

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論 文 題 目

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

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

申 請 者

高木	潤
Jun	TAKAGI

物理学及応用物理学専攻 実験生物物理学研究

2014 年 2 月

紡錘体は、微小管（チューブリンの繊維状重合体）を骨格とし、様々な分子モーターや微小管結合タンパク質が介在することで自己組織的に形成される、大きさ 10-50 μm の超分子集合体である。細胞分裂期に入って核膜が崩壊すると、紡錘体の形成が始まる。分裂中期までに紡錘体はラグビーボール状となり、複製された一对の染色体は紡錘体の赤道面に整列する。分裂後期に入ると、紡錘体は長軸方向に伸長し、染色体は 2 等分されて 2 つの紡錘体極へ輸送される。それとともに、細胞膜上に形成された収縮環が収縮することによって、細胞は 2 つの娘細胞に分裂する。本研究では、中期紡錘体の形状がどのように制御されているか、中期紡錘体中の染色体が赤道面に整列する仕組みは何か、この 2 点に着目した。そのため申請者は、アフリカツメガエル卵抽出液という半人工系の中で自己組織化される紡錘体を対象に、マイクロ力学計測を行った。

これまでの申請者らの研究によって、紡錘体の形状は外力により変形しても、しばらくすると元に戻ることが分かっていた。そこで本研究では、紡錘体の形状を特徴づけるパラメータの導出、各パラメータの評価、紡錘体の力学特性の測定を通して、紡錘体の形状安定性のメカニズムを調べた。

第 1 章は、本研究の背景と目的、そして本論文の概要をまとめた序章である。

第 2 章では、本研究で用いた実験材料とそれらの調製法（アフリカツメガエル卵抽出液、蛍光性（GFP）タンパク質、量子 dot（Qdot）ラベルタンパク質など）、そして、用いた装置（落射蛍光・共焦点顕微鏡、マイクロ力学操作系など）と方法（粘弾性測定のための顕微操作・顕微解析法、紡錘体の粘弾性モデル、分子モーター・微小管動態の観察・記録）について説明されている。

第 3 章では、まず中期紡錘体の形状パラメータの導出が行われた。紡錘体を 3 次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が見出された。つぎに、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変動幅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が示唆された。その上、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、 $L^3 = M/D\alpha^2\gamma$ という関係式が導かれた。この式中では α 、 γ 、 D が L によらないことから、微小管量 M を変化させると、長軸 L がそれに応じて変化することが示唆された。そこで、2 本の微小ガラス針を用いて紡錘体を長軸に沿って 2 つに切断することで、1 つの構造物あたりの微小管量を力学的に、しかも短時間の操作（ ~ 10 s）でそれぞれ半分以下に減少させた。切断操作によって生じた 2 つの紡錘体断片は大きく変形するが、それぞれ 5 分以内に正常な形に回復した。断片 1 つあたりの微小管量は、切断前の紡錘体の微小管量の 3 分の 1 程度で、断片の大きさも切断前の紡錘体より小さくなり、切断後 20 分ほど観察し続けても小さいままであった。断片について、大きさと微小管量の関係を調べたところ、切断前の紡錘体におけ

る関係と同じ関係を持つことが分かった。次に 2 つの断片を、ガラス針を操作して接触させると、2 つの断片は融合し、1 つの紡錘体となった。この紡錘体の大きさと微小管量は、切断前のものに近くなった。切断・融合実験の結果を定量的に評価するため、形と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かった。つまり、紡錘体の大きさ L は、形や微小管密度でなく、微小管量 M と相関があり、切断後もその関係が成り立つことが確認された。

次に、個々の紡錘体の形状がどのように制御されているかを探るため、微小ガラス針を用いて紡錘体の力学特性を調べた。紡錘体に 2 本のガラス針を挿入し、片方のガラス針を紡錘体の長軸方向に沿って動かしていくと、ガラス針が紡錘体極付近で引っかかる。さらにガラス針を動かすと、紡錘体が長軸方向に伸長し、それと同時に短軸が短くなる。紡錘体の伸長に要する力を測定し弾性率を見積もったところ、ガラス針を比較的早く ($2 \mu\text{m/s}$) 動かしたときは $4 \text{ nN}/\mu\text{m}$ 程度であった。また、紡錘体は粘弾性的な特性を持ち、伸長速度を変えて伸長に要する力を測定したところ、長軸方向についての粘弾性的特性は Zener 型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見出された。また、伸長後ガラス針を固定し、紡錘体を伸長した状態で保持しておく、徐々に体積が元の値に戻ることが観察された。ここで観察された、紡錘体の持つ粘弾性的な性質や、体積の回復といった機構が、紡錘体形状の安定性に寄与していることが考えられる。

さらに、以上の結果をもとに、紡錘体の 2 次元的な粘弾性モデルを構築した。このモデルは紡錘体を 2 次元の菱形とみなし、菱形の辺に沿ったところに加えて、中央部を横切るところの 5 か所に Zener 型の粘弾性要素を配したものである。このモデルをもとに、紡錘体を長軸方向に引き伸ばす際にみられる縦横の変形と力の時間経過をある程度説明することができた。

第 4 章では、染色体の整列に関わる、キネシン Xkid の紡錘体内における動態を観察した。Xkid は染色体に結合し、結合した状態で微小管上を歩行することで、染色体を紡錘体の赤道面に整列させると考えられている。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ことも知られている。また *in vitro* 運動系で、Xkid は 1 分子では微小管上をほとんど動けないが、複数分子が一緒に働くと微小管上を長距離運動することが観察されている。しかし、紡錘体内での Xkid の運動は分かっていなかった。微小管には方向性があり、Xkid は微小管のプラス端に向かって運動する。紡錘体内では、プラス端を赤道面方向に、マイナス端を極方向に向けている微小管の割合が多い。つまり、紡錘体中の微小管の方向性の分布は赤道面を挟んで左右対称になっている。本研究では、このシステムの持つ特徴が、紡錘体内を運動する Xkid の動態にどのような影響を与えるかが調べられた。

本研究では、光退色の起こらない高輝度 $Qdot$ と呼ばれる蛍光微小粒子の表面に $Xkid$ を結合させることで、紡錘体内での $Xkid$ の運動を、 $Qdot$ の動きを通じて長時間観察することに成功した。 $Xkid$ が結合した $Qdot$ ($Xkid-Qdot$) は、紡錘体中の微小管の配向(長軸方向)に沿って、時折向きを変えながら長距離(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 $Xkid-Qdot$ の割合が多いのに対し、赤道面付近では、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、微小管の方向性分布を反映した運動をしていることが推察された。このことを確かめるため、紡錘体形成の際にキネシン 5 ($Eg5$) の阻害剤である $Monastrol$ を加えて、単極性の構造物を形成させた。この構造物中では 1 つの極から微小管が放射状に延びており、7・8 割の微小管が極から外向きの方向に延びている。この単極性構造内で $Xkid-Qdot$ の運動を観察したところ、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、紡錘体中の $Xkid$ は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、染色体対が配列するまでの時間、赤道面付近に滞在しうると結論された。こうして、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。

以上で述べたように申請者は、アフリカツメガエル卵抽出液中で自発的に形成される紡錘体を対象に、そのサイズと形状がどのように制御されているか、紡錘体中の染色体が赤道面に整列する仕組みはどのようなものか、という 2 つのテーマに取り組んだ。その結果、1) 紡錘体という染色体分配装置を、2 本のガラス微小針を巧みに顕微操作することによって、2 分割したり、自在に変形したり、それに必要な力を計測するなどして、紡錘体の粘弾性特性、構造安定性を定量的に顕微解析し、紡錘体の大きさや形状を特徴づけるパラメータの抽出に世界に先駆けて成功し、粘弾性モデルを構築した。さらに、2) 微小管上の染色体輸送を担う分子モーター $Xkid$ の運動特性を顕微解析し、多くの染色体対が紡錘体の中央部に集積する仕組みを明らかにした。これらの成果は、染色体分配を支える紡錘体構造の静的・動的制御機構を明らかにしたものであり、高く評価される。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。

2014 年 1 月

審査委員 主査	早稲田大学教授	理学博士(名古屋大学)	石渡信一
	早稲田大学教授	理学博士(東京大学)	木下一彦
	早稲田大学教授	博士(学術)(東京大学)	高野光則