xkid-Qdot の観察) では、微小管の方向性のそろった単極性構造物を形成させるのが目的であったので、コーティング作業をしていないガラスを用いて Closed chamber で観察を行った。

また、Monastrol をエクストラクトに入れるタイミングは、間期から中期に移行させるとき (CSF エクストラクトを 20 μl 加えるとき)、前中期または中期になってから、と論文によってまちまちである。しかし、最終的に出来上がる Monopolar spindle の構造は、Monastrol を入れるタイミングによって見た目には違いが見られなかった。本研究では Monastrol を前中期 (間期から中期に移行させてから 30 分後、観察開始の 30 分前) にエクストラクトに

2 実験材料と方法

加えた(分裂中期に Monastrol をエクストラクトに加えると、15–30 分程度で Bipolar spindle は Monopolar spindle となる(Kapoor *et al.*, 2000))。

2つ以上の Monopolar spindle が近くにあると、Monopolar spindle の先端同士が相互作用するところが観察される(図 4-13)。また、Xkid-Qdot がこの相互作用する領域に集積することが観察されている(4.2.3)。

Monastrol の溶媒には DMSO を使用しているが、次の項で述べるように DMSO をエクストラクトに最終濃度 5%で加えると、微小管が安定化し、Aster ができることが知られている(Stearns and Kirschner, 1994)。本研究で用いた Monastrol (10 mM)を最終濃度 200 μ M で加えると、DMSO のエクストラクト中の DMSO 濃度が 2 %になる(他の研究グループの論文でも同程度の DMSO 濃度になっている)。エクストラクトによっては DMSO 濃度 2.5 %程度で Aster が形成されることがあるため、実験目的によっては Monastrol ストックの濃度やエクストラクトに加える量に注意する必要がある。

AMPPNP

加水分解されない ATP アナログである AMPPNP をエクストラクトに加えると、1.0-3.0 mM で Polewards microtubule flux が止まることが知られている(Sawin and Mitchison, 1991b; Shimamoto *et al.*, 2011)。この結果は、アフリカツメガエル卵エクストラクト系において Polewards microtubule flux は Eg5 が主に駆動していることから(Miyamoto *et al.*, 2004)、AMPPNP が Eg5 の機能を阻害したからであると考えられる。ただし AMPPNP の場合、脱重合キネシンや Dynein 等、エクストラクト中のすべての ATPase の機能を阻害する。キネシンの場合、AMPPNP 存在下では微小管結合状態(rigor)となる。本研究では AMPPNP (ストックは 50 mg/ml in Sperm dilution buffer (5 mM K-Hepes, pH 7.7, 1 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 150 mM Sucrose)、-80°C 保存)を最終濃度 1.0 mM または、1.5 mM でエクストラクトに加えた。ただし、濃度が 1.0 mM 以上になると紡錘体の構造が不安定化し、10 分以上たつと構造が壊

れてしまう(Sawin and Mitchison, 1991b; Shimamoto *et al.*, 2011)ため、AMPPNPは観察の直前に加え、加えた5分後以降(よく混ざるのを待つため)から観察を開始した。また、AMPPNPは分注後、非常に不安定なため(Sigma-AldrichのHPには-70°Cで最長3か月保存可能と書いてある)、必ず新しいものを使用すること。分注後1年たっているAMPPNPを使用したところ、阻害効果が全くみられなかった。

Hexylene glycol

Hexylene glycolは様々なタンパク質の集合を促進する物質で、微小管の重合を促進し、紡錘体や星状体(紡錘体極から細胞膜へ延びる微小管の構造)を安定化させることが知られている(Mitchison *et al.*, 2005)。Hexylene glycolを濃度が3%(v/v)以上エクストラクトに加えると、すぐにエクストラクトの至る所で、微小管Asterが形成されるが、濃度が2%だとエクストラクト中での微小管の重合はそれほど促進されない代わりに紡錘体の長軸が~1.7 $\mu\text{m}/\text{min}$ 程度で伸びていく(図 4-14a)(Mitchison *et al.*, 2005)。本研究ではYangらの研究(Yang *et al.*, 2007)を参考に、Hexylene glycol(20%(v/v) in water)を最終濃度2%でエクストラクトに加え、加えた5分後以降(よく混ざるのを待つため)から観察を開始した。

2.4.6 DMSO aster

微小管を安定化させる薬剤であるDMSO(Dimethyl sulfoxide)またはTaxolをエクストラクトに加えると、中心体や染色体がなくても単極の微小管構造物が形成され、通常の紡錘体の極に集積するタンパク質(γ -tubulin等)が極に集積することが知られている(Verde *et al.*, 1991; Stearns and Kirschner, 1994; Heald *et al.*, 1997)。DMSOを最終濃度5%(v/v)でエクストラクトに加えると、単極の構造物である、DMSO asterが形成され、微小管の方向性はMonastrol阻害下のMonopolar spindle同様、マイナス端を極方向に向ける微小管が多数を占める(Sawin and Mitchison, 1994; Heald *et al.*, 1997)。本研究ではDMSO(Sigma-Aldrich)を最終濃度2.5

または 5.0% (v/v)で CSF エクストラクトに加え、16°Cで 30 分インキュベートすることで DMSO aster を形成させた (図 4-15)。日によって (エクストラクトによって)、同じ濃度の DMSO を加えても、DMSO aster がなかなか形成されないか、あるいはエクストラクト中が微小管だらけになってしまうことがあった。そのため、その日のエクストラクトに合わせて最終濃度を決めた。

2.4.7 FSM (Fluorescent Speckle Microscopy)を用いた微小管ダイナミクスの観察

赤道面から紡錘体極への紡錘体微小管の流れ (Polewards microtubule flux) の観察には、Caged 蛍光チューブリンを用いる方法(Sawin and Mitchison, 1991b)と、FSM を用いる方法 (Maddox *et al.*, 2002, 2003; Yang *et al.*, 2007)がある。前者の方法では、Caged 蛍光チューブリンを紡錘体微小管に取り込ませ、紫外光を紡錘体の一部に当てることで、当てた部分にある Caged 蛍光チューブリンの Cage を外す。それにより、紫外光を当てた部分にある蛍光チューブリンのみが蛍光を発するようになる。蛍光を発している領域は flux によって紡錘体極へと動いていく。この方法では flux の平均的な動きを追えるが、微小管 1 本 1 本の動きは追えない。また、紡錘体微小管の半減期が 60-90 s と短く、flux の移動速度に比べて蛍光の減衰が大きいため、追跡の精度があまり高くないといったデメリットがある。一方 FSM では、蛍光チューブリンをエクストラクトに低濃度加えることで、紡錘体微小管を斑状に染める。そして輝点 (Speckle) の動きから微小管 1 本 1 本の動きを追跡することができる。Caged 蛍光チューブリンではなく、通常の観察に用いる蛍光チューブリンを使用し、エクストラクトに加える濃度を低くするだけなので、手法的にも非常に簡単である。ただし、微小管 1 本 1 本の動きは、時空間的ばらつきや微小管ごとのばらつきが大きいため、速度の平均などの統計的データをとる際には多くのデータをとる必要がある。また、輝点を検出するためには背景光をかなり抑える必要があり、共焦点顕微鏡を用いる必要がある。

本研究では微小管ダイナミクスの観察に FSM を用いた。Speckle 観察用に

Rhodamine-labeled tubulin を 10 nM 程度（その日のエクストラクトに合わせて濃度を調整する）、微小管観察用に Alexa488-labeled tubulin を 200 nM 程度エクストラクトに加える。紡錘体に蛍光チューブリンが取り込まれたら、共焦点顕微鏡を用いて、2 秒おきに Time lapse 観察を行う。Binning はかけない。Speckle をきれいに観察するためには、背景光をできるだけ抑える必要があり、紡錘体はガラス面付近で観察し、試料の厚さを薄くした。また、レーザーパワーは最大にし、露光時間は 600-1000 ms と長くとした。原因は不明であるが、エクストラクトによって（日によって）Speckle の見え方が異なり、きれいに見えない日はいくら Rhodamine-labeled tubulin の濃度を調整しても見え方は改善されなかった。

輝点の検出と追跡には、Kymograph を用いる方法と、輝点追跡ソフトを用いる方法がある。Kymograph を用いる方法では、輝点の動きを大まかに追うことができる。輝点追跡ソフトは、本研究では G-Track (G-Angstrom) を用いた。このソフトでは、2 次元ガウシアンフィッティングにより輝点を検出した後、輝点の追跡を行う。輝点の追跡の際、エクストラクトの流れにより、紡錘体が視野内で常に動いているため、視野内での輝点の動きを紡錘体内の座標に変換する必要がある。本研究では、紡錘体の 2 つの極を蛍光チューブリンの蛍光から検出し、輝点の座標を、極間をつなぐ軸とその軸と垂直で極間の中心を通る軸からなる直交座標系に変換した。また、座標変換の簡易的な方法として、画像自体を座標変換し、紡錘体の動きを抑える方法がある。本研究では Kymograph の作成時に、ImageJ (National Institutes of Health) の Multi stack regulation という Plugin を用いて、画像の座標変換を行った。この Plugin ではフレーム間の画像内蛍光強度分布の差が最小になるように各フレーム画像を平行移動・回転させる。ただし画像内に他の紡錘体や強い蛍光を放つものが現れると、座標変換が適切に行われなかったことがあるため、注意する必要がある。また、この方法で座標変換を行う際、Speckle の画像ではなく、微小管全体を蛍光ラベルした画像 (Alexa488-labeled tubulin) を用いると、より適切に座標変換ができる。

G-Track は、あるフレームで検出された輝点の次のフレーム以降の動きを追跡するので、

2 実験材料と方法

全てのフレームで、輝点の検出・追跡を行い、そこから重複するデータを消去する必要がある。そのため、紡錘体微小管の **Speckle** のように輝点の数が多い場合、検出・追跡とその後のデータ整理に非常に時間がかかる。その点、後述する **Xkid-Qdot** 観察において、輝点の検出・追跡に用いた **PTA (Particle Track and Analysis)** という **ImageJ** の **Plugin** は、最初に全てのフレームで輝点を検出し、その後追跡を行うため、解析の時間が大幅に軽減される。本研究の微小管ダイナミクスの解析において、**PTA** を使用したことはなく、適切に検出・追跡が行えるかは不明であるが、試してみる必要は大いにある(**PTA** の使用については、留意事項を読むこと。論文を書く際、**Acknowledgement** に記入する必要がある)。

2.4.8 紡錘体の 3 次元観察

紡錘体は 3 次元的な構造物であり、紡錘体の長軸を回転軸とする回転楕円体のような形状をしている。通常、顕微鏡の焦点面を 2 つの紡錘体極がある面に合わせ観察を行う。しかし、紡錘体が焦点面に対し斜めになっている場合や、回転軸に垂直な面について紡錘体が非対称な形をしていたり非対称な変形を加えたりする場合、紡錘体の正確な形状を測定するには紡錘体を 3 次元的に観察する必要がある。そこで本研究では、共焦点顕微鏡を用いて紡錘体の 3 次元スキャニングを行い、さらにデコンボリューションソフトを用いることで紡錘体の体積と紡錘体内の全微小管量の定量的な測定を行った。

共焦点顕微鏡を用いた紡錘体の 3 次元スキャニングは、顕微鏡のステージを光軸方向にステップモーターを用いて 2.48 $\mu\text{m/s}$ で動かし、画像を露出時間 200 ms (Streaming) で取得することで行った(496 nm/frame)。また、イメージングは $\sim 3\text{mg/ml}$ の Rhodamine-labeled tubulin と Alexa488-labeled tubulin をそれぞれ最終濃度 $\sim 200\text{ nM}$ でエクストラクトに加え、3 次元スキャニングをする際には Rhodamine-labeled tubulin の蛍光を、紡錘体を探す時やスキャニング以外で撮影する時には Alexa-488 tubulin の蛍光を用いた。このような蛍光チューブリンの使い分けをした理由は、スキャニングで紡錘体内の微小管量（総蛍光量）を測定する際、スキャニング以外の原因（紡錘体を探す時など）による蛍光の退色の影響をなくするためである。また、レーザーパワーはできるだけ抑えた（10 mW で行った）。対物レンズによっては、ガラス面からある程度離れると像がゆがむことがあるため、観察に用いる範囲で像のゆがみが起きないことを確認した。

ステップモーターの z 軸方向(光軸方向)の動作速度は、FocalCheck (Invitrogen)を用いて、大きさ既知のビーズから計算した。共焦点顕微鏡の光軸方向分解能 z_{FWHM} の理論値は、波長 λ 、イメージンオイルの屈折率 n 、対物レンズの開口数 NA に対し、

$$z_{\text{FWHM}} = \frac{2n\lambda}{NA^2}$$

で与えられ、本研究では $\lambda = 568\text{ nm}$ 、 $n = 1.518$ 、 $NA = 1.35$ で行ったため、 $z_{\text{FWHM}} = 946\text{ nm}$ と

2 実験材料と方法

なる。また、直径 40 nm の蛍光ビーズを用いて光軸方向の分解能を実際に測定したところ、 $z_{FWHM} = 576 \text{ nm}$ となった（分解能未満の大きさの蛍光ビーズについて 3 次元スキヤニングを行い、光軸方向の蛍光強度分布の半値幅から求めた）。本研究では、フレーム間の距離（496 nm）が光軸方向分解能の実測値、理論値より小さくなるようにステッピングモーターの速度と画像取得間隔を調節した。

本研究ではニポードィスク走査型の共焦点顕微鏡を用いた。共焦点顕微鏡では標本の蛍光部分が連続的に大きな領域を占めているときには光軸方向の分解能が落ち、特にニポードィスク式ではピンホールとピンホールの間隔が小さい場合には光軸方向の分解能は落ちる（生細胞蛍光イメージング（共立出版）より一部改変して引用）。蛍光チューブリンを取り込ませた紡錘体は、まさにこの条件に当てはまり、共焦点顕微鏡を用いても焦点面以外からの蛍光も検出してしまう。そのため、共焦点顕微鏡を用いただけでは、光軸方向の蛍光のにじみにより、紡錘体の体積や、紡錘体内の全蛍光量を正確に測定することができない。この問題を解決するため、本研究ではデコンボリューションソフトを用いて、光軸方向の蛍光のにじみを計算によって取り除いた。蛍光顕微鏡では、紡錘体などの構造物は、真の構造に点像分布関数を作用させたものとして観察されるが、デコンボリューションソフトを用いると、観察によって得られた 3 次元データと、理論的または測定によって得られた点像分布関数から、真の構造を計算によって求めることができる。本研究ではデコンボリューションソフトとして Huygens Essential (version 4.1.0p8, Scientific Volume Imaging) を用いた。デコンボリューションのアルゴリズムは、Classic maximum likelihood estimation と呼ばれる、一般的に使われているアルゴリズムを用いた。また、本研究で用いた顕微鏡の点像分布関数を実験的に測定することは非常に難しいため、ソフト上で理論的に計算を行ったものを使用した（対物レンズの倍率、開口数、共焦点顕微鏡の方式、ピンホール径、ピンホールの間隔、励起・蛍光波長、イメージジョンオイルと試料の屈折率から計算）。また、デコンボリューションを行う際のバックグラウンドの値は、細胞質の蛍光強度の 1.5 倍とし

た（つまり、蛍光強度が細胞質の 1.5 倍の領域を紡錘体として定義した）。ただし、蛍光強度は、蛍光チューブリンを入れていないときの値を差し引くことに注意。本研究における蛍光チューブリン濃度や対物レンズなどの実験条件では、細胞質の蛍光強度の 1.5 倍で紡錘体を定義すると、紡錘体の輪郭をうまく再現できた（**図 2-4**）が、異なる実験条件では異なる値で定義する必要があった。また、データによっては紡錘体と定義する蛍光強度の閾値を、デコンボリューション後のデータの蛍光強度ヒストグラムから決定した。

本研究では紡錘体微小管に取り込ませた蛍光チューブリンの蛍光から、紡錘体の体積と紡錘体内の微小管量を測定した。3次元スキニングによって得られた3次元データの各Voxel ($74 \times 74 \times 496 \text{ nm}^3$)について、細胞質の蛍光強度(FI_{cyto})の 1.5 倍の蛍光強度を持つ場合、そのVoxelは紡錘体の一部であるとした。この蛍光強度の閾値を FI_{Th} とおくと、 FI_{Th} は

$$FI_{Th} = 1.5 FI_{cyto}$$

となる。 i 番目のVoxelの蛍光強度を FI_i 、各Voxelの体積を v とすると、紡錘体の体積 V は

$$V = v * \sum_i^{FI_i > FI_{Th}} 1,$$

で与えられる。紡錘体内の微小管量 M を、紡錘体内の全蛍光量から細胞質の蛍光量分を差し引いたものとして定義すると、微小管量は

$$M = \sum_i^{FI_i > FI_{Th}} (FI_i - FI_{cyto})$$

で与えられる。また、紡錘体内の微小管密度は

$$D = \frac{M}{V}$$

で定義した。

3次元スキニングを用いて紡錘体内の微小管量を連続的、断続的に測定する際には、スキニングによる退色を考慮する必要がある。退色の較正は Salmon らの論文を参考に行なった(Salmon *et al.*, 1984)。あるVoxelについて、1回目の3次元スキニングから t 秒後の蛍光強度 FI_t は、3次元スキニング直後の蛍光強度 FI_0 と、3次元スキニングから十分に

時間がたった時の蛍光強度 FI_{∞} (1 回目の 3 次元スキヤニングで得られた蛍光強度と同等) を用いて

$$FI_t = FI_0 + (FI_{\infty} - FI_0) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right)$$

数式 3

と表すことができる。緩和時間 τ は、様々な t について FI_t を 3 次元スキヤニングにより測定することで、実験的に求めることができ、 $\tau = 63$ s ($n = 11$) となった (図 2-5)。ただし、 FI_t の測定による退色の影響を避けるため、 FI_t の測定は 1 つの紡錘体について 1 回のみ行った。緩和時間の値は Caged 蛍光チューブリンを用いて測定した紡錘体微小管の半減期 (75-100 s) と近い値になった (Sawin and Mitchison, 1991b)。この測定によって得られた緩和時間を用いて、紡錘体内の微小管量の較正を行った。また、紡錘体の体積については、細胞質の蛍光強度も 3 次元スキヤニングによって落ちるため、スキヤニングを連続的または断続的に行っても、ほとんど影響を受けなかったため、較正は行わなかった。

2.4.9 Xkid-Qdot の観察

本研究では、Xkid-GFP と抗 GFP 抗体付 Qdot をエクストラクト中で結合させた。中期紡錘体を形成させたエクストラクト 15 μl に対し、Xkid-GFP を発現させた CSF エクストラクトと抗 GFP 抗体付 Qdot をそれぞれ 0.2-1.0 μl (2-10 % v/v)、0.3 μl (20-40 nM) 加え、結合を開始させた。Xkid-GFP 入り CSF エクストラクトを加える量は、Xkid-GFP の発現量によって調節する必要がある。発現量が多いときに多量加えると、染色体の整列と紡錘体の形成に影響が出る。Xkid-GFP と抗 GFP 抗体付 Qdot を紡錘体入りエクストラクトに加えた直後 (~5min) から紡錘体微小管上を運動する Qdot を確認できる (Xkid-GFP を加えないと、この運動は見られない (Movie 16)) ことから、両者の結合は非常に早いと言える。ただし、Qdot 1 分子あたり、何分子の Xkid-GFP が結合しているかについては確認できていない。

1 つの Qdot に対し Xkid-GFP 4 分子 (結合できる最大の分子数。1 つの Qdot から 4 つの反応基が出ているため) を結合させるため、あらかじめ Xkid-GFP と抗 GFP 抗体付 Qdot を混ぜ、長時間インキュベート (15-30 min) してから紡錘体入りエクストラクトに投入することも試みたが、この方法では紡錘体微小管上を運動する Qdot は観察されなかった。この理由としては、インキュベートの際、Xkid-GFP 入り CSF エクストラクトと Qdot 溶液の割合を 1 対 1 程度としたため、溶液環境が Xkid-GFP に適さなかった可能性がある。Qdot 溶液の溶媒である PBS をエクストラクト 40 μl に対し 1.0 μl 以上入れると紡錘体の形成に影響が出るという情報もあるので (ただし、定量的なデータはまだとれていない)、Qdot 溶液が Xkid-GFP の活性に影響を与えている可能性がある。

Xkid-GFP の紡錘体内での分布の観察は、Xkid-GFP のみを紡錘体入りエクストラクトに加え、30 分後に固定サンプルを作り行った。Xkid-Qdot の観察は、Closed chamber (シリコンコートガラス+Pluronic F-127) を用い、Xkid-GFP と抗 GFP 抗体付 Qdot を紡錘体入りエクストラクトに加えて 5 分程度してから開始した。すぐに観察を開始する理由としては、時間がたつと染色体に結合する Xkid-Qdot が増え、染色体に結合していない Xkid-Qdot の運動

2 実験材料と方法

を観察するのが難しくなるためである。すなわち、染色体に結合していない Xkid-Qdot の運動を観察するためには、Xkid-GFP と抗 GFP 抗体付 Qdot を加えてすぐに観察する必要がある。逆に、Xkid-GFP の中期紡錘体内での分布を見る際は、Xkid-GFP を加えてから十分に時間がたち、定常状態に達してから観察する。

Xkid-GFP の固定サンプルでの観察は正立顕微鏡(Axio Image, Carl Zeiss)で行った (対物レンズ; 40×, 0.75 NA, Carl Zeiss, カメラ; AxioCam MRm, Carl Zeiss)。

Xkid-Qdot は、共焦点顕微鏡(IX71, 60×対物レンズ)を用いて、Time-lapse 観察(2 秒間隔)をした。レーザーパワーは最大で行った(~20 mW)。Xkid-Qdot は 488 nm の励起光で、微小管は TMR-labeled tubulin を用い 568 nm の励起光でそれぞれ観察を行った。今回用いた光学系では吸収フィルターを用いていないため、488 nm の励起光では Xkid-GFP と Qdot、568 nm の励起光では微小管と Qdot が観察されてしまうが、蛍光強度の関係から、それぞれ Qdot と微小管の蛍光を主に観察することができた。

Xkid-Qdot の輝点の検出と追跡には、2 次元ガウシアンフィッティングを用いた輝点追跡ソフト、G-Track (G-Angstrom) または、ImageJ の Plugin である PTA (Particle Track and Analysis、新井由之博士作成 (無料で使えるが留意事項を読むこと。論文作成の際に Acknowledgement に記載する必要あり)) を用いて行った。「2.4.7FSM (Fluorescent Speckle Microscopy)を用いた微小管ダイナミクスの観察」で述べたように、PTA の方が使い勝手が良い。

エクストラクト内の流れにより、紡錘体は常に視野内で動いているため、「2.4.7FSM (Fluorescent Speckle Microscopy)を用いた微小管ダイナミクスの観察」と同様に、視野内での輝点の動きを紡錘体内の座標に変換した。まず紡錘体の 2 つの極を蛍光チューブリンの蛍光から検出し、輝点の座標を、極間をつなぐ軸とその軸と垂直で極間の中心を通る軸からなる直交座標系に変換した。座標変換の簡易的な方法として、画像自体を座標変換し、紡錘体自体の動きを抑える方法がある。本研究では Kymograph の作成時に、ImageJ (National

Institutes of Health)の Multi stack regulation という Plugin を用いて、画像の座標変換を行った (「2.4.7FSM (Fluorescent Speckle Microscopy)を用いた微小管ダイナミクスの観察」に詳細を記述)。

Xkid-Qdot の運動の解析は以下のように行った。まず、時刻 $t = t_k$ における Xkid-Qdot の紡錘体内での位置を (x_{tk}, y_{tk}) とする。通常の 2 極性の紡錘体の場合、座標は前述のように極間をつなぐ軸 (x 軸) と、極間の中心 ($x = 0$) を通る x 軸に垂直な軸 (y 軸、 $y = 0$ で x 軸と交差) で定義した。一方、Monastrol 存在下で形成される Monopolar spindle では (「2.4.5 エクストラクト中での阻害剤の使用」参照)、極の位置を座標の原点とした。Monastrol 存在下で形成される 2 極性の構造物では、2 つの Aster の境界を y 軸として定義し、y 軸と直交する軸を x 軸 ($x = 0$ で y 軸と交差) と定義した。単一の焦点面内での運動についてのみ解析を行った。

瞬間速度 (Instantaneous velocity (Ins. Vel.)) は Time-lapse 間隔 $\tau (\tau = t_{k+1} - t_k)$ を用いて以下のように定義した。

$$\text{Ins. Vel.} (t_k) = \frac{\sqrt{(x_{tk+2} - x_{tk})^2 + (y_{tk+2} - y_{tk})^2}}{2\tau}$$

瞬間的な進行方向 (Instantaneous direction (Ins. Dir.)) については、通常の紡錘体では

$$\text{Ins. Dir.} (t_k) = \begin{cases} \text{Equator} & \text{when } |x_{tk+2}| - |x_{tk}| < 0 \\ \text{Pole} & \text{when } |x_{tk+2}| - |x_{tk}| > 0 \end{cases}$$

Monastrol 存在下での Monopolar spindle の場合では

$$\text{Ins. Dir.} (t_k) = \begin{cases} \text{Outward} & \text{when } \sqrt{(x_{tk+2})^2 + (y_{tk+2})^2} - \sqrt{(x_{tk})^2 + (y_{tk})^2} > 0 \\ \text{Pole} & \text{when } \sqrt{(x_{tk+2})^2 + (y_{tk+2})^2} - \sqrt{(x_{tk})^2 + (y_{tk})^2} < 0 \end{cases}$$

Monastrol 存在下での 2 極性の構造物では

$$\text{Ins. Dir.} (t_k) = \begin{cases} \text{Outward} & \text{when } |x_{tk+2}| - |x_{tk}| < 0 \\ \text{Pole} & \text{when } |x_{tk+2}| - |x_{tk}| > 0 \end{cases}$$

でそれぞれ定義した。

各時刻の進行方向 ($\text{Dir.} (t_k)$) は、以下の式が成り立つ場合、 $\text{Ins. Dir.} (t_k)$ で定義した。

$$\text{Ins. Dir.} (t_k) = \text{Ins. Dir.} (t_{k+1}) = \text{Ins. Dir.} (t_{k+2})$$

この式が成り立たない場合（どちらに向かって動いているか分からない場合）、Dir. (t_k) は E-P (O-P)として定義した。本研究で、Xkid-Qdot の進行方向と述べる場合は、Dir. (t_k) を指す。

Dir. (t_{k-1}) \neq Dir. (t_k) = Dir. (t_{k+1}) = \dots = Dir. (t_{k+l}) \neq Dir. (t_{k+l+1}) ($l \geq 1$) が成り立つ時、一方向性の運動の持続長 (Run length) と持続時間 (Lifetime) はそれぞれ以下のように定義した。

$$\text{Run length } (t_k \sim t_{k+l}) = \sqrt{(x_{tk+l} - x_{tk})^2 + (y_{tk+l} - y_{tk})^2}$$

$$\text{Lifetime } (t_k \sim t_{k+l}) = t_{k+l} - t_k,$$

Xkid-Qdot の全運動距離 (Total run length) と全運動時間 (Total lifetime) は1つの Xkid-Qdot について Run length または Lifetime をすべて足し合わせたものとして定義した。

座標変換と、速度、方向、Run length、Lifetime の解析は Excel (Microsoft) の表計算機能と VBA の自作マクロを用いて、半自動的に行った。また、データの統計情報の抽出と、ヒストグラムのフィッティングは Origin 8.1 (Originlab) を用いて行った。

2.4.10 EB1 を用いた微小管のプラス端の観察

EB1 は微小管の重合端に結合するタンパク質として知られている (Bieling *et al.*, 2007)。微小管の重合は微小管の+端で起こるため、EB1 を観察することで微小管の+端の位置を確認できる。また、+端の伸長とともに EB1 の輝点 (多分子) が動いていくため、微小管 1 本 1 本が観察できなくても、EB1 の輝点の動く方向から微小管の方向性を知ることができ (輝点の動く方向に向かって、微小管のプラス端が伸びている) (Tirnauer *et al.*, 2002, 2004)。

本研究では観察の 10 分前に Alexa488-labeled EB1 を最終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ (340 nM) で紡錘体入りエクストラクトに加えた。ウェスタンブロットにより CSF エクストラクト中の EB1 の濃度が見積もられているが、それによると濃度は $\sim 8 \mu\text{g/ml}$ (~ 270 nM) である (Tirnauer *et al.*, 2002)。微小管のプラス端を観察する際、エクストラクト中の EB1 とほぼ等量の蛍光 EB1

を加えているが、加えたことによる紡錘体形状への影響は見られなかった。他の研究グループも、同様の濃度で観察を行っている。

2.4.11 検定方法

検定は Origin 8.1 (Originlab)を用いて行った。

力学測定の数値については Paired two-tailed Student's *t*-test、Xkid-Qdot の瞬間速度については Unpaired two-tailed Student's *t*-test、Xkid-Qdot の Run length と Lifetime についてはノンパラメトリック検定である Mann-Whitney *U* test を用いて、それぞれ検定を行った。

パラメータ間の相関については、Pearson の相関係数 r を用いて調べた。ただし、相関についての検定結果において、相関係数 r は「相関の強さ」を表し、 p 値は「相関の有無」を表していることに注意する。

2.5 図

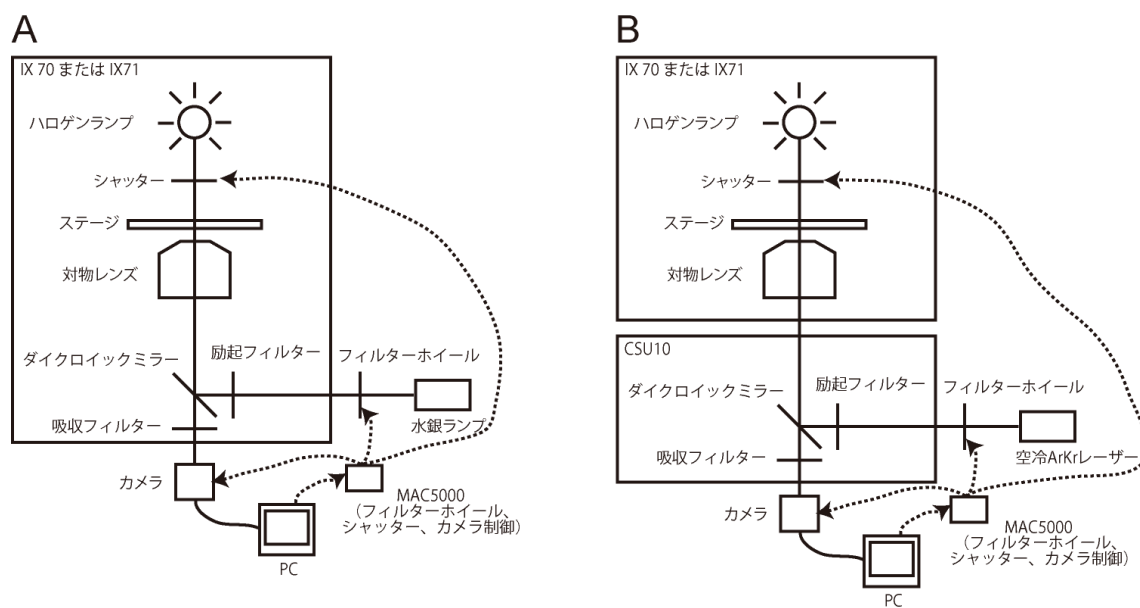


図 2-1 光学系

(左) 落射蛍光顕微鏡

(右) 共焦点顕微鏡 (CSU10 内のピンホール等は省略)

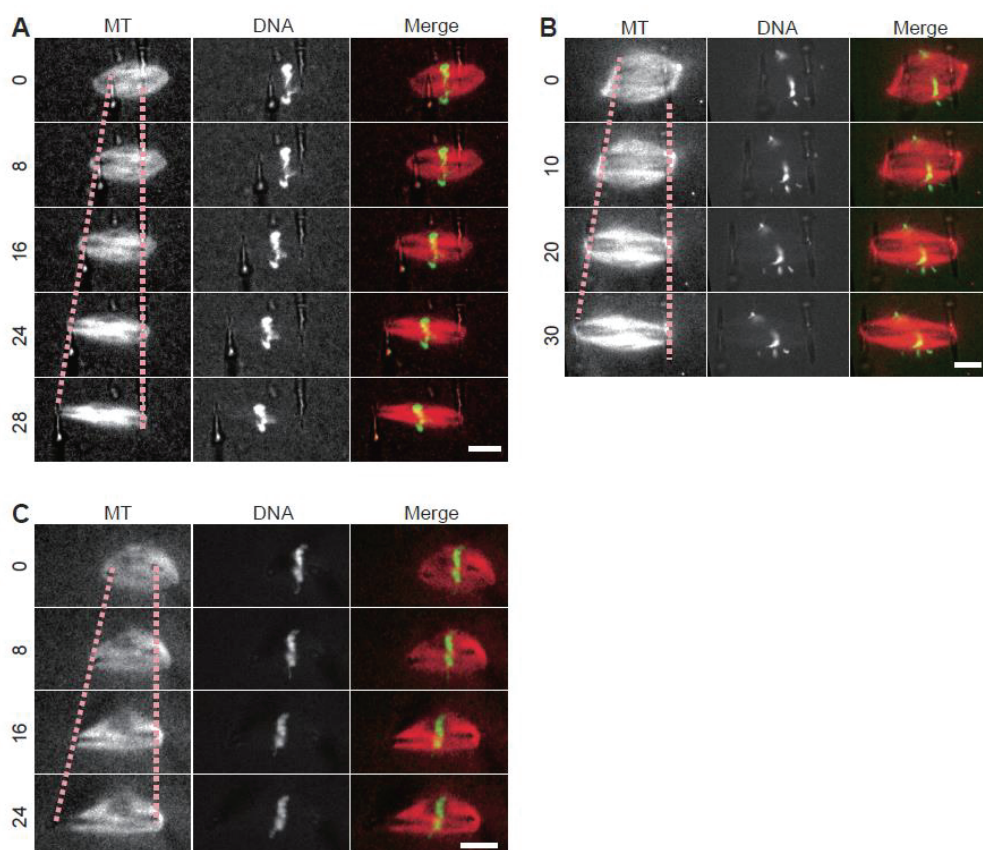


図 2-2 微小ガラス針のコーティングと、微小ガラス針の紡錘体への挿入角度の、伸長実験への影響

伸長時の紡錘体の蛍光画像（赤；微小管、緑；染色体）。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ 。ピンクの点線は微小ガラス針の先端の位置を示す。画像の左の数字は、伸長を開始してからの時間を示す（秒）。伸長速度は $1.0\ \mu\text{m/s}$ 。伸長はシリコンコートされたガラス針（A）または Pluronic F-127 でコーティングされたガラス針（B）を互いに斜めに紡錘体へ挿入することで行った。また、コーティングされていないガラス針をスライドガラスに垂直な方向に紡錘体へ挿入して伸長を行った（C）。いずれの方法でも、本研究で採用した方法（コーティングされていないガラス針を斜めに紡錘体へ挿入）と同じように紡錘体を伸長することができた。つまりガラス針のコーティングや紡錘体への挿入角度は、短時間の伸長操作にそれほど影響を与えなかった。しかし、長時間伸長する際には、コーティング又は挿入角度が問題になってくるようである（2.4.2）。

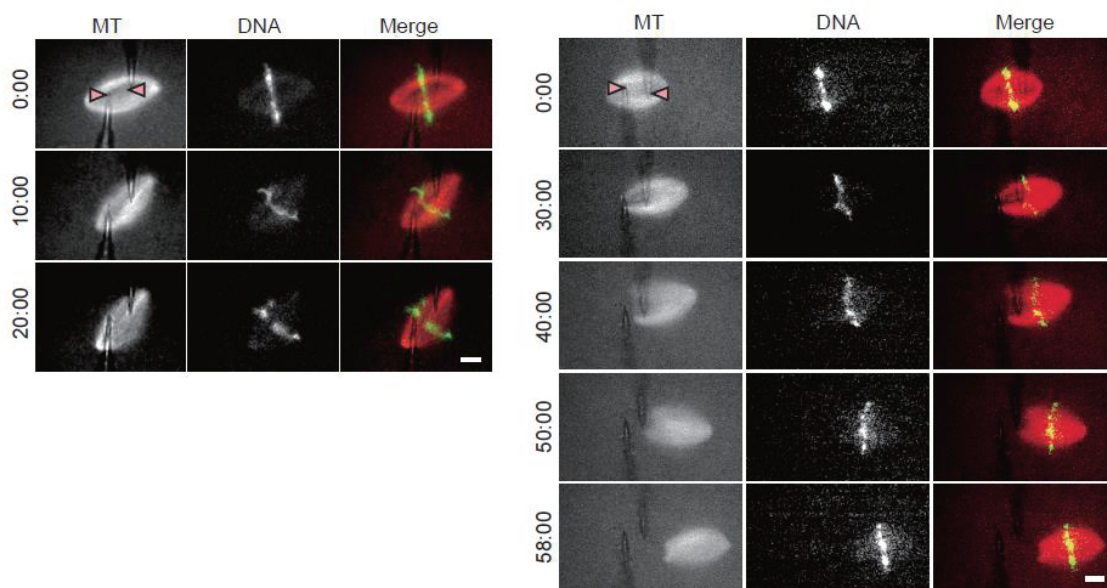


図 2-3 コーティングをしていない微小ガラス針は紡錘体に結合しない

コーティングされていない 2 本の微小ガラス針が挿入された紡錘体の蛍光画像（赤；微小管、緑；DNA）。スケールバーは 10 μm 。ピンクの矢印は微小ガラス針の先端の位置を示す。画像の左の数字は、伸長を開始してからの時間を示す（分：秒）。ガラス針が挿入されているにもかかわらず、紡錘体は回転したり（左）、ガラス針から抜けたり（右）し、ガラス針の紡錘体への結合は観察されなかった。

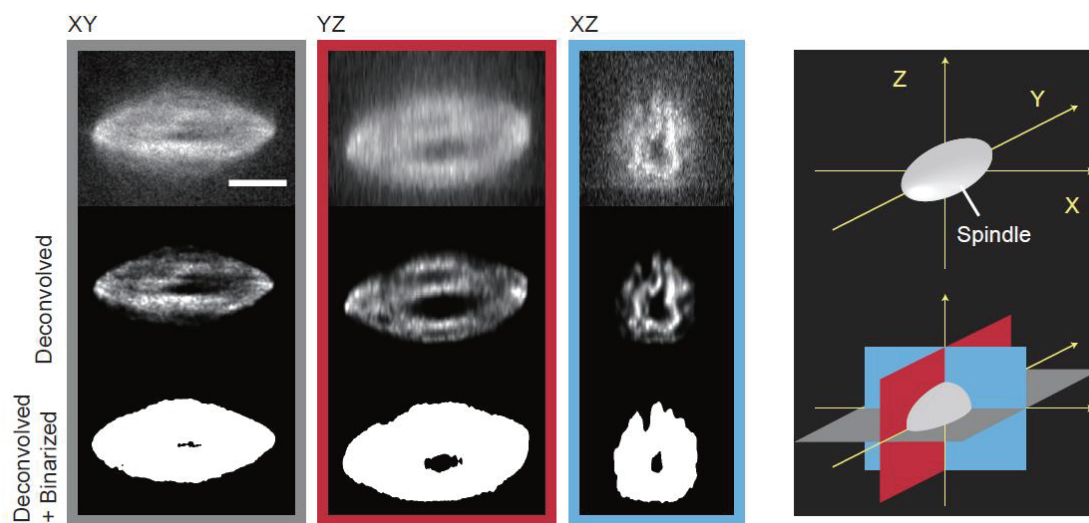


図 2-4 紡錘体の3次元観察

紡錘体の3次元蛍光画像（微小管）。スケールバーは10 μm 。中段と下段の画像はデコンボリューションをかけたものである。また、下段の画像は細胞質の蛍光強度の1.5倍の蛍光強度を閾値として2値化を行った。

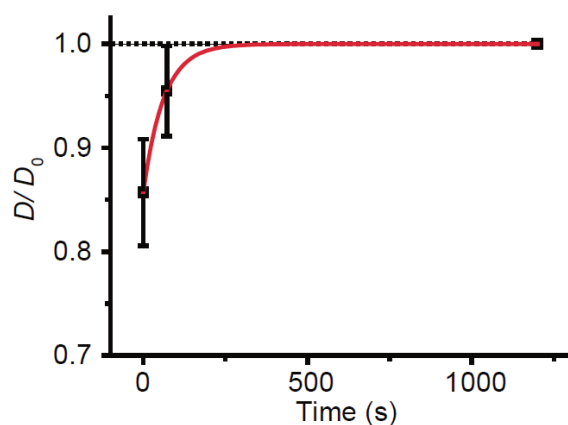


図 2-5 退色の影響の定量化

1つの紡錘体につき、2度3次元スキャンを行い、退色の影響を定量化した ($n = 11$)。2回目のスキャンは、1回目のスキャンから、70秒後または270秒後に行った (平均値 \pm SD)。2回目のスキャンで得られた紡錘体の微小管密度 (蛍光密度) D の値を1回目のスキャンで得られた値 (D_0) で規格化した。1回目のスキャンから時間がたつにつれ、蛍光密度が回復することが分かった。赤線は数式 3 を用いてフィッティングを行った結果である。

3 中期紡錘体の形状制御機構の解明

3.1 序論

中期紡錘体の大きさと細胞の大きさには相関があることが知られているが、ある程度の大きさ以上の細胞では、細胞の大きさと紡錘体の大きさに相関がなくなる(Wühr *et al.*, 2008; Hara and Kimura, 2009)。この、細胞の大きさによらない紡錘体の大きさ制御は、微小管脱重合キネシンや微小管切断タンパク質、微小管を不安定化させるタンパク質、染色体周辺にある微小管重合シグナルなどによる、微小管の重合・脱重合ダイナミクスの制御によって行われていると考えられている(Heald *et al.*, 1996; Budde *et al.*, 2001; Gaetz and Kapoor, 2004; Mitchison *et al.*, 2005; Kaláb *et al.*, 2006; Ohi *et al.*, 2007; Houghtaling *et al.*, 2009; Loughlin *et al.*, 2011)。例えば、脱重合キネシンを加えると紡錘体は小さくなり、脱重合キネシンを除去すると紡錘体は大きくなる(Ohi *et al.*, 2007)。また、katanin と呼ばれる微小管切断タンパク質を阻害すると、紡錘体は大きくなる(Loughlin *et al.*, 2011)。微小管の核形成と安定化を促進する RanGTP の濃度勾配が紡錘体の大きさと関連していることも知られている(Kaláb *et al.*, 2006)。このように、紡錘体の大きさは微小管ダイナミクスを制御するような細胞質因子により制御されていると考えられている。一方、微小管のスライディングを引き起こす分子モーターや、微小管の束の曲げなどにより生み出される力が、紡錘体内でつりあうことで、紡錘体の大きさが制御されている、という研究結果やモデルもある(Goshima *et al.*, 2005; Burbank *et al.*, 2007; Wollman *et al.*, 2008; Brust-Mascher *et al.*, 2009)。細胞や紡錘体に対して外部から人為的に加えた力により、細胞質環境を変えることなく微小管ダイナミクスや紡錘体の大きさを変えられることも報告されている(Dumont and Mitchison, 2009; Itabashi *et al.*, 2009)。このように、これまでの生化学的または生物物理学的な研究により、微小管ダイナミクスが紡錘体の大きさ制御に寄与することが示されてきた。しかし、微小管の量と紡錘体の大きさの関係を定量的に調べた研究はまだない。

さらに、微小管切断タンパク質 (katanin など) や微小管を不安定化させるタンパク質

は紡錘体内の微小管密度を制御している(Vernos *et al.*, 1995; Andersen, 2000; Budde *et al.*, 2001; McNally *et al.*, 2006)。また、Eg5 や dynein などの分子モーターや、微小管の曲げにより発生した力は、紡錘体の形を制御していると考えられている(Sawin *et al.*, 1992; Merdes *et al.*, 1996; Gaetz *et al.*, 2006; Rubinstein *et al.*, 2009; Hara and Kimura, 2013)。これらのことから、微小管の量と紡錘体の大きさの関係をj知るためには、微小管密度や紡錘体の形の影響も考慮する必要があると考えられる。

そこで本研究では、3次元観察の手法と、細胞質環境を変えることなく微小管量を制御するマイクロマニピュレーション技術を用いて、微小管量と紡錘体の大きさとの関係を定量的に調べるとともに、紡錘体の形や微小管密度といった、紡錘体の大きさを決めるためのパラメータを見出した(3.2、3.3)。

中期紡錘体の形や大きさは長時間安定している。その理由を探るため、これまでガラス針やカンチレバーを用いて紡錘体の力学特性が調べられてきた。例えば、紡錘体の長軸方向と短軸方向では硬さや変形の様子が異なること(異方性がある)(Itabashi *et al.*, 2009; Gatlin *et al.*, 2010)、紡錘体内部は長軸方向については粘性的であり短軸方向については粘弾性的である(Shimamoto *et al.*, 2011)、といったことが調べられてきた。しかし、大きな変形に対する紡錘体の力学特性については、特に粘性的な性質についてよく分かっていないほか、紡錘体全体の長軸方向についての力学特性については、長軸方向の圧縮力に対する弾性定数しか分かっていない。

そこで、本研究では、紡錘体の長軸にそった伸長方向の力に対する、紡錘体の力学特性を調べた(3.4)。この力の方向は、細胞分裂の方向と同じであるため、力学特性を知ることが非常に重要である。細胞内において、紡錘体極は、紡錘体の中と外をつなぐ場所であり、本研究により紡錘体極に力をかけた時の紡錘体の力学特性を調べたことで、紡錘体内外の力のやり取りに対する知見を得ることができた。

3.2 中期紡錘体の形状パラメータ

3.2.1 実験結果

紡錘体の大きさと微小管量には相関がある

最初に、紡錘体の大きさと微小管量の関係を3次元観察により調べた(図 3-1、Movie 2)。紡錘体の大きさは、図 3-1A に示すように紡錘体の長軸を Length (L)、短軸を Width (W)と定義し測定したほか、体積 (Volume (V)) は3次元スキニングを用いて測定した(「2.4.8 紡錘体の3次元観察」を参照)。紡錘体内の微小管量は、紡錘体微小管に導入した蛍光チューブリンの蛍光から測定した(「2.4.8 紡錘体の3次元観察」を参照)。 L 、 W 、 V の平均値はそれぞれ $34.1 \pm 5.3 \mu\text{m}$ 、 $18.0 \pm 4.0 \mu\text{m}$ 、 $(5.56 \pm 3.81) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ (平均値 \pm SD, $n = 78$) であり、 L と W は線形の関係を持つことが分かった(図 3-1B、 $W = -0.57 L - 1.3$ 、Pearson correlation coefficient; $r = 0.74$, $p < 0.05$)。また、 V は L の約3乗に比例した(図 3-1B、 $V = 0.035 L^{3.4}$)。測定の結果、紡錘体の大きさは微小管量 M と相関があることが分かった(図 3-1C、 $n = 78$ 、 $M = (2.0 \pm 3.2) \times 10^{-3} L^{4.0 \pm 0.4}$ ($R^2 = 0.53$)、 $M = (4.1 \pm 2.7) \times 10^{-5} W^{3.1 \pm 0.2}$ ($R^2 = 0.75$)、 $M = (0.61 \pm 0.02) \times V$ ($R^2 = 0.93$); \pm SEM、黒実線)。

紡錘体は固有の大きさを持つ

紡錘体の大きさの違いが、個々の紡錘体の持つ固有の大きさの違いによるものなのか、それとも個々の紡錘体の時間的なばらつきに由来するものなのかを調べるために、30分間紡錘体を観察し続け大きさの時間変化を観察した(図 3-2A)。すると、各紡錘体の大きさは揺らいでおり、大きさの時間的な分布を調べると、1つ又は複数のピークを持つことが分かった(図 3-2B、右側のヒストグラム、図 3-3)。ところが、個々の紡錘体の大きさの時間的なばらつきは、異なる6つの細胞質抽出液中で観察された78個の紡錘体の大きさのばらつきや(図 3-2B、左のヒストグラムの紫のSDバー)、各抽出液中で観察された紡錘体の大きさのばらつき(図 3-2B、左のヒストグラム上の黒のSDバー)よりも有意に小さいこと

が分かった (図 3-2、表 3-1)。これらの結果と、紡錘体の大きさと微小管量の関係から、個々の紡錘体は固有の大きさと微小管量を持ち、紡錘体の大きさは固有の大きさ付近である大きさの間を揺らいでいることが分かった。

紡錘体の形と微小管密度は、紡錘体の大きさと無関係に決まる

次に、紡錘体の大きさと形の関係を調べた (図 3-4、パラメータ同士の相関は表 3-2 にまとめた)。ここで、紡錘体の形は Aspect ratio α ($= W/L$) と γ ($= V/LW^2$) で定義した。すると、 α と γ は L によらず一定であることが分かった (図 3-4A; $n = 78$, Pearson correlation coefficient; $r = 0.057$ ($p > 0.05$), 0.337 ($p < 0.01$); $\alpha = 0.53 \pm 0.08$, $\gamma = 0.44 \pm 0.06$ (平均値 \pm SD))。また、紡錘体の 3 次元的な形は双円錐より回転楕円体に近いことが分かった (回転楕円体; $\gamma = 0.52$ 、双円錐; $\gamma = 0.26$)。

紡錘体内の微小管密度 D を M/V ($D = 0.53 \pm 0.16 \text{ AU}/\mu\text{m}^3$ (平均値 \pm SD, $n = 78$)) で定義すると、各パラメータの定義から、Length (L) は

$$L^3 = \frac{M}{D\alpha^2\gamma}$$

数式 4

のように書くことができる。数式 4 を模式的に表すと図 3-5 のようになる。ここで、 D は L に依存しないことが分かった (図 3-4B, Pearson correlation coefficient; $r = 0.227$ ($p < 0.05$))。数式 4 の右辺のうち、紡錘体の形 (α , γ) と微小管密度 D は紡錘体の大きさ L に依存しないことから、微小管量 M と紡錘体の大きさ L が直接相関していること分かる。

3.2.2 考察

これまでの研究では、微小管量と紡錘体の大きさの関係について、定量的な解析が行われてこなかった。その理由としては、紡錘体が 3 次元的な構造物であり、微小管量を正確に見積もるのが難しい点があげられる。今回、紡錘体を 3 次元的に観察することで、微小管量と紡錘体の大きさの関係を定量的に解析することができた。その結果、紡錘体の大きさと微小管量には強い相関があることが分かった。また、3 次元観察の結果と、紡錘体の長時間観察から、個々の紡錘体は固有の大きさと微小管量を持ち、紡錘体の大きさは固有の値の周りで揺らいでいることが分かった。それでは、固有の値はどのようにして決まっているのであろうか。1 つの仮説としては、細胞質はヘテロな性質をもち、個々の紡錘体で局所的な細胞質環境が異なっているのではないかと考えられる。しかし、次の 3.3 項で示すように、紡錘体を切断し、微小管量を減少させると、まわりの細胞質環境が変わらないにもかかわらず紡錘体の大きさは小さくなることから、局所的な細胞質環境の違いだけで紡錘体の大きさが決まるとは言えない。染色体の数により、微小管の長さや微小管量が変化するという報告もあるが(Nicklas and Gordon, 1985; Dinarina *et al.*, 2009)、紡錘体の大きさの制御にどの程度寄与しているかは分かっていない。しかし、どのように微小管量が決定されるかはまだ分からないにしろ、本研究により、微小管量と紡錘体の大きさに相関があるということを示すことができた。

本研究では紡錘体の大きさと微小管量に加え、紡錘体の形と微小管密度の測定を行った。測定により、紡錘体の形は大きさによらず一定であることが分かった。これに対し、*Caenorhabditis elegans* Embryo では大きな紡錘体ほど Aspect ratio は小さくなる(Hara and Kimura, 2013)ことから、紡錘体の形の制御機構は種によって異なる可能性がある。また、微小管密度も紡錘体の大きさによらないことも分かった。本研究では、形などのパラメータをうまく定義することにより、パラメータ間の関係を 1 つの数式(数式 4)で表わした。これまでの紡錘体についての研究では、紡錘体の形、大きさ、微小管ダイナミクスについ

3 中期紡錘体の形状制御機構の解明

での情報はバラバラに論じられてきたが、この数式を用いることで、実験結果をより整理し、原因と結果を見極めることができるようになるであろう。本研究により、紡錘体の大きさは、形や微小管密度よりも、微小管量によって決まる、ということがこの数式を用いることで説明できる。

3.3 中期紡錘体の切断と融合

3.3.1 実験結果

D 、 α 、 γ は L に依存しないことから、数式 4 は微小管量 M の変化が紡錘体の大きさ L に大きく影響を与えることを示唆する。つまり、 D 、 α 、 γ が変化しない条件で、 M のみが減少した場合、 M の減少に対応して紡錘体の大きさ L も減少する。このことを確かめるため、微小ガラス針を用いて顕微鏡下で物理的に微小管量を減少させた。2本の微小ガラス針を紡錘体の赤道面付近に挿入し、挿入後2本のガラス針を長軸と垂直な方向にそれぞれ逆向きに動かすことで、紡錘体を長軸に沿って2つの断片に切断した (図 3-6、図 3-7A、Movie 3)。針の挿入後、切断までには10秒程度しかかからない。また、ほとんどの場合、紡錘体内の染色体も2つのグループに分けられ、それぞれ各断片に結合したままになる。切断により、染色体が紡錘体断片から離れてしまった場合、染色体をもたない紡錘体断片は微小管が脱重合して消滅してしまった (図 3-9)。また、切断の過程で、染色体の位置が断片の赤道面から一時的にずれることがあったが、切断から数分で赤道面に再整列した。分裂後期においてこの断片が正常に染色体分配できるかについては確認していない。

切断の操作により各断片は大きく変形するが、切断から5分以内に元の紡錘体のような形に回復する (図 3-7A)。切断により各断片の微小管量 M は元の紡錘体の微小管量の約3分の1となり、20分程度観察を続けてもこの値で安定していた (図 3-7B、図 3-8A、 $M = (0.24 \pm 0.12) \times 10^4$ AU (切断前)、 $M = (0.074 \pm 0.058) \times 10^4$ AU (切断後) (平均値 \pm SD, $n = 10$ (切断前の紡錘体)、 $n = 20$ (切断後の断片)))。微小管量 M の減少に伴い、各断片の大きさも元の紡錘体よりも小さくなり、切断後20分たっても回復しなかった (図 3-7B、図 3-8A、 $L = 34.1 \pm 3.9$ μm 、 $W = 16.4 \pm 2.2$ μm 、 $V = (4.6 \pm 1.6) \times 10^3$ μm^3 (切断前、平均値 \pm SD, $n = 10$ (紡錘体))、 $L = 27.1 \pm 4.3$ μm 、 $W = 12.1 \pm 2.7$ μm 、 $V = (1.9 \pm 1.0) \times 10^3$ μm^3 (切断後、平均値 \pm SD, $n = 20$ (断片)))。元の紡錘体における大きさ L と微小管量 M の関係は、切断後にできた微小管量が少なく小さい紡錘体でも保たれた (図 3-8A)。また、紡錘体の形 (α 、 γ) は切断

3 中期紡錘体の形状制御機構の解明

前後で変わらなかった (図 3-7B、図 3-8B,C、 $\alpha = 0.48 \pm 0.05$ 、 $\gamma = 0.48 \pm 0.03$ (切断前、平均値 \pm SD、 $n = 10$ (紡錘体))、 $\alpha = 0.45 \pm 0.11$ 、 $\gamma = 0.46 \pm 0.09$ (切断後、平均値 \pm SD、 $n = 20$ (断片)))。切断により、微小管密度は若干減少した (図 3-7B、図 3-8B,C、 $D = 0.50 \pm 0.16$ (切断前、平均値 \pm SD、 $n = 10$ (紡錘体))、 $D = 0.37 \pm 0.13$ (切断後、平均値 \pm SD、 $n = 20$ (断片))、 $p < 0.01$)。しかし、微小管密度の減少 ($\sim 25\%$) は微小管量の減少 ($\sim 70\%$) に比べて小さく、数式 4 から切断後の大きさ L の減少は M の減少に主に起因することが示された。

次に、切断によってできた 2 つの断片を、微小ガラス針で接触させることで、微小管量 M を 2 倍にした (図 3-10A)。その結果、接触から 15 分程度で 2 つの断片は融合し、1 つの正常な形をした紡錘体となった (Movie 4)。融合の過程は、2 つの正常な紡錘体が融合し、1 つの正常な形の紡錘体になる際 (Gatlin *et al.*, 2009) と同じような経過をたどった。また、融合の過程で、微小管量 M は 2 つの断片の微小管量の合計より一時的に大きくなった (図 3-10B)。融合実験は切断実験に比べ穏やかな顕微操作であるが、紡錘体の大きさと形の応答はほぼ同じであった。融合によりできた紡錘体の微小管量は、融合前の個々の断片より多くなり、大きさも融合前より大きくなった (図 3-11A、 $M = (0.069 \pm 0.056) \times 10^4$ AU、 $L = 26.2 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 、 $W = 12.0 \pm 2.8 \mu\text{m}$ 、 $V = (1.8 \pm 1.0) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ (融合前、平均値 \pm SD、 $n = 18$ (断片))、 $M = (0.18 \pm 0.094) \times 10^4$ AU、 $L = 29.9 \pm 3.8 \mu\text{m}$ 、 $W = 16.9 \pm 3.9 \mu\text{m}$ 、 $V = (4.3 \pm 2.4) \times 10^3 \mu\text{m}^3$ (融合後、平均値 \pm SD、 $n = 9$ (紡錘体)))。 γ の値は融合前後で変わらなかった一方、Aspect ratio と微小管密度は若干増加した (図 3-10B、図 3-11B,C、 $\gamma = 0.46 \pm 0.09$ 、 $\alpha = 0.46 \pm 0.11$ 、 $D = 0.36 \pm 0.13$ (融合前、平均値 \pm SD、 $n = 18$ (断片))、 $\gamma = 0.47 \pm 0.04$ 、 $\alpha = 0.57 \pm 0.15$ ($p < 0.01$)、 $D = 0.43 \pm 0.14$ ($p < 0.01$) (融合後、平均値 \pm SD、 $n = 9$ (紡錘体)))。また、元の紡錘体における L と M の関係は融合後も、切断後と同様に保たれた (図 3-11A)。切断・融合実験の結果は、微小管の減少と増加によって、紡錘体の大きさを動的に制御されることを示唆する。

3.3.2 考察

本項では、紡錘体の大きさが微小管量に依存するというを、定量的に、同じ紡錘体を用いて、細胞質環境を変えずに示すことができた。紡錘体の大きさは切断や融合による微小管の量の変化に応じて変化した一方、紡錘体の形と微小管密度はあまり変化しなかった(図 3-12)。また、操作直後、特に切断直後では紡錘体の形と微小管密度は大きく変化していたが、すぐに元の値に戻った。この結果を数式 4 を用いて考えると、紡錘体の形と微小管密度の素早い回復が、紡錘体の大きさの微小管量へのすばやい適応に対応すると言える。紡錘体の形と微小管密度は分子モーターや微小管結合タンパク質により制御されていると考えられているが、これらの分子がどのようにして動的に紡錘体の形と微小管密度を制御しているかを調べるのが、紡錘体の大きさ制御の機構を知るうえで重要である。また、紡錘体は、大きな変形と、紡錘体の構成物の量の大きな変化を受けても、正常な構造を取り戻すことができることが分かった。

紡錘体の大きさについてのこれまでの研究では、細胞質中の分子の量を変える実験から得られた情報を基にした、分子モーターや微小管のキネティクスに関するモデルが主であった(Goshima *et al.*, 2005; Burbank *et al.*, 2007; Loughlin *et al.*, 2011; Reber *et al.*, 2013)。それに対し、本研究は細胞質中の分子組成を変えずに、力学的な摂動のみから紡錘体の構造を特徴づける保存量を見出した。このように本研究は本質的に異なる方法論から得られた結果であるため、既存のモデルにも新たな視点を与えることができるであろう。

3.4 中期紡錘体の力学特性

3.4.1.1 中期紡錘体の伸長

長軸方向の力に対する紡錘体の力学特性を調べるため、2本の微小ガラス針を紡錘体に挿入し、片方のガラス針を長軸方向に等速で動かすことで、紡錘体を長軸方向に伸長した(図 3-13。方法の詳細については「2.4.2 紡錘体の力学顕微操作」を参照)。針を動かす速度は 0.1–10.0 $\mu\text{m/s}$ で行った。2本の微小ガラス針の先端がそれぞれ紡錘体極に近づくと (~4 μm)、紡錘体の長軸 L がガラス針の動きに合わせて伸長し始めた(図 3-14A、Movie 5)。ただし、ガラス針が紡錘体極付近に到達するまでも、ガラス針により紡錘体には粘性的な力がかかっている(Shimamoto *et al.*, 2011)。紡錘体の長軸 L が伸長するにつれ、短軸 W は減少していった。また、紡錘体の赤道面に整列している染色体の短軸方向の幅も、短軸 W の減少とともに減少していった。伸長を続けると、紡錘体極とガラス針との距離は徐々に減少し、あるところで紡錘体の極がガラス針により切断される。ガラス針の移動速度によらず、紡錘体極が切断するまでに、紡錘体の長軸を 10%以上伸長できた(図 3-14B)。これは、紡錘体を長時間観察し続けた時の紡錘体長軸の変化の割合 (~4%、図 3-2、表 3-1) より大きい。また、ガラス針の移動速度が遅いほど、紡錘体をより大きく伸長できた(図 3-14B)。ガラス針の移動速度によって、紡錘体の短軸 W の変形の仕方が異なったが、その結果については「3.4.1.4 中期紡錘体の 2次元粘弾性モデル」で詳細を述べる。紡錘体は、極が切れない程度に伸長 (~8%) した後、ガラス針を固定した状態で 300 秒程度保持できた(300 秒程度で極が切断する)。紡錘体の伸長操作は、比較的簡単に行え、長軸を軸とする回転体としての紡錘体に、回転軸についてほぼ対称な変形を加えることができ、紡錘体形状の変形と応答を定量的に調べるうえで非常に良い実験系である。なぜ紡錘体極付近でガラス針が引っかかるかについては分かっていないが、紡錘体極付近では γ チューブリンなど、様々なタンパク質が集積しており、微小管などからなる固い網目構造をとっている可能性がある。

3.4.1.2 伸長に対する紡錘体形状の応答

紡錘体を伸長する手法を用いて、変形に対する紡錘体の形状応答性を観察した。紡錘体を長軸に沿って約 10%伸長し（針を動かす速度 = 1.0–5.0 $\mu\text{m/s}$ ）、その後針を元の位置に素早く戻した（図 3-15A、Movie 9）。伸長により長軸 L は伸び、短軸 W は縮むが、針を元の位置に戻した後、 L と W の値は徐々に元の値に回復し、300 秒以内に元の値に完全に回復した（ $L = 36.5 \pm 7.2 \mu\text{m}$ 、 $W = 18.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ （伸長前）、 $L = 36.3 \pm 7.3 \mu\text{m}$ 、 $W = 18.1 \pm 3.9 \mu\text{m}$ （伸長後）（平均値 \pm SD、 $n = 5$ ））（図 3-15B-C）。紡錘体の大きさ、形ともに完全に元に戻ることから、瞬間的な伸長に対し紡錘体は粘性的ではなく粘弾性的にふるまうことが分かった。

次の実験では、紡錘体を 8%程度伸長した後（針を動かす速度 = 1.0–5.0 $\mu\text{m/s}$ ）、針を固定し、長軸 L が伸長された状態で短軸 W がどのように応答するかを観察した（図 3-16A、Movie 10）。 W は L の伸長に伴い減少するが、針の固定後、 L が伸長された状態であるにもかかわらず W の値は徐々に増加していき、200 秒程度で安定状態に達した（図 3-16B）。この安定状態での W の値は、伸長前の W の値（ W_0 ）よりも若干小さかった（図 3-16C-D、 $W/W_0 = 0.94 \pm 0.06$ （平均値 \pm SD、 $n = 13$ ）、 $p < 0.05$ ）。つまり、これらの結果から、 W は L の回復がなくともある程度回復するが、完全に回復するには L の回復が必要であると考えられる。

次に、伸長操作により紡錘体の構成物の量が変化しているのかを調べるために、3次元観察を行い紡錘体内の微小管の量（ M ）、紡錘体の体積（ V ）、紡錘体内の微小管密度（ $D = M/V$ ）を測定した（図 3-17A。測定方法については「2.4.8 紡錘体の 3次元観察」を参照）。伸長の方法は、前の実験と同様に紡錘体を 8%程度伸長した後針を固定した。3次元観察の結果、 M の値は実験を通して変わらない一方、伸長直後は V の値は減少、 D の値は増加するが、針固定後は V と D の値は共に 240 秒以内に伸長前の値に回復した（図 3-17B、Movie 11）。 M の値は実験を通して変わらないことから、 V と D の値の回復はパラメータの定義より相

互に関係しており、どちらかを制御する機構があるとすれば、両方の値の回復を説明できる。また、 W が完全に回復しない理由として、 V または D を元の値に回復させる機構があるとすると、 L が伸長した状態にあるので、 W は必然的に元の値よりも小さくなる、といった仮説が考えられる。

3.4.1.3 伸長に要する力の測定

ここまでの実験により、中期紡錘体は伸長に対し粘弾性的な性質を持つことが分かった。そこで、粘弾性的性質をさらに詳細に調べるため、較正済みの柔らかい針を用いて、紡錘体を伸長する際に必要な力を測定した（図 3-18A、Movie 12-14）。具体的には、固い針と較正済みの柔らかい針をそれぞれ 1 本ずつ紡錘体に挿入し、固い針を等速で動かす（針の移動速度 = $0.1 \mu\text{m/s}$ 、 $2.0 \mu\text{m/s}$ 、 $5.0 \mu\text{m/s}$ ）ことで紡錘体を長軸方向に伸長し、柔らかい針の位置の初期位置からのずれから、伸長に必要な力を測定した（方法の詳細は「2.4.2 紡錘体の力学顕微操作」を参照）。伸長に必要な力は固い針の移動速度に大きく依存し、移動速度が $0.1 \mu\text{m/s}$ と遅いときは伸長に必要な力は小さく、移動速度が $2.0 \mu\text{m/s}$ と速いときは伸長に必要な力は大きくなった（図 3-18B-C、図 3-19）。しかし、移動速度をさらに速くし、 $5.0 \mu\text{m/s}$ にしても、伸長に必要な力は移動速度が $2.0 \mu\text{m/s}$ のときと変わらなかった。次に、実験によって得られた力と変形の関係（図 3-18C）を、図 3-18D の Zener モデルを用いて評価した。Zener モデルを採用したのは、長軸方向の粘弾性モデルを考えると、(1)前項の瞬間的に伸長する実験において長軸が伸長後完全に回復することから、弾性項と粘性項が並列につながっている、(2)本項の力測定の実験において、ガラス針の移動速度を上げていくと、伸長に必要な力が上限に達することから、粘性項には弾性項が直列につながっている、という 2 つの理由からである。さらに複雑なモデル、または非線形のモデルを採用することによってより紡錘体の力学特性を正確に表現できる可能性もあるが、研究結果を再現できる最も単純な粘弾性モデルとして、本研究では Zener モデルを採用した。図 3-18C の 3

種のガラス針の移動速度における力と変形の間を、Zener モデルでグローバルフィッティングしたところ（方法については「2.4.3 紡錘体の粘弾性測定（1次元モデル）」を参照）、 $k_1 = 0.4 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $k_2 = 5.2 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $\gamma = 41 \text{ nN s}/\mu\text{m}$ となった。

短軸方向についての力学特性も Zener モデルで表され、弾性定数と粘性係数はそれぞれ $k_1 = 0.08 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $k_2 = 0.78 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $\gamma = 7.5 \text{ nN s}/\mu\text{m}$ と報告されている(Shimamoto *et al.*, 2011)。本研究により各素子の値は、長軸方向の方が短軸方向に比べ大きいことが分かった。このような力学特性の異方性は、紡錘体をカンチレバーで圧縮した際の、紡錘体の力学特性を測定した実験でも観察されており、長軸方向の硬さ($2.69 \text{ nN}/\mu\text{m}$)の方が、短軸方向の硬さ($1.19 \text{ nN}/\mu\text{m}$)に比べ 2 倍程度大きい(Itabashi *et al.*, 2009)。紡錘体の力学特性の異方性の原因はまだ分かっていないが、紡錘体内の微小管配向の異方性（長軸に沿った方向に配向している微小管が多い）を反映している可能性がある。

3.4.1.4 中期紡錘体の 2次元粘弾性モデル

長軸の伸長に伴う短軸の変化を定量的に調べるため、長軸を伸長する速度（ガラス針を動かす速度）を変えて実験を行い（ $0.1 \mu\text{m/s}$ 、 $1.0 \mu\text{m/s}$ and $10.0 \mu\text{m/s}$ ）、短軸の変化を観察した（等速伸長実験）（**図 3-20**、**図 3-21**、Movie 6-8）。短軸 W の変化は、伸長速度が遅い場合の方が速い場合に比べ小さくなることが分かった。例えば、伸長速度が遅いとき（ $0.1 \mu\text{m/s}$ ）、 $L/L_0=1.055$ で $W/W_0 = 0.92 \pm 0.05$ (平均値 \pm SD, $n = 8$)であったのに対し、伸長速度が速いとき（ $1.0 \mu\text{m/s}$ ）は $L/L_0=1.055$ で $W/W_0 = 0.75 \pm 0.11$ (平均値 \pm SD, $n = 7$)であった。この結果は、3.4.1.2 で観察された、伸長後針を固定した後に短軸が徐々に回復するという現象が、伸長中にも起きていることを示している。

伸長中の短軸の回復を定量的に解析するため、**図 3-21B** に示すような 2次元モデルを作成した。このモデルでは、紡錘体をひし形で近似した。ひし形の辺の長さ S は

$$S = \frac{1}{2} \sqrt{L^2 + W^2}$$

数式 5

で表される。伸長速度が速いとき(1.0 $\mu\text{m/s}$ 、10.0 $\mu\text{m/s}$)、変形開始からしばらくは S の値がほぼ一定であった (図 3-20)。つまり、変形前の形によらず、 S が一定という条件の下でひし形モデルを用いて変形の様子を表すことができる。ある程度変形すると、 S の値は徐々に増加する。それに対し、伸長速度が遅いとき、 S の値は伸長開始から徐々に伸び始める。伸長速度が遅いとき、 $dS/dt = 0.55 \pm 0.33 \mu\text{m/min}$ (平均値 \pm SD, $n = 8$)となることが分かった。この値は、紡錘体内の微小管の流れの速さ (2-3 $\mu\text{m/min}$) に近い値となった。

等速伸長実験の結果から、紡錘体は長軸方向だけではなく、短軸方向も粘弾性的な性質をもつことが示唆された。短軸方向の粘弾性的性質を調べるため、3.4.1.3 で測定した伸長に要する力(図 3-18C)を、ひし形モデルを拡張することで2次元的に評価した(図 3-22)。ひし形の角における力のつり合いを考えると、伸長に要する力 F_{ex} は以下のように短軸方向にかかる力($F_{\text{ex}})_W$ と辺方向にかかる力($F_{\text{ex}})_S$ に分解できる。

$$(F_{\text{ex}})_W = F_{\text{ex}} \left(\frac{W}{L} \right)$$

数式 6

$$(F_{\text{ex}})_S = F_{\text{ex}} \left(\frac{S}{L} \right)$$

数式 7

この式を図 3-18C の結果に適用することで、図 3-22C のように、短軸方向、辺方向の力—変形の関係が得られる。グラフより、短軸方向、辺方向共に粘弾性的な性質を持つことが分かった。3.4.1.3 と同様の理由から、Zener モデルを用いて粘弾性を評価する (図 3-22D)。この2次元粘弾性モデルでは、微小ガラス針による外力がない場合、全てのばねが自然長であるとした。外力をかけると、Zener モデルの各素子による短軸方向と辺方向の力が生じ (F_W, F_S)、これら3つの力はひし形の4つの角でつり合う。ここで、 $(F_{\text{ex}})_W = -F_W$ 、 $(F_{\text{ex}})_S =$

- F_S となる。また、長軸方向の粘弾性的性質は、辺方向の粘弾性に含まれる(辺の定義より)。このモデルを用いて、短軸方向と辺方向の粘弾性を評価した(方法は 2.4.4 参照)。短軸方向の Zener モデルの各素子の弾性定数、粘性係数は、グローバルフィッティングの結果、 $k_{w1} = 0.10 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $k_{w2} = 1.51 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $\gamma_w = 27 \text{ nN s}/\mu\text{m}$ となった。この値は、短軸方向について粘弾性測定を行った実験で得られた値 ($k_1 = 0.08 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $k_2 = 0.78 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $\gamma_1 = 7.5 \text{ nN s}/\mu\text{m}$) (Shimamoto *et al.*, 2011) と近い値となった。本研究で得られた値の方が少し大きかった理由としては、本研究では 3 次元的な大変形を加えているのに対し、島本らの研究では 2 次元的な小変形を加えている、といった違いが考えられる。辺方向の Zener モデルの各素子の弾性定数、粘性係数を、グローバルフィッティングを用いて計算した。その結果、 $k_{s1} = 0.45 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $k_{s2} = 21.52 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 、 $\gamma_s = 97 \text{ nN s}/\mu\text{m}$ となった。

このモデルと、得られた定数の値から、固いガラス針を用いて紡錘体を等速で伸長した際の、伸長速度による変形の違いをシミュレーションにより計算した(方法は 2.4.4 参照)。その結果、**図 3-21A** (青線) のように、実際の変形の様子と一致した。

本研究では外力をかける前に紡錘体内で働いている力は、外力に比べ十分に弱いとして計算を行った(つまり、外力をかける前にはすべてのばねが自然長であるとした)。ここで、弱い力が常に紡錘体にかかっているとすると、2次元粘弾性モデルはどのような応答をするかを考える。この弱い力というのは、例えば紡錘体内に存在する分子モーターによる力や、紡錘体極から紡錘体膜に延びる微小管(星状体微小管)を細胞膜上に存在するダイニンが細胞膜方向に引っ張る力を想定している。すべての素子が自然長にあり、そこに時刻ゼロで紡錘体の長軸に沿って外向きの一定の力がかかるとしてシミュレーションを行うと、**図 3-23A 左**のように長軸が少し伸び、短軸が少し短縮するが、しばらくすると安定化する(シミュレーション方法は 2.4.4 参照)。これは、Zener モデルの平行バネと外力がつりあうためである。一方、Zener モデルではなく Maxwell モデルとして振る舞うとしてシミュレーションを行うと、大きさは安定せず、どんどん紡錘体は大きくなる(**図 3-23A 中央**)。

この結果から、紡錘体の粘弾性的特性が Zener モデルで表されることは、定常的な力に対して紡錘体の大きさと形を安定化させるために重要であることが示された。

3.4.2 考察

本項では、紡錘体の伸長実験を通して、紡錘体の力学特性を調べた。伸長実験は比較的操作が容易なため、紡錘体ごとの操作のバラつきが少なく、操作のバラつきが測定結果にあまり影響しないという利点がある。また、紡錘体は長軸に沿って回転対称な形状をしているが、伸長実験は、回転対称性を保ったまま行える。そのため、カンチレバーを用いた研究や、ガラス針を用いて紡錘体の短軸方向の力学特性を測定した研究など、非対称な変形を用いた先行研究(Itabashi *et al.*, 2009; Shimamoto *et al.*, 2011)に対し、大きな優位性がある。

紡錘体を長軸方向に伸長できたことは、紡錘体極の構造が他の領域に比べて頑丈であることを意味する。紡錘体極には中心体がある他、ダイニンなどの働きにより極形成にかかわる様々なタンパク質が集積している(Merdes *et al.*, 1996; Barr and Gergely, 2007; Lüders and Stearns, 2007)。また紡錘体極には短い微小管が数多く存在し、Eg5 やダイニンによりお互いに架橋されている(Burbank *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007)。これらの要素が、紡錘体極の剛健性に寄与していると思われる。光ピンセットを用いて星状体の極の硬さを測定したという研究(Charlebois *et al.*, 2011)はあるが、正常な形状をした紡錘体の、極の力学特性についてはまだよく分かっていない。

紡錘体の長時間観察や、切断、融合実験から、紡錘体の形や大きさは非常に安定しており、微小ガラス針を用いて変形しても、しばらくすると元の形に回復することが分かった。この、変形と回復を定量的に測定する上で、伸長実験は最適であった。伸長に対する変形は伸長速度に依存する一方、同じ伸長速度に対しては異なる紡錘体が同じような変形をした。伸長という、2極性を保った変形に対し、紡錘体形状は5分以内に定常状態を取

り戻した。この時与えた変形は、長軸については、3 μm (全長の 10%) 程度であり、回復の速度のオーダーは 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ 程度である。紡錘体内の微小管の flux 速度は 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ 程度 (Yang *et al.*, 2008) であり、回復の速度のオーダーと同程度である。このことから、flux を駆動する分子モーターが、直接的、あるいは間接的に紡錘体の形の制御に寄与しているのではないかと推測される。

伸長後、針を固定した実験においては、最終的に短軸の長さは完全には元に戻らないが、体積は完全に回復した。また、微小管の量は実験を通してほとんど変わらなかった。微小管量が変わらないのは、伸長実験に要する時間が 5 分程度と短いことも影響しているのかもしれない (融合実験では 15-20 分程度かかり、微小管量が変化する)。微小管量が変わらないことから、体積が完全に回復することは、微小管密度も完全に回復することを意味する。体積を制御する機構と、微小管密度を制御する機構のいずれが本質かははっきりしない。ただ、紡錘体の観察や切断融合実験によると、微小管密度は紡錘体の大きさによらず一定に保たれていた。このことから、微小管密度を制御する機構があるのではないかと推測される。紡錘体内の微小管密度の制御は、染色体から発せられる微小管重合シグナルのような化学的制御と、微小管同士をリンクする分子の運動性や大きさ、固さといった物理的制御によって決まっていると考えられる。前者では、変形からの回復時に微小管量の増減が生じる可能性があるが、本研究ではそのような現象は測定されていないため、後者の可能性の方が有力と考えている。ただし、3次元スキニングを用いた微小管量等の測定は、蛍光退色の影響を受けることから時間分解能が低く、形状の回復の過程で微小管量の増減が起こっている可能性を否定できない。さらなる測定手法の改善が求められる。伸長によって長軸周辺に集まった微小管が、その後どうなるのか。例えば分子モーターによる Sliding により元の微小管密度と体積に戻るのか、もしくは長軸周辺に集まった微小管の一部が脱重合して元の微小管密度に戻り、新たに紡錘体周りに新しい微小管が重合するのか。形状回復過程の詳細な分子ダイナミクスを観察することで、紡錘体の自己組織化の

メカニズム解明に大きく近づくであろう。

伸長に要する力を測定することで、紡錘体の長軸方向の力学特性をより詳細に調べたところ、素早い伸長に対し、長軸方向の硬さは $4 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 程度であることが分かった。この値は、紡錘体をカンチレバーで長軸方向に圧縮した際の値 $2.69 \text{ nN}/\mu\text{m}$ と近い値となった (Itabashi *et al.*, 2009)。また、伸長速度を変えて実験を行い、粘弾性的特性を測定したところ、紡錘体の長軸方向の粘弾性特性は Zener モデルを用いて表すことができることが分かった。また、本研究では、Zener モデルを 2 次元的につなげることで、長軸方向に加え、紡錘体の形の粘弾性的性質を表すことに成功した。このモデルを用いることで、紡錘体の短軸方向と、紡錘体をひし形で近似した際のひし形の辺方向で異なる粘弾性特性が導出できた。紡錘体は異方性をもつ構造物であり、測定結果は、平行に束ねられた微小管の、微小管軸と垂直な方向と、軸に沿った方向で、力学特性が異なる、ということを示しているのである。このような力学特性の異方性について、溶液系など、より単純な系で詳細に調べる必要がある。

島本らの研究(Shimamoto *et al.*, 2011)により、Zener モデルの平行バネの弾性は、染色体に結合している微小管（動原体微小管）に起因していることが示唆された。紡錘体内では 2 つの極から伸びる微小管が姉妹染色体の 2 つの動原体にそれぞれ結合することで、染色体を介して 2 つの紡錘体極が動原体微小管によってつながれている。このことが、動原体微小管の弾性的な性質をもたらしていると思われる。そのため、分裂後期に入り姉妹染色体間の結合が切れると、この弾性的な性質が失われると考えられる。つまり、分裂後期に入ると Zener モデルではなく、Maxwell モデルのように振る舞うようになるのではないかと考えた。紡錘体の粘弾性特性が Maxwell モデル型になると、長軸が伸長していく (図 3-23) が、これは分裂後期における紡錘体伸長の時間経過と似ている。つまり、分裂中期から後期にかけて紡錘体の粘弾性的特性の変調がおこること、そのことが紡錘体伸長のスイッチになっているのではないだろうか。

最後に、紡錘体の力学特性を、他の構造物の力学特性と比較する。伸長速度が速いとき、 $L/L_0 = 1.08$ でポアソン比は 2.1 ± 0.8 (平均値 \pm SD, $n = 13$)であった。ゴムなどの等方性の物質のポアソン比は 0.5 以下であるのに対し、紡錘体は伸長により体積が小さくなるため、ポアソン比はかなり大きい値となった。紡錘体に比べて非常に大きな構造物ではあるが、コラーゲン線維が束になることで形成される腱も同様に、伸長により体積が小さくなるため、ポアソン比は大きい (~ 3) (Lynch, 2003)。腱の場合、伸長により中から水が出るため、体積が小さくなると考えられているが、紡錘体も同様に、微小管間を埋めている細胞質が、伸長によって紡錘体外に流出している可能性がある。一方、同じ生体内構造でも、細胞や横紋筋のポアソン比は 0.5 程度である。膜の存在や、構造に由来する性質により、ポアソン比が大きく異なると考えられる。ポアソン比の違いが、生体内構造物にとってどのような意味があるのかはわからない。しかし、紡錘体に関して考えると、ポアソン比が大きいということは、外力、例えば細胞外からの力が紡錘体にかかる時、紡錘体の体積が変化することで、紡錘体内の微小管密度、微小管間隔の変化として、外力の存在を瞬時に紡錘体内全体に伝えることができる。外力により細胞周期を制御できることが知られているが (Itabashi *et al.*, 2012)、紡錘体のポアソン比が大きいという力学的性質が、細胞周期の制御という、紡錘体の持つ非常に重要な機能に結びついている可能性がある。

3.5 本章のまとめ

本章では、紡錘体の構造制御機構を知るため、紡錘体の力学特性の測定を中心に述べてきた。アフリカツメガエル卵エクストラクト系で形成させた紡錘体は様々な大きさのものがあるが、個々の紡錘体は固有の大きさを持ち、その大きさのもとで揺らいでいた。固有の大きさを何が決めるか、という疑問を明らかにするため、3次元観察と切断・融合実験を行ったところ、固有の大きさは微小管量と強い相関があるということが分かった。また、切断により微小管量が半分以下になった後、微小管量が元の値に戻らなかったことから、微小管量および紡錘体の大きさは周りの溶液環境のみで決まるわけではないということが分かった。これらの結果は、分子の機能阻害によって溶液環境を変える実験とは異なり、微小ガラス針を用いた物理的手法を用いたからこそ得られた結果である。また、3次元観察と、切断・融合実験から、紡錘体の形と微小管密度は紡錘体の大きさによらない、という結果も得られた。このことから、個々の紡錘体は形と微小管密度を制御する機構を備えていることが示唆された。

次に、個々の紡錘体がどのように構造を安定化させているか、という疑問を明らかにするため、紡錘体を伸長するという変形方法を採用した。伸長実験には微小管量変化が伴わなかったため、微小管量一定の条件での個々の紡錘体の形状制御機構を探ることができた。結果、紡錘体は変形に対し、紡錘体内の分子ダイナミクスと同じような時間スケールで応答し、形を回復させることが分かった。また、紡錘体の力学的性質を、簡単な粘弾性モデルを用いて表すことに成功した。そのモデルによると、紡錘体は細胞内においても、紡錘体の外からの力に対し、構造を安定化させることのできるような力学特性を持つことが分かった。

紡錘体は非常に多くの種類の分子からなる構造物である。そのすべての分子ダイナミクスを明らかにしよう、というのがこれまでの研究の潮流であったが、研究が進むにつれ紡錘体の理解はむしろ混とんとしてきている。しかし、少し異なる視点をとると、紡錘体

の構造を決めるのは力であり、分子はその力の源であるという描像が浮かび上がる。本章で行ったように、構造と分子の間に、力というパラメータを加えることで、紡錘体構造の物理的描像を明らかにすることができるのではないだろうか。

3.6 図

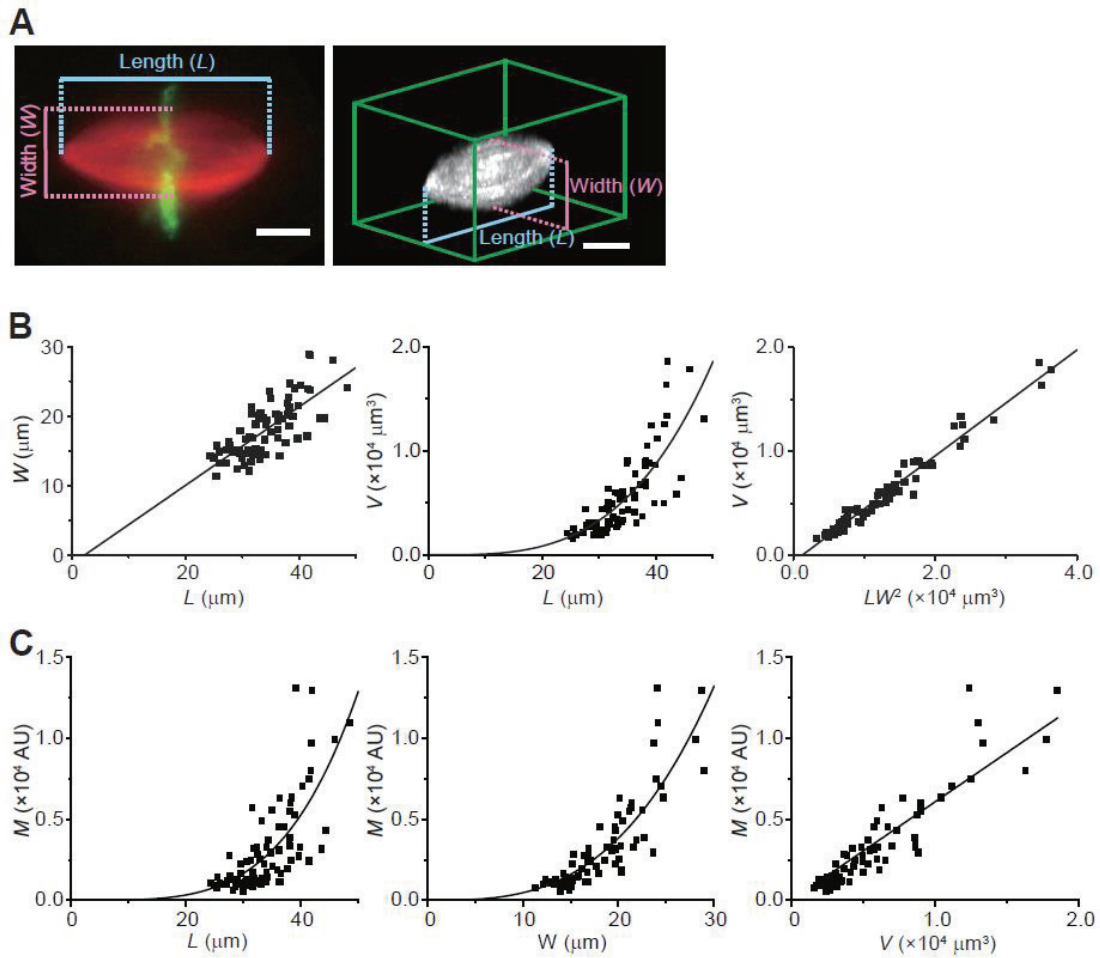


図 3-1 紡錘体の大きさ、形、微小管量の関係

(A) 紡錘体の 2 次元画像 (左、赤 ; 微小管、緑 ; DNA) と 3 次元画像 (右、微小管)。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。

(B) パラメータ間の関係 ($n = 78$)。長軸 L 、短軸 W 、体積 V 。実線はベストフィットを表す ($W = -0.57L - 1.3$ ($R^2 = 0.54$)、 $V = 0.035L^{3.4}$ ($R^2 = 0.63$)、 $V = 0.51LW^2 - 630$ ($R^2 = 0.97$))。

(C) 紡錘体の大きさと微小管量 M の関係。実線はベストフィットを表す ($M = 2.0 \times 10^{-3}L^{4.0}$ ($R^2 = 0.53$)、 $M = 4.1 \times 10^{-5}W^{3.1}$ ($R^2 = 0.75$)、 $M = 0.61 \times V$ ($R^2 = 0.93$))。

Movie 2 参照。

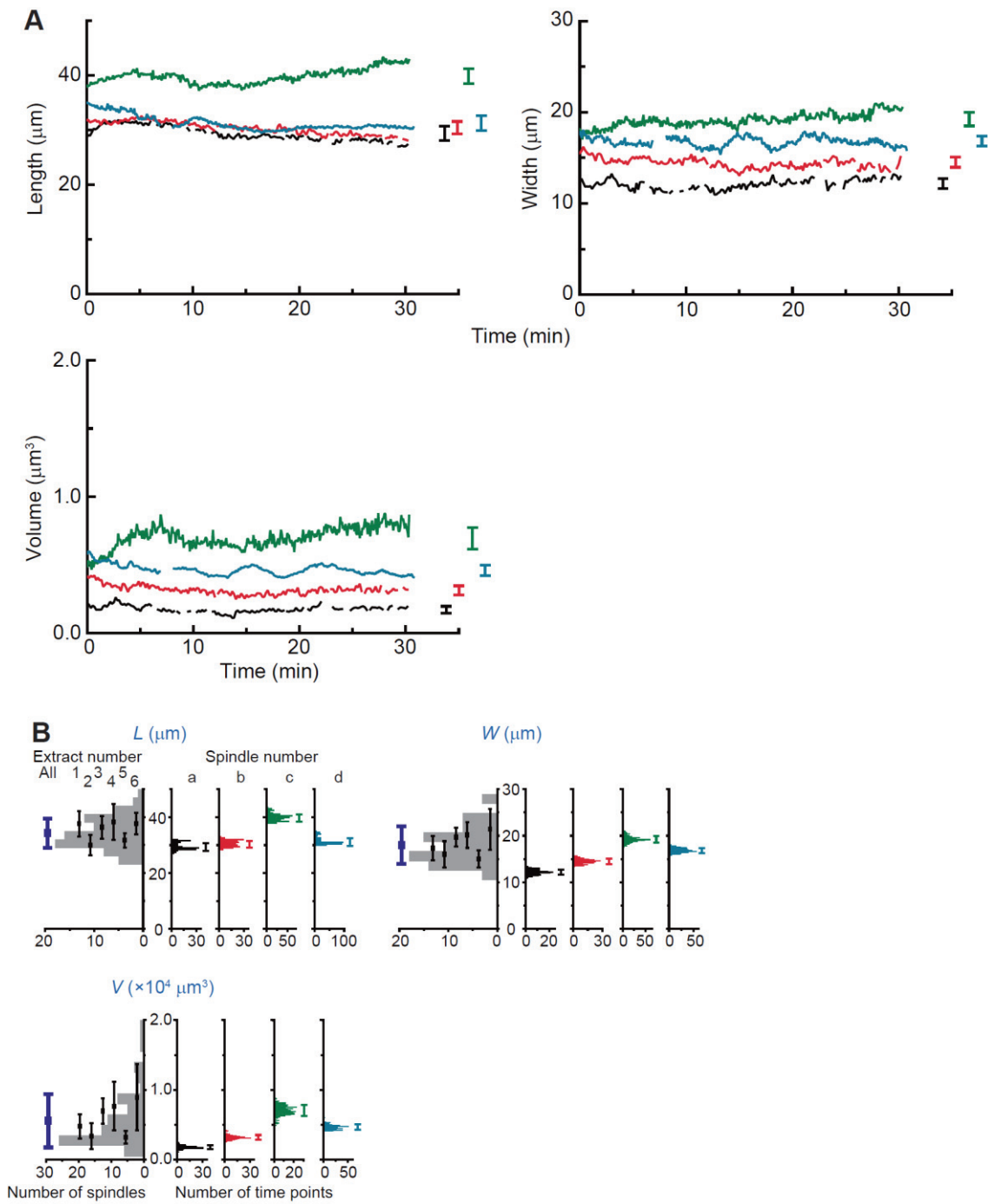


図 3-2 紡錘体の長時間観察

(A) 紡錘体を 30 分間観察し、長軸 L 、短軸 W 、体積 V の変化を調べた ($n = 4$)。

(B) (A) の各パラメータの値の 4 つのデータについてヒストグラムを作成した (右)。各ヒストグラムの右にあるバーはそれぞれの SD を示す。各パラメータのヒストグラムは 1 つ

3 中期紡錘体の形状制御機構の解明

または複数のピークをもつ。左のヒストグラムは、6つの異なるエクストラクト中で観察された78個の紡錘体について、ヒストグラムを作ったものである。ヒストグラムの左にある紫色のバーは、78個の紡錘体についてのSD、ヒストグラム中の黒いバーは各エクストラクトで観察された紡錘体についてのSDである。

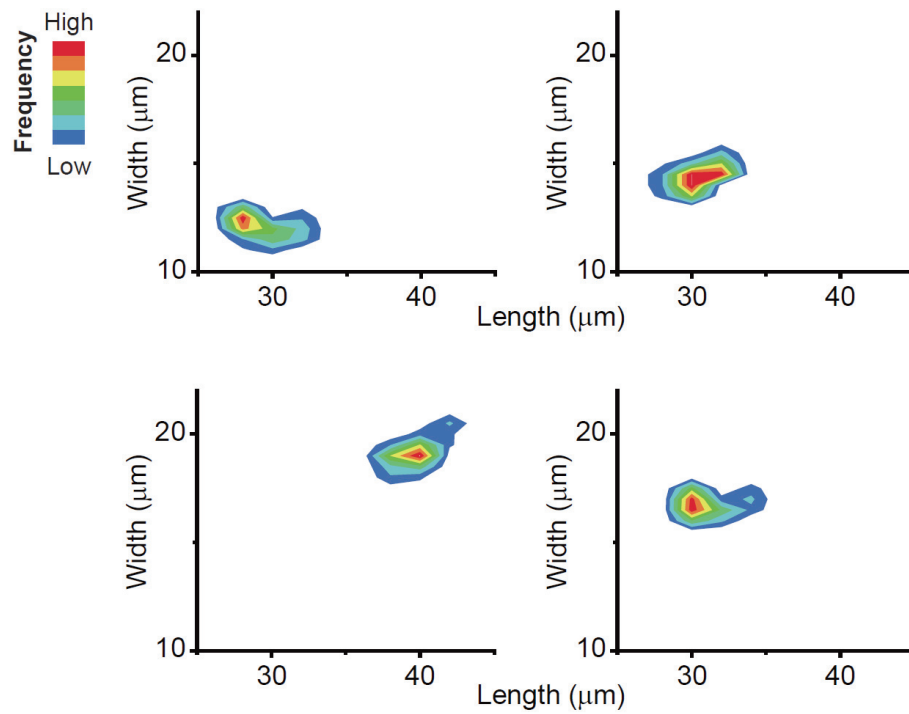


図 3-3 紡錘体の長時間観察 (つづき)

図 3-2A について、長軸と短軸の関係に関する時間的な分布を調べた ($n=4$)。すると、長軸と短軸の関係には、1 つまたは複数のピークがあることが分かった。

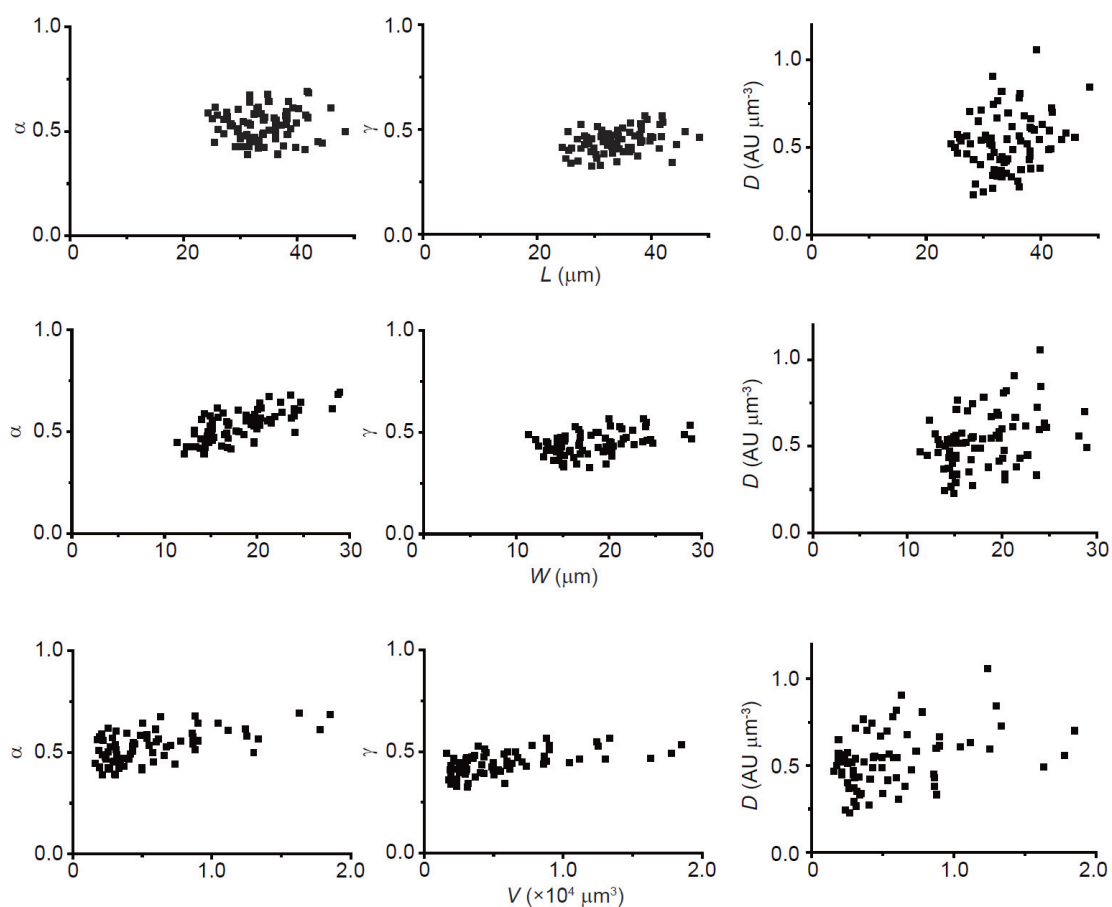


図 3-4 紡錘体の形、微小管密度と紡錘体の大きさとの関係

78 個の紡錘体について、形 (Aspect ratio (α), $\gamma (= V/LW^2)$)、微小管密度 D と大きさ (Length (L), Width (W), Volume (V)) との関係調べた。形と微小管密度は紡錘体の大きさに対してあまり相関がないことが分かった。表 3-2 に相関係数などをまとめている。

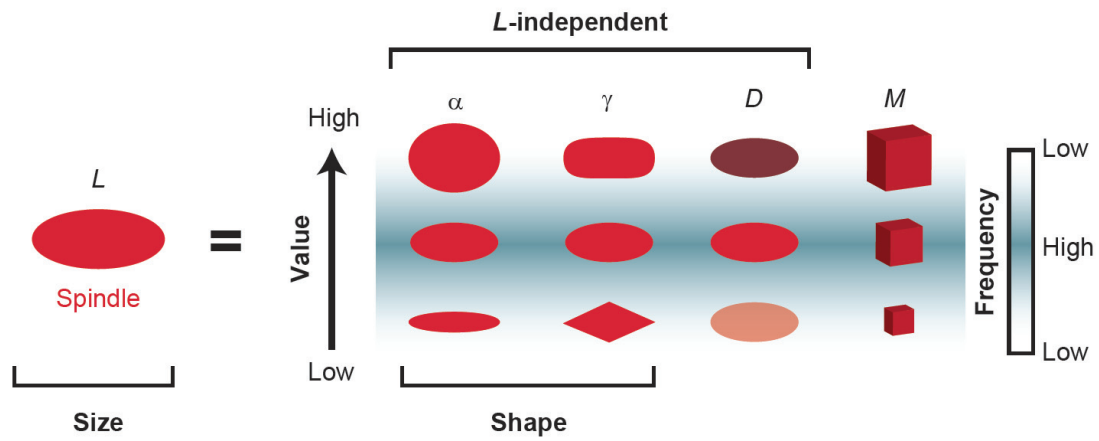


図 3-5 紡錘体の大きさ制御に関するパラメータ

数式 4 中のパラメータを視覚的に表したものである。紡錘体の大きさ L は、微小管量 M と、 L に依存しない 3 つのパラメータ、 α 、 γ 、 D で定義される。つまり、個々の紡錘体の大きさ L の違いは、微小管量 M の違いによるところが大きい。

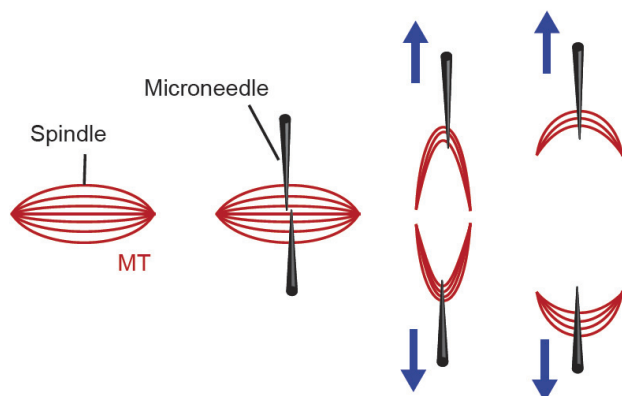


図 3-6 紡錘体の切断方法

紡錘体の切断は、2本の微小ガラス針を紡錘体の中心に挿入し、2本のガラス針を紡錘体の短軸に沿ってそれぞれ逆向きに動かすことで行う。切断によってできた2つの断片の間に微小管のリンクが残ると、お互いに引き合い融合してしまうため、切断後断片を十分に離してリンクを切断する必要がある。

Movie 3 参照。

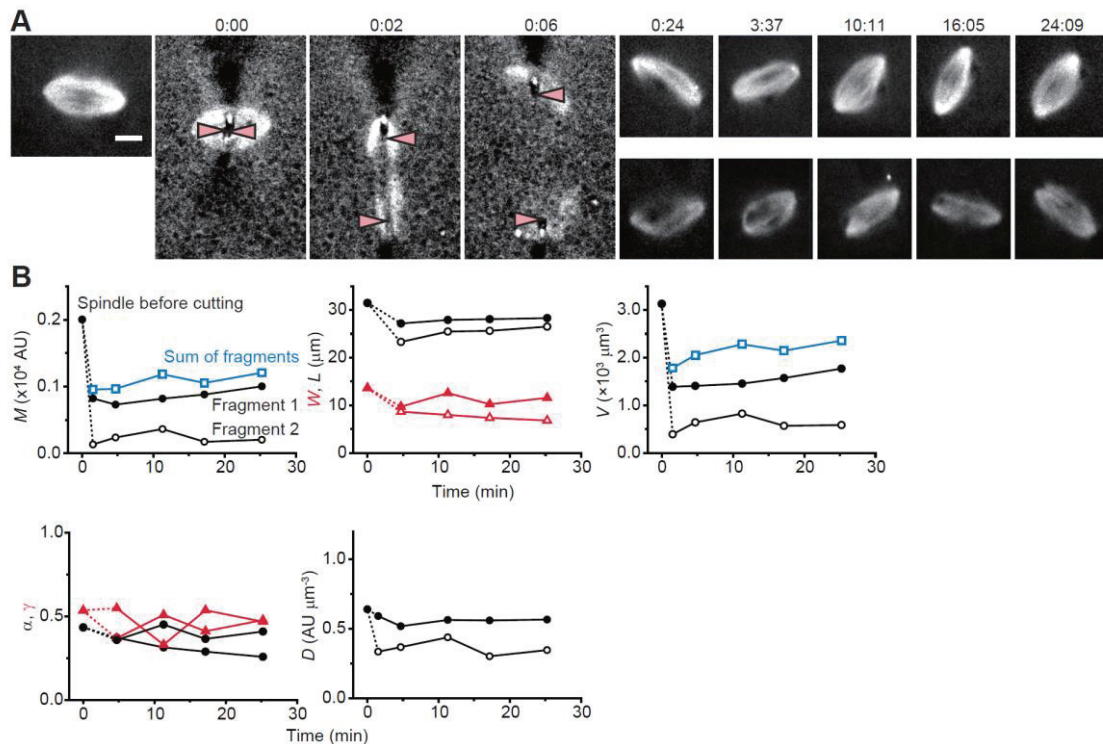


図 3-7 微小管量の減少により紡錘体は小さくなる

- (A) 切断時の紡錘体の蛍光画像（微小管）。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。画像の上の数字は、切断開始からの時間を示す（分：秒）。ピンクの矢頭はガラス針の先端を指す。切断後、各断片は 2~3 分で元の 2 極性の形状に回復する。
- (B) 切断時の各パラメータの時間変化。紡錘体を切断することで、各断片の微小管量 M は元の紡錘体の微小管量の 3 分の 1 程度になった。それに伴い、紡錘体の長軸 L 、短軸 W 、体積 V は小さくなった。それに対し Aspect ratio α 、 $\gamma (= V/LW^2)$ 、微小管密度 D はあまり変わらなかった。切断後 20 分以上たっても、各断片の微小管量と大きさは小さいままであった。

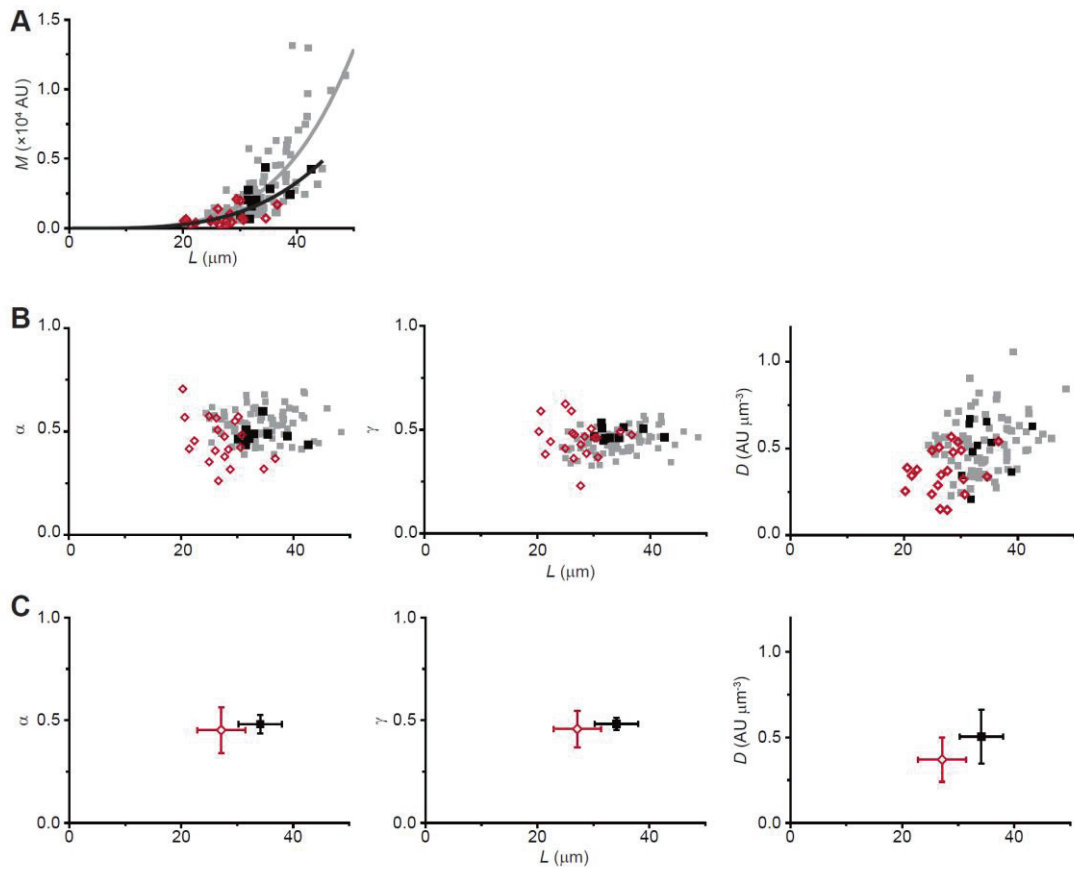


図 3-8 切断前後の微小管量、紡錘体の形、微小管密度と紡錘体の大きさとの関係

(A) 切断前後の長軸 L と微小管量 M の関係。切断後 (赤、 $n = 20$ (断片))、各断片は長軸、微小管量ともに切断前 (黒、 $n = 10$) に比べて小さくなった。灰色のプロットは 78 個の未処理紡錘体について L と M の関係を調べたものである (黒の実線は切断前後のデータについて、灰色の実線は灰色のプロットについてのベストフィット)。

(B) – (C) 切断前後の長軸 L と形 (Aspect ratio (α), $\gamma (= V/LW^2)$)、微小管密度 D の関係。黒いプロットは切断前 ($n = 10$)、赤いプロットは切断後 ($n = 20$ (断片))、灰色のプロット (B のみ) は 78 個の未処理紡錘体についてそれぞれ調べたものである。エラーバーは SD を示す。切断により、形はほとんど変わらず、微小管密度は若干減少した。

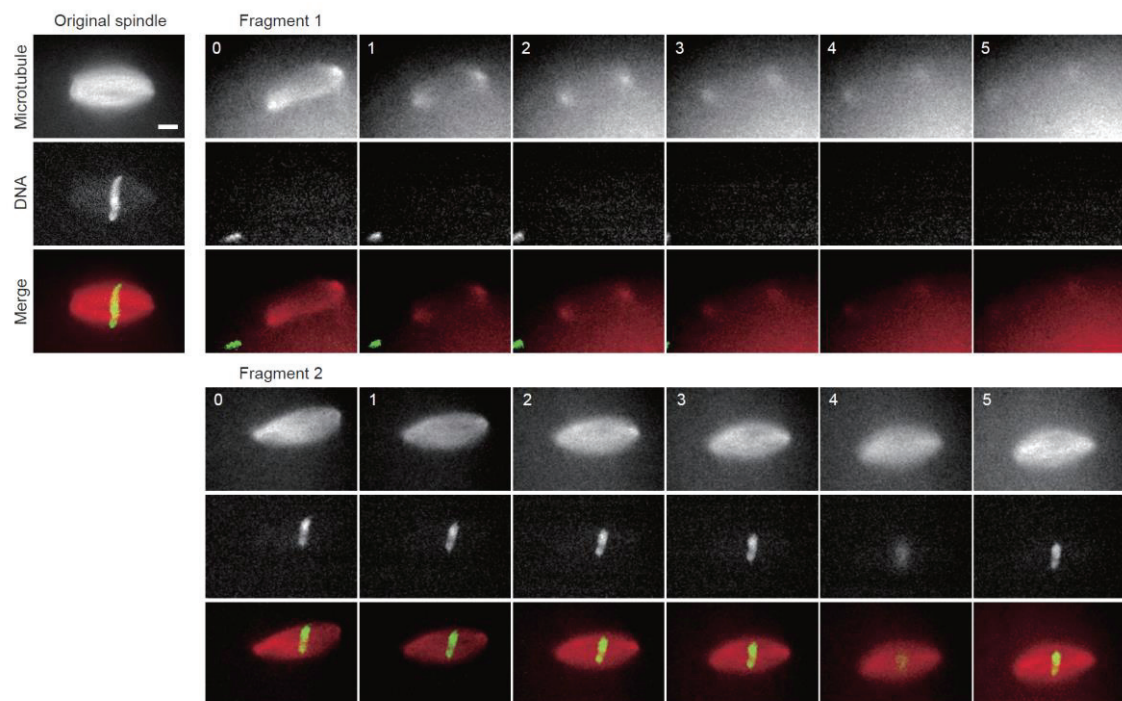


図 3-9 切断後、染色体のない断片は消滅する

紡錘体の蛍光画像（赤；微小管、緑；DNA）。スケールバーは 10 μm 。画像の上の数字は、切断終了からの時間を示す（分：秒）。

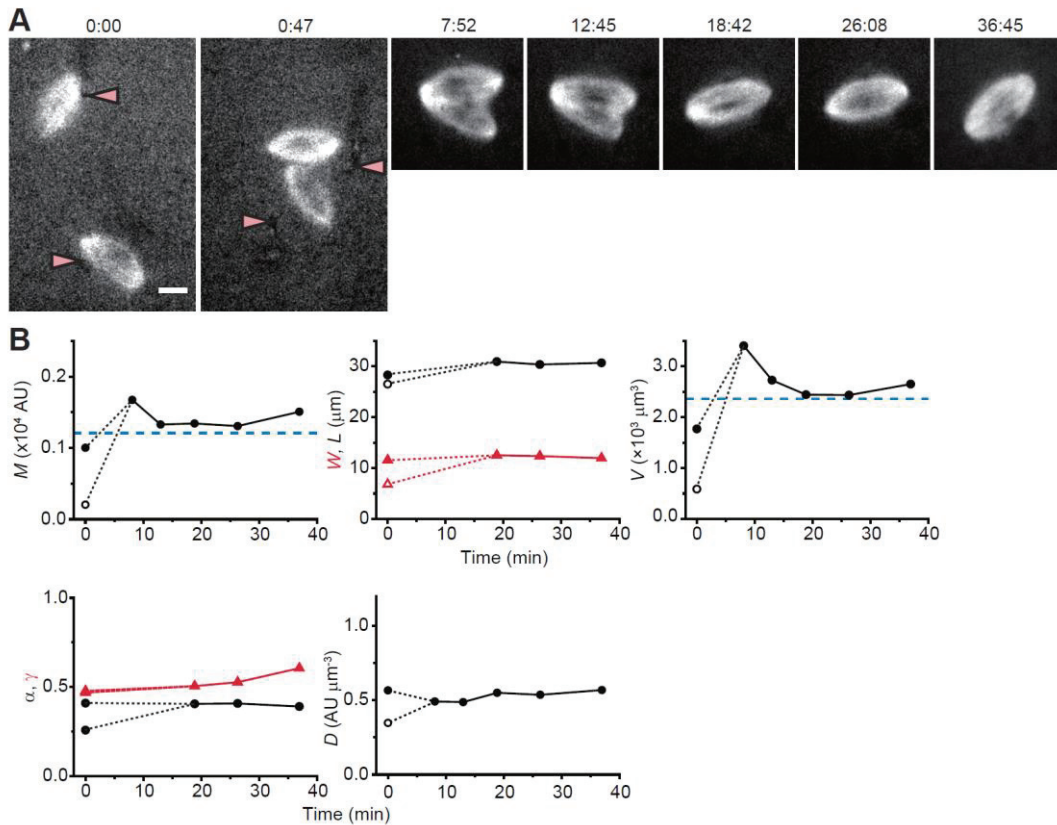


図 3-10 微小管量の増加により、紡錘体は大きくなる。

- (A) 融合時の紡錘体の蛍光画像（微小管）。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。ピンクの矢頭は微小ガラス針の先端を示す。画像の上の数字は、紡錘体の移動を開始した時点からの時間を示す（分：秒）。切断によって生じた2つの断片（図 3-7A の断片）同士を微小ガラス針を用いて接触させると、2つの断片は融合し、1つの正常な形をした紡錘体になる。
- (B) 融合時の各パラメータの時間変化。2つの断片を接触させ1つの構造物にすることで、構造物内の微小管量 M は各断片の微小管量よりも多くなる。融合が完了した時の微小管量も、各断片の微小管量よりも多かった。微小管量 M の増加に伴い、紡錘体の大きさ、つまり長軸 L 、短軸 W 、体積 V は増加した。それに対し Aspect ratio $\alpha, \gamma (= V/LW^2)$ 、微小管密度 D は融合前後であまり変わらなかった。融合後 20 分以上たっても、融合によってできた紡錘体の微小管量と大きさは、融合前に比べ大きいままであった。

Movie 3 参照。

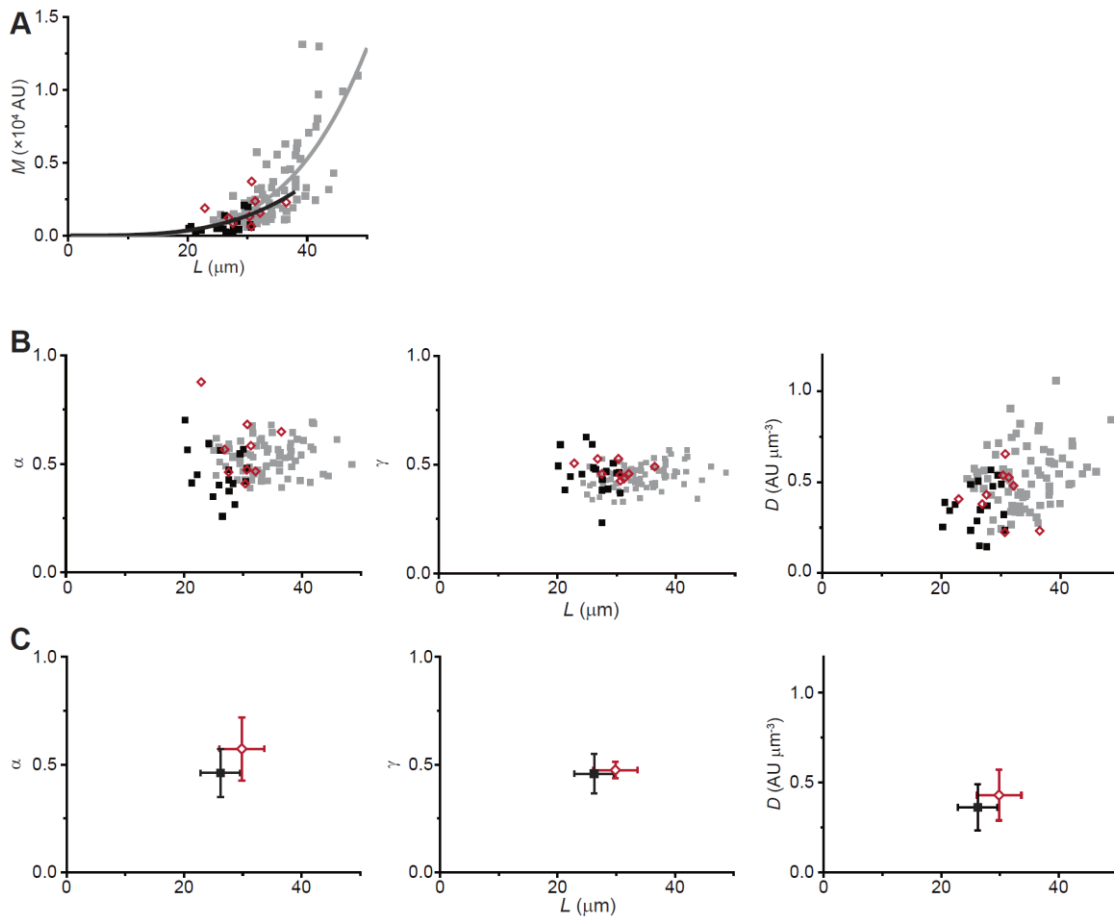


図 3-11 融合前後の微小管量、紡錘体の形、微小管密度と紡錘体の大きさとの関係

- (A) 融合前後の長軸 L と微小管量 M の関係。融合後 (赤、 $n = 9$)、できた紡錘体の長軸、微小管量はともに融合前 (黒、 $n = 18$ (断片)) に比べ大きくなった。灰色のプロットは 78 個の未処理紡錘体について L と M の関係を調べたものである (黒の実線は融合前後のデータについて、灰色の実線は灰色のプロットについてのベストフィット)。
- (B) – (C) 融合前後の長軸 L と形 (Aspect ratio (α), $\gamma (= V/LW^2)$)、微小管密度 D の関係。黒いプロットは融合前 ($n = 18$ (断片))、赤いプロットは融合後 ($n = 9$)、灰色のプロット (B のみ) は 78 個の未処理紡錘体についてそれぞれ調べたものである。エラーバーは SD を示す。融合により、Aspect ratio は若干増加したが、 γ と微小管密度はほとんど変わらなかった。

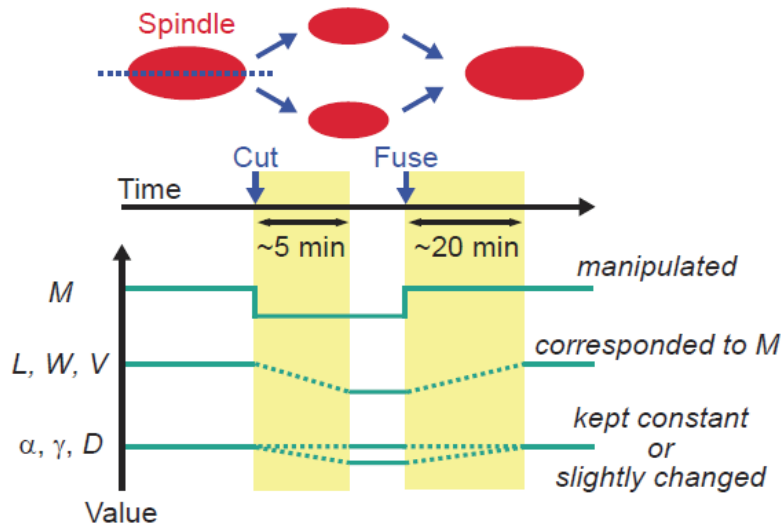


図 3-12 切断・融合実験時の各パラメータの変化

切断・融合実験では、細胞質環境を変えることなく、微小管量 M を操作した。切断実験では、微小管量 M を減少させたが、それに合わせるように紡錘体の大きさ（長軸 L 、短軸 W 、体積 V ）は小さくなった。それに対し紡錘体の形（Aspect ratio α 、 $\gamma (= V/LW^2)$ ）微小管密度はあまり変化しなかった。融合実験では微小管量 M を増加させたが、それに合わせるように紡錘体は大きくなった。紡錘体の形と微小管密度は、切断時と同様にあまり変化しなかった。つまり、紡錘体の大きさは微小管量の変化に合わせて変化するが、紡錘体の形と微小管密度はあまり変わらない、ということが分かった。

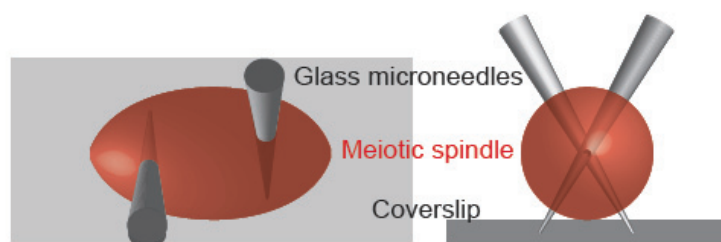


図 3-13 紡錘体の長軸に沿った伸長

伸長の様子を、左は顕微鏡の焦点面と平行な面で (XY)、右は左の絵を左から右に向かって (XZ)、それぞれ見たものである。2本の微小ガラス針を紡錘体に互い違いに斜めに挿入し、片方のガラス針を紡錘体の長軸方向に動かすことで、紡錘体を長軸方向に伸長する。

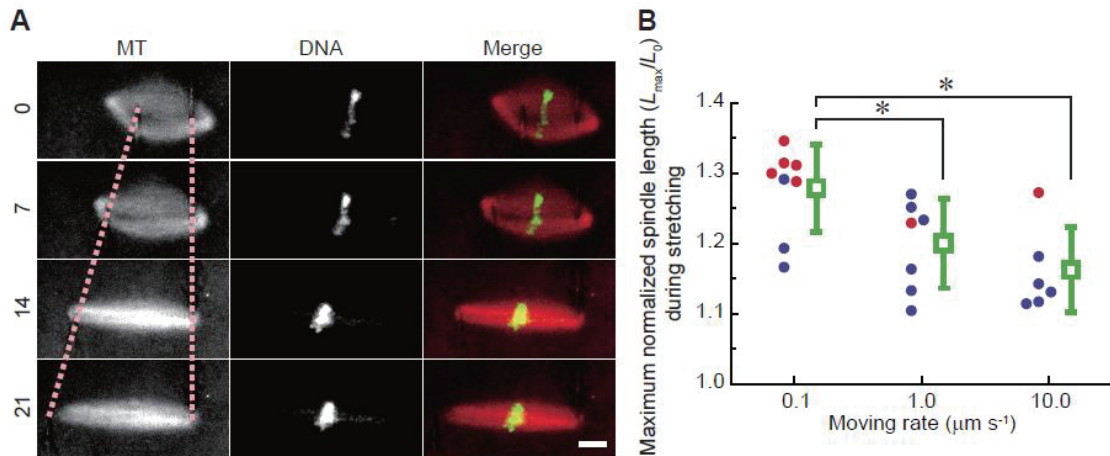


図 3-14 紡錘体の長軸に沿った伸長と、極の切断

(A) 伸長時の紡錘体の蛍光画像（赤；微小管、緑；染色体）。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。ピンクの点線は微小ガラス針の先端の位置を示す。画像の左の数字は、伸長を開始した時点からの時間を示す（秒）。伸長速度は $1.0 \mu\text{m/s}$ 。ガラス針の先端が紡錘体極にある程度近づくと紡錘体の変形が始まる。伸長により長軸は伸び、短軸と染色体の幅は小さくなる。伸長が進むにつれ、ガラス針の先端と紡錘体極が徐々に近づき、最終的に紡錘体極がガラス針によって切断される。

(B) 紡錘体の最大伸長率 ($n = 21$)。紡錘体を最大でどこまで伸長できたかを示す。伸長時の最大の長軸の長さを L_{max} とし、それを伸長前の長軸の長さ (L_0) で規格化した。青いプロットは伸長の途中で極が切れたもの、赤いプロットは微小ガラス針を動かすピエゾアクチュエータの可動範囲いっぱいまで伸長できたものを示す。緑のプロットとバーは、青と赤のプロットを合わせたものの平均値と SD を示したものである。アスタリスクは t 検定の結果を示す ($p < 0.05$)。ガラス針の移動速度が遅いほど、より大きく伸長できることが分かった。また、移動速度によらず、紡錘体極が切断するまでに紡錘体の長軸を 10%程度は伸長できることが分かった。

Movie 5 参照。

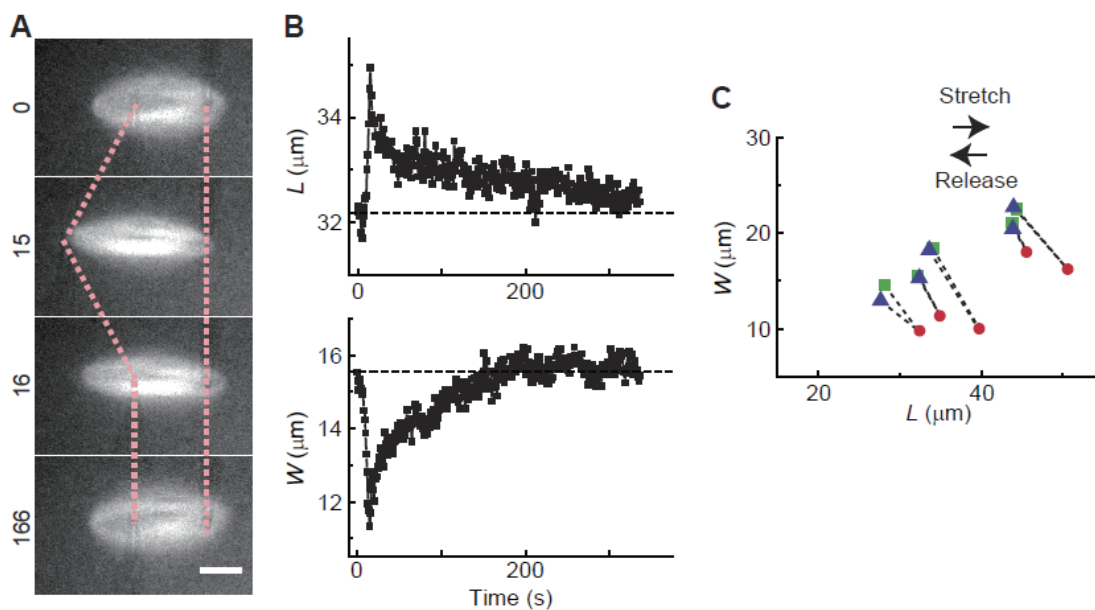


図 3-15 紡錘体は伸長に対し粘弾性的に応答する

- (A) 伸長前後の紡錘体の蛍光画像（微小管）。紡錘体を伸長後、ガラス針を元の位置に素早く戻した。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ 。ピンクの点線は微小ガラス針の先端の位置を示す。画像の左の数字は、伸長を開始後の時間を示す（秒）。ガラス針の移動速度は $1.0\ \mu\text{m/s}$ 。
- (B) 伸長前後の長軸 L と短軸 W の時間変化。点線は伸長前の値を示す。伸長後、 L と W は徐々に元の値に回復した。
- (C) 伸長前後の L と W の関係 ($n = 5$)。緑のプロットは伸長前、赤のプロットは伸長直後、青のプロットは伸長後しばらくたった後の値である。

Movie 9 参照。

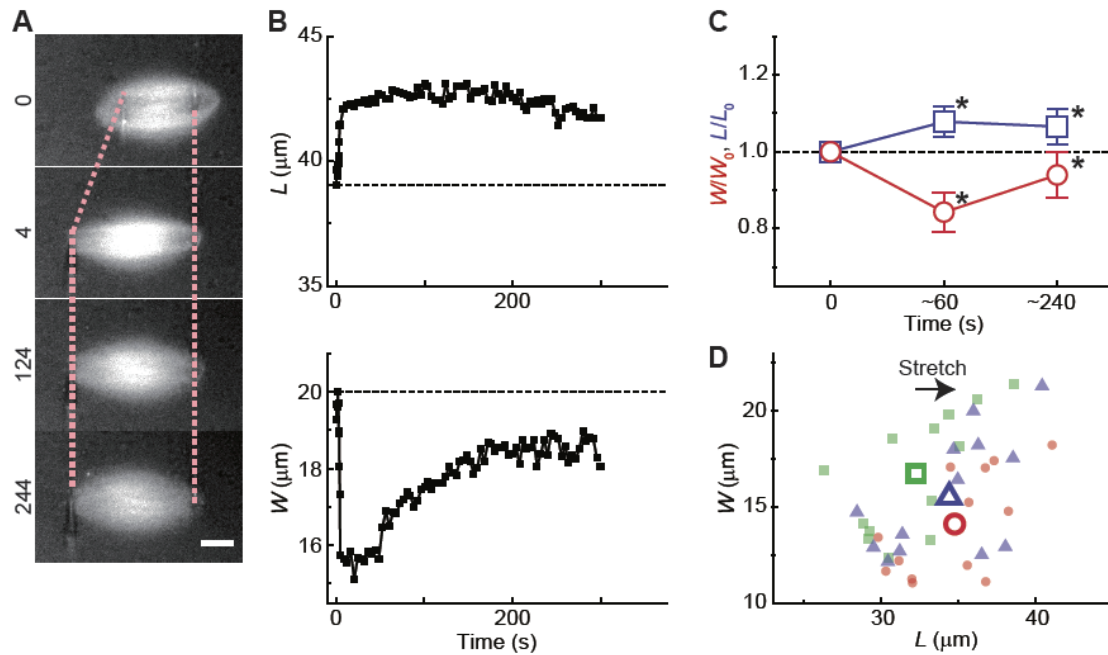


図 3-16 紡錘体の短軸は、長軸が伸長された状態でも回復する

- (A) 伸長前後の紡錘体の蛍光画像（微小管）。紡錘体を伸長後、ガラス針をその位置で固定した。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。ピンクの点線は微小ガラス針の先端の位置を示す。画像の左の数字は、伸長開始後の時間を示す（秒）。ガラス針の移動速度は $5.0 \mu\text{m/s}$ 。
- (B) 伸長前後の長軸 L と短軸 W の時間変化。点線は伸長前の値を示す。伸長後、 L はガラス針があるのでほとんど変わらず伸長されたままであるが、伸長により減少した W は徐々に回復し、伸長前より少し小さい値で安定化した。つまり、 W の回復は L の回復が起きなくても起こるが、完全に元の値に回復するには L の回復が必要である。
- (C) 伸長前後の長軸 L と短軸 W の時間変化（平均値 \pm SD、 $n = 13$ ）。左から順に、伸長前、伸長直後、伸長後となっている。伸長前の長軸と短軸の値 (L_0, W_0) で規格化してある。アスタリスクは t 検定の結果を示す ($p < 0.05$)。
- (D) 伸長前後の L と W の関係 ($n = 13$)。緑のプロットは伸長前、赤のプロットは伸長直後、青のプロットは伸長後の値である。中抜きのプロットは平均値を示す。

Movie 10 参照。

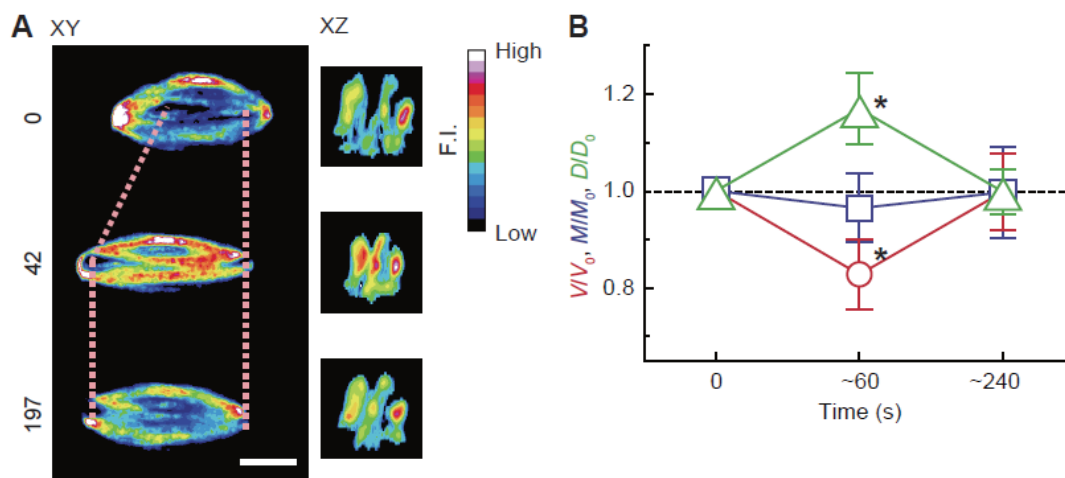


図 3-17 伸長実験の 3 次元観察

(A) 伸長前後の紡錘体の 3 次元画像（微小管）。紡錘体を伸長後、ガラス針をその位置で固定した。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ 。ピンクの点線は微小ガラス針の先端の位置を示す。画像の左の数字は、伸長開始後の時間を示す（秒）。ガラス針の移動速度は $1.0\ \mu\text{m/s}$ 。伸長により一時的に蛍光強度が増加する、つまり微小管密度が増加するが、短軸の回復に伴い蛍光強度は元の値に戻る。

(B) 伸長前後の体積 V 、微小管量 M 、微小管密度 D の時間変化（平均値 \pm SD、 $n = 13$ ）。左から順に、伸長前、伸長直後、伸長後となっている。伸長前の値 (V_0 , M_0 , D_0) で規格化してある。アステリスクは t 検定の結果を示す ($p < 0.05$)。伸長により、一時的に微小管密度が増加し、体積は減少するが、時間がたつと、それぞれ元の値に回復した。また、微小管量の伸長による変化はなかった。

Movie 11 参照。

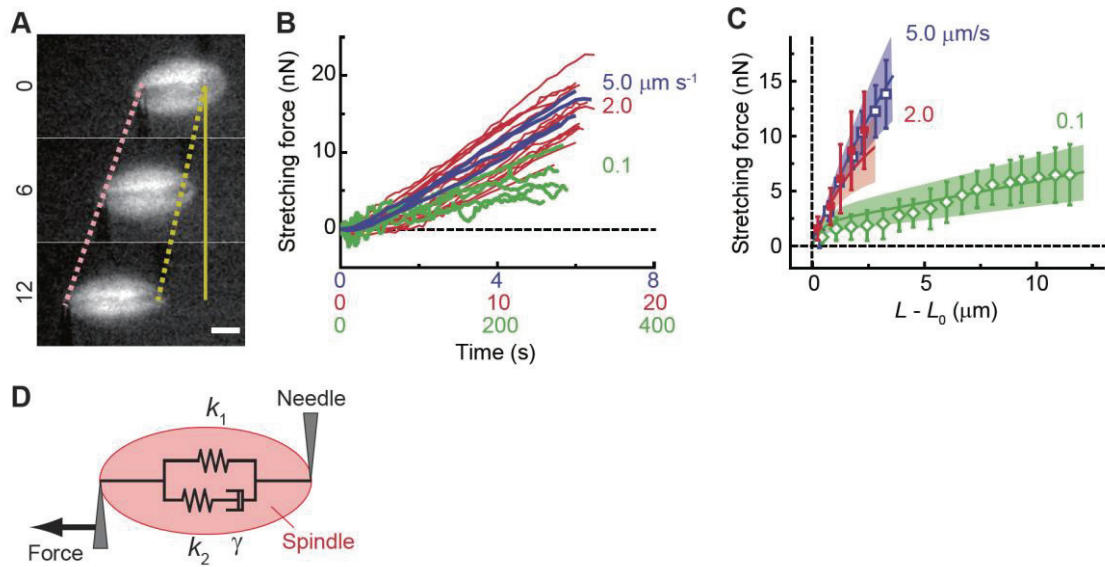


図 3-18 伸長に対する紡錘体の粘弾性的応答の測定

- (A) 伸長時の紡錘体の蛍光画像（微小管）。点線は微小ガラス針（ピンク；硬い針、黄色；較正済みの柔らかい針（ $\sim 1 \text{ nN}/\mu\text{m}$ ）の先端の位置を示す。黄色の実線は柔らかい針の初期位置を示す。柔らかい針の初期位置からのずれから、伸長に要する力を測定する。画像の左の数字は、伸長開始後の時間を示す（秒）。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。
- (B) 伸長に要する力の時間経過。長軸 L が伸び始めた時刻を時刻ゼロとした。硬い針の移動速度は $0.1 \mu\text{m/s}$ ($n = 5$ 、緑)、 $2.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 14$ 、赤)、 $5.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 4$ 、青)。
- (C) 長軸の長さとの伸長に要する力の関係（平均値 \pm SD。 L_0 は伸長前の長軸の値を示す）。硬い針の移動速度は $0.1 \mu\text{m/s}$ ($n = 5$ 、緑)、 $2.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 14$ 、赤)、 $5.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 4$ 、青)。実線と色のついた領域は、Zener モデルを用いて移動速度の異なるプロットをグローバルフィットすることで求めたものである（平均値 \pm SD）。ガラス針の移動速度が $0.1 \mu\text{m/s}$ と遅いとき、伸長に要する力は小さい。一方、移動速度を $5.0 \mu\text{m/s}$ と速くしても、移動速度が $2.0 \mu\text{m/s}$ の時と伸長に要する力はほとんど変わらなかった。
- (D) 紡錘体の長軸に沿った粘弾性モデル（Zener モデル）。

Movie 12-14 参照。

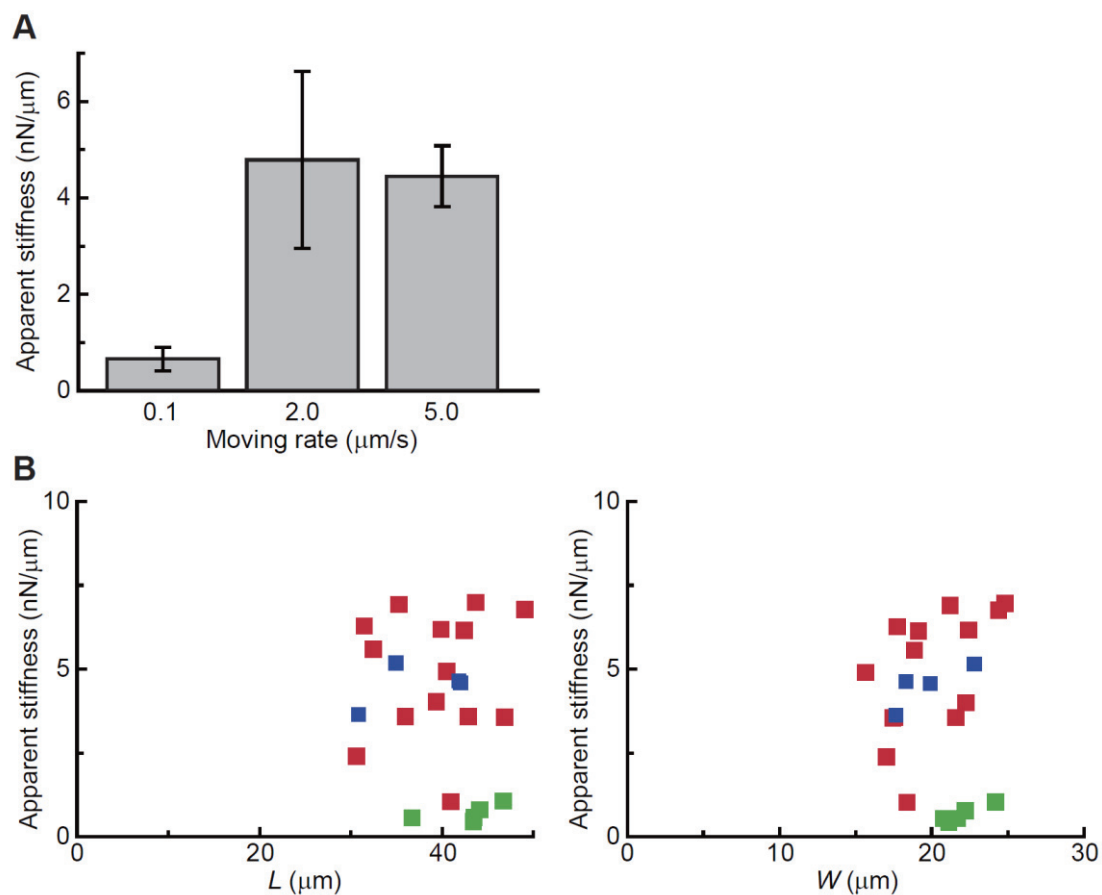


図 3-19 ガラス針の移動速度と、紡錘体の長軸方向の硬さとの関係

(A) 伸長に対する、紡錘体の見かけの硬さとガラス針の移動速度との関係（平均値 \pm SD、ガラス針の移動速度； $0.1 \mu\text{m/s}$ ($n = 5$)、 $2.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 14$)、 $5.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 4$)）。図 3-18C を線形フィットすることで求めた。

(B) 紡錘体の見かけの硬さと、長軸 L 、短軸 W との関係。ガラス針の移動速度； $0.1 \mu\text{m/s}$ ($n = 5$ 、緑)、 $2.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 14$ 、赤)、 $5.0 \mu\text{m/s}$ ($n = 4$ 、青)。短軸 W が大きいほど、紡錘体は硬い。

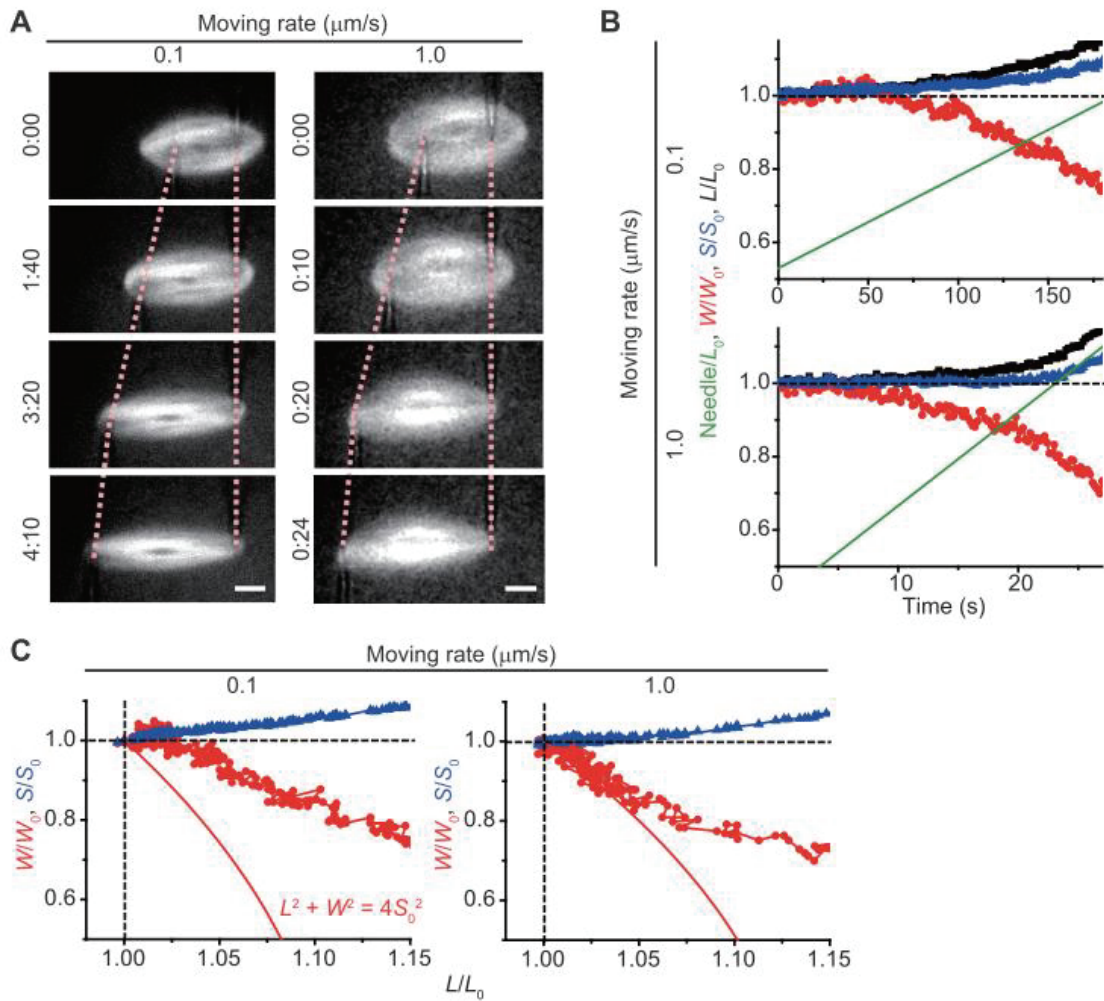


図 3-20 伸長時における短軸の変化は伸長速度に依存する

- (A) 等速伸長時の紡錘体の蛍光画像（微小管）。ピンクの点線はガラス針の先端の位置を示す。画像中の数字は伸長開始時からの時間（分：秒）。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。
- (B) 伸長時の各パラメータの時間変化。伸長前の値で規格化してある。
- (C) 伸長時の長軸と、短軸またはひし形モデルにおける辺の長さの関係。それぞれ伸長前の値で規格化してある。赤い実線は、 S 一定の条件下におけるひし形モデルでの短軸の変化である。

Movie 6-8 参照。

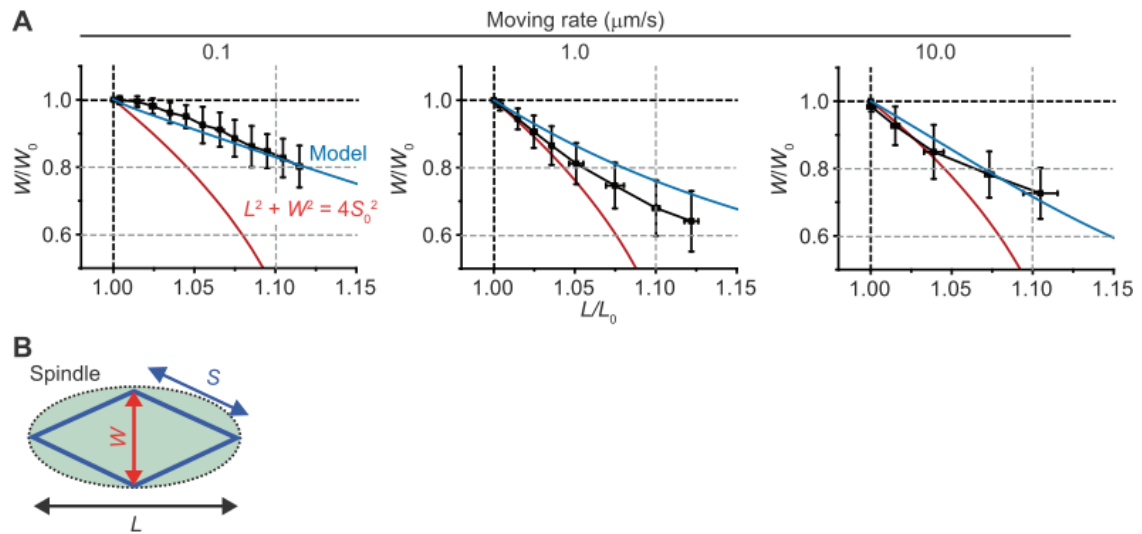


図 3-21 2次元粘弾性モデルを用いた紡錘体の力学特性の測定

(A) 等速伸長時の、長軸 L に対する短軸 W の変化 (黒、平均値 \pm SD, $n = 8$ (伸長速度 = 0.1 $\mu\text{m/s}$)、 $n = 5$ (伸長速度 = 1.0 $\mu\text{m/s}$)、 $n = 6$ (伸長速度 = 10.0 $\mu\text{m/s}$)。 L_0 と W_0 はそれぞれ伸長前の値を表す。青線の実線は2次元粘弾性モデルを用いたシミュレーション結果。赤線は S 一定の条件下におけるひし形モデル。

(B) ひし形モデルの模式図

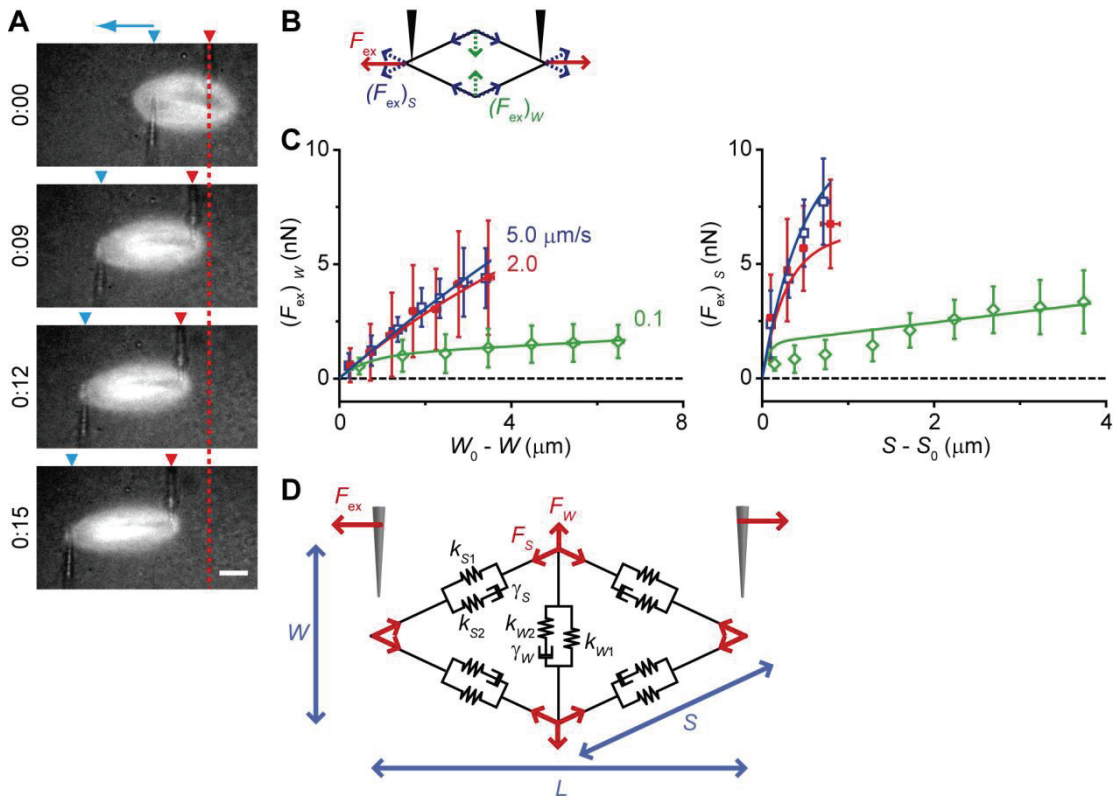


図 3-22 伸長速度が速いとき、変形はひし形モデルで表される。

- (A) 力学測定時の紡錘体の蛍光画像（微小管）。矢頭は微小ガラス針（青色；硬い針、赤色；較正済みの柔らかい針（ $\sim 1 \text{ nN}/\mu\text{m}$ ）の先端の位置を示す。赤色の点線は柔らかい針の初期位置を示す。柔らかい針の初期位置からのずれから、伸長に要する力を測定する。画像中の数字は伸長開始時からの時間（分：秒）。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。
- (B) 伸長力の短軸方向成分と辺方向成分の模式図。
- (C) (左) 伸長時の短軸の変化と、短軸方向にかかる力の関係（ $\text{平均値} \pm \text{SD}$, $n = 14$ (伸長速度： $2.0 \mu\text{m/s}$ (黒)), $n = 5$ (伸長速度： $0.1 \mu\text{m/s}$ (赤))、 W_0 は伸長前の短軸の長さ)。実線はグローバルフィッティングによって求めた（ $\text{平均値} \pm 0.5 \text{ SD}$ ）。(右) 伸長時の辺の長さの変化と、辺方向にかかる力の関係（ $\text{平均値} \pm \text{SD}$, $n = 14$ (伸長速度： $2.0 \mu\text{m/s}$ (黒)), $n = 5$ (伸長速度： $0.1 \mu\text{m/s}$ (赤))、 W_0 は伸長前の辺の長さ)。実線はグローバルフィッティングによって求めた（ $\text{平均値} \pm 0.5 \text{ SD}$ ）。
- (D) 2次元粘弾性モデルの模式図。

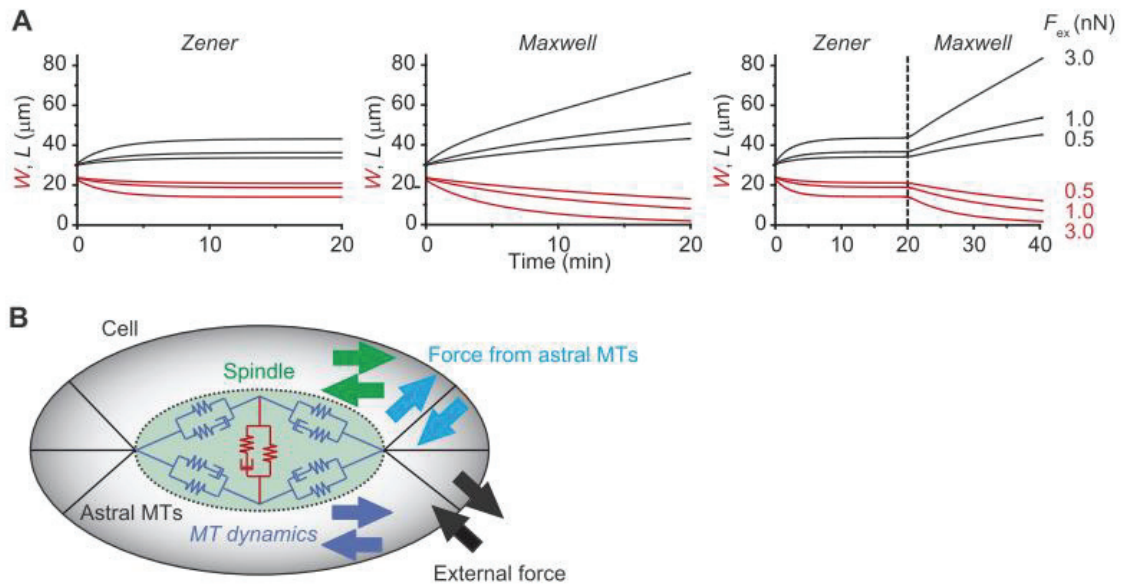


図 3-23 2次元粘弾性モデルを用いた、紡錘体の外力に対する応答のシミュレーション

- (A) 2次元粘弾性モデルに対し、時刻ゼロで外力 F_{ex} が負荷された時の、長軸 L と短軸 W の応答。(左) Zener モデル、(中央) Maxwell モデル、(右) 20分を境に Zener モデルから Maxwell モデルにした。
- (B) 細胞内の力のバランスの模式図。紡錘体は Zener モデルで表される力学特性により、細胞内で発生する様々な力に対し、形と大きさを安定化することができる。

表 3-1 中期紡錘体の大きさを表すパラメータ

		Mean \pm SD		
		Length (μm)	Width (μm)	Volume (μm^3)
Single time point ^a	No. of spindles			
Extract 1	22	37.5 \pm 3.9	21.4 \pm 4.4	8910 \pm 4750
Extract 2	12	31.5 \pm 2.6	15.0 \pm 1.8	3224 \pm 890
Extract 3	5	38.1 \pm 6.5	20.1 \pm 2.8	7660 \pm 3480
Extract 4	4	36.2 \pm 4.0	19.7 \pm 2.1	6970 \pm 1840
Extract 5	25	29.8 \pm 3.6	16.0 \pm 2.8	3380 \pm 1840
Extract 6	10	37.5 \pm 4.5	17.3 \pm 2.6	4770 \pm 1740
Average	78	34.1 \pm 5.3	18.0 \pm 4.0	5560 \pm 3810
Time variation ^b				
Spindle 1		29.4 \pm 1.3	12.1 \pm 0.6	1760 \pm 250
Spindle 2		30.4 \pm 1.1	14.4 \pm 0.6	3180 \pm 330
Spindle 3		39.8 \pm 1.4	19.1 \pm 0.7	7000 \pm 800
Spindle 4		31.2 \pm 1.4	16.7 \pm 0.5	4650 \pm 380
Average	4	32.7 \pm 1.3	15.6 \pm 0.6	4150 \pm 440

a; エクストラクトの番号は、図 3-2B の左のヒストグラム上にある黒い SD バーを左から右の順に振ってある。

b; 30 分間観察した際の平均値と SD を示す。紡錘体の番号は、図 3-2 のデータ中、黒、赤、緑、青の順に振ってある。

紡錘体の大きさの時間的ばらつきは、個々の紡錘体の大きさの違いに比べ小さいことから、個々の紡錘体は固有の大きさを持つことが分かる。

表 3-2 紡錘体のパラメータ間の相関係数 r (Pearson correlation coefficients)

	L	W	V	M	α	γ	D
L		0.741**	0.786**	0.704**	0.057	0.337**	0.227*
W			0.951**	0.856**	0.707**	0.407**	0.355**
V				0.924**	0.563**	0.554**	0.372**
M					0.516**	0.573**	0.647**
α						0.213	0.305**
γ							0.335**
D							

$n = 78$ 。長軸 L 、短軸 W 、体積 V 、微小管量 M 、Aspect ratio α 、 $\gamma = V/LW^2$ 、微小管密度 D 。

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

p 値は相関の有無を、 r 値は相関の強さをそれぞれ表す。 α 、 γ 、 D は L と相関がない、もしくは相関があっても相関の程度が低いことが分かった。一方、 L 、 W 、 V は M と強い相関をもつ。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

4.1 序論

分裂前中期から中期にかけての染色体の赤道面への整列は、正確に染色体を分配するための重要なステップである (Scholey *et al.*, 2003; Rajagopalan and Lengauer, 2004)。Chromokinesin と呼ばれるプラス端方向キネシンは、染色体の腕に結合し微小管上を運動することで、染色体の整列を担うことが知られている (Rieder and Salmon, 1994; Walczak *et al.*, 2010)。また、動原体に存在するプラス端方向キネシン CENP-E も染色体整列に重要な役割を果たす (Kapoor *et al.*, 2006)。近年の研究により、染色体整列の際、Bi-orientation (姉妹染色体の 2 つ動原体が、それぞれ 2 つの紡錘体極から伸びる微小管に捕捉されること) の前に、染色体が紡錘体の赤道面に整列することが報告されている (Kitajima *et al.*, 2011; Magidson *et al.*, 2011)。しかし、どのような仕組みで染色体が Bi-orientation に至るまで赤道面で保持されているかはまだよく分かっていない。

kinesin-4 や Kid (kinesin-10) といった Chromokinesin は、細胞分裂の際、染色体の整列、紡錘体の形成、紡錘体微小管の密度の制御などを担っている (Levesque and Compton, 2001; Perez *et al.*, 2002; Mazumdar and Misteli, 2005; Castoldi and Vernos, 2006; Ohsugi *et al.*, 2008; Wandke *et al.*, 2012)。最近のヒト体細胞の研究によって、染色体整列における kinesin-4 と Kid のそれぞれの役割が明らかにされた (Stumpff *et al.*, 2012)。その研究によると、kinesin-4 と Kid はそれぞれ Polar ejection force (染色体腕を紡錘体極から離れる方向に押し出す力) を抑制/増進させる。Kid は染色体を微小管のプラス端方向へ輸送し、特にアフリカツメガエルにおいては染色体の整列に重要な役割を担っている (Funabiki and Murray, 2000; Perez *et al.*, 2002)。Kid の分子モーターとしての性質はこれまで *in vitro* において調べられてきた (Yajima *et al.*, 2003; Bieling *et al.*, 2010)。しかし、紡錘体という 2 極性の微小管構造物の中で Kid がどのように運動していて、そして Kid の運動特性がどのように染色体の整列に関わっているのかについてはまだ分かっていない。本研究では、アフリカツメガエルのエクスト

ラクト中で形成させた紡錘体を用いて Xkid (アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の Kid) の紡錘体内での運動を直接観察した。そして、Xkid が紡錘体内の微小管の方向性・長さ分布を利用しながら、染色体を紡錘体の赤道面に運び保持していることを明らかにした。

4.2 実験結果

4.2.1 紡錘体内での Xkid-Qdot の運動の観察

アフリカツメガエルのエクストラクト中で Xkid-GFP (Full length と 3 つの変異体) を発現させ、ウェスタンブロットを用いて発現を確認した (図 4-1)。次に、Xkid-GFP の紡錘体内での分布を観察したところ、Full length の Xkid-GFP は染色体上に局在した (図 4-2)。また、Xkid-GFP の染色体上への局在は、Xkid の C 末端にある DNA 結合ドメインの有無に依存し、このドメインを除去した変異体(Xkid-GFP- Δ DB)は染色体上に局在せず、紡錘体微小管全体に分布した (図 4-2)。これらの結果はアフリカツメガエルの卵母細胞や、人間の Kid タンパク質の体細胞での観察結果と一致した(Perez *et al.*, 2002; Tokai-Nishizumi *et al.*, 2005)。

次に、Xkid のモータータンパク質としての働きを調べるために、ATP 加水分解能をもたない変異体(Xkid-GFP-FL-T125N)をエクストラクトへ加えた。すると、エクストラクト内には内在性の Xkid が存在するにもかかわらず、この変異体は染色体の紡錘体赤道面への整列を妨げることが分かった (図 4-2)。一方、染色体結合ドメインを持たず、ATP 加水分解能も持たない変異体 (Xkid-GFP- Δ DB-T125N) は、染色体整列に影響を与えなかった (図 4-2)。これらの結果から、Full length の Xkid-GFP は染色体に結合し、ATP を加水分解することで染色体を紡錘体の赤道面に整列させていることが分かった。

続いて、紡錘体内で Xkid の運動を観察した。観察に用いた紡錘体の大きさ (長軸) は $44.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$ (平均値 \pm SEM, $n = 9$) であった。Xkid-GFP に結合させた抗 GFP 抗体付 Qdot を蛍光顕微鏡 (共焦点) で観察することで、Xkid の運動を観察した。Qdot 一分子あたり、最

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

大 4 分子の Xkid-GFP が結合できる。Full length の Xkid (Xkid-GFP-FL) を用いると、Xkid-Qdot は染色体上と、紡錘体微小管上で観察され、微小管上の Xkid-Qdot は紡錘体の長軸方向に沿って時折向きを変えながら運動した (図 4-3、Movie 15)。Xkid-Qdot は赤道面付近に到達すると、染色体に結合するか、赤道面をそのまま通過した。Xkid-GFP-FL 非存在下では、抗 GFP 抗体付 Qdot の染色体上での局在や、紡錘体微小管上での運動は観察されなかったことから、抗 GFP 抗体付 Qdot の染色体への結合と微小管上での運動は非特異的な結合によるものではなく、Xkid によるものであることが確認できた (図 4-4、Movie 16)。in vitro の実験において、Kid は non-processive な分子モーターであるがビーズ上で多分子になると微小管上を連続的に運動できること、また Gliding assay では微小管を滑り運動させることが知られている (Yajima *et al.*, 2003; Bieling *et al.*, 2010)。これらの知見と、後述する Xkid-GFP と Xkid-Qdot の分布の違いから、抗 GFP 抗体付 Qdot には複数の Xkid が結合していることが予想される。

次に、Xkid-Qdot の運動を詳細に解析した (図 4-5、解析方法は「2.4.9 Xkid-Qdot の観察」を参照)。Xkid-Qdot は微小管上を運動する際、止まったり、運動方向を変えたりすることから、複数の微小管を乗り換えながら運動していると考えられる。また、Xkid-Qdot は長距離、長時間運動し、Total run length と Total lifetime はそれぞれ最大で 17 μm 、180 s となった。この結果から、Xkid は紡錘体 (~45 μm) 内を移動するのに十分な距離を運動できることが分かった。Total run length と Total lifetime を Single exponential でフィッティングしたところ、平均値はそれぞれ 5.4 μm 、35 s となった (図 4-5)。ただし、観察の途中で焦点面から離れる Xkid-Qdot もあるため、実際にはもう少し長距離にわたって長時間運動すると考えられる。

続いて、運動の様子と運動方向との関係を調べた。Xkid-Qdot の運動の方向を、紡錘体の赤道面に向かっている場合を Equator mode、極に向かっている場合を Pole mode、どちらに向かっているか判別できない場合を E-P mode と定義した (詳細な定義は「2.4.9 Xkid-Qdot

の観察」を参照)。各 mode の瞬間速度の平均値を、瞬間速度のヒストグラムを Single Gaussian フィッティングすることで求めた (図 4-6)。平均値はそれぞれ 136 ± 1 nm/s (Equator mode)、 125 ± 1 nm/s (Pole mode)、 92 ± 2 nm/s (E-P mode) となった。Equator mode と Pole mode における瞬間速度の平均値は、*in vitro* での Kid (*human*) と Xkid (*Xenopus laevis*) の速度 (140-160nm/s) と近い値となった一方、微小管 flux の速度 (~ 43 nm/s) (Yang *et al.*, 2008) と比較すると 3 倍程度の値となった。

ここで、瞬間速度のヒストグラムを 2 つのガウス分布の和でフィッティングすると、mode によらずピークは ~ 60 nm/s と ~ 140 nm/s 付近に検出され、 ~ 60 nm/s のピークは微小管 flux の速度と近い値となった (図 4-7)。このことから、紡錘体内の Xkid-Qdot の運動は、程度としては少ないものの、flux の影響を受けていると考えられる。特に、運動方向が判別しづらい E-P mode においては、 ~ 60 nm/s をピークの中心にもつ分布の占める割合が大きい。ため、この mode においては flux による運動の割合が大きいと推察される。また、flux の速度や運動方向は微小管ごとにばらつきが大きいことが知られており (Yang *et al.*, 2007, 2008)、そのことが Xkid-Qdot の瞬間速度の広い分布を生み出している可能性がある。ただし、瞬間速度の分布が広い原因として、紡錘体が常に 3 次元的に動いており変形も起こることから、解析の際の座標系が不安定であること、また Time-lapse の時間間隔が長く (2 秒ごと) その間に運動の様子が変化している可能性があることなど、測定上の問題による可能性も否定できない。

Run length と Lifetime はそれぞれ、1–2 μm 、10–17 s であり、ともに Equator mode の方が Pole mode よりも長かった (図 4-6)。紡錘体内の微小管は紡錘体の大きさ (30–50 μm) に比べて短いものが多い (2–15 μm) ことが知られている (Brugués *et al.*, 2012)。Equator mode における Xkid-Qdot の Run length (2.32 ± 0.18 μm (平均値 \pm SEM)) は、紡錘体極から赤道面方向に延びる紡錘体微小管の平均長 (2.4 \pm 1.0 μm) (Brugués *et al.*, 2012) に近い値となった。この結果は、Xkid-Qdot が微小管のプラス端まで運動し、次の微小管に乗り換える、といっ

た運動をしていることを示唆する。

4.2.2 Xkid-Qdot の運動の領域依存性

紡錘体微小管の向きと長さは、紡錘体内の領域によって異なることが知られている。そこで、Xkid-Qdot の運動に領域依存性があるかについて調べた (図 4-8)。ここでは、2つの紡錘体極をつなぐ軸に沿って領域を定義した。観察された Xkid-Qdot の分布を調べると、Xkid-Qdot の数は赤道面に近いほど多く、紡錘体極に近づくにつれ少なくなった (図 4-9、図 4-10)。また、ピークの位置は赤道面から少しずれていた。このピーク位置のずれは、染色体に多数の Xkid-Qdot が結合していることで、赤道面付近を運動している Xkid-Qdot が観察しづらいために起こると考えられる。染色体結合ドメインを除去した Xkid (Xkid-GFP- Δ DB) を用いると、染色体上に Xkid-Qdot は観察されず、Xkid-Qdot の数のピーク位置は赤道面となった (図 4-11)。このことから Full length の Xkid でピーク位置がずれる理由が、染色体に結合した Xkid-Qdot の影響であると推測される。このように、Full length、 Δ DB とともに Xkid-Qdot が紡錘体の赤道面付近に集積するという結果は、Xkid の染色体結合ドメインの有無と染色体が紡錘体の赤道面にあることは、Xkid-Qdot の赤道面への集積に関係がないことを示す。つまり、Xkid-Qdot は Xkid の分子モーターとしての性質によって赤道面へ集積したと考えられる。また、Xkid-GFP- Δ DB が結合した Qdot は赤道面近くに集積したのに対し、Xkid-GFP- Δ DB 自体は紡錘体全体に分布した (図 4-2)。この結果は、Xkid が Qdot 上で多分子になることで、Xkid-Qdot は赤道面付近に集積する性質を獲得したことを示唆している。

ここまでの結果から、Xkid-Qdot が赤道面付近に集積するのは、Xkid の多分子としての運動機能によることが強く示唆された。次に、Xkid-Qdot の運動の領域依存性を調べるため、まず紡錘体内での Xkid-Qdot の運動方向の分布を調べた (図 4-9、図 4-10)。その結果、紡錘体極付近では Equator mode が多く、赤道面付近では Equator mode と Pole mode の割合が

同程度であった。また、Equator mode の速度は紡錘体極付近で速く、赤道面付近では遅いことが分かった。一方、Pole mode は逆の傾向を示し、紡錘体極付近で遅くなった。また Run length と Lifetime は紡錘体極付近で短くなった。このように、Xkid-Qdot の速度、Run length、Lifetime には領域依存性と運動方向依存性があることが分かった。

紡錘体微小管の向きや長さは紡錘体内の領域によって異なり、例えば極から 10 μm 離れたところでは、極から赤道面方向へ延びる微小管の割合が全体の 70%を占めており、赤道面付近では、方向が互いに異なる微小管がほぼ半々の割合で存在する(Heald *et al.*, 1997; Brugués *et al.*, 2012)。Xkid-Qdot の運動もこの微小管の方向性分布を反映すると考えられるが、実際に紡錘体極から 10 μm のところでは約 83% (Equator mode/ (Equator mode + Pole mode) (%)) の Xkid-Qdot が赤道面方向へ運動し、赤道面付近では Equator mode と Pole mode の割合がほぼ半々であった。また、Xkid-Qdot の速度の分布については、Xkid-Qdot が乗っている微小管と同じ方向の微小管が多い領域では速度が速いといえる。例えば、Equator mode の場合、極付近だと Equator mode になる方向の微小管（極から赤道面方向へ延びる微小管）の割合が多いが、そこでは速度が速い。一方、赤道面付近になり逆向きの微小管の割合が増えてくると速度が遅くなる。遅くなる理由としては、Xkid-Qdot が一時的に逆向きの微小管に乗り移るか、あるいは Qdot には複数の Xkid が結合していると考えられるため同時に 2 本以上の方向性の異なる微小管に結合することで抵抗力を受けることなどが考えられる。また、紡錘体極付近では短い微小管が多くなるが、そのことが極付近で Run length と Lifetime が短くなった理由として考えられる。このように、Xkid-Qdot の運動の領域依存性は、紡錘体内における紡錘体微小管の方向性分布と長さ分布を大きく反映していた。また、運動方向の割合、速度、Run length、Lifetime の領域依存性はすべて Xkid-Qdot を赤道面付近に集積させるような特性を持っていた。

4.2.3 Xkid-Qdot の微小管プラス端への集積

Xkid-Qdot の運動性と微小管の方向性との関係をより詳細に調べるために、Eg5 (キネシン 5) の阻害剤である Monastrol をエクストラクトに加え、単極性の微小管構造物を形成させた (Monastrol の最終濃度は 200 μ M。詳細は「2.4.5 エクストラクト中での阻害剤の使用」を参照)。この構造物では約 80%の微小管が極から外向きの方向に伸びている (図 4-12、Movie 18) (Brugués *et al.*, 2012)。このような微小管の方向性を反映するように Xkid-Qdot は極から外向きに運動するもの (Outward mode) の方が、極方向へ運動するもの (Pole mode) に比べ多いことが分かった (Movie 21)。Xkid-Qdot は微小管の先端に到達し、先端付近で運動 (Outward mode or Pole mode)、または先端に留まっていた (O-P mode)。これらの結果から、微小管構造物内での Xkid-Qdot の運動方向は、構造中の微小管方向性を反映することが確認された。

Monastrol 存在下で形成した 2 つの単極性構造物が近くに存在すると、それぞれの構造物の先端同士が相互作用し、紡錘体のような 2 極性の構造をとることがある (図 4-13)。このような 2 極性の構造物では、境界付近で方向性の異なる微小管が存在している一方、境界から少し離れると、極から境界の方向に伸びる微小管の割合が一気に増える (図 4-13、Movie 19)。このような 2 極性の構造物内で Xkid-Qdot の運動を観察すると、境界から離れるにつれ、境界に向けて運動 (Outward mode) する Xkid-Qdot の割合が増加する (図 4-13、Movie 22)。一方、境界付近では運動方向の割合は同程度であった。このような運動方向の性質を反映するように、Xkid-Qdot は境界付近に集積し、往復運動を行っていた。境界での Xkid-Qdot の集積は、3 つの単極性構造物が相互作用するような構造物でも見られた (図 4-13、Movie 23)。

2 極性構造物内では Xkid-Qdot の速度は遅く、Run length と Lifetime は短かった。また、O-P mode の割合が大きかった。この理由としては、Eg5 が阻害されていることにより微小管同士の間隔が広くなり、Xkid-Qdot が微小管のプラス端に到達した後に次の微小管へなか

なか乗り換えられず、それによって O-P mode が増え、Run length と Life time が短くなったと考えられる。Monastrol 存在下での微小管同士の間隔は測定されていないが、非存在下に比べて微小管 1 本 1 本がはっきりと確認できるほか、微小管の、線維と垂直方向のゆらぎが大きいことから、間隔が広がっていることが推測される。また、横方向のゆらぎが大きいことにより、微小管上での運動方向が、構造物内での Xkid-Qdot の運動方向に解析上正確に反映されず、Run length と Lifetime が実際よりも短くなった可能性もある。

4.2.4 Hexylene glycol 存在下での Xkid-Qdot の運動

微小管の重合を促進する Hexylene glycol をエクストラクトに加えると、紡錘体が大きくなり、紡錘体微小管の平均長が長くなることが知られている(Mitchison *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007)。そこで、微小管の長さ と Xkid-Qdot の運動の関係を調べるために、Hexylene glycol 存在下での運動の観察を試みた（実験方法の詳細は「2.4.5 エクストラクト中での阻害剤の使用」を参照）。2% Hexylene glycol で紡錘体は徐々に大きくなり（図 4-14）、また微小管 1 本 1 本の様子が見えにくくなったため、微小管密度も上がっていると考えられる。Xkid-Qdot の染色体上での局在はかなり抑えられ、Xkid-Qdot は紡錘体微小管上にはほとんど見られなかった。一方、紡錘体周りにある微小管に Xkid-Qdot が数多く存在した（図 4-14、Movie 24）。Hexylene glycol がなければ、紡錘体周りにこのように微小管が多数存在することはない。この、紡錘体周りの微小管が障壁となり、紡錘体微小管と染色体への Xkid-Qdot の結合が抑えられたと考えられる。本研究ではこのような理由から、Hexylene glycol 存在下での紡錘体微小管上の Xkid-Qdot の運動を観察・解析することができなかった。

またこの結果は、紡錘体周りの環境が、紡錘体への分子モーターなどの補給に重要であることを示唆する。

4.2.5 DMSO aster 内での Xkid-Qdot の運動

DMSO をエクストラクトに加えると、染色体や中心体がなくても微小管が重合し、単極性構造物 (DMSO aster) が形成される (Stearns and Kirschner, 1994; Heald *et al.*, 1997)。DMSO aster は Monastrol 存在下で形成される単極性構造物と同様に、極から外向きに延びる方向の微小管が多数を占める (図 4-15、Movie 20)。染色体からは様々なシグナルが出ており、例えば微小管の nucleation を促進させるシグナル、分子モーターの活性を変えるようなシグナル、などがある。そこで、染色体がなく、これらのシグナルがない状況での Xkid の運動を観察するため、DMSO aster 上で Xkid-Qdot の運動を観察した。

Xkid-Qdot は紡錘体内と同様に DMSO aster 内でも長い距離、複数の微小管を乗り換えながら運動した (図 4-15、Movie 25)。ただし、微小管のゆらぎが非常に大きいため、詳細な運動の解析は行わなかった。この結果から、Xkid-Qdot は染色体がなくても微小管上を運動できることが確認された。

4.3 考察とまとめ

分裂中期に染色体の動原体に微小管のプラス端が結合して染色体が微小管に捕捉されるためには、まず染色体が紡錘体の赤道面に整列することが重要である(Kapoor *et al.*, 2006; Kitajima *et al.*, 2011; Magidson *et al.*, 2011)。これまでの研究により、どのような仕組みで染色体が赤道面に集合し、動原体が 2 つの極から伸びる微小管に捕捉されるかについて明らかにされてきた。しかし、動原体の捕捉までの間、赤道面に到達した染色体がいかんして保持されているかについては、よく分かっていなかった(Walczak *et al.*, 2010; Dumont and Desai, 2012; McIntosh *et al.*, 2012)。本研究で観察を行った Xkid-Qdot は、染色体腕の小さな一部分を模倣していると言え、観察された運動は Chromokinesin による、いわゆる Polar ejection force の作用を観察していると言える(Rieder *et al.*, 1986)。実際、Xkid-Qdot の運動は、紡錘体内における染色体腕の動き、すなわち赤道面への移動と、赤道面での整列といった動きとよく似ていた。また、アフリカツメガエルの紡錘体でも、マウスの卵母細胞で見られるような Prometaphase belt (赤道面の縁に染色体が配置する) が観察された (図 4-16) (Kitajima *et al.*, 2011)。Metaphase plate(赤道面全体に染色体が配置する)形成前の染色体のこのような配置には、Chromokinesin による運搬機構が必要と考えられている(Kitajima *et al.*, 2011; Magidson *et al.*, 2011)。本研究の結果は、Prometaphase から Metaphase にかけて、Chromokinesin が染色体整列の機構を担い、動原体由来の染色体整列機構がなくても染色体を赤道面に保持するような能力があることを示した。

また、図 4-16 にまとめたように、本研究の結果は、Chromokinesin の赤道面への集積が、紡錘体の持つ赤道面を挟んで左右対称な微小管構造により起こるということを示した(Brugués *et al.*, 2012)。すなわち、キネシン、ダイニン等の分子モーターや、微小管結合タンパク質により形成される紡錘体の微小管構造が、染色体の整列に直接作用していることを示した(Walczak and Heald, 2008; Shimamoto *et al.*, 2011; McIntosh *et al.*, 2012; Meunier and Vernos, 2012)。本研究により、紡錘体の持つ左右対称な微小管構造が、分子モーターによる

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

紡錘体構成物の輸送の“場”として作用していることが示された。

4.4 図

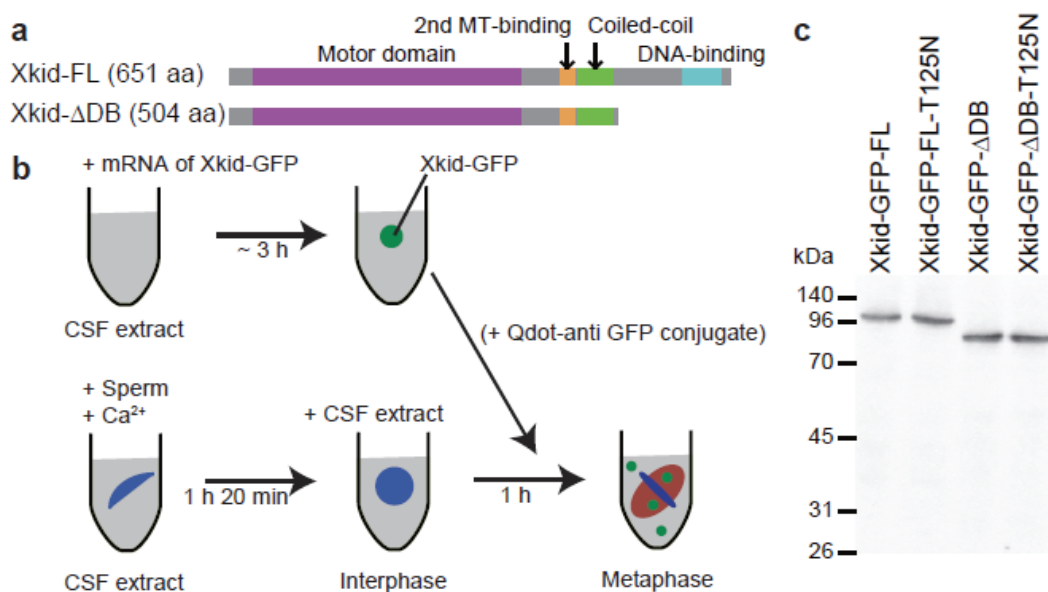


図 4-1 CSF エクストラクト中での Xkid-GFP の発現と、Xkid-GFP と抗 GFP 抗体付 Qdot の結合

- (a) Full length の Xkid と、DNA 結合ドメインを持たない Xkid のアミノ酸配列
- (b) Xkid-GFP の発現と、Xkid-Qdot の作製方法の概略図
- (c) Xkid-GFP の mRNA を CSF エクストラクトに加え、2 時間インキュベート後のウェスタンブロット結果。抗体は Roche 社の GFP 抗体を用いた。Xkid-GFP の発現を確認できた。

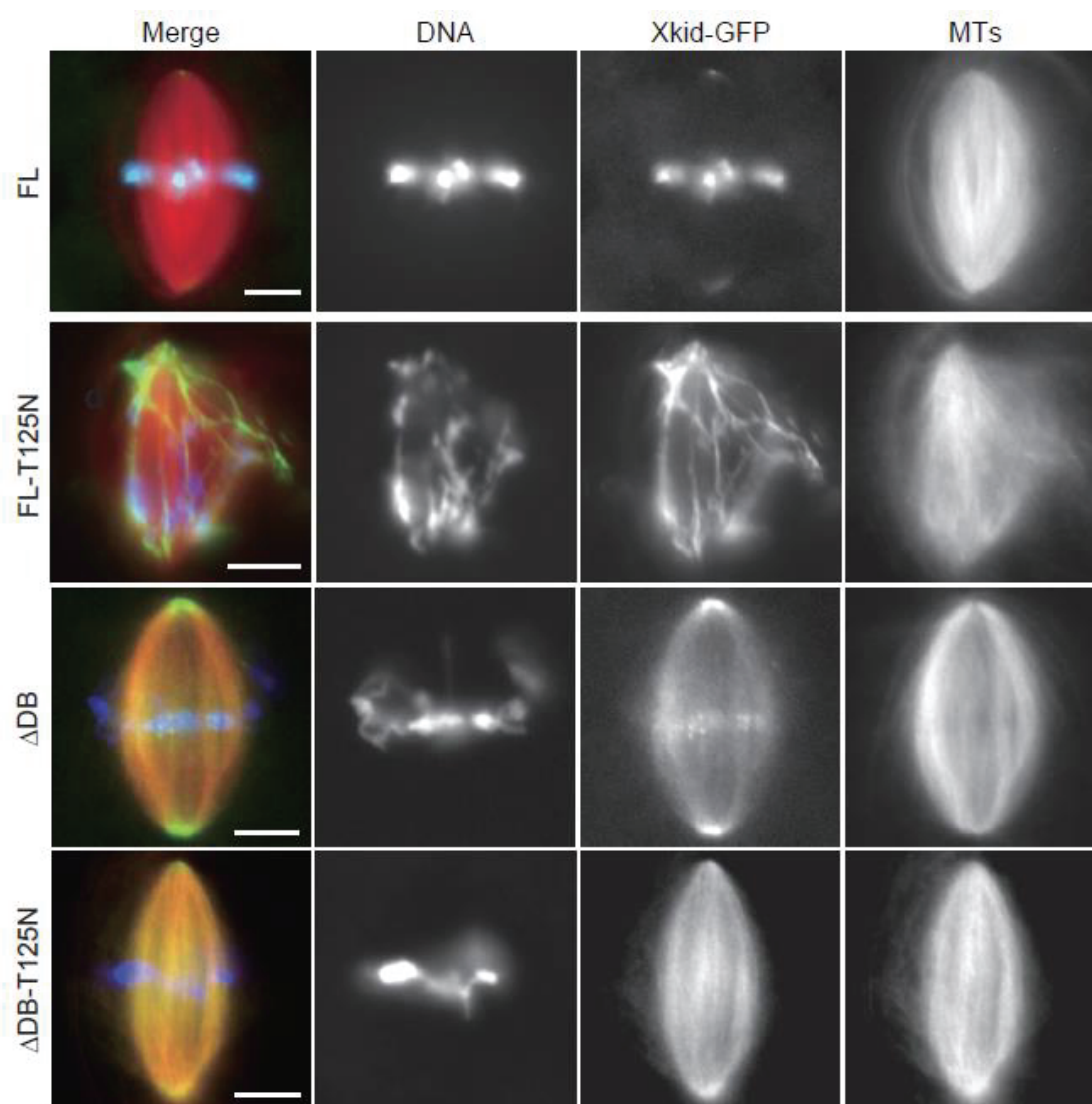


図 4-2 Xkid-GFP の紡錘体内での分布

Xkid-GFP (Xkid-GFP-FL, Xkid-GFP-FL-T125N, Xkid-GFP- Δ DB, Xkid-GFP- Δ DB-T125N) の中期紡錘体内での分布。Xkid は緑で示されている。また、Rhodamine-labeled tubulin と 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)をそれぞれ微小管 (赤) と DNA (青) を可視化するためにエクストラクトに加えた。スケールバーは 10 μ m。

Xkid-GFP は Full length では染色体上、 Δ DB は微小管上にそれぞれ分布した。また、Full length の ATP 加水分解能を阻害した変異体 (Xkid-GFP-FL-T125N) では染色体の整列が妨げられた。

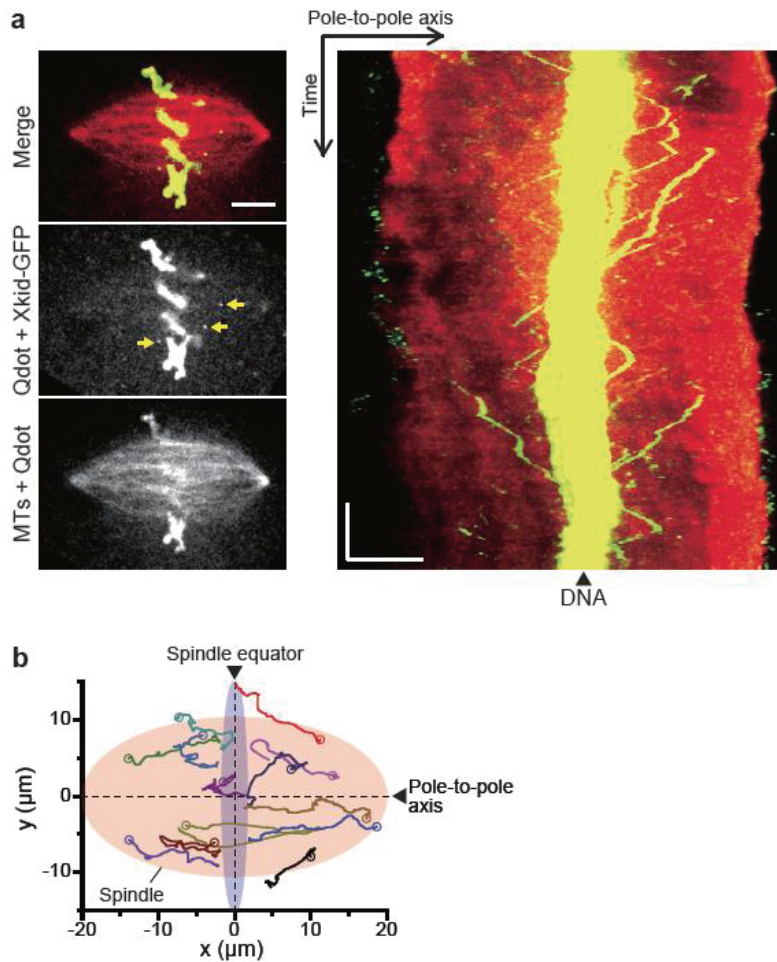


図 4-3 紡錘体内での Xkid-Qdot の運動の観察

- (a) 中期紡錘体内での Xkid-Qdot の分布と運動。左の図の矢印の位置にある Xkid-Qdot は微小管上を運動している。右の図は左の図の紡錘体の長軸方向 (Pole-to-pole axis) についての Kymograph である (紡錘体の全領域について長軸方向に Kymograph を作製し、全ての Kymograph を輝度最大で合成した (ImageJ の Z-projection を使用))。スケールバーはそれぞれ $10\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \text{s}$ である。Kymograph から、Xkid-Qdot は微小管上を止まったり方向を変えたりしながら運動することが分かる。
- (b) Xkid-Qdot の運動の軌跡。中抜き丸は最初の位置を示す。Xkid-Qdot が紡錘体の長軸方向に沿って運動していることが分かる。

Movie 15 参照。



図 4-4 Xkid-GFP 非存在下での抗 GFP 抗体付 Qdot の分布

紡錘体を形成させたエクストラクトに抗 GFP 抗体付 Qdot のみを加えた。抗 GFP 抗体付 Qdot の染色体及び紡錘体微小管への結合は観察されなかった。スケールバーは 10 μm 。

この結果から、Xkid-GFP 共存下で観察された抗 GFP 抗体付 Qdot の染色体及び紡錘体微小管への結合と、微小管上での運動は、Xkid の機能によるものと確認できた。

Movie 16 参照。

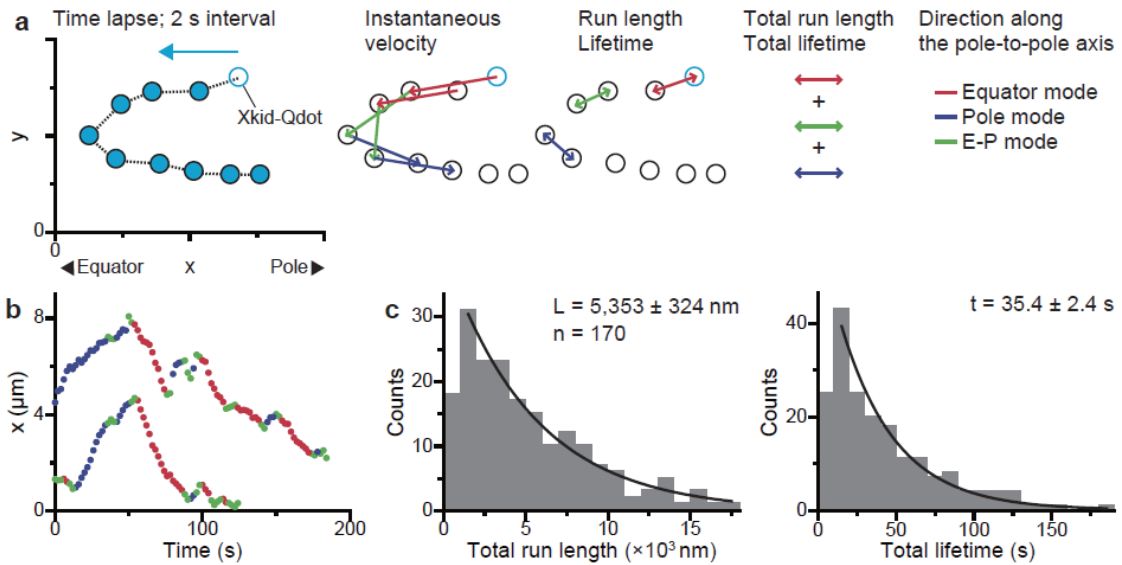


図 4-5 Xkid-Qdot は紡錘体微小管上を長距離・長時間運動する

- (a) Xkid-Qdot の運動の解析方法の概略図。Xkid-Qdot の運動を、紡錘体の長軸に沿った方向について、赤道面方向に動くもの(Equator mode)、極方向に動くもの(Pole mode)、どちらに動いているかよく分からないもの(E-P mode)に分類した。詳細な定義については「2.4.9Xkid-Qdot の観察」を参照。
- (b) Xkid-Qdot の紡錘体の長軸に沿った運動の時間経過($n = 2$ Qdots; 赤, Equator mode; 青, Pole mode; 緑, E-P mode)。個々の Xkid-Qdot が複数の mode で運動していることが分かる。
- (c) Xkid-Qdot の Total run length と Total lifetime ($n = 9$ spindles, 170 Qdots)。平均値 (\pm SEM) は、Single exponential でフィッティングすることで求めた。ただし、最初の bin は除いてフィッティングを行った。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

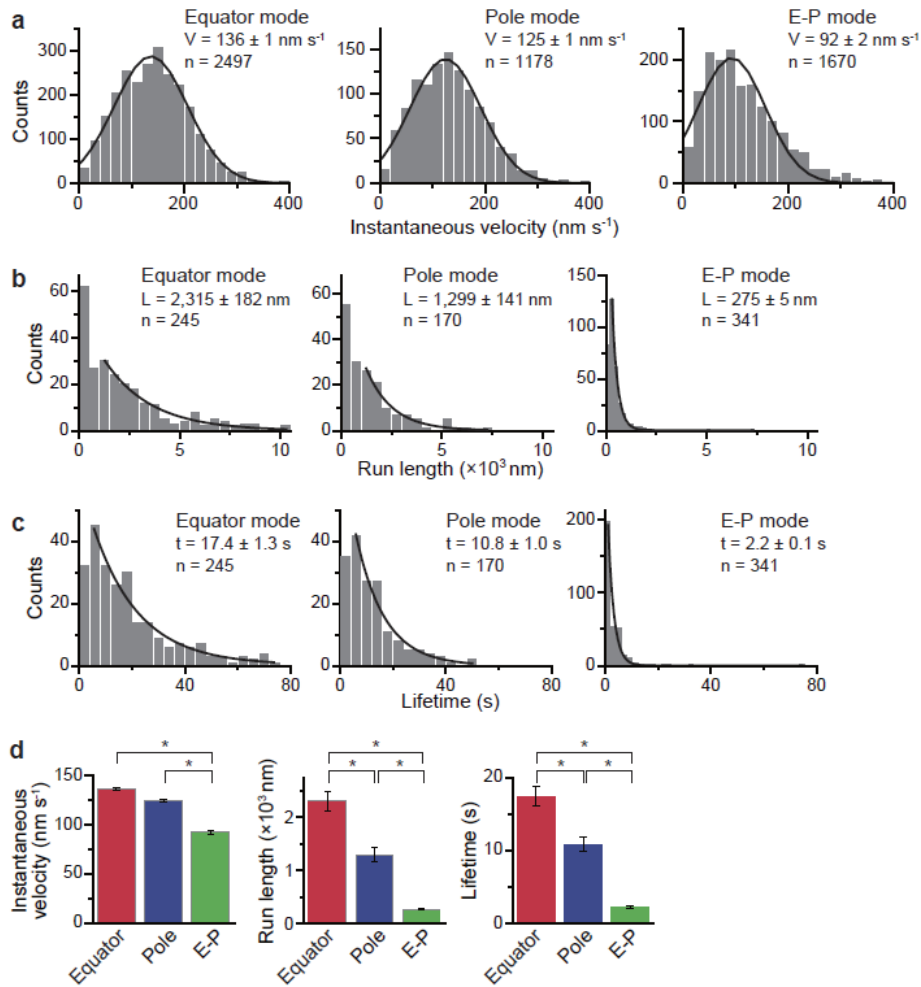


図 4-6 Xkid-Qdot の運動の運動方向依存性の解析

- (a)-(c) Xkid-Qdot の瞬間速度 (Instantaneous velocity, a)、Run length (b)、Lifetime (c) のヒストグラム ($n = 9$ spindles, 170 Qdots)。瞬間速度の平均値 (\pm SEM) は Single Gaussian で、Run length と Lifetime の平均値 (\pm SEM) は Single exponential でそれぞれフィッティングを行い求めた。ただし、Run length は先頭 2 つの bin、Lifetime は最初の bin は除外してフィッティングを行った。
- (d) Xkid-Qdot の Instantaneous velocity、Run length、Lifetime の平均値 (\pm SEM)。アステリスクは、Instantaneous velocity の場合は t 検定、Run length と Lifetime の場合は Mann-Whitney U 検定の結果、有意水準 0.05 で有意な差があることを示す。Run length と Lifetime は、Equator mode の方が Pole mode より有意に長いことが分かった。

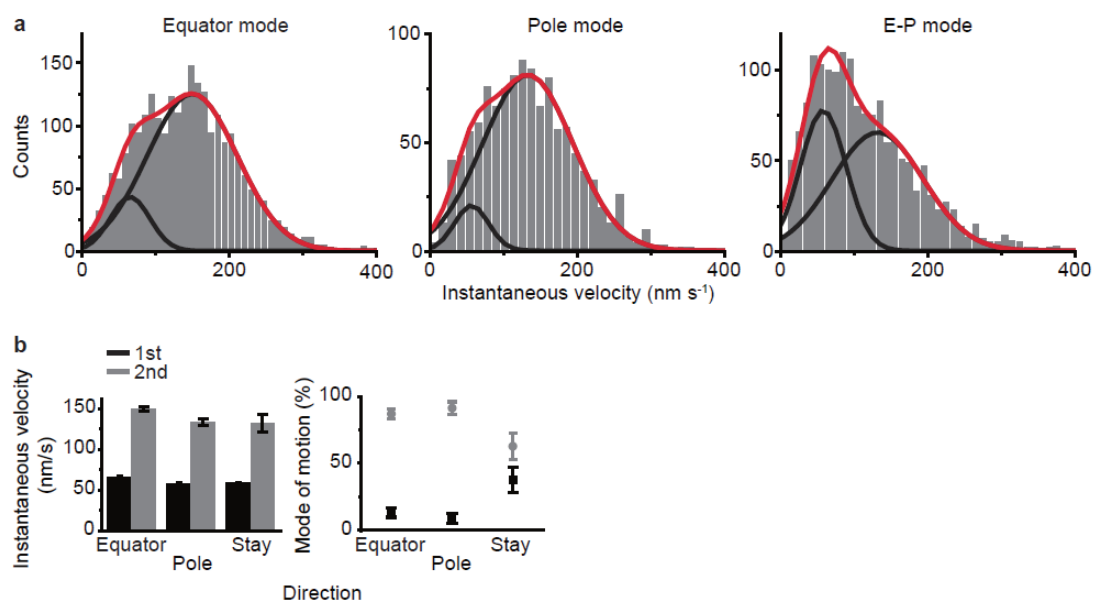


図 4-7 Xkid-Qdot の瞬間速度 (Instantaneous velocity) のフィッティング

前の図では Instantaneous velocity を Single Gaussian でフィッティングしたが、2つの Gaussian でフィッティングを行うと、mode によらず、60 nm/s 付近と 140 nm/s 付近にピークが検出される(a), (b)。ただし、ヒストグラムの bin は前の図に比べ小さくとった。E-P mode では最初のピークの割合が大きい。最初のピークの値は微小管の flux 速度 (~40 nm/s) に近いことから、Xkid-Qdot が結合している微小管の速度を反映していると考えられる。E-P mode では、Xkid-Qdot が微小管のプラス端に到達し、次の微小管に乗り移るのを待っていると考えられることから、E-P mode では微小管自体の動きが Xkid-Qdot の運動に反映されやすいと考えられる。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

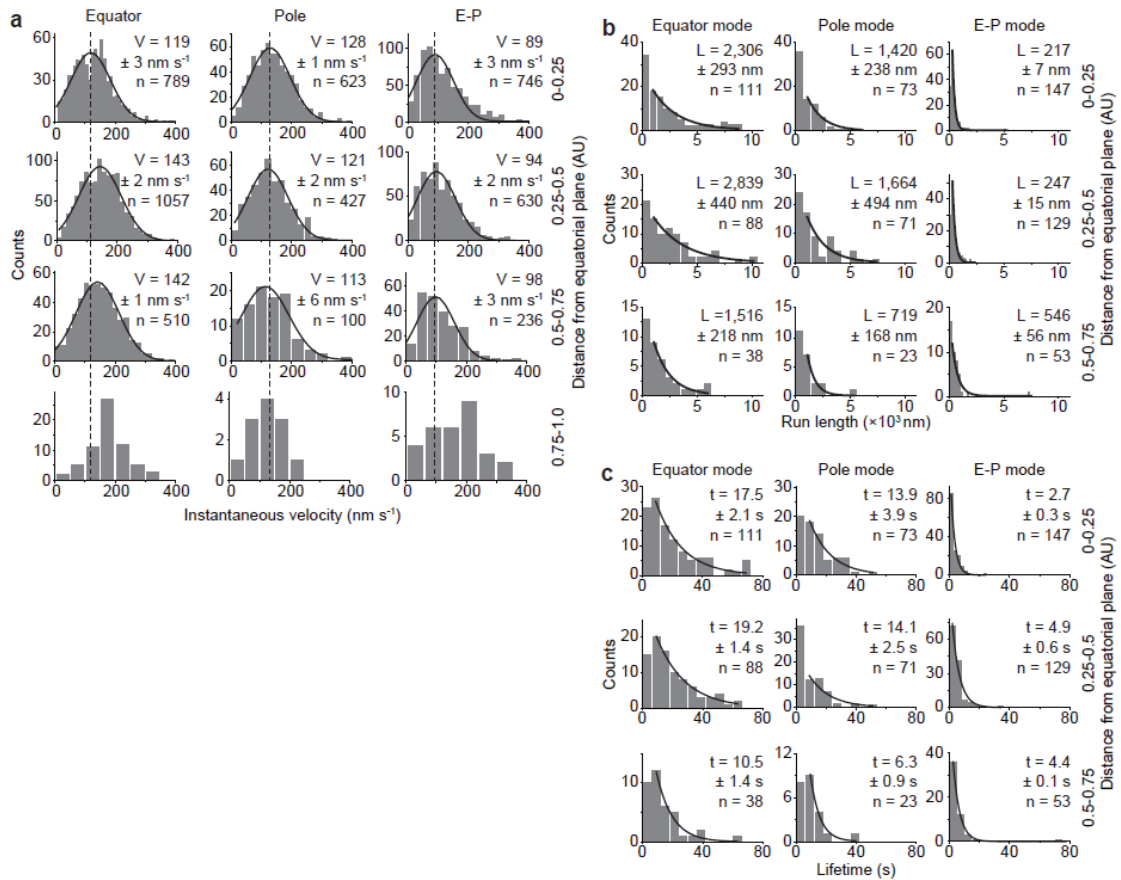


図 4-8 Xkid-Qdot の運動の領域依存性①

Xkid-Qdot の領域ごとの瞬間速度 (Instantaneous velocity, a)、Run length (b)、Lifetime (c) のヒストグラム ($n = 9$ spindles, 170 Qdots)。瞬間速度の平均値 ($\pm \text{SEM}$) は Single Gaussian で、Run length と Lifetime の平均値 ($\pm \text{SEM}$) は Single exponential でそれぞれフィッティングをして求めた。ただし、Run length と Lifetime は最初の bin は除外してフィッティングを行った。

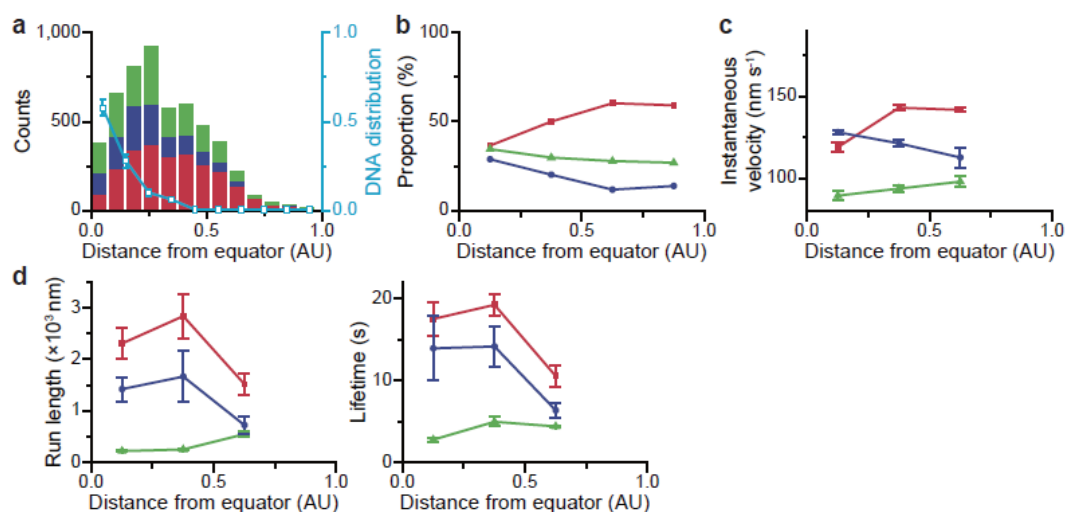


図 4-9 Xkid-Qdot の運動の領域依存性②

(a) Xkid-Qdot の紡錘体長軸方向についての分布 (0 が赤道面の位置、1 が紡錘体極の位置)。

微小管上を運動している Xkid-Qdot の各時刻における位置を解析し、ヒストグラムを作成した(赤, Equator mode; 青, Pole mode; 緑, E-P mode) ($n = 9$ spindles, 170 Qdots, 5,234 time points)。水色のプロットは DNA の紡錘体長軸方向についての分布を Sytox-green の蛍光から解析したものである(平均値 \pm SEM.; $n = 7$)。赤道面付近では DNA に結合した Xkid-Qdot の蛍光のため、微小管上を運動している Xkid-Qdot が観察されにくい。このことにより分布のピークの位置が赤道面から少しずれると考えられる。染色体に結合しない変異体 (Xkid-GFP- Δ DB) では分布のピークが赤道面にあることも、この推測を支持する (図 4-11)。

(b) 運動方向の領域依存性(赤, Equator mode; 青, Pole mode; 緑, E-P mode; $n = 9$ spindles, 170 Qdots)。各領域について、データ数は 100 time points 以上ある。赤道面付近では Equator mode と Pole mode の割合は同程度であるが、紡錘体極に近づくにつれ Equator mode の割合が多くなる。

(c)-(d) 瞬間速度 (Instantaneous velocity, a)、Run length (b)、Lifetime (c)の領域依存性(平均値 \pm SEM ; 赤, Equator mode; 青, Pole mode; 緑, E-P mode; $n = 9$ spindles, 170 Qdots)。検定結果については表 4-2 を参照。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

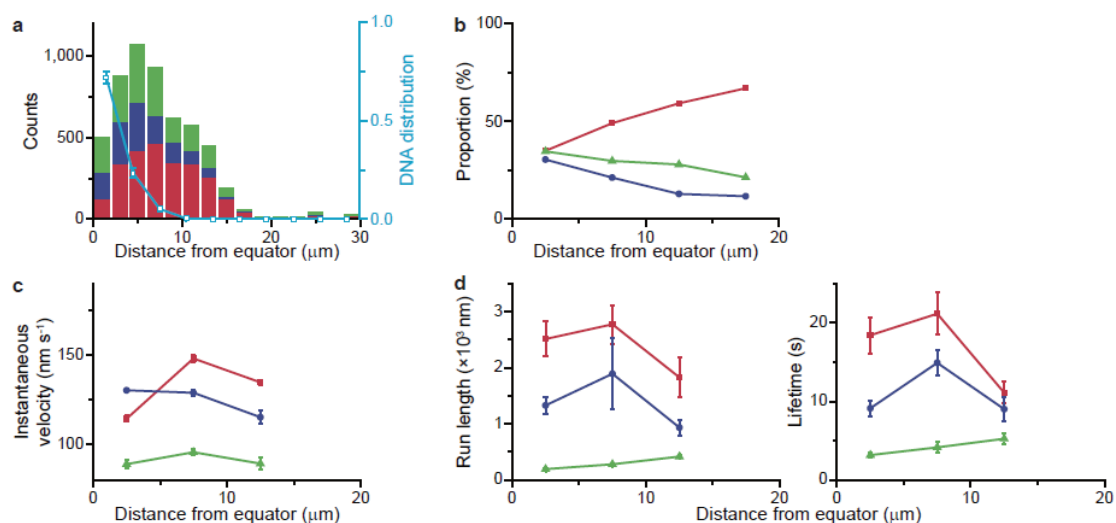


図 4-10 Xkid-Qdot の運動の領域依存性③

図 4-9 の横軸を、赤道面からの距離（絶対値）にした。解析結果の傾向としてはほぼ同じとなったが、紡錘体極付近での Run length と Lifetime の減少が図 4-9 に比べてあまり見られなくなった。これは、異なる大きさの複数の紡錘体において、Xkid-Qdot の運動を観察しているため、紡錘体極からの距離がまちまちになっているためと考えられる。すなわち、Xkid-Qdot の Run length と Lifetime は、赤道面からの距離ではなく、紡錘体極からの距離に依存すると言える。

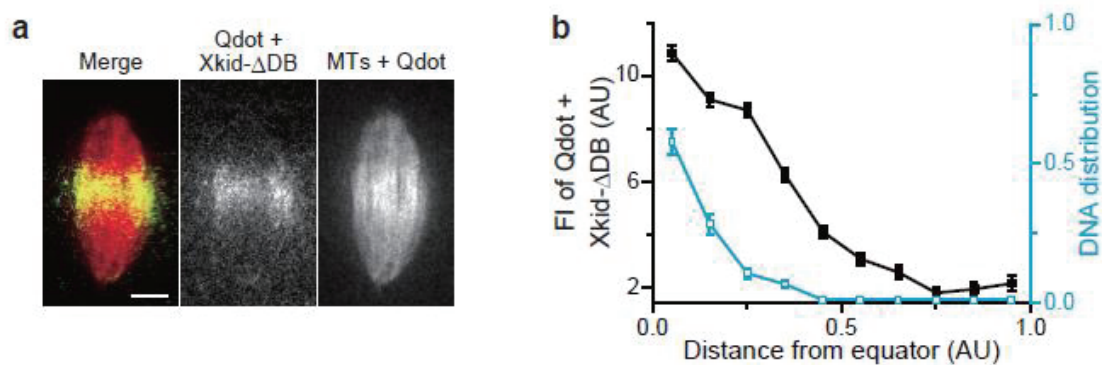


図 4-11 Xkid-GFP- Δ DB-Qdot の中期紡錘体内の分布

紡錘体の形成したエクストラクトに、DNA 結合ドメインを持たない Xkid (Xkid-GFP- Δ DB) と、抗 GFP 抗体付 Qdot を加えた後、Xkid-Qdot の中期紡錘体内の分布を観察し(a)、蛍光強度から分布を解析した(平均値 \pm SEM; $n = 5$) (b)。(b)の DNA の分布は図 4-9 と同じデータである。スケールバーは 10 μ m である。

DNA 結合ドメインを持たない Xkid (Xkid-GFP- Δ DB) が結合した Qdot は紡錘体の赤道面近くに集積することが分かった。Xkid-GFP- Δ DB は紡錘体全体に分布する (図 4-2) ことから、ここで見られた Xkid-Qdot の赤道面への集積は、Xkid の多分子としての性質であると考えられる。また、Xkid-Qdot の赤道面への集積は DNA 結合ドメインに依存しないことが分かった。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

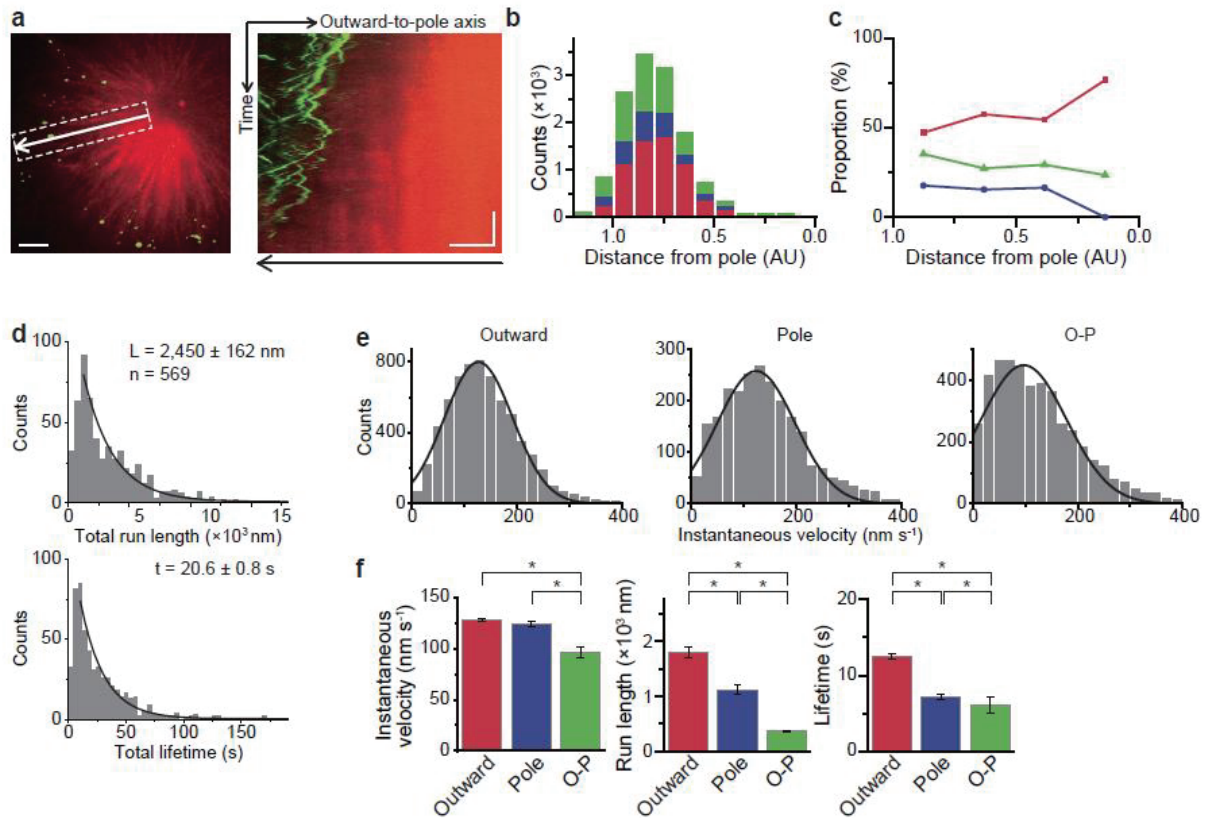


図 4-12 Monastrol 存在下の単極性構造物内における Xkid-Qdot の運動

- (a) 200 μM Monastrol 存在下で形成される単極性構造物 (Monopolar spindle) 内における Xkid-Qdot の分布と Kymograph。Kymograph は左の点線で囲った領域全体について矢印の軸に沿って Kymograph を作成し、蛍光強度最大で合成したものである (緑、Xkid ; 赤、微小管)。スケールバーは 10 μm と 100 s である。
- (b)-(f) 単極性構造物内での Xkid-Qdot の運動の解析結果 ($n = 12$ spindles, 569 Qdots, 12,362 time points)。赤は Outward mode、青は Pole mode、緑は O-P mode をそれぞれ示す。平均値 (\pm SEM) は Total run length と Total lifetime については Single exponential で (ただし先頭 2 つの bin は除く)、Instantaneous velocity については Single Gaussian でそれぞれフィッティングをして求めた (値の詳細は表 4-1 を参照)。アステリスクは Instantaneous velocity は t -test、Run length と Lifetime は Mann-Whitney U test でそれぞれ検定を行い、有意水準 0.05 で有意差があることを意味する。

Xkid-Qdot は単極性構造物の先端、つまり微小管のプラス端に集積することが分かった。

Movie 21 参照。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

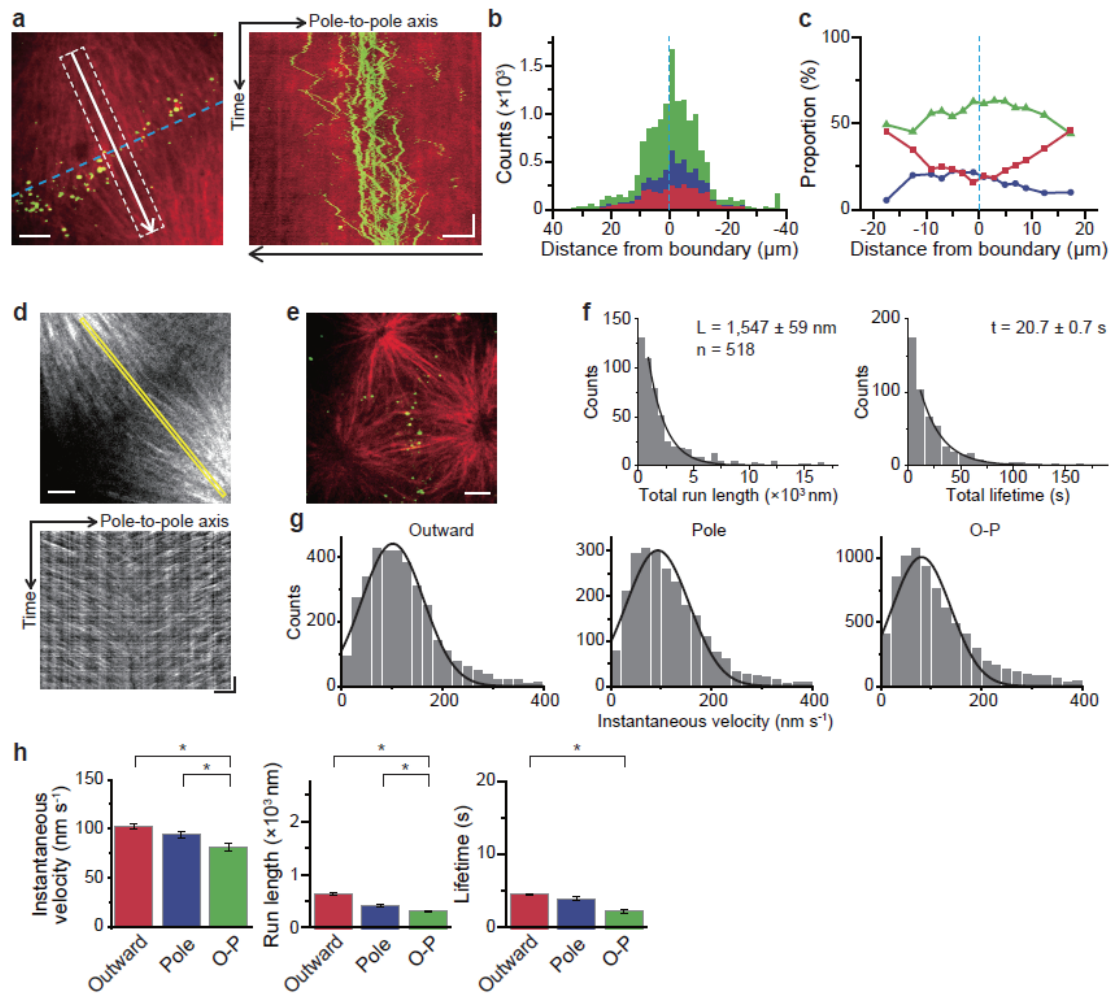


図 4-13 Monastrol 存在下の 2 極性構造物内における Xkid-Qdot の運動

- (a) 200 μM Monastrol 存在下で形成される 2 極性構造物内における Xkid-Qdot の分布と Kymograph。Kymograph は左の点線で囲った領域全体について矢印の軸に沿って Kymograph を作成し、蛍光強度最大で合成したものである（緑、Xkid；赤、微小管）。スケールバーは 10 μm と 100 s である。
- (b) 2 極性構造物内における Xkid-Qdot の紡錘体長軸方向についての分布 ($n = 1$ spindle, 518 Qdots, 13,792 time points)。赤は Outward mode、青は Pole mode、緑は O-P mode をそれぞれ示す。Xkid-Qdot は 2 つの構造物の境界に集積する。
- (c) 2 極性構造物内における Xkid-Qdot の運動方向の紡錘体長軸方向についての分布。赤は Outward mode、青は Pole mode、緑は O-P mode をそれぞれ示す。境界付近では Outward

mode と Pole mode の割合は同程度であるが、境界から離れると Outward mode の割合が多くなる。

- (d) 2 極性構造物の微小管像（上）と EB1 の Kymograph（下）。Kymograph は上の黄色で囲った領域について作製した。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ と $100\ \text{s}$ である。EB1 の軌跡が 2 つの極から境界に向かい、境界付近で交差する。このことから、2 極性構造物内の微小管は極から境界に向かう方向性を持ち、境界付近では異なる方向性を持つ微小管が存在することが分かった。
- (e) $200\ \mu\text{M}$ Monastrol 存在下で形成される 3 極性構造物内での Xkid-Qdot の分布（緑、Xkid；赤、微小管）。2 極性構造物と同様に、境界付近に Xkid-Qdot が集積する。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ 。
- (f)-(h) 2 極性構造物内での Xkid-Qdot の運動の解析結果（ $n = 1\ \text{spindle}, 518\ \text{Qdots}, 13,792\ \text{time points}$ ）。赤は Outward mode、青は Pole mode、緑は O-P mode をそれぞれ示す。平均値（ $\pm\ \text{SEM}$ ）は Total run length と Total lifetime については Single exponential で（ただし最初の bin は除く）、Instantaneous velocity については Single Gaussian でそれぞれフィッティングをして求めた（値の詳細は表 4-1 を参照）。アスタリスクは、Instantaneous velocity は t -test、Run length と Lifetime は Mann-Whitney U test でそれぞれ検定を行い、有意水準 0.05 で有意差があることを意味する。

Movie 22-23 参照。

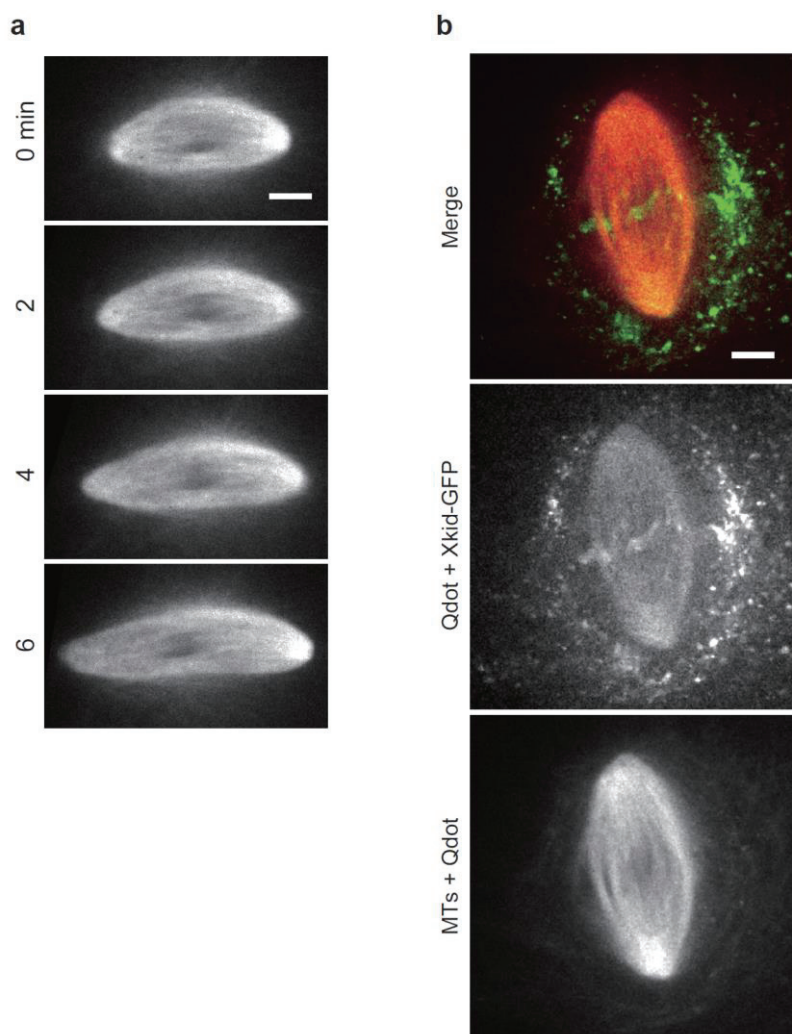


図 4-14 Hexylene glycol 存在下での Xkid-Qdot の観察

(a) 中期紡錘体の微小管蛍光画像。Hexylene glycol を最終濃度 2% (v/v) でエクストラクトに加えると、中期紡錘体は徐々に長軸方向に伸長した。スケールバーは 10 μm 。

(b) Hexylene glycol 存在下での Xkid-Qdot の観察 (緑 Xkid-Qdot ; 赤、微小管)。Xkid-Qdot は染色体上と紡錘体微小管上にも存在したが、Hexylene glycol により紡錘体周りで重合した微小管に吸着し運動するものが多数を占めた。スケールバーは 10 μm 。

Movie 24 参照。

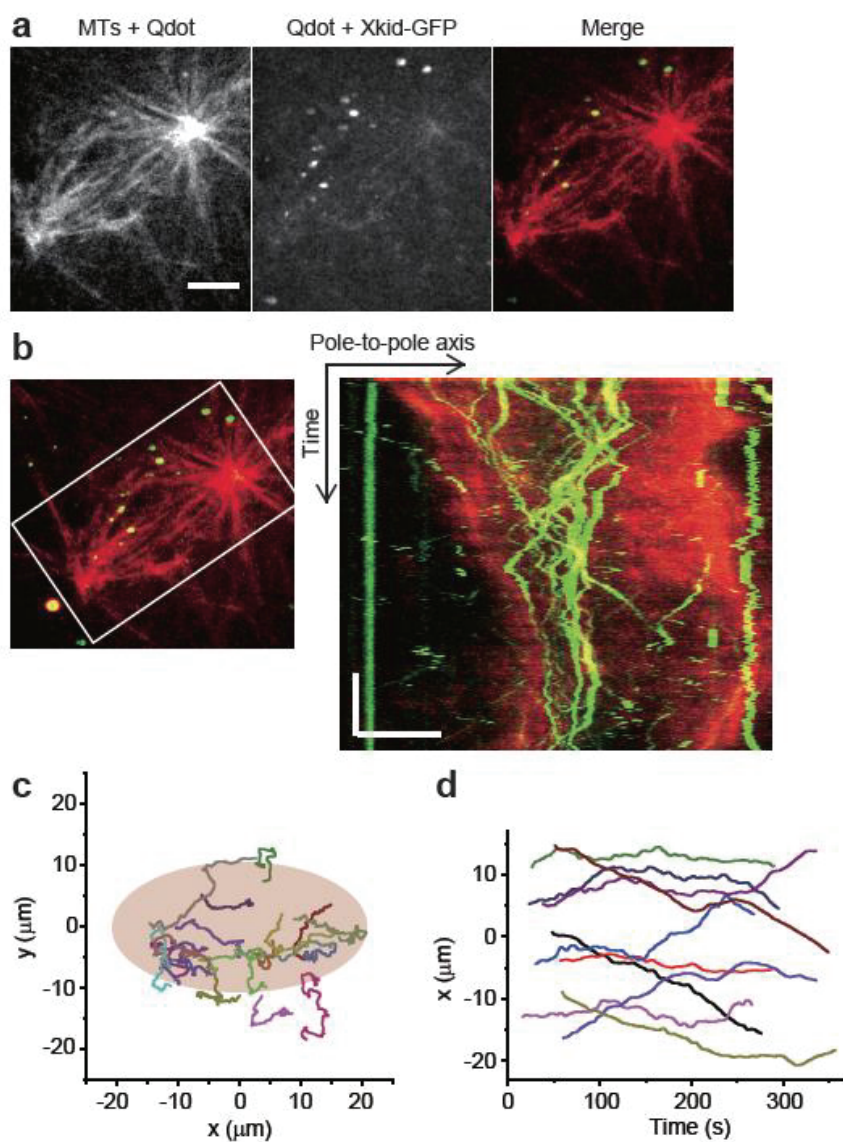


図 4-15 DMSO aster 内での Xkid-Qdot の観察

- (a) DMSO aster 内での Xkid-Qdot の分布 (緑 Xkid ; 赤、微小管)。DMSO を最終濃度 2.5% で CSF エクストラクトに加えた。2 つの DMSO aster が相互作用している。Xkid-Qdot は DMSO aster の微小管上で観察された。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。
- (b) DMSO aster 内での Xkid-Qdot の運動の観察 (緑 Xkid ; 赤、微小管)。右の Kymograph は、左の白い四角で囲った領域全体を四角の長軸に沿って Kymograph を作成した後、全ての Kymograph を最大蛍光強度で合成したものである。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ と 100 s である。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

(c), (d) DMSO aster 内での Xkid-Qdot の運動の軌跡。Xkid-Qdot は複数の微小管を乗り換えながら運動している。DMSO aster の微小管は非常に動きが激しいため、Xkid-Qdot の運動の様子は動画の方が確認しやすい。

Movie 25 参照。

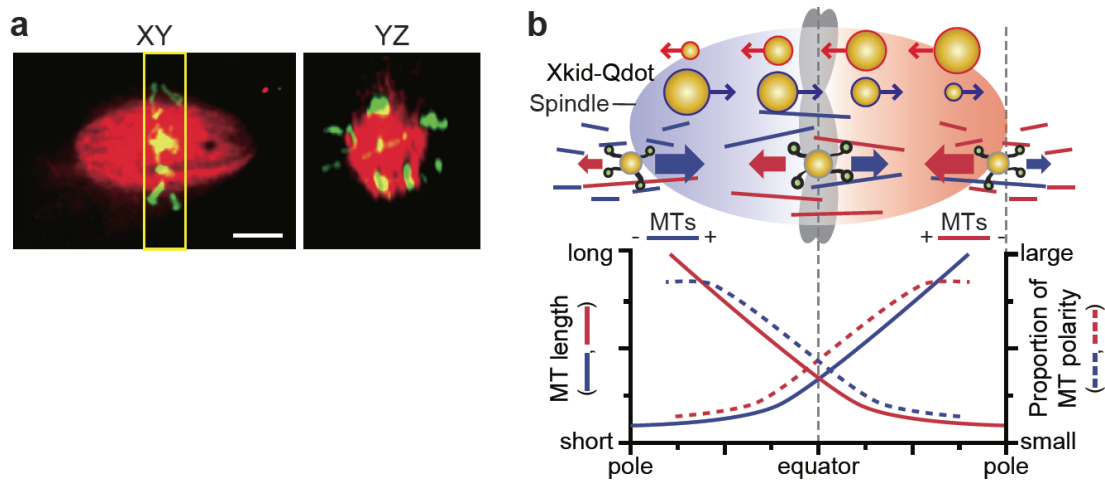


図 4-16 Prometaphase belt と、まとめの図

- (a) アフリカツメガエル卵エクストラクト系で形成させた紡錘体の Prometaphase belt (緑 DNA ; 赤、微小管)。3次元観察を用い、赤道面上 (YZ) の染色体の配置を観察した。YZ 面の画像は、XY 面の画像の黄色い四角で囲った領域について、3次元データの Projection (最大蛍光強度) をとったものである。DNA は Sytox-green を用いて可視化した。スケールバーは 10 μm である。染色体が赤道面の縁に配置され、マウスの卵母細胞と同じように Prometaphase belt が形成されていることが分かった。
- (b) Xkid-Qdot の紡錘体内での運動の模式図。Xkid-Qdot の運動は黄色の円で表され、円の大きさは各領域での運動方向の割合を示す。グラフ中の点線と実線はそれぞれ、微小管の方向性の割合と微小管の平均長を示す。微小管の方向性の割合と平均長は、紡錘体の赤道面を中心に対称な分布をしている。Xkid-Qdot は対称な微小管構造を反映するような運動を行うことで、紡錘体の赤道面に集積すると考えられる。

4 染色体結合キネシン Xkid の紡錘体内における運動の観察

表 4-1 紡錘体内と、Monastrol 存在下の単極性構造物、2 極性構造物内における Xkid-Qdot の運動

	Mode	average	s.e.m.	n	
Meiotic spindle		5353	324	170	
	Total run length (nm)				
			35.4	2.4	170
	Total lifetime (s)				
		Equator	136	1	2497
	Instantaneous velocity (nm s ⁻¹)	Pole	125	1	1178
		E-P	92	2	1670
		Equator	2315	182	245
	Run length (nm)	Pole	1299	141	170
		E-P	275	5	341
		Equator	17.4	1.3	245
	Lifetime (s)	Pole	10.8	1	170
E-P		2.2	0.1	341	
Monopolar MT structure		2450	162	569	
	Total run length (nm)				
			20.6	0.8	569
	Total lifetime (s)				
		Outward	127	2	6566
	Instantaneous velocity (nm s ⁻¹)	Pole	123	3	2437
		O-P	96	5	4454
		Outward	1766	86	674
	Run length (nm)	Pole	1098	81	349
		O-P	361	13	804
		Outward	12.1	0.3	674
	Lifetime (s)	Pole	6.8	0.4	349
O-P		5.9	1.1	804	
Bipolar MT structure		1547	59	518	
	Total run length (nm)				
			20.7	0.7	518
	Total lifetime (s)				
		Outward	102	2	3481
	Instantaneous velocity (nm s ⁻¹)	Pole	94	3	2421
		O-P	81	4	7890
		Outward	637	19	581
	Run length (nm)	Pole	433	21	452
		O-P	324	7	1177
		Outward	4.6	0.1	581
	Lifetime (s)	Pole	4.1	0.2	452
O-P		2.3	0.3	1177	

表 4-2 紡錘体内における Xkid-Qdot の運動の領域依存性についての検定結果

Instantaneous velocity												
Distance from equator (AU)	Mode	Distance from equator (AU)									mean \pm s.e.m. (nm s ⁻¹)	n
		0-0.25 E	0.25-0.5 E	0.5-0.75 E	0-0.25 P	0.25-0.5 P	0.5-0.75 P	0-0.25 E-P	0.25-0.5 E-P	0.5-0.75 E-P		
0-0.25	E		0.000	0.000	0.000	0.098	0.446	0.284	0.203	0.177	119 \pm 3	789
0.25-0.5	E	***		0.056	0.976	0.002	0.053	0.000	0.000	0.105	143 \pm 2	1057
0.5-0.75	E	***	*		0.175	0.001	0.058	0.000	0.000	0.053	142 \pm 1	510
0-0.25	P	***				0.042	0.219	0.000	0.000	0.270	128 \pm 1	623
0.25-0.5	P	*	***	***	**		0.855	0.047	0.048	0.796	121 \pm 2	427
0.5-0.75	P		*	*				0.357	0.355	0.807	113 \pm 6	100
0-0.25	E-P		***	***	***	**			0.777	0.114	89 \pm 3	746
0.25-0.5	E-P		***	***	***	**				0.120	94 \pm 2	630
0.5-0.75	E-P			*							98 \pm 3	236

Run length												
Distance from equator (AU)	Mode	Distance from equator (AU)									mean \pm s.e.m. (nm)	n
		0-0.25 E	0.25-0.5 E	0.5-0.75 E	0-0.25 P	0.25-0.5 P	0.5-0.75 P	0-0.25 E-P	0.25-0.5 E-P	0.5-0.75 E-P		
0-0.25	E		0.937	0.071	0.007	0.130	0.009	0.000	0.000	0.000	2306 \pm 293	111
0.25-0.5	E			0.070	0.002	0.150	0.005	0.000	0.000	0.000	2839 \pm 440	88
0.5-0.75	E	*	*		0.862	0.563	0.253	0.000	0.000	0.000	1516 \pm 218	38
0-0.25	P	***	***			0.264	0.242	0.000	0.000	0.000	1420 \pm 238	73
0.25-0.5	P						0.060	0.000	0.000	0.000	1664 \pm 494	71
0.5-0.75	P	***	***			*		0.000	0.000	0.000	719 \pm 168	23
0-0.25	E-P	***	***	***	***	***	***		0.062	0.004	217 \pm 7	147
0.25-0.5	E-P	***	***	***	***	***	***	*		0.079	247 \pm 15	129
0.5-0.75	E-P	***	***	***	***	***	***	***	*		546 \pm 56	53

Lifetime												
Distance from equator (AU)	Mode	Distance from equator (AU)									mean \pm s.e.m. (s)	n
		0-0.25 E	0.25-0.5 E	0.5-0.75 E	0-0.25 P	0.25-0.5 P	0.5-0.75 P	0-0.25 E-P	0.25-0.5 E-P	0.5-0.75 E-P		
0-0.25	E		0.920	0.063	0.070	0.132	0.009	0.000	0.000	0.000	17.5 \pm 2.1	111
0.25-0.5	E			0.069	0.065	0.154	0.009	0.000	0.000	0.000	19.2 \pm 1.4	88
0.5-0.75	E	*	*		0.727	0.510	0.280	0.000	0.000	0.000	10.5 \pm 1.4	38
0-0.25	P	*	*			0.658	0.077	0.000	0.000	0.000	13.9 \pm 3.9	73
0.25-0.5	P						0.060	0.000	0.000	0.000	14.1 \pm 2.5	71
0.5-0.75	P	***	***		*	*		0.000	0.000	0.000	6.3 \pm 0.9	23
0-0.25	E-P	***	***	***	***	***	***		0.851	0.752	2.7 \pm 0.3	147
0.25-0.5	E-P	***	***	***	***	***	***			0.855	4.9 \pm 0.6	129

* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$.

5 まとめ

5.1 本研究のまとめ

本研究では、中期紡錘体の大きな特徴である、ラグビーボール状の形状、赤道面に集積した染色体の 2 点に着目した。紡錘体は、切っても、くっつけても、変形させても、最終的に同じような形に戻った。このような紡錘体構造の動的な安定性は、微小管や分子モーターが常にエネルギーを消費しながら局所構造を修復できることによっている。本研究では、紡錘体の形状、微小管量・密度の定量的な解析と、力学測定からこの修復の様子を明らかにした。

紡錘体の構造が常に維持されることは、2 極性の左右対称な形が常に維持されるということである。それにより、紡錘体内部の微小管の方向性分布は、赤道面を中心とする左右対称性が保たれると考えられる。Xkid の観察により、この左右対称な微小管方向性の分布が、染色体の赤道面への輸送の構造的基盤となっていることが示された。つまり、紡錘体の微小管構造の安定性が、染色体の赤道面への安定した集積という、中期紡錘体の最も重要な機能に直結していることになる。

5.2 課題と今後の展望

生体内構造は、分子が力を発生することで形成される。紡錘体形状の力学特性の測定により、「構造」と「力」の関係を定量的に示すことができた。今後は、「力」と「分子」の関係を明らかにすることを目指す。粘弾性的性質のうち、粘性項、弾性項はそれぞれどのような分子が担っているのかを調べる。予備的な実験として、AMPPNP を溶液中に加えると、紡錘体が硬くなることが分かっている。この結果から、Eg5 などの分子モーターが紡錘体の力学的性質に寄与していることが示唆された。どの分子が紡錘体のどのような力学的性質に寄与しているかを明らかにするため、分子の機能阻害実験や、分子動態の直接観察によって、分子から力、そして構造形成に至る道筋を明らかにしたい。また、本研究で

は中期紡錘体を取りあげたが、その形状は中期にとどまる限り非常に安定している（定常状態）。しかし、分裂後期に入ると、紡錘体は伸長し、非定常状態となる。これまでの多くの研究により、分子機能の変化、例えば紡錘体極での微小管の脱重合が収まるといったことが分裂後期における非定常状態の原因として挙げられてきたが、力学的側面からも、分裂中期～後期にいたる紡錘体の構造変化と安定性の変化の原因を探りたい。

一方、染色体の赤道面への集積に関しては、Xkidの動態を直接観察することによって、紡錘体内での「分子」の性質を明らかにすることができた。しかし、染色体を動かすのは力であって、分子が紡錘体内でどのような力を発生しているのかを明らかにする必要がある。紡錘体内で染色体がXkidからの力をどのように感じているのか、紡錘体内に赤道面を中心としたポテンシャルのようなものが存在するのか、などに注目して今後の研究を進めていきたい。

動画

スケールバーは全て 10 μm 。時間は分：秒。

1. ガラス面上を運動する微小管の蛍光画像。最初に現れる静止画は、蛍光チューブリンで微小管全体を染めたもの。途中からは、微小管の Speckle 画像。
2. 紡錘体の 3 次元画像。左から微小管、DNA、およびこの 2 つを合成した画像。
3. 紡錘体の切断（微小管）。
4. 紡錘体の融合（微小管）。
5. 紡錘体の等速伸長（赤：微小管、緑：DNA）。伸長速度は 1.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。
6. 紡錘体の等速伸長（微小管）。伸長速度は 10.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。
7. 紡錘体の等速伸長（微小管）。伸長速度は 1.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。
8. 紡錘体の等速伸長（微小管）。伸長速度は 0.1 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。
9. 紡錘体を伸長後、すぐに針の位置を元に戻す（微小管）。伸長速度は 1.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。
10. 紡錘体を伸長後、針を固定する（微小管）。伸長速度は 5.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。
11. 紡錘体を伸長後、針を固定する（微小管、3 次元画像）。左は伸長前、真ん中は伸長後すぐ、右は伸長後しばらくたってから。
12. 長軸方向の粘弾性特性の測定（微小管）。伸長速度は 0.1 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。柔らかい針の硬さは~1 nN/ μm 。
13. 長軸方向の粘弾性特性の測定（微小管）。伸長速度は 2.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。柔らかい針の硬さは~1 nN/ μm 。
14. 長軸方向の粘弾性特性の測定（微小管）。伸長速度は 5.0 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。柔らかい針の硬さは~1 nN/ μm 。
15. 紡錘体内での Xkid-Qdot の運動（赤：微小管、緑：Xkid-Qdot）。
16. 紡錘体内での抗 GFP 抗体付 Qdot の観察（赤：微小管、緑：Qdot）。GFP-Xkid をエクストラクト中に加えていない。微小管上を運動する Qdot は観察されなかった。
17. 紡錘体内の EB1 の蛍光画像。
18. 200 μM Monastrol 存在下で形成した単極性構造物（Monopolar）内の EB1 の蛍光画像。
19. 200 μM Monastrol 存在下で形成した 2 極性構造物（Bipolar）内の EB1 の蛍光画像。
20. 2.5 % DMSO (v/v) 存在下で形成した DMSO aster 内の EB1 の蛍光画像。
21. 200 μM Monastrol 存在下で形成した単極性構造物（Monopolar）内での Xkid-Qdot の運動（赤：微小管、緑：Xkid-Qdot）。

22. 200 μ M Monastrol 存在下で形成した 2 極性構造物 (Bipolar) 内での Xkid-Qdot の運動 (赤 : 微小管、緑 : Xkid-Qdot)。
23. 200 μ M Monastrol 存在下で形成した 3 極性構造物 (Tripolar) 内での Xkid-Qdot の運動 (赤 : 微小管、緑 : Xkid-Qdot)。
24. 2 % Hexylene glycol 存在下における紡錘体内での Xkid-Qdot の運動 (赤 : 微小管、緑 : Xkid-Qdot)。
25. 2.5 % DMSO (v/v) 存在下で形成した DMSO aster 内での Xkid-Qdot の運動 (赤 : 微小管、緑 : Xkid-Qdot)。

用語（英訳、和訳、正式名称、略称）

微小管（microtubule、MT）

チューブリン（tubulin）

MAPs（微小管結合タンパク質、microtubule associated proteins）

分子モーター（molecular motor）

キネシン（kinesin）

Dynein（ダイニン）

Xkid: キネシン 10 ファミリーに属する、*Xenopus* の Kid。「X」は *Xenopus* の意味。

紡錘体（spindle）

紡錘体極（spindle pole）

中心体（centrosome）

中心小体（centriole）

染色体（chromosome）

DNA (deoxyribonucleic acid、デオキシリボ核酸)

赤道面（equatorial plane）

星状体微小管（astral microtubule）

間期（interphase）、分裂前期（prophase）、分裂前中期（prometaphase）、分裂中期（metaphase）、

分裂後期（anaphase）

GTP (guanosine triphosphate)

ATP (adenosine triphosphate)

Monastrol（モナストロール）：キネシン 5 (Eg5)の機能阻害剤。

Qdot (quantum dot、量子ドット)

GFP (green fluorescent protein)

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)

参考文献

- Andersen, S. S. (2000). Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol.* *10*, 261–267.
- Antonio, C., Ferby, I., Wilhelm, H., Jones, M., Karsenti, E., Nebreda, a R., and Vernos, I. (2000). Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell* *102*, 425–435.
- Barr, A. R., and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J. Cell Sci.* *120*, 2987–2996.
- Bieling, P., Kronja, I., and Surrey, T. (2010). Microtubule motility on reconstituted meiotic chromatin. *Curr. Biol.* *20*, 763–769.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E. L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., and Surrey, T. (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* *450*, 1100–1105.
- Brugués, J., Nuzzo, V., Mazur, E., and Needleman, D. J. (2012). Nucleation and transport organize microtubules in metaphase spindles. *Cell* *149*, 554–564.
- Brust-Mascher, I., Sommi, P., Cheerambathur, D. K., and Scholey, J. M. (2009). Kinesin-5-dependent poleward flux and spindle length control in *Drosophila* embryo mitosis. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1749–1762.
- Budde, P. P., Kumagai, a, Dunphy, W. G., and Heald, R. (2001). Regulation of Op18 during spindle assembly in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* *153*, 149–158.
- Burbank, K. S., Mitchison, T. J., and Fisher, D. S. (2007). Slide-and-cluster models for spindle assembly. *Curr. Biol.* *17*, 1373–1383.
- Castoldi, M., and Vernos, I. (2006). Chromokinesin Xklp1 contributes to the regulation of microtubule density and organization during spindle assembly. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1451–1460.
- Charlebois, B. D., Kollu, S., Schek, H. T., Compton, D. a, and Hunt, A. J. (2011). Spindle pole mechanics studied in mitotic asters: dynamic distribution of spindle forces through compliant linkages. *Biophys. J.* *100*, 1756–1764.
- Crevel, I. M.-T. C., Alonso, M. C., and Cross, R. A. (2004). Monastrol stabilises an attached low-friction mode of Eg5. *Curr. Biol.* *14*, R411–2.

- Desai, A., Murray, A., Mitchison, T. J., and Walczak, C. E. (1999). No TitleThe use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function in vitro. *Methods Cell Biol* *61*, 385–412.
- Dinarina, A., Pugieux, C., Corral, M. M., Loose, M., Spatz, J., Karsenti, E., and Nédélec, F. (2009). Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell* *138*, 502–513.
- Dogterom, M., and Yurke, B. (1997). Measurement of the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules. *Science* (80-.). *278*, 856–860.
- Dumont, J., and Desai, A. (2012). Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. *Trends Cell Biol.* *22*, 241–249.
- Dumont, S., and Mitchison, T. J. (2009). Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol.* *19*, 1086–1095.
- Funabiki, H., and Murray, A. W. (2000). The *Xenopus* chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* *102*, 411–424.
- Gaetz, J., Gueroui, Z., Libchaber, A., and Kapoor, T. M. (2006). Examining how the spatial organization of chromatin signals influences metaphase spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* *8*, 924–932.
- Gaetz, J., and Kapoor, T. M. (2004). Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.* *166*, 465–471.
- Gatlin, J. C., Matov, A., Danuser, G., Mitchison, T. J., and Salmon, E. D. (2010). Directly probing the mechanical properties of the spindle and its matrix. *J. Cell Biol.* *188*, 481–489.
- Gatlin, J. C., Matov, A., Groen, A. C., Needleman, D. J., Maresca, T. J., Danuser, G., Mitchison, T. J., and Salmon, E. D. (2009). Spindle fusion requires dynein-mediated sliding of oppositely oriented microtubules. *Curr. Biol.* *19*, 287–296.
- Goshima, G., Wollman, R., Stuurman, N., Scholey, J. M., and Vale, R. D. (2005). Length control of the metaphase spindle. *Curr. Biol.* *15*, 1979–1988.
- Hannak, E., and Heald, R. (2006). Investigating mitotic spindle assembly and function in vitro using *Xenopus laevis* egg extracts. *Nat. Protoc.* *1*, 2305–2314.

-
- Hara, Y., and Kimura, A. (2009). Cell-size-dependent spindle elongation in the *Caenorhabditis elegans* early embryo. *Curr. Biol.* *19*, 1549–1554.
- Hara, Y., and Kimura, A. (2013). An allometric relationship between mitotic spindle width, spindle length, and ploidy in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol. Biol. Cell* *24*, 1411–1419.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., and Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* *382*, 420–425.
- Heald, R., Tournebise, R., Habermann, A., Karsenti, E., and Hyman, A. (1997). Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J. Cell Biol.* *138*, 615–628.
- Houghtaling, B. R., Yang, G., Matov, A., Danuser, G., and Kapoor, T. M. (2009). Op18 reveals the contribution of nonkinetochore microtubules to the dynamic organization of the vertebrate meiotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15338–15343.
- Hyman, A., Drechsel, D., Kellogg, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P., Wordeman, L., and Mitchison, T. (1991). Preparation of modified tubulins. *Methods Enzym.* *196*, 478–485.
- Itabashi, T., Takagi, J., Shimamoto, Y., Onoe, H., Kuwana, K., Shimoyama, I., Gaetz, J., Kapoor, T. M., and Ishiwata, S. (2009). Probing the mechanical architecture of the vertebrate meiotic spindle. *Nat. Methods* *6*, 167–172.
- Itabashi, T., Terada, Y., Kuwana, K., Kan, T., Shimoyama, I., and Ishiwata, S. (2012). Mechanical impulses can control metaphase progression in a mammalian cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 7320–7325.
- Kaláb, P., Pralle, A., Isacoff, E. Y., Heald, R., and Weis, K. (2006). Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* *440*, 697–701.
- Kapitein, L. C., Peterman, E. J. G., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M., and Schmidt, C. F. (2005). The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* *435*, 114–118.
- Kapoor, T. M., Lampson, M. a, Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E. D., McEwen, B. F., and Khodjakov, A. (2006). Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* *311*, 388–391.
-

- Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., and Mitchison, T. J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* *150*, 975–988.
- Kapoor, T. M., and Mitchison, T. J. (2001). Eg5 is static in bipolar spindles relative to tubulin: evidence for a static spindle matrix. *J. Cell Biol.* *154*, 1125–1133.
- Kitajima, T. S., Ohsugi, M., and Ellenberg, J. (2011). Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* *146*, 568–581.
- Krzysiak, T. C., Wendt, T., Sproul, L. R., Tittmann, P., Gross, H., Gilbert, S. P., and Hoenger, A. (2006). A structural model for monastrol inhibition of dimeric kinesin Eg5. *EMBO J.* *25*, 2263–2273.
- Kwok, B. H., Kapitein, L. C., Kim, J. H., Peterman, E. J. G., Schmidt, C. F., and Kapoor, T. M. (2006). Allosteric inhibition of kinesin-5 modulates its processive directional motility. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 480–485.
- Lakämper, S., Thiede, C., Düselder, A., Reiter, S., Korneev, M. J., Kapitein, L. C., Peterman, E. J. G., and Schmidt, C. F. (2010). The Effect of Monastrol on the Processive Motility of a Dimeric Kinesin-5 Head/Kinesin-1 Stalk Chimera. *J. Mol. Biol.* *399*, 1–8.
- Levesque, a a, and Compton, D. a (2001). The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *J. Cell Biol.* *154*, 1135–1146.
- Loughlin, R., Riggs, B., and Heald, R. (2008). SnapShot: motor proteins in spindle assembly. *Cell* *134*, 548–548.e1.
- Loughlin, R., Wilbur, J. D., McNally, F. J., Nédélec, F. J., and Heald, R. (2011). Katanin contributes to interspecies spindle length scaling in *Xenopus*. *Cell* *147*, 1397–1407.
- Lüders, J., and Stearns, T. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 161–167.
- Lynch, H. A. (2003). Effect of Fiber Orientation and Strain Rate on the Nonlinear Uniaxial Tensile Material Properties of Tendon. *J. Biomech. Eng.* *125*, 726.
- Maddox, P., Desai, A., Oegema, K., Mitchison, T. J., and Salmon, E. D. (2002). Poleward microtubule flux is a major component of spindle dynamics and anaphase a in mitotic *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* *12*, 1670–1674.
-

-
- Maddox, P., Straight, A., Coughlin, P., Mitchison, T. J., and Salmon, E. D. (2003). Direct observation of microtubule dynamics at kinetochores in *Xenopus* extract spindles: implications for spindle mechanics. *J. Cell Biol.* *162*, 377–382.
- Magidson, V., O’Connell, C. B., Lončarek, J., Paul, R., Mogilner, A., and Khodjakov, A. (2011). The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell* *146*, 555–567.
- Manning, A. L., and Compton, D. a (2008). SnapShot: Nonmotor proteins in spindle assembly. *Cell* *134*, 694.
- Mayer, T. U. (1999). Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* (80-.). *286*, 971–974.
- Mazumdar, M., and Misteli, T. (2005). Chromokinesins: multitasked players in mitosis. *Trends Cell Biol.* *15*, 349–355.
- McIntosh, J. R., Molodtsov, M. I., and Ataullakhanov, F. I. (2012). Biophysics of mitosis. *Q. Rev. Biophys.* *45*, 147–207.
- McNally, K., Audhya, A., Oegema, K., and McNally, F. J. (2006). Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J. Cell Biol.* *175*, 881–891.
- Merdes, a, Ramyar, K., Vechio, J. D., and Cleveland, D. W. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* *87*, 447–458.
- Meunier, S., and Vernos, I. (2012). Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *J. Cell Sci.* *125*, 2805–2814.
- Mitchison, T. J., Maddox, P., Gaetz, J., Groen, A., Shirasu, M., Desai, A., Salmon, E. D., and Kapoor, T. M. (2005). Roles of polymerization dynamics, opposed motors, and a tensile element in governing the length of *Xenopus* extract meiotic spindles. *Mol. Biol. Cell* *16*, 3064–3076.
- Miyamoto, D. T., Perlman, Z. E., Burbank, K. S., Groen, A. C., and Mitchison, T. J. (2004). The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J. Cell Biol.* *167*, 813–818.
- Moore, A., and Wordeman, L. (2004). The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis. *Trends Cell Biol.* *14*, 537–546.
-

- Murray, A. W. (1991). Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* *36*, 581–605.
- Nicklas, R. B., and Gordon, G. W. (1985). The total length of spindle microtubules depends on the number of chromosomes present. *J. Cell Biol.* *100*, 1–7.
- Oguchi, Y., Uchimura, S., Ohki, T., Mikhailenko, S. V., and Ishiwata, S. (2011). The bidirectional depolymerizer MCAK generates force by disassembling both microtubule ends. *Nat. Cell Biol.* *13*, 846–852.
- Ohi, R., Burbank, K., Liu, Q., and Mitchison, T. J. (2007). Nonredundant functions of Kinesin-13s during meiotic spindle assembly. *Curr. Biol.* *17*, 953–959.
- Ohsugi, M., Adachi, K., Horai, R., Kakuta, S., Sudo, K., Kotaki, H., Tokai-Nishizumi, N., Sagara, H., Iwakura, Y., and Yamamoto, T. (2008). Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelope formation. *Cell* *132*, 771–782.
- Parsons, S. F., and Salmon, E. D. (1997). Microtubule assembly in clarified *Xenopus* egg extracts. *Cell Motil. Cytoskeleton* *36*, 1–11.
- Perez, L. H., Antonio, C., Flament, S., Vernos, I., and Nebreda, A. R. (2002). Xkid chromokinesin is required for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus laevis* oocytes. *Nat. Cell Biol.* *4*, 737–742.
- Petry, S., Groen, A. C., Ishihara, K., Mitchison, T. J., and Vale, R. D. (2013). Branching microtubule nucleation in *Xenopus* egg extracts mediated by augmin and TPX2. *Cell* *152*, 768–777.
- Rajagopalan, H., and Lengauer, C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature* *432*, 338–341.
- Reber, S. B., Baumgart, J., Widlund, P. O., Pozniakovsky, A., Howard, J., Hyman, A. a, and Jülicher, F. (2013). XMAP215 activity sets spindle length by controlling the total mass of spindle microtubules. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1–8.
- Rieder, C. L., Davison, E. a, Jensen, L. C., Cassimeris, L., and Salmon, E. D. (1986). Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. *J. Cell Biol.* *103*, 581–591.
- Rieder, C. L., and Salmon, E. D. (1994). Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J. Cell Biol.* *124*, 223–233.

-
- Roostalu, J., Hentrich, C., Bieling, P., Telley, I. a, Schiebel, E., and Surrey, T. (2011). Directional switching of the kinesin Cin8 through motor coupling. *Science* 332, 94–99.
- Rubinstein, B., Larripa, K., Sommi, P., and Mogilner, a (2009). The elasticity of motor-microtubule bundles and shape of the mitotic spindle. *Phys. Biol.* 6, 016005.
- Salmon, E. D., Leslie, R. J., Saxton, W. M., Karow, M. L., and McIntosh, J. R. (1984). Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: analysis using a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. *J. Cell Biol.* 99, 2165–2174.
- Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M., and Mitchison, T. J. (1992). Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* 359, 540–543.
- Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1991a). Poleward microtubule flux mitotic spindles assembled in vitro. *J. Cell Biol.* 112, 941–954.
- Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1991b). Poleward microtubule flux mitotic spindles assembled in vitro. *J. Cell Biol.* 112, 941–954.
- Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1994). Microtubule flux in mitosis is independent of chromosomes, centrosomes, and antiparallel microtubules. *Mol. Biol. Cell* 5, 217–226.
- Schiff, P. B., and Horwitz, S. B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1561–1565.
- Scholey, J. M., Brust-Mascher, I., and Mogilner, A. (2003). Cell division. *Nature* 422, 746–752.
- Shimamoto, Y., and Kapoor, T. M. (2012). Microneedle-based analysis of the micromechanics of the metaphase spindle assembled in *Xenopus laevis* egg extracts. *Nat. Protoc.* 7, 959–969.
- Shimamoto, Y., Maeda, Y. T., Ishiwata, S., Libchaber, A. J., and Kapoor, T. M. (2011). Insights into the micromechanical properties of the metaphase spindle. *Cell* 145, 1062–1074.
- Stearns, T., and Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* 76, 623–637.
- Stumpff, J., Wagenbach, M., Franck, A., Asbury, C. L., and Wordeman, L. (2012). Kif18A and chromokinesins confine centromere movements via microtubule growth suppression and spatial control of kinetochore tension. *Dev. Cell* 22, 1017–1029.
-

Svoboda, K., and Block, S. M. (1994). Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* *77*, 773–784.

Tirnauer, J. S., Grego, S., Salmon, E. D., and Mitchison, T. J. (2002). EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3614–3626.

Tirnauer, J. S., Salmon, E. D., and Mitchison, T. J. (2004). Microtubule plus-end dynamics in *Xenopus* egg extract spindles. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1776–1784.

Tokai-Nishizumi, N., Ohsugi, M., Suzuki, E., and Yamamoto, T. (2005). The chromokinesin Kid is required for maintenance of proper metaphase spindle size. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5455–5463.

Uteng, M., Hentrich, C., Miura, K., Bieling, P., and Surrey, T. (2008). Poleward transport of Eg5 by dynein-dynactin in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J. Cell Biol.* *182*, 715–726.

Verde, F., Berrez, J. M., Antony, C., and Karsenti, E. (1991). Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* *112*, 1177–1187.

Verde, F., Dogterom, M., Stelzer, E., Karsenti, E., and Leibler, S. (1992). Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* *118*, 1097–1108.

Vernos, I., Raats, J., Hirano, T., Heasman, J., Karsenti, E., and Wylie, C. (1995). Xklp1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning. *Cell* *81*, 117–127.

Walczak, C. E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 91–102.

Walczak, C. E., and Heald, R. (2008). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int. Rev. Cytol.* *265*, 111–158.

Walczak, C. E., Vernos, I., Mitchison, T. J., Karsenti, E., and Heald, R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr. Biol.* *8*, 903–913.

-
- Wandke, C. *et al.* (2012). Human chromokinesins promote chromosome congression and spindle microtubule dynamics during mitosis. *J. Cell Biol.* *198*, 847–863.
- Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., Scholey, J. M., and Mogilner, A. (2008). Reverse engineering of force integration during mitosis in the *Drosophila* embryo. *Mol. Syst. Biol.* *4*, 195.
- Wühr, M., Chen, Y., Dumont, S., Groen, A. C., Needleman, D. J., Salic, A., and Mitchison, T. J. (2008). Evidence for an upper limit to mitotic spindle length. *Curr. Biol.* *18*, 1256–1261.
- Yajima, J., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Tokai-Nishizumi, N., Yamamoto, T., and Toyoshima, Y. Y. (2003). The human chromokinesin Kid is a plus end-directed microtubule-based motor. *EMBO J.* *22*, 1067–1074.
- Yang, G., Cameron, L. a, Maddox, P. S., Salmon, E. D., and Danuser, G. (2008). Regional variation of microtubule flux reveals microtubule organization in the metaphase meiotic spindle. *J. Cell Biol.* *182*, 631–639.
- Yang, G., Houghtaling, B. R., Gaetz, J., Liu, J. Z., Danuser, G., and Kapoor, T. M. (2007). Architectural dynamics of the meiotic spindle revealed by single-fluorophore imaging. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1233–1242.

研究業績

論文

Jun Takagi, 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.

Biophysical Journal, in press.

Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki, Tarun M. Kapoor, Yuta Shimamoto, and Shin'ichi Ishiwata.

Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size.

Cell Reports 5:44-50 (2013).

Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Kazuya Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata.

Chromosome position at the spindle equator is regulated by chromokinesin and a bipolar microtubule array.

Scientific Reports 3, 2808. (2013).

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Kazuya Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata.

Responses of chromosome segregation machinery to mechanical perturbations.

BIOPHYSICS 9:73-78. (2013).

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. 49:250-251. (2009).

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, 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.

Nat Methods. 6:167-72. (2009).

学会発表

- ・ 国際学会

Kazuya Suzuki, Jun Takagi, 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.

Jun Takagi, 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.

Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Yuta Shimamoto, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata.

Probing the force-balancing mechanism of the meiotic spindle in *Xenopus* egg extracts.

The Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA, Feb 2010, Poster.

Shin'ichi Ishiwata, Yusuke Oguchi, Sergey V. Mikhailenko, Madoka Suzuki, Katsuhiko Sato, Masako Ohtaki, Yuta Shimamoto, Kazuya Suzuki, Jun Takagi, 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.

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, 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.

Jun Takagi, 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.

Jun Takagi, 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.

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, Hiroaki Onoe, Kenta Kuwana, Isao Shimoyama, 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, Long beach USA, Feb 2008, Oral.

Jun Takagi, 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.

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, 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.

・国内学会

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

鈴木和也、高木潤、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

谷田部聡、高木潤、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

鈴木和也、高木潤、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

高木潤、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

鈴木 和也、高木 潤、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

鈴木 和也、高木 潤、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

板橋 岳志、高木 潤、島本 勇太、尾上 弘晃、桑名 健太、下山 勲、Jedidiah Gaetz、
Tarun M. Kapoor、石渡 信一

減数分裂紡錘体の力学的特徴付け

第 46 回 日本生物物理学会、福岡、2008 年 12 月、ポスター

高木 潤、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

Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Tarun M. Kapoor, Shin'ichi Ishiwata.

Effects of physical perturbation on the dynamic properties of metaphase spindle.

第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008 年 12 月

高木 潤、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

高木 潤、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

板橋 岳志、阿部 祐大、高木 潤、山田 裕美、島本 勇太、Jedidiah Gaetz、Jenny Z. Liu、

Tarun M. Kapoor、石渡 信一

抽出した有糸分裂紡錘体のダイナミクス —顕微操作と観察—、2007 年 生体運動研究合同

班会議、金沢、2007 年 1 月、口頭

謝辞

本研究にあたり、ご指導いただきました石渡信一教授に心から感謝いたします。やりたいように研究をやらせていただき、回り道もしましたが、楽しく研究をさせていただきました。また、それと同時に論文を作成する上での厳しさも学ぶことができ、非常に有意義な研究生活を送ることができました。また、本研究の遂行と本論文の作成にあたり、貴重なご意見をくださいました木下一彦教授（早大・理工・物理）、高野光則教授（早大・理工・物理）に心から感謝いたします。

ピペットマンの使い方に始まり、研究生活のすべてのことを親身にご指導いただいた板橋岳志博士に、心より感謝いたします。本研究は、私が石渡研に入る1~2年前、ロックフェラー大学の Tarun Kapoor 教授のご指導の下、板橋岳志博士、島本勇太博士（ロックフェラー大学博士研究員）によって石渡研にアフリカツメガエルエクストラクト系が導入されたことに端を発します。非常に難しい実験系であり、何年にもわたり試行錯誤を繰り返してきました。Kapoor 教授、板橋博士、島本博士をはじめ、この系に携わった、鈴木和也くん、田邊優敏くん、卒業生の原田昌彦さん、佐藤静香さん、阿部祐大さん、山田裕美さん、谷田部聡くん、のみなさんの尽力なしには本研究はなしえませんでした。皆様に心から感謝いたします。また、活発な議論をしていただいた研究室の皆様に心から感謝いたします。