

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

微小管ネットワークのミクロ力学と動的構造の研究：
紡錘体の対称性と細胞質流動に着目して

A study on the micromechanics and dynamic structure of
microtubule network:

Focusing on the spindle symmetry and cytoplasmic flow

申請者

| | |
|--------|--------|
| 鈴木 | 和也 |
| Kazuya | SUZUKI |

物理学及応用物理学専攻 実験生物物理学研究

2016年12月

本研究の目的は、細胞質において形成される微小管ネットワークの力学特性、動態を明らかにすることである。具体的には、細胞分裂時に構築される紡錘体の力学特性、そして細胞質流動時に観察されるような微小管渦構造を再構成し、動態を解析した。本概要では、まず1つ目のテーマ「紡錘体のミクロ力学」、そして2つ目のテーマ「微小管渦構造による細胞質流動」の順に説明する。

紡錘体は、微小管（チューブリンという球状タンパク質の円筒状重合体）のマイナス端（脱重合端）が2つの極に集合した紡錘形状をしている。このような二極構造は、様々な動物種で観察される、紡錘体の普遍的な性質の1つである。紡錘体の主要な役割は、中期において染色体を赤道面に整列させ、後期に2つの娘細胞へと牽引し、正確に二分することである。二極構造の形成の失敗は、染色体分配に支障をきたすことにつながり、ひいてはガンや重篤な遺伝病の引き金にもなり得るため、生物学だけでなく、医学的にも広く研究されている。

紡錘体を構成する微小管は、重合と脱重合を繰り返しているだけでなく、赤道面から両極に向けて輸送されており（微小管フラックス）、非常に動的な構造体である。このような動的な構造であるにも関わらず、紡錘形状は安定している。これまでの研究により、微小管を架橋しつつスライドさせる分子モーター（キネシン、ダイニン）や、微小管の重合・脱重合を制御する微小管結合タンパク質が紡錘体の二極構造の形成・維持に関与していることが知られている。そして、「これらのタンパク質がどのようにして二極構造を維持するのか」について、様々なモデルが提唱されている。有力なモデルの1つに、力のつり合いモデルがある。分子モーターは、微小管の配向に対して決まった方向に力を発生する（例えばキネシン-5はプラス端方向、ダイニンはマイナス端方向）。これらの力の釣り合いにより、構造が決定されるというモデルである。

近年、微小ガラス針や平板のカンチレバーを用いて紡錘体を顕微鏡下で直接変形することで、紡錘体の力学特性が定量的に調べられてきた（ガラス針やカンチレバーのたわみから、力を計測できる）。これらの研究の中で、紡錘体の極構造は紡錘体全体の力学特性に寄与していることが報告されている。しかしながら、極構造自体の力学特性は定量化されていなかった。また、紡錘体の形状や力学特性の左右対称性に注目している研究は存在しなかった。

申請者らはまず、紡錘体の極から、紡錘体の二極間距離の20%までの範囲を極領域と定義した。極領域の形状パラメーターを導出し、紡錘体が両極で対称であることを、定量的に確認した。次に、極領域に十分硬いガラス針と力を較正済みの柔らかいガラス針（バネ定数： $1\text{nN}/\mu\text{m}$ 程度）を挿入し、針の間を広げる方向に硬い針を移動、その際の柔らかい針のたわみから力を計測した。極領域の弾性を、「極領域を広げるのに必要な単位長さ当たりの力」と定義した。この手法により、紡錘体は形状だけでなく力学特性も左右対称であることを明らかにした。そして、従来モデルにおいて二極構造の形成に重要とされている、ダイニンやキネシン-5を機能阻害すると、弾性がそれぞれ低下、増大するが、両者ともに阻害すると、コントロールと同程度まで回復した。この結果は、二極紡錘形状の維持において、ダイニンとキネシン-5が拮抗関係にあることを示している。

先行研究において、紡錘体全体の弾性は微小管密度と相関することが報告されていることから、本研究においても微小管密度を計測し、弾性と比較した。その結果、微小管密度は両極でほぼ等しいこと、そして紡錘体極の弾性は架橋タンパク質に強く依存していることが明らかになった。また微小管密度においても、ダイニンとキネシン-5の拮抗関係が存在した。

次に、これまでに示してきた、紡錘体の両極領域における形状、弾性、微小管密度の対称性は動的に維持されているのかを確認するため、一方の極領域だけを2本のガラス針で広げ、その広がった状態を保持し続けた(非対称変形)。その結果、変形を加えていないもう一方の極領域が自発的に広がり、タル状の紡錘体が形成された。広げた極領域では微小管密度、弾性ともに大きく低下し、5分以内にもう一方の極領域でもこれらの値が低下した。この結果は、紡錘体が形状や力学特性を両極で対称的に維持する機構を備えていることを示唆している。対称性維持機構としては、次のようなことが考えられる。広げるという変形によって微小管同士の間隔が増加し、微小管架橋タンパク質が解離する。このような過程が、広げた極領域からもう一方の極領域へと連鎖的に生じ、最終的にもう一方の極領域も広がる。紡錘体形状の対称性は、ダイニンとキネシン-5の同時阻害時に比較的低下していた。これは、対称性を維持する能力が低下した結果だと推測し、同時阻害した紡錘体に対して非対称変形を行った。しかしこの条件下では、もう一方の極領域の形状に変化は見られなかった。微小管密度の低下は観察されたが、低下し始めるまでに20分以上経過した。このことは、密度の伝搬能力の低下が、形状の対称性を維持する能力の低下につながったことを示唆している。様々な種類の、多くのタンパク質が複雑に相互作用しながら紡錘体の形状は維持されているため、現段階で明確に分子機構を理解することは難しい。しかしながら、微小管密度を制御する様々なタンパク質が発見されていることから、それらのタンパク質が非対称変形時にどのような挙動を見せるのかを調べるのが、対称性維持機構の解明につながるものと期待される。

次に、2つ目のテーマである、「微小管渦構造による細胞質流動」について記述する。細胞質流動は、主に紡錘体やオルガネラなど、拡散では細胞質内を十分な速度で移動することができない大きさの細胞内構造体の運搬に利用されていると考えられている。細胞質流動は、駆動する繊維状重合体によって、2種類に分類される。1つが微小管であり、もう1つがアクチン繊維である(球状のアクチン分子がらせん状に重合した繊維状重合体。微小管と合わせて、細胞骨格と総称される)。アクチン駆動の流動は、これまでよく研究されている。アクチン繊維の上をミオシン分子モーターが、オルガネラを運搬することで周囲に流動を発生し、この流動が他のアクチン繊維を流体力学的相互作用によって配列する。このような作用によって、秩序だったアクチンネットワークが形成され、時空間的に安定した流動が生じる。

一方微小管駆動の流動は、線虫の卵母細胞やショウジョウバエの胚などで観察されている。渦状に微小管が配向しており、回転流動を生み出すのが特徴だが、アクチン駆動の流動と比較して、未解明な部分が多い。例えば、どのようにして微小管が渦状に配列するかは、明らかでない。そこで本研究では、アフリカツメガエルの卵抽出液を封入した油中液滴において、微小管がどのようにして流動を起こし得るのかを調べた（微小管の挙動に集中するため、アクチン重合は阻害）。油中液滴を用いて閉鎖空間を作り出す理由としては、微小管の持続長（繊維が硬い棒として振る舞える最大長の目安）が 1-2 mm であること、そして卵母細胞などの直径が主に 100 μm 程度であることから、システムサイズが微小管の振る舞いに大きく影響を与えることが考えられるからである。まずは、液滴ではなく、微小管にとって十分広いスペース（溶液空間）における微小管ネットワークの形成を観察した。微小管を重合する薬剤を加えると、微小管はいくつもの星状体が連結した、格子構造を形成した。微小管による星状体形成にはダイニンが必須であることがよく知られているため、ダイニンの阻害剤を加えたところ、格子構造ではなく、微小管のランダムネットワークが形成された。このような条件下では、直径数 10 μm の渦流がいたるところで生成・消滅を繰り返していることが、PIV (Particle Image Velocimetry) 解析によって明らかになった。微小管の挙動を、共焦点顕微鏡を用いて詳細に観察すると、微小管の束が伸長していることが確認された。伸長は周囲に流動を発生することから、渦流は、微小管束同士の流体力学的相互作用によって生じている可能性が示唆された。これは、高密度のバクテリア懸濁液で観察される渦流に非常に現象や機構が類似している。

次に、液滴に封入すると、直径 100-700 μm において、伸長する微小管束が自発的に渦状に配列し、細胞質回転流動を引き起こした（流動が発生する直径は、前述の卵母細胞や胚の直径に近い）。また、キネシンの加水分解機能阻害時には、流動が全く生じなかったことから、微小管束の伸長はキネシンによる微小管同士のスライドであることが判明した。溶液空間での渦流と比較して、時間的、空間的に 10-100 倍安定的であった。溶液空間での実験結果や、よく調べられているバクテリアの懸濁液の研究、そして境界に端が接している微小管束が、伸長しながら曲がっていく（あるいは、屈曲する）ことが観察されたことから、このような安定的な流動が生じた要因として、微小管束同士の流体力学的相互作用の他に、微小管束と液滴境界の力学的相互作用の存在が考えられる。つまり、液滴境界に到達した微小管束が微小管ネットワークを押し出すことによって回転力を発生し、回転流動を生じさせる。この回転流動が、微小管束の渦構造への配列を促すという正のフィードバック・ループを生じさせ、安定的な流動が発生することが考えられる。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 鈴木 和也 印

(2017年2月 現在)

| 種 類 別 | 題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む) |
|-------|--|
| 論文 | <p>○ Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata Spatial confinement of active microtubule networks induces large-scale rotational cytoplasmic flow <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>, in press (2017).</p> <p>○ Kazuya Suzuki, Takeshi Itabashi and Shin'ichi Ishiwata Mechanical properties of a pair of spindle poles are symmetrically balanced. <i>Biophys. Physicobiol.</i>, 14: 1–11 (2017).</p> <p>Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Katsuhiko Sato, Koutaro Nakagome, Seine A. Shintani, Fuyu Kobirumaki-Shimozawa, Norio Fukuda, Kazuya Suzuki, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, and Takeshi Itabashi Dynamic properties of bio-motile systems as a liquid-crystalline structure. <i>Mol. Cryst. Liq. Cryst.</i>, in press. (2016).</p> <p>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. <i>Biophys. J.</i> 106:735–740. (2014).</p> <p>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. <i>Cell Rep.</i> 5:44–50. (2013).</p> <p>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. <i>Sci. Rep.</i> 3:2808. (2013).</p> <p>Takeshi Itabashi, Jun Takagi, Kazuya Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata. Responses of chromosome segregation machinery to mechanical perturbations. <i>BIOPHYSICS</i> 9:73–78. (2013).</p> <p>板橋 岳志, 鈴木 和也, 高木 潤, 石渡 信一 紡錘体の力学計測 <i>生物物理.</i> 49:250–251. (2009).</p> |

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

| 種 類 別 | 題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む） |
|--------------|--|
| 講演 (国際会議) | <p>(Invited talk) Makito Miyazaki, Kazuya Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata In vitro reconstitution of active cytoskeletal networks in cell-sized droplets. EMN (Energy Materials Nanotechnology) Meeting on Droplets 2016. San Sebastian, Spain , May 9-13, 2016</p> <p>Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata. Spatial confinement organizes microtubules into the vortex inducing rotational cytoplasmic flow. 3D Lab Exchange Symposium, Interaction of Nano-Biotechnology, Chemical Biology and Medical Sciences. Singapore, September 7-9, 2015</p> <p>Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata. Observation of directional flow induced by active microtubule networks. Workshop on mechanics and growth of tissues. Paris, France, January 13-16, 2014</p> <p>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, February 2-6, 2013.</p> <p>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, January 27-29, 2010.</p> |

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

| 種 類 別 | 題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む） |
|--------------|---|
| 講演 (国内会議) | <p>(招待講演) <u>鈴木和也</u> 微小管ネットワークの形成における空間的境界の役割 第5回分子モーター討論会、東京、2015年6月、</p> <p>(ポスター) <u>鈴木和也</u>、宮崎牧人、高木潤、板橋岳志、石渡信一 Cytoplasmic rotational flow induced by symmetry breaking of active microtubule network. 第52回 日本生物物理学会、札幌、2014年9月</p> <p>(ポスター) 田邊優敏、宮崎牧人、<u>鈴木和也</u>、石渡信一 Observation of directional F-actin flow in Xenopus egg extracts. 第52回 日本生物物理学会、札幌、2014年9月</p> <p>(口頭) 高木潤、板橋岳志、<u>鈴木和也</u>、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</p> <p>(口頭) <u>鈴木和也</u>、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</p> <p>(口頭・ポスター) <u>鈴木和也</u>、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</p> <p>(ポスター) 谷田部聡、高木潤、<u>鈴木和也</u>、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</p> <p>(口頭) <u>鈴木和也</u>、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</p> <p>(口頭・ポスター) <u>鈴木和也</u>、高木潤、板橋岳志、石渡信一 Bilateral regulation of spindle shape at metaphase. 第47回 日本生物物理学会、徳島、2009年10月</p> |