

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**

2017年3月

鈴木 和也

Kazuya SUZUKI

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**

2017年3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

鈴木 和也

Kazuya SUZUKI

目次

1 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.1.1 紡錘体	1
1.1.2 微小管渦構造	3
1.2 本研究の概要	5
2. 実験材料と方法	9
2.1 序論	9
2.2 試料調製方法	9
2.2.1 アフリカツメガエルの卵抽出液	9
2.2.2 紡錘体形成	10
2.2.4 紡錘体極領域の弾性計測	26
2.2.5 リン脂質-オイル混合物の作製	27
2.2.6 PEG 被膜蛍光ビーズの作製	28
2.2.7 溶液空間での流動の解析と、微小管ネットワークの観察	29
2.2.8 個々の微小管の長さの計測	29
2.2.9 液滴の形成	30
2.2.10 液滴内での流動の解析	31
2.3 光学系	33
2.3.1 落射型顕微鏡	33
2.3.2 共焦点顕微鏡	33
2.4 図	34
3 紡錘体のマイクロ力学	36
3.1 序論	36
3.2 結果と考察	37
3.2.1 極領域の定義と、紡錘体の左右対称性の定量的な評価	37
3.2.2 極領域の弾性	38
3.2.3 極領域の弾性に対する、ダイニン、Eg5 の役割	39
3.2.4 極領域における、弾性と微小管密度の関係	42
3.2.5 力学特性や形における、紡錘体の対称性維持	44
3.2.6 対称性維持機構における、ダイニン、Eg5 の寄与	46
3.3 本章のまとめ	47
3.4 図	48
4 微小管渦構造による細胞質流動	65
4.1 序論	65
4.2 結果と考察	67

4.2.1 溶液空間における渦流.....	67
4.2.2 閉鎖空間における細胞質回転流動.....	68
4.2.3 回転する微小管渦構造の形成.....	69
4.2.4 回転流動の駆動力：分子モーターによる微小管の滑り運動.....	70
4.2.5 細胞質回転流動の発生モデル.....	71
4.2.6 渦構造形成における力学的相互作用の役割.....	72
4.3 本章のまとめ.....	75
4.4 図.....	76
5 まとめ.....	87
5.1 本研究のまとめ.....	87
5.2 課題と今後の展望.....	88
5.2.1 紡錘体.....	89
5.2.2 渦構造体.....	90
動画.....	92
参考文献.....	94
謝辞.....	107
研究業績.....	108

1 序論

1.1 研究の背景

細胞骨格 (cytoskeleton) である微小管 (microtubule) は、真核細胞の細胞分裂や細胞内輸送など、様々な細胞機能で中心的な役割を果たしている。これらの機能は、微小管結合タンパク質 (MAPs : Microtubule-Associated Proteins) による微小管の架橋や重合・脱重合動態の制御、そしてキネシン (kinesin)、ダイニン (dynein) といった分子モーターによる微小管の滑り運動や配向により、秩序だった動的構造を形成することで達成される。細胞内で微小管ネットワークが作る動的構造の形成機構を理解するために、細胞分裂時に染色体分配装置として機能する紡錘体のミクロ力学と対称性、そして、細胞質回転流動時に形成される微小管渦構造に着目する。

1.1.1 紡錘体

細胞分裂時に、微小管は紡錘体 (spindle) と呼ばれる構造を形成する。紡錘体は、両端に微小管のマイナス端が集中している極構造をもつ、二極構造をしている。このような左右対称的な形状は、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。紡錘体は、分裂中期 (metaphase) には赤道面に染色体 (chromosome) を整列させ、後期 (anaphase) には2つの娘細胞に染色体を正確に分配する役割を担っている。二極構造の異常は染色体分配 (chromosome segregation) の失敗につながり、ガンや重篤な遺伝病など、致命的な病気の原因となるため (Gordon *et al.*, 2001, Oshimori *et al.*, 2001, Oshimori *et al.*, 2006)、紡錘体の形態維持機構の研究は生物学のみならず、医学的にも意義がある。

生化学的、遺伝子工学手法の発展により、紡錘体形状の維持に関わる様々なタンパク質とその役割のリストが出来上がりつつある。これらの手法を用いて、標的となるタンパク質の機能や発現量を変調させ、その際の紡錘体形状への影響を調べることで、機能や役割が明らかにされてきた。その結果、紡錘体の微小管は染色体由来の拡散性シグナルによって重合が促されていること (Kalab *et al.*, 2002, Kalab *et al.*, 2006)、重合した微小管はキネシンやダイニンといった分子モーターの働きによって配向されていることが明らかになった。微小管の重合・

1.1 研究の背景

脱重合の制御には、様々な MAPs が関与していることも判明している (Walczak *et al.*, 1998, Akhmanova and Steinmetz, 2008, Glotzer, 2009)。

紡錘体を構成する微小管の半減期は1-2分である (Needleman *et al.*, 2010)。さらに、紡錘体内の微小管は赤道面から両極に向けておよそ 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ の速さで絶えず輸送されており (微小管フラックス、と呼ばれている ; cf. Sawin and Mitchison, 1991)、非常に動的な構造体である。しかしながら、紡錘体は数十分の間大きさや形を維持することができ、この形態維持機構として様々なモデルが提唱されている (Dumont and Mitchison, 2009)。その中で有力なモデルの1つとして、力のつり合いモデルについて説明する。キネシンやダイニンは、微小管に対して発生する力の方向が決まっている。例えば、14ファミリーを除くキネシンはプラス端指向性 (微小管のプラス端方向きに移動) であり、ダイニンとキネシン-14 はマイナス端指向性 (微小管のマイナス端方向きに移動) である。これらの発生する力のつり合いによって、紡錘体の大きさや形が決定されるというモデルである。力のつり合いモデルによって説明される代表的な実験結果として、ダイニンと Eg5 (キネシン-5 の四量体) の阻害実験が挙げられる。ダイニンの機能阻害は紡錘体の極構造を破壊するが、同時に Eg5 をも機能阻害すると、極構造が回復する (Mitchison *et al.*, 2005)。精製したダイニンと Eg5 の解析から、これらは微小管に対して発生する力の方向が反対であることに由来すると推測されている。そのためこの結果は、紡錘体内部においてダイニンと Eg5 が拮抗した力を発生しており、二極構造はその力のつり合いの結果であると解釈されている。

一方で、近年、個々の分子の役割ではなく、紡錘体全体でどのように力がつり合い、構造を維持しているのかに着目した研究が行われている。こういった研究では、微小ガラス針や平板のカンチレバーによって、紡錘体を顕微鏡下で直接変形するという手法により、紡錘体構造のミクロ力学特性や、力学刺激に対する応答性を明らかにしている (Itabashi *et al.*, 2009, Shimamoto *et al.*, 2011, Itabashi *et al.*, 2013, Takagi *et al.*, 2014)。これらの研究により、紡錘体は粘弾性体であること、そして極構造が紡錘体全体の弾性に影響を与えていることが明らかにな

1 序論

った。その一方で、極構造そのものの弾性については、未だ解明されていない。そこで本研究では、極構造の弾性を計測すること、そして極構造維持における分子モーターの役割を定量的に評価することを目的とした。

1.1.2 微小管渦構造

細胞質流動は、植物細胞において初めて発見された現象であり (Corti B, 1774)、主に紡錘体やオルガネラ (organelle) など、拡散 (diffusion) では十分な速度で細胞質中を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 (Serbus *et al.*, 2005, Goldstein *et al.*, 2015)。細胞質流動は、駆動する繊維状重合体 (細胞骨格) 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 つがアクチン線維 (actin filament) である。アクチン駆動の流動は、これまでによく研究されている。アクチン線維の上を、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線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線維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 (Ueda *et al.*, 2010, Woodhouse *et al.*, 2012, Woodhouse *et al.*, 2013, Goldstein *et al.*, 2015)。

一方微小管駆動の流動は、線虫やショウジョウバエの卵母細胞において観察されている。微小管が渦状に配向しており、回転流動であることが特徴だが、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のかは、明らかでない。そこで本研究では、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵抽出液を封入した油中液滴 (extract-in-oil droplet) を細胞のモデル系として採用し、微小管がどのようにして流動を起こし得るのか、そしてどのようにして渦構造を形成するのかを解明することを目的とした。特に、空間的境界が流動や渦構造形成に与える影響に着目した。微小管の持続長 (persistence length : 繊維が硬い棒として振る舞える最大長の目安) が細胞質において 1-2 mm であること (Keller *et al.*, 2008)、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

1.1 研究の背景

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。このような仮説は、アクチン駆動の流動においてはシミュレーションモデルによって支持されているが (Woodhouse *et al.*, 2013)、微小管駆動の流動においては報告がない。

1 序論

1.2 本研究の概要

本研究のテーマは、紡錘体のミクロ力学（第3章）、微小管渦構造による細胞質回転流動（第4章）に分けられる。紡錘体の極構造の重要性が示されているにも関わらず、その力学特性は明らかでない。そこで第3章では、極領域の形、力学特性、微小管密度を測定し、紡錘体の二極構造がどのようにして維持されているのかを調べた。また、紡錘体の二極構造形成に重要とされている、ダイニン、Eg5 の上記のパラメーターや対称性維持機構にどのように寄与しているかを明らかにした。次に第4章では、微小管が発生する流動の様子を溶液空間と閉鎖空間において解析し、空間的境界が流動に及ぼす影響を定量化した。

第1章では、本研究の背景と概要について記述する。

第2章では、本研究の実験材料と実験方法について記述する。本研究では、アフリカツメガエルの卵抽出液を細胞質のモデル系として使用した (Desai *et al.*, 1999)。この系は、細胞膜のない状態で様々な細胞現象を再現することが知られている (Ma *et al.*, 1998, Desai *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2010, Abu *et al.*, 2014)。このような性質により、微小ガラス針を用いて紡錘体を直接変形することができる。また、卵抽出液を様々な大きさの液滴に封入することで、微小管の発生する細胞質流動のシステムサイズ依存性を、容易に解析することができる。本章ではまず、卵抽出液の調製方法と、紡錘体形成方法、観察方法について記述する。紡錘体形状や微小管密度の変化を3次元的に解析するため、高木潤博士が確立した、共焦点蛍光顕微鏡を用いた3次元スキャニングによる、紡錘体形状や微小管密度の評価方法について記述する (Takagi *et al.*, 2013)。また、紡錘体極領域の変形方法や弾性測定についても記述する。次に、溶液空間や液滴の作製方法、流動の解析方法について述べる。

第3章の概要を記述する。紡錘体の形や、先行研究において明らかにされている微小管フラックスの速度分布から、紡錘体極から二極間距離の20%までの領域を極領域として定義した。極領域の幅 W_p 、長さ L_p 、面積 S から、極領域の2次元的な形を表すパラメーターとして、アスペクト比 ($=W_p/L_p$) と γ ($=S/(W_p \times L_p) \times 2$) を定義した。そして、これらのパラメ

1.2 本研究の概要

ーターが両極領域で等しいことが判明し、紡錘体の左右対称性を定量的に示した。次に、極領域に十分硬いガラス針と、弾性定数を校正済みの柔らかいガラス針 (0.3–1.0 nN/μm) を挿入し極領域を広げるように硬い針を移動させた。その際の柔らかい針のたわみから、極領域を広げるのに必要な力を見積もることができる。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」と定義して計算したところ、平均して 0.84 nN/μm であり、これは先行研究において計測された紡錘体全体の弾性と等しいオーダーであった (Itabashi *et al.*, 2009, Shimamoto *et al.*, 2011, Itabashi *et al.*, 20013, Takagi *et al.*, 2014)。また、両極領域の弾性がほぼ等しい値であることが判明した。次に、二極構造の構築に重要であると考えられている、ダイニンと Eg5 の弾性に対する寄与を調べた。阻害剤 (p150-CC1) を 400 nM という高濃度で加え、ダイニンの機能を完全に阻害した場合には、極構造が形成されず、この状態では構造が脆すぎるためか、柔らかい針で変形時の力の検出することができなかった。そこで、75%の紡錘体が二極構造を維持している、100 nM という低濃度の阻害剤存在下で、二極構造を維持している紡錘体について弾性を計測した。この条件下では、極領域の形が保たれているにも関わらず、弾性は 73%低下していた。また、Eg5 の機能阻害時には、弾性が 33%増加しており、ダイニン、Eg5 を両方阻害した際にはコントロールと同等程度にまで弾性が回復していた。これらの結果は、ダイニンと Eg5 が、極構造に対して拮抗した作用を及ぼしていることを示唆している。つまり、ダイニンは極構造の力学的強度を強めるように、そして Eg5 は弱めるように機能していると考えられる。先行研究において、紡錘体全体の弾性が微小管密度に依存していることが明らかになっている (Shimamoto *et al.*, 2011)。このことから、上記の阻害剤存在下での弾性の変化は、分子モーターの架橋動態の変化以外に、微小管密度の変化に起因することが考えられる。そこで、阻害剤存在下での極領域の微小管密度を計測したところ、弾性の変化と同様、ダイニン機能阻害時には密度は 25%低下し、Eg5 の機能阻害時には 43%増加、両方阻害時には同等程度にまで回復した。極領域の弾性の微小管密度依存性を、 D^b (D : 微小管密度) でフィッティングしたところ、 $b = 1.91$ となった。先行研究において、 $b = 1$ の場合には架橋されてい

1 序論

いネットワークの弾性に等しく（つまり、ネットワークの弾性が繊維の剛性にのみ依存）、 $b=2$ の場合には強く架橋されているネットワークの弾性に等しいことが明らかになっていることから (Claessens *et al.*, 2006)、極領域の弾性には微小管の剛性、そして架橋動態が強く寄与していることが示唆される。つまり、例えばダイニンの機能阻害時には、架橋の減少が直接的に極領域の弾性低下につながるだけでなく、微小管密度の減少を引き起こすことで、極領域の弾性を低下させていると考えられる。

本研究により、極領域の形、弾性、微小管密度は両極において等しいことが明らかになった。この対称性が動的に維持されているものなのかを検証するため、2本のガラス針で一方の極領域のみを広げた状態に維持し、両極領域において上記パラメーターがどのように変化するかを調べた。広げた極領域では、広げてから1、2分以内に微小管密度が低下した。もう一方の極領域においても5分以内に微小管密度が低下し、その後自発的に広がり、結果として紡錘体は樽型の構造を形成した。先行研究通り、紡錘体は自発的に針から抜けてしまうが (Gatlin *et al.*, 2009)、その後は極構造を回復し、元の二極構造となった。以上の結果から、紡錘体には、動的に左右対称性を維持する機構が存在することが示唆される。

第4章では、細胞質回転流動を引き起こす、微小管渦構造について記述する。本研究ではまず、微小管に対して境界がないとみなせるほど広い空間（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。微小管重合促進剤であるタキソールを100 nM（この濃度では、微小管の重合・脱重合は阻害されない）になるように加えておくと、星状体 (aster) が連結したような、格子構造を形成した。卵抽出液中における星状体の形成はダイニンの機能に起因することがよく知られているため (Verde *et al.*, 1991)、ダイニンの阻害剤 p150-CC1 を加えたところ、微小管束のランダムネットワークが形成された。この条件下において PIV (Particle Image Velocimetry) による解析を行うと、直径数 10 μm 程度の渦流が、いたるところで生成・消滅を繰り返していることがわかった。生成から消滅までは1分以内であり、時間的に不安定であった。個々の微小管束を詳細に観察すると、それぞれが伸長し、やがて消滅することが判明した。

1.2 本研究の概要

このことから、微小管束の伸長が周囲に流動を生み出しており、微小管束間の流体力学的相互作用によって、渦流が発生したのだと考えられる。次に、微小管の持続長よりも小さい直径の液滴（100–700 μm ）に卵抽出液を封入すると、伸長する微小管束が自発的に渦状に配列し、数十分から数時間に及ぶ細胞質回転流動が発生した。流動の角速度は液滴の大きさに強く依存していたが、境界付近の流速自体は大きさに依らず一定であり、そして一端が境界に接している微小管束においては、接している端は滑ることや離れること無く、伸長しながら屈曲していくことが観察された。これらの結果から、微小管束の伸長が回転流動の原動力であることが考えられる。微小管束の伸長は、微小管自体の重合か、キネシンによる微小管同士の滑り運動が候補となる。そこで、タキソール濃度を上げることで、重合速度を低下させたが、流動の速度に変化はなかった。一方、アピラーゼを加えて内在性 ATP を枯渇させた場合や、非分解性 ATP アナログである AMP-PNP を加えてキネシンの加水分解を阻害したところ、微小管束は伸長せず、2 時間以上に渡って流動は発生しなかった。これらの結果から、微小管束の伸長はキネシンによる微小管同士の滑り運動によるものであり、回転流動のエネルギー源は ATP であることが判明した。本研究の結果により、流体力学的相互作用に加えて力学的相互作用を利用することで、微小管は卵母細胞で観察されるような、時空間的に安定的な流動を発生していることが示唆される。

第 5 章では、本研究のまとめを記述する。

以降、動画の説明、参考文献、謝辞、研究業績を記述する。

2. 実験材料と方法

2. 実験材料と方法

2.1 序論

本研究では、アフリカツメガエルの卵抽出液を細胞質のモデル系として用いて、紡錘体の形成や、細胞質流動の観察を行った。細胞膜のない状態で紡錘体を形成できるため、直接顕微操作が可能となるだけでなく、様々な大きさの液滴を形成することでシステムサイズを自在に変化させられるといった利点がある。早稲田大学 石渡研究室において確立した。卵抽出液の調製方法について記述する。

紡錘体極領域の弾性を計測するため、微小ガラス針を用いて顕微鏡下で紡錘体極領域を直接変形した。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、極領域の弾性を定量的に調べることに成功した。本章では、微小ガラスの作製方法、操作方法、弾性計測の方法について記述する。また、共焦点顕微鏡とデコンボリューションソフトを用いた微小管密度計測方法についても記述する。

本研究では、溶液空間、液滴内での細胞質流動の解析を行った。溶液空間は少しでも隙間があれば毛細管現象や蒸発によって流動が生じてしまうため、密閉の方法に工夫が必要となる。本研究での密閉方法を記述する。液滴は、リン脂質を分散させたミネラルオイルに少量の卵抽出液を加えて攪拌することで形成した。特に、リン脂質の分散方法について詳細に記述する。また、流動の解析方法として PIV や PTV (Particle Tracking Velocimetry) を採用した。これらについても記述する。

2.2 試料調製方法

2.2.1 アフリカツメガエルの卵抽出液

アフリカツメガエルの卵抽出液は、Murray と Desai の方法 (Murray, 1991, Desai *et al.*, 1999) にしたがって調製した。大まかな方法として、アフリカツメガエルの分裂中期の未受精卵を遠心することで、細胞質と膜に分離する。細胞質区画のみを取り出したものが、卵抽出液である。この卵抽出液は、調製過程で加える EGTA の作用でカルシウム濃度が低く抑えられており、分

2.2 試料調製方法

裂中期の状態に維持されている。卵抽出液は、使用するまでは氷上にて保存した（調製後、24時間以内に使用した）。また、断りがない限り、試薬や精製したタンパク質は氷上にて加えた。

2.2.2 紡錘体形成

卵抽出液にカルシウム溶液を加え、一時的にカルシウム濃度を 0.3 mM にまで増加させることで、間期の状態に移行させた。ここに、Murray の方法 (Murray, 1991) によって調製した、アフリカツメガエルの脱膜した精子を加えて 16°C で 80 分間インキュベーションした。インキュベーション後、分裂中期の卵抽出液を新たに等量加えることで、卵抽出液を分裂中期へと移行させた。16°C、60 分間インキュベーションすることで、紡錘体の形成が完了。紡錘体の観察のため、TAMRA (C-1171, Molecular Probes) または Alexa-488 (A-20000, Molecular Probes) を結合させたチューブリンを、200 nM になるように卵抽出液に加えた。チューブリンは、Hyman らの方法 (Hyman *et al.*, 1991) にしたがって豚脳から精製した。

次ページより、実際に行った 3 つの詳細なプロトコルを掲載する。まず始めに、早稲田大学 石渡研究室で板橋岳志博士が確立し、作成したアフリカツメガエルの卵抽出液の調製から紡錘体にいたるまでのプロトコルを、一部改変して掲載する。次に、早稲田大学 石渡研究室にて板橋岳志博士が確立した、脱膜精子の調製プロトコルを一部改変して掲載する。そして最後に、早稲田大学 石渡研究室卒業生、上村想太郎博士 (2016 年現在、東京大学教授) の博士論文 (2004 年 3 月) を引用・一部改変して高木潤博士が作成したチューブリン精製のプロトコルを、さらに一部改変・加筆したプロトコルを掲載する。

2. 実験材料と方法

アフリカツメガエル卵の抽出液調製

卵母細胞成熟のための注射

1. 1匹あたり、100 U/mL PMSG (Gonadotropin from pregnant mare serum ; G4877-2000IU、Sigma-Aldrich) を 0.5 mL、メスのアフリカツメガエルに注射した。
2. 行程1の2日後、100 U/mL PMSG を 0.25 mL、同じカエルに注射した。これらのカエルは、1週間後から2週間後までの間に実験に使用した。

排卵させるための準備

排卵を促すホルモン hCG (Chorionic Gonadotropin, human ; CG10-10VL、Sigma-Aldrich) を注射してから 16–18 時間後にカエルは排卵するため、以下の行程は卵抽出液調製の前日に行った。また、カエルが飛び出してしまう可能性があるため、必ず蓋付きのプラスチックバケツ (容積 ~4 L) を使用した。

1. 実験に使用するカエルを水槽からバケツに移し、18°Cの恒温槽に2–4時間静置した (排卵は恒温槽内で行わせるため、あらかじめカエルを慣れさせる目的がある。また、恒温槽は完全に遮光した)。
2. 卵抽出液調製を始める16–18時間前に、1000 U/mL hCG を 0.5 mL 注射した。カエルによっては排卵しないことや、卵が少なすぎる場合があるため、通常は4匹、最低でも2匹のカエルを使用した。
3. hCG を注射したカエルを、18°C前後にしておいた MMR (Marc's Modified Ringer's ; 5 mM HEPES、0.1 mM EDTA、2 mM NaCl、2 mM KCl、1 mM MgCl₂、2 mM CaCl₂ ; NaOH で pH 7.8 に調整) が入ったバケツに入れ、18°Cの恒温槽に戻した。

卵抽出液調製

以下の行程で用いた溶液は全て、18–20°Cである。

2.2 試料調製方法

1. バケツからカエルを取り出した後、まずは卵の見た目を確認した。全体的に白くなっている卵は、ワイドマウスピペット（内径7 mm程度のガラス管にスポイトをはめたもの）を使って取り除いた（通常の卵は、動物極側が黒、植物極側が白）。排卵される卵は分裂中期の状態のはずだが、そのような白い卵は何らかの原因で細胞周期が進行している可能性がある。こういった卵は卵抽出液の質（例えば、正常な形態の紡錘体形成率など）に影響を与えるため、発見次第取り除く必要がある。しかし、あまりにも白い卵の個数が多い場合（経験上、1匹のカエルから一見して5個以上見つかる場合）、他の卵も次第に白くなるか、不完全な分裂が始まるため、そのカエルの卵は正常に見えるものでも使用しなかった。
2. 卵を捨てないように注意しつつ、MMRをできるだけ多く捨てた。新たに500 mLのMMRを加え、卵がバケツの底に沈降した後にMMRを捨てるという作業を4回繰り返し、卵を洗浄した。MMRをバケツに注ぐ際には、直接卵に当たらないように注意した（以下、別の溶液を注ぐ際にも同様）。
3. バケツからMMRを捨て、MMRが100–200 mL入った500 mLビーカーに卵を移し、卵が沈降した後、ビーカーのMMRを捨てた。
4. 卵を覆っているゼリーを除去するため、Dejelling solution（次の行程のXBにL-Cysteineを最終濃度2%（w/v）で加え、NaOHでpH 7.8に調整した溶液）を200 mL加え、ビーカー全体を回すようにして、1分45秒間、ゆるやかに攪拌した。卵が沈降した後にDejelling solutionを捨てた。この操作をさらに2回繰り返した。ただし、2回目、3回目はDejelling solution 100 mLでそれぞれ2分間ずつの攪拌である（3回目は、最長4分間行う場合がある。詳細は、次の行程を参照）。
5. 卵のゼリーが取り除かれていくと、静置した際に卵同士の距離がほぼゼロになるように見える。このような卵が全体の約75%に達したときに（3回目の2分間の攪拌で75%達している場合、4分間まで延長。）、速やかにDejelling solutionを捨て、XB（Extract Buffer ; 100 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂） 200 mLが入った結晶皿（3140-170-WS、PYREX ;

2. 実験材料と方法

(外径) 170 × (高さ) 90 mm) に卵を移した。なお、この結晶皿は以下の作業により、あらかじめゼラチンで内側を被膜したものである。

結晶皿のゼラチン被膜:MMR に 0.02% (w/v) の濃度で溶解させたゼラチン溶液 20 mL を、結晶皿に注ぎ、表面がゼラチン溶液に浸かるように結晶皿を傾ける。全ての表面が浸かった後は新たにゼラチン溶液を加え、同じように結晶皿を傾ける。この操作を 4 回繰り返した。

6. 速やかに XB を捨て、新たに XB を 100 mL 加えた。この操作をもう一度行った。
7. CSF-XB (Cytostatic Factor-XB ; XB に EGTA、MgCl₂ をそれぞれ最終濃度 5 mM、1 mM になるように加えた溶液) を 60 mL ずつ使用し、合計 3 回行程 6 と同じ作業を繰り返した。
8. CSF-XB-PI (CSF-XB に Leupeptin、Pepstatin、Chymostatin をそれぞれ最終濃度 10 µg/mL で加えた溶液) を 30 mL ずつ使用し、合計 2 回、行程 6 と同じ作業を繰り返した (最終的に、卵は CSF-XB-PI 30 mL の中で静置)。
9. CSF-XB-PI (+200 µM Cytochalasin D) 1 mL が入った 5 mL 遠心チューブ (332245A、Hitachi Koki) にワイドマウスピペットを用いて卵を慎重に移し、以下の条件で遠心を行った。

遠心機 : KUBOTA 2420 (KUBOTA)、ローター : RS-240、バケット : 053-4910

1500 rpm、20°C (KUBOTA 2420 に温度制御機能はないため、室温を 20°C にして対応した)、60 秒。

10. 卵に体温が伝わらないように注意してチューブを持ちつつ、上清をアスピレーターで可能な限り吸い取った。その後速やかに、以下の 2 段階の遠心を行った。

遠心機 : KUBOTA 2420 (KUBOTA)、ローター : RS-240、バケット : 053-4910

1) 2000 rpm、20°C、60 秒

2) 3000 rpm、20°C、30 秒

*1) の遠心中に、回転数の変更を手動で行うことで、2) の遠心に移行させた。

11. 上清をアスピレーターで可能な限り吸い取り、以下の 2 段階の遠心を行った。

2.2 試料調製方法

遠心機：CP70MX、ローター：P28S

1) 3000 rpm、16°C、3分

2) 10000 rpm、16°C、12分

* 1) から 2) へは、あらかじめ設定したプログラムによって自動的に移行される。

なお、P28S のバケットは 40 mL 遠心チューブ専用だが、5 mL 遠心チューブで遠心を行うため、特注のアダプターをバケットに挿入した。

12. 遠心チューブの側面に注射針 (1 mL シリンジ + 16G 注射針) を突き刺し、細胞質のみを回収した (この細胞質が、卵抽出液である)。
13. 回収した卵抽出液にプロテアーゼインヒビター (Leupeptin、Pepstatin、Chymostatin : 最終濃度 10 µg/mL)、Cytochalasin D (最終濃度 2 µM)、Energy Mix (creatine phosphate、ATP、MgCl₂ をそれぞれ最終濃度 7.5 mM、1 mM、1 mM) を加え、氷上で保存。

紡錘体形成

1. 20 µL の卵抽出液に、カルシウムイオンが最終濃度 0.3–0.4 mM となるように、カルシウム溶液を加え、間期に移行させた (1.5 mL 遠心チューブ使用)。
2. 間期の卵抽出液に、蛍光標識したチューブリン (最終濃度 400 nM) と脱膜した精子の核を加えてタッピングにより攪拌した (ボルテックスは、細胞内構造体を破壊する恐れがあるため、行わなかった)。その後、80 分間、16°C でインキュベーション (CHT-1000、IWAKI)。この行程により、核が形成される。
3. 行程 2 の抽出液に、新たに卵抽出液 (カルシウム溶液を加えていない状態の卵抽出液) を 20 µL 加えることで、卵抽出液の状態を分裂中期へと移行させた (合計で 40 µL となるため、蛍光チューブリンの濃度は 200 nM となる)。染色体を観察する場合には、新たに卵抽出液を加える際、同時に Sytox Green Nucleic Acid Stain (S7020, Life Technologies) を最終濃度 50 nM になるように加えた。

2. 実験材料と方法

4. 行程 3 の卵抽出液を 60 分間、16°C でインキュベーションすることで、紡錘体が形成された。

2.2 試料調製方法

アフリカツメガエル脱膜精子の調製

前準備

三日前に PMSG 0.25 mL (100 U/mL)、前日に hCG 0.125 mL (1 kU/mL) をオスのアフリカツメガエル 3 匹に注射。

1. PMSG と hCG を注射したアフリカツメガエル 3 匹を、氷水に 20 分以上いれておき、冬眠状態にした。
2. 冬眠状態のカエルを包丁で断頭した。初めに解剖用ハサミで薄皮を切り、続いて中皮と肋骨を切り、精巣を取り出し、氷上で MMR 入りのシャーレに入れた。
3. 精巣を傷つけないようにしながら脂肪をできるだけ取り除き、MMR で 3 回洗浄した。この作業も極力氷上で行い、精巣を温めないようにした。
4. NPB (250 mM Sucrose、15 mM HEPES、1 mM EDTA、0.5 mM Spermidine trihydrochloride、0.2 mM Spermine tetrahydrochloride、0.3 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)、1 mM DTT (Dithiothreitol)、10 µg/mL Leupeptin ; pH7.4 になるように、KOH で調整) で精巣を 2 回洗浄した (ここでは 20 ml 程度使用)。

NPB をピペットあるいはアスピレーターも使い可能な限り取り除いた後、精巣をカミソリでできるだけ細かく刻んだ。

5. NPB 2mL を加え、シャーレ上でワイドマウスピペットを使って懸濁した。
6. 15 mL 遠心チューブにガーゼ 8 枚を詰め、ワイドマウスピペットで精子懸濁液をこす。NPB 8ml を複数回に分けて用いることで、シャーレやガーゼを洗いつつ、行程 5 で回収できなかつた分を回収。

遠心機 (GR22G、Hitachi) とスウィングローター (R4S、Hitachi) を用いて、3000 rpm、10 min、4°C の条件で遠心 (以下の遠心においても、同じ遠心機、ローターを使用し、回転数などの時間も同じである)。

2. 実験材料と方法

7. 上清を捨て、NPB 8mL に懸濁（ワイドマウスピペット使用。以下の行程でも同様）した後、遠心を行った。
8. 上清を捨て、NPB 1 mL で懸濁した。
Lysolecithin 50 μ l を加えた後、室温で 5 分間インキュベーション。
9. NPB (+ 3% BSA) 10 mL を加え、懸濁した後、遠心。
10. 上清を捨て、NPB (+ 0.3% BSA) 5 mL を加え、懸濁した後、遠心
11. 上清を捨て、NPB (+ 0.3%BSA, +30% Glycerol, -PMSF) 1 mL で懸濁した。
12. ヘモサイトメーターで、精子の密度を調べた。超純水で 100 倍に薄めた後、DAPI (D9542-1MG、sigma-aldrich) で精子の核を染色した（最終濃度：5 ng/ml）。
最後に、原液の精子密度が $3-10 \times 10^7$ 個/ml の間になるように、NPB (+ 0.3%BSA, +30% Glycerol, -PMSF) を加えて調整した。

2.2 試料調製方法

チューブリンの精製と蛍光標識化

溶液

名称(分量)	濃度	組成	備考
Washing Buffer (500 mL)	240	mM Sucrose	
	10	mM MgCl ₂	
	10	mM NaH ₂ PO ₄	
	10	mM Na ₂ HPO ₄	
RB, pH 6.8 (500 mL)	10	mM MES	pHはNaOHで調整。
	0.5	mM MgSO ₄	
	100	mM KCl	
	1	mM EGTA	
	2	μg/mL Leupeptin	
	0.4	mM PMSF	
	1	mM DTT	
PC, pH 6.8 (500 mL)	20	mM MES	
	0.5	mM MgCl ₂	
	1	mM EGTA	
Buffer A, pH6.8 (500 mL)	100	mM MES	pHはNaOHで調整。
	0.5	mM MgCl ₂	
	1	mM EGTA	
Buffer B, pH6.9 (10 mL)	900	mM HEPES	pHはNaOHで調整。
	11	mM MgSO ₄	
	1	mM EGTA	
H-pH Buffer, pH 8.6 (20 mL)	100	mM HEPES	pHはNaOHで調整。
	1	mM MgCl ₂	
	1	mM EGTA	
40% Glycerol H-pH Buffer, pH 8.6 (20 mL)	100	mM HEPES	pHはNaOHで調整。
	1	mM MgCl ₂	
	1	mM EGTA	
	40	%(v/v) Glycerol	
60% Glycerol H-pH Buffer, pH 8.6 (20 mL)	100	mM HEPES	pHはNaOHで調整。
	1	mM MgCl ₂	
	1	mM EGTA	
	60	%(v/v) Glycerol	
× 2 Glycerol PB, pH 6.8 (20 mL)	160	mM PIPES	pHはKOHで調整。
	10	mM MgCl ₂	
	2	mM EGTA	
	2	mM GTP	
	66	%(v/v) Glycerol	
L-Glutamic acid (1 mL)	100	mM L-Glutamic Acid	PIPESは、事前にKOHでpH 6.8に調整しておく
	160	mM PIPES	
	2	mM MgCl ₂	
	2	mM EGTA	
	40	%(v/v) Glycerol	

2. 実験材料と方法

蛍光色素

蛍光試薬は、一級アミン基に結合する、Succinimidyl Ester (SE) を用いた。

- 5(6)-TAMRA-SE、Molecular Probes、C-1171
- Alexa Fluor 488-SE、Molecular Probes、A-20000

手順

チューブリン精製用の陽イオン交換カラムの作製

1. 陽イオン交換セルロース担体 (4071-010、GE Healthcare ; 2013 年に販売終了) 10 g を、0.5 M NaOH 500 mL に加えて攪拌した後、セルロース担体が沈殿するまでの間静置 (5-10 分程度)。
2. セルロース担体を捨ててしまわないように注意しながら、上清を捨てた。超純水を 1 L 程度加えて攪拌した後、セルロース担体が沈降するまで静置。
3. 行程 2 を、上清の pH が 11 程度になるまで繰り返した (pH の計測にはリトマス紙を使用)。
4. 上清を捨ててから 0.5 M HCl 500 ml を加え、攪拌してからセルロース担体が沈殿するまで静置。
5. 行程 2 と同様の操作を、上清の pH が 3 以上になるまで繰り返した (pH 計測には、リトマス紙を使用)。待ち時間に、以下の行程 6 の作業を進めた。
6. カラム (エコノカラム ; 7372512、BIO-RAD) をスタンドに固定しておき、超純水を 500 mL 程度流した。
7. 行程 5 の上清を捨てた後 BufferA を加え、NaOH で pH を 6.8 に合わせた (この行程においては、正確に pH を調整する必要があるため、リトマス紙ではなく pH メーターを使用)。
8. セルロース担体分散液を攪拌し、行程 6 で準備したカラムに数回に分けて流し込んだ。セルロース担体がカラムの 8 割くらいになるまで流し込んだ。
9. セルロース担体の充填終了後、カラムを低温室 (4°C) に運び、空気が入らないように注

2.2 試料調製方法

意しながら PC 液 200 mL で平衡化。カラムは低温室で保存し、作製後 24 時間以内に使用した。

2. 実験材料と方法

チューブリン精製と蛍光標識化

1. 豚脳を超純水で洗浄し、ゴム手袋をした手で、迅速に膜と血管を取り除いた（洗浄から 10 分以内）。この行程と次の行程は、低温室で行った。
2. 膜と血管を取り除いた豚脳を washing buffer で順に洗浄した。その後、包丁で豚脳を細切れにし、RB-ATP (RB に、使用直前に ATP を最終濃度 1 mM になるように加えた溶液) 250 mL とともにミキサーにかけた (50 mL は共洗い用に残しておいた)。500 mL 遠心管 2 本に移し、以下の条件で遠心を行った。

遠心機：GRX220 (Tomy)、ローター：No.17 (Tomy)

6300 rpm、2°C、50 分

3. 低温室で上清を一度 500 mL ビーカーに移し、その後 75 mL 遠心管に移した。その後、以下の条件で遠心を行った。

遠心機：CP70MX (Hitachi Koki)、ローター：RP42、または P45AT (Hitachi Koki)

36000 rpm、2°C、50 分

4. 上清を 500 mL ビーカーに移し、スターラーで攪拌しながら 0.1 M ATP 3mL、グリセロールを全体の 1/3 程度まで加えた。37°C の恒温槽で 40 分間攪拌を続けた。この行程では、泡立たないように注意した。
5. 行程 4 の溶液を 75 mL 遠心管 6 本に分けて、以下の条件で遠心を行った。

遠心機：CP70MX、ローター：RP42、または P45AT

36000 rpm、37°C、50 分

6. 上清を捨て、ペレットに RB-GTP (RB に、使用直前に GTP を最終濃度 1 mM になるように加えた溶液) を 5 mL ずつ加えた後、5-10 分程度氷上に静置した。その後、低温室で、ペレットが溶解するまでサスペンドした。
7. 行程 6 でペレットを十分に溶解させた後、以下の条件で遠心を行った。

遠心機：CP70MX、ローター：RP42、または P45AT

2.2 試料調製方法

36000 rpm、2°C、50 分

8. 上清を 75 mL 遠心管 1 本に移し、ATP が最終濃度 ~1 mM になるように 0.1 M ATP を加えた後、グリセロールを 75 ml になるまで (1/3vol) 加えた。グリセロールがよく混ざるように攪拌し、37°Cの恒温槽に 30 分間静置 (微小管重合の促進のため)。

9. 以下の条件で遠心を行い、微小管を沈降させた。

遠心機 : CP70MX、ローター : RP42、または P45AT

36000 rpm、37°C、60 分

10. 上清を捨て、RB-GTP を 15 mL 加えた後、低温室で 5 分おきに、30 分間サスペンドし、ペレットを溶解させた。その後、液体窒素で凍結させ、-80°Cで保存した (以降の行程を、翌日から行うため。この状態で数年は保存可能なので、日をおいて精製を再開することもできる)。

11. 行程 10 で凍結させたチューブリン溶液を 37°Cで解凍後、25 mL 遠心管に移して 30 分程度氷上で冷却させた。その後、以下の条件で遠心を行い、凍結・融解により変性したチューブリンなどを沈降させた。

遠心機 : CP70MX、ローター : P70AT

43000 rpm、2°C、40 分

12. 上清を別の 25 mL 遠心管に移し、ATP が最終濃度~1 mM になるように、0.1 M ATP を加えた。その後、グリセロールを 1/3(vol)加えて、37°Cの恒温槽で 20 分間静置した。

13. 以下の条件で、遠心により微小管を沈降させた。

遠心機 : CP70MX、ローター : P70AT

43000 rpm、37°C、60 分

14. 以降、行程 17 まで、低温室で作業を行った。上清を捨て、ペレットを PC-GTP (PC 液に、使用直前に GTP を最終濃度 1 mM になるように加えた溶液) 10 mL でサスペンドし、溶解させた。

2. 実験材料と方法

15. 「チューブリン精製用の陽イオン交換カラム作製」の手順で作製、平衡化したカラムに、PC-GTP (PC 液に GTP 最終濃度が 5 mM になるように加えた溶液) を 150 mL 程度流した (流速はペリスタポンプで制御。カラムから 1 秒に 1 滴流出する程度)。

16. カラムをフラクションコレクター (Frac-100、Amersham) に接続し、以下の設定で行程 14 を完了したチューブリン溶液を流した (溶出液は、フラクションコレクターに設置したガラスチューブで回収)。

Channel speed 5, Range 10, Fraction 20.0,

Control Unit: 0.5 AU

PERISTA: ×15, 1, R

チューブリン溶液を流しきった後に、PC-GTP を流した (溶出液のタンパク質濃度が一度ピーク値を越えて、もう一度上がり始めたところで終了。1 つ目のピークがチューブリンであり、2 つ目のピークは微小管結合タンパク質など)。

17. 1 つ目のピークの溶出液を 1 本のガラスチューブにまとめ、Buffer B と GTP を加えた (ガラスチューブ 1 本あたり、Buffer B 100 μ L、0.1 M GTP 10 μ L)。
18. 行程 17 のチューブリン溶液を、全量が 5 mL 以下になるまで、濃縮用の遠心フィルター (Millipore Cat. No. 4304) によって濃縮。濃縮のための遠心は、以下のような条件で行った。

遠心機 : GRX220 (Tomy)、ローター : TA-22 (Tomy)

3000 G、4°C、60 分

19. 濃縮後、×2 Glycerol-PB-GTP (×2 Glycerol-PB 10 ml に、使用直前に 0.1 M GTP 400 μ l を加えた溶液) を全量が 10 mL になるよう加え、37°Cの恒温槽で 30 分間静置、微小管を重合させた。
20. 37°Cに温めておいた 60% Glycerol H-pH buffer 4 mL を 9 mL 遠心管に加え、その上層に行程 19 の微小管溶液をパスツールで加えた (60% Glycerol H-pH buffer と微小管溶液が混ざ

2.2 試料調製方法

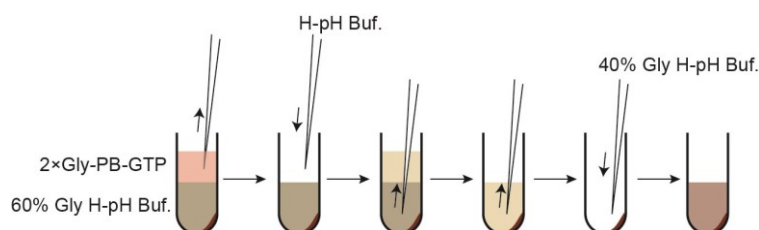
らないように、丁寧に)。

21. 以下の条件で、遠心を行った。

遠心機 : CP70MX (Hitachi Koki)、ローター : P65AT (Hitachi Koki)

65000 rpm、37°C、38 分

22. 以下の模式図のようにして、ペレットの表面を洗浄した (遠心管底のワインレッドがペレットを表している)。



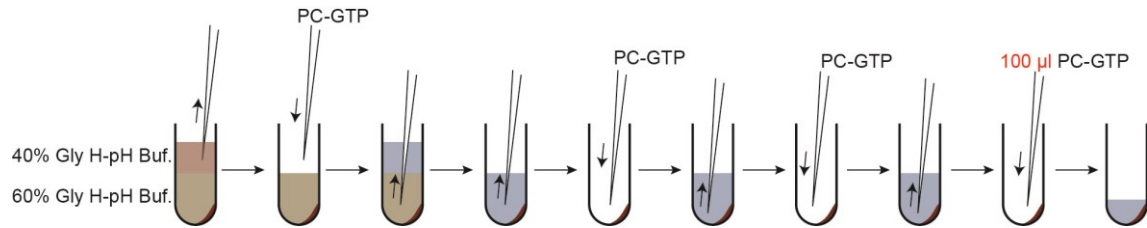
23. 遠心管を手で握って温度を保持しつつ、100 μ L の 40% Glycerol H-pH buffer で、ペレットを懸濁した (ペレットが大きい場合には、200 μ L で懸濁した)。
24. 遠心管をアルミホイルで遮光した後、標識する蛍光色素 (DMSO (Dimethyl Sulfoxide) に溶解させておく) を加えて、37°Cの恒温槽で 10 分間静置した (蛍光色素の最終濃度は、10 mM)。
25. 行程 24 と同量の L-Glutamic acid を加え、37°Cの恒温槽で 15 分間静置することで反応を停止させた。
26. 60% Glycerol H-pH buffer を 3 mL 遠心チューブに 1.5–2.0 mL 加え、その上層に行程 25 の微小管溶液を加えた (2つの溶液が混ざらないよう、丁寧に)。
27. 以下の条件で、遠心を行った。

遠心機 : CS120 (Hitachi Koki)、ローター : RP100AT4 (Hitachi Koki)

70000 rpm、37°C、30 分

2. 実験材料と方法

28. 以下の模式図のようにペレットの表面を洗浄した。



29. 以降、行程 31 まで低温室で作業を行った。ペレットに PC-GTP を 100 μ L 加え、10 分程度氷上で静置した（ペレットが大きい場合には、PC-GTP を 200 μ L 使用した）。

30. 10 分おきに、60 分間サスペンドし、ペレットを完全に溶解させた。

31. ゲルろ過カラム (NAP5 ; 17-0853-01、GE Healthcare) を 10 mL の PC-GTP で平衡化し、PC-GTP がなくなりそうになった段階で、行程 30 のチューブリン溶液を加えた。チューブリン溶液がなくなる直前に再度 PC-GTP を 2-3 mL カラムに加え、溶出してきた液を 6 滴ずつ、合計 7 本の 1.5 mL チューブで回収した。

32. 温めないように注意しつつ、バイオ・ラッドプロテインアッセイでタンパク質の濃度を計測した。タンパク質の濃度が 2-4 mg/mL になるように、PC-GTP を加え、5 μ L ずつ分注した後、液体窒素で凍結させた。保存は -80°C で行った。

2.2 試料調製方法

2.2.3 生化学的阻害

ダイナクチンサブユニットである p150 のコイルドコイルドメイン 1 (CC1) を、ダイニンの阻害剤として使用した (Quintyne *et al.*, 1999, King *et al.*, 2003, Gaetz *et al.*, 2004)。これは、p150-CC1 と呼ばれている。紡錘体の力学計測実験においては、p150-CC1 は、分裂中期の卵抽出液を追加する際に同時に加えた。このタイミングで加えることで、極構造の形成が阻害されることが知られている (Gaetz *et al.*, 2004)。Eg5 の阻害剤としては、monastrol (M8515, Sigma-Aldrich) を使用した (Kapoor *et al.*, 2000, Kwok *et al.*, 2006)。Monastrol は、紡錘体形成完了後に加え、30 分経過後に形や微小管密度、弾性の計測を行った。ダイニンと Eg5 を両方阻害する際にも、このような手順で行った。

2.2.4 紡錘体極領域の弾性計測

硬いガラス針は、直径 1 mm のガラス棒 (G-1000, Narishige) から鉛直落下型プーラー (PC-10, Narishige; 1 ステップ目: 86.8°C、2 ステップ目: 100.9°C、ステップサイズ: 4.8 mm) を用いて作製した。作製した針は、先端の直径が 1-2 μm 程度となる。柔らかいガラス針は、このようにして作製した硬い針の先端をマイクロフォーger (MF-900, Narishige) で引き伸ばして作製した。この方法により、たわむ部分がガラスの先端 100 μm 程度となり、空気の流れの影響がほぼない力計測が可能となった。このようにして作製した柔らかい針の中で、弾性定数が 0.3-1.0 nN/ μm のもののみを実験に使用した。

針の弾性定数の較正は、高木博士から提供されたマスター針 (弾性定数が数 10 nN/ μm) と、上記の方法で作製した柔らかい針同士を押し付け合い、そのたわみから弾性定数を決定することで行った。マスター針自体の較正は、先端を直角に曲げ、そこに重さ既知の金属線をひっかけ、針のたわみを測定することで行った。

針はマイクロマニピュレーター (MHW-3, Narishige) によって制御し、硬い針の方はピエゾアクチュエータ (P-841.20, PI Japan) に備え付けた。ピエゾアクチュエータを用い

2. 実験材料と方法

ることで、1 $\mu\text{m/s}$ という速度での硬い針の移動を、精度よく行った。また、両極領域の弾性を計測する場合、一方の極領域の計測をしてから 1 分以内にもう一方の極領域の計測を行った。紡錘体中央領域（赤道面から、二極間距離の $\pm 10\%$ の領域と定義）の弾性も極領域の計測と同様に行った。

紡錘体を内包した卵抽出液は、Pluronic F-127 (P2443, Sigma-Aldrich) で親水加工したシリコンコートガラス（特注、Matsunami Glass）に滴下した。卵抽出液の蒸発を防ぐため、その上をミネラルオイル (M-5310, Sigma-Aldrich) で覆った (Tirnauer *et al.*, 2004, Takagi *et al.*, 2013, Takagi *et al.*, 2014)。

2.2.5 リン脂質-オイル混合物の作製

リン脂質-オイル混合物の作製は、宮崎牧人博士が早稲田大学 石渡研究室において確立した手法を基に行った (Chiba *et al.*, 2014, Miyazaki *et al.*, 2015a, Miyazaki *et al.*, 2015b)。
L- α -phosphatidylcholine from chicken egg yolk (egg PC ; 840051P, Avanti Polar Lipids ; ニワトリの卵黄から抽出した、様々な疎水基を有するホスファチジルコリンの混合物) をクロロホルムに 20 mM になるように溶解し、1.5 mL ガラスチューブ (0407-03, Maruemu) に分注した。真空デシケーターの中で一晩放置することでクロロホルムを蒸発させ、チューブの底にリン脂質の膜を形成させた。これに 1 mL のミネラルオイル (23306-84, Nacalai Tesque) を加え、80°C に保ちつつ、ボルテックスにかけてリン脂質膜をオイルに溶解させた。さらに、60°C で 90 分間ソニケーション処理し (AS12GTU, As One を使用)、リン脂質をオイルに分散させた。リン脂質-オイル混合物は常温で光を避けて保管し、1 週間以内に使用した。

以下に、リン脂質-オイル混合物作製のために実際に行った詳細な手順を掲載する。

手順

使用する試薬の保存：リン脂質は酸化を防ぐため、窒素充填、-20°C で保存した。また、クロロ

2.2 試料調製方法

ホルムは Molecular Sieves (Sigma-Aldrich) で脱水しつつ、常温で保存した。

1. 1.5 mL 遠心チューブ (0030120086, Eppendorf) の中でリン脂質が 20 mM となるように脱水クロロホルムに溶解させた。
2. リン脂質-クロロホルム溶液 50 μ L を 1.5 mL ガラスチューブに入れ、デシケーターで、遮光しつつ真空状態で一晚静置。この行程により、クロロホルムを蒸発させ、ガラスチューブの底にリン脂質のドライフィルムを形成させた。
3. ミネラルオイル 1 ml をドライフィルムに加え、10 秒間ボルテックス。
4. 80°C に設定したドライバスインキュベーターで 30 分から 1 時間インキュベーション。
※ この間、何度かボルテックスを加え、フィルムがなくなることを目視で確認。
5. ミクロチューブに、熱に強いフィルム (DuraSeal ; Diversified Biotech) をかけて密封し、60°C で 90 分間ソニケーションを行った。キャップを閉じ、常温に冷却することで完成 (最終的に、ミネラルオイル中のリン脂質の濃度は 1 mM)。

※ 水がミクロチューブに入らないように注意を払った。また、ソニケーション中、蓋は閉じなかった (蓋を閉じると、フィルムが溶けることがあるため)。

2.2.6 PEG 被膜蛍光ビーズの作製

PEG 被膜蛍光ビーズの作製は、Bioconjugate Techniques 2nd Edition, pp215–223 を参考にして行った。カルボキシル基が表面に付加された蛍光ビーズ (直径 0.25 μ m ; F-8810、直径 2.0 μ m、F-8827、Life Technologies) を、1 L の PBS(-) で 1 時間透析した (69570、Thermo Scientific)。これらのビーズはその後、Sulfo-NHS (24510、Thermo Scientific)、EDC (22980、Thermo Scientific)、アミノ基が結合した PEG (methoxypolyethylene glycol amine ; 5,000 Da PEG, 06679, Sigma-Aldrich) とともに 500 μ L の PBS(-) に溶解させた (これら 3 つの化合物は、それぞれ 8–16 mg/mL になるように加えた。EDC は水溶液中で分解しやすいため、最後に溶解させた)。PEG をビーズ表面のカルボキシル基とアミド結合させるため、ローテーター (MTR103、

2. 実験材料と方法

Matsuura) で2時間ゆっくりと混合させた。終了後、遠心フィルター (4304、Millipore) を用いて、50 μL 程度になるまで濃縮した。濃縮後に、4°Cで一晩、PBS(-)で透析を行い (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices、10K MWCO ; Thermo Scientific)、未反応の化合物を除去した。こうして作製したビーズは、4°Cで保存した。

2.2.7 溶液空間での流動の解析と、微小管ネットワークの観察

Oregon-green で標識されたタキソール (OG-taxol ; P22310、Life Technologies) と p150-CC1 が、それぞれ 100 nM、800 nM の条件下で、溶液空間での流動を観察した。卵抽出液 40 μL を Pluronic F-127 で親水処理したシリコンコートガラスの上に滴下し、同じように親水処理した 20 \times 20 mm^2 のシリコンコートガラスをゆっくりとのせ、Valap (ワセリン、ラノリン、パラフィン) を等量ずつ混ぜた混合物) で密封した。MATLAB のプラグインである、PIVLab (Thielicke *et al.*, 2014) を使用し、明視野像のタイムラプスに対して PIV 解析を行った。グリッドサイズはおよそ 9.5 μm 程度である。空間相関関数 $C(\mathbf{r}, t)$ は、以下のように定義した。

$$C(\mathbf{r}, t) = \left\langle \frac{\vec{v}(\vec{x} + \vec{r}, t) \cdot \vec{v}(\vec{x}, t)}{|\vec{v}(\vec{x} + \vec{r}, t)| |\vec{v}(\vec{x}, t)|} \right\rangle_{x, \theta}$$

この式で、 $\langle \rangle_{x, \theta}$ は空間平均、そして \vec{r} の角度に対する平均を示している。

流動の観察のみの場合には、高さ 100 μm のセルを用いたが、これでは厚みがありすぎるため、微小管束の挙動を観察することが難しかった (厚みがあることで、背景光が多い)。そこで、微小管束の挙動を観察する際には、微細加工技術により SU-8 製のホール (直径 1 cm、高さ 25 μm) を作製し、その中に 5 μL の卵抽出液を滴下、親水処理した 20 \times 20 mm^2 のシリコンコートガラスをのせた。密封の効果をより高めるため、Valap の前に、白色ワセリンも用いた。

2.2.8 個々の微小管の長さの計測

卵抽出液で重合した微小管は通常、束化しているため、そのままでは個々の長さを計測するこ

2.2 試料調製方法

とは難しい。そこで、先行研究 (Mitchison *et al.*, 2013) に従って、微小管束を個々の微小管へと分離した。具体的な手順は、以下の通りである。

1. 卵抽出液に OG-taxol, p150-CC1 をそれぞれ 100 nM, 800 nM となるように加え、30 分間、20°C でインキュベーションし、微小管束を形成させた。
2. 行程 1 の卵抽出液 5 μ L を、HEPES-Taxol Buffer (250 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM MEGTA, and 20 μ M Taxol ; KOH で pH 7.7 に調整) 50 μ L に加え、チップの先をハサミで切り落としたマイクロピペットで、ゆっくりとピペッティングして攪拌した。その後、20°C で 2-5 分静置した。
3. 行程 2 の溶液に、Fixation Buffer (0.1% (v/v) glutaraldehyde, 60% (v/v) glycerol, 80 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM MEGTA ; KOH で pH 6.8 に調整) 100 μ L 加えることで、微小管を固定し、5 分間静置。
4. 行程 3 の溶液に、Fixation Buffer から glutaraldehyde を除いた溶液 1 mL を加え、顕微観察した。先行研究 (Mitchison *et al.*, 2013) に記述がある通り、明らかに他と比較して蛍光強度の強いフィラメントが数%ほど観察された。これは、分離が不十分な微小管束である可能性があるため、そのようなフィラメントは結果に含めなかった。

2.2.9 液滴の形成

OG-taxol は、原則として 100 nM になるように加えた。ダイニンの阻害剤である p150-CC1 は、細胞質流動を観察する際、原則として 800 nM 加えたが、400 nM、2000 nM 加えた実験もある (そのような場合、図のキャプションに記述)。400 nM 以上では、細胞質流動の頻度や角速度に有意差がなかったことを明記しておく。液滴形成は、16°C でインキュベーションしておいたリン脂質-オイル混合物に、卵抽出液を 5-10%(v/v)になるように加え、タッピングで攪拌した。液滴を内包したリン脂質-オイル混合物は、厚み 300 μ m の両面テープをスペーサーとしたセル

2. 実験材料と方法

に流しこみ、Valap で密封した。高さが 300 μm を超える液滴を観察する際には、両面テープを重ねて高さ 600 μm のセルを構築した。

高さ 5–10 μm の液滴を形成するために、液滴を内包したリン脂質-オイル混合物を 2–4 μL 滴下し、親水処理したシリコンコートガラス (20 \times 20 mm^2) をのせて液滴を高さ方向に圧縮した。

2.2.10 液滴内での流動の解析

液滴の中心は、液滴境界への円形のベストフィットから決定した (明視野像を使用)。また、 $d/R > 0.5$ (d : 液滴中心からの距離、 R : 液滴半径) の領域に位置しているビーズが 30 分以上、同一の高さの焦点面で観察し続けることができた場合、その流動は焦点面に平行な回転流動であると判断した。このような定義では、焦点面と回転面のなす角度の最大値は、約 11° である。なぜなら、液滴は Z 軸方向に 5 μm おきにスキャンされており、回転流動を発生した液滴における、液滴中心からビーズまでの距離の最小値が 25 μm だったからである (回転流動を発生した、最小の液滴の半径が約 50 μm)。つまり、 11° とは、以下の計算の結果である: $180 \times \pi^{-1} \times \tan^{-1}(5/25)$ 。

ビーズの位置の決定には、ImageJ のプラグイン、Particle Track and Analysis (<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/ImageJcontents/frameImageJ-en.html>) を使用した。

ビーズの角速度 ω は、以下の式から計算した。

$$\omega(t) = \left\{ \sin^{-1} \left(\frac{|\overline{X}(t) \times \overline{X}(t + \Delta t)|}{\sqrt{|\overline{X}(t)|^2 |\overline{X}(t + \Delta t)|^2}} \right) \right\} / \Delta t$$

この式の中で、 $\overline{X}(t)$ はある時刻 t における、液滴中心からビーズの位置を結ぶ、平面ベクトルである。 $\omega(t)$ の正負は、反時計回り、時計回りを示している。

図 4-2G のような、回転流動の流速プロファイルは、溶液空間と同様、PIVLab を使用して作成した (グリッドサイズ: 11 μm)。図 4-2G の中のそれぞれのプロットは、 d の領域

2.2 試料調製方法

が 0–15 μm 、 15–30 μm 、 30–45 μm 、 . . . の範囲の平均値である。

2. 実験材料と方法

2.3 光学系

2.3.1 落射型顕微鏡

以下の2種類の光学系を使用した。

1. Axio Imager (正立顕微鏡、Carl Zeiss)

対物レンズ：40×対物レンズ (0.75 NA, Carl Zeiss)

カメラ：AxioCam MRm (Carl Zeiss)

画像取得ソフト：AxioVision (Carl Zeiss)

2. 宮崎牧人博士作製の顕微鏡

対物レンズ：10×, 20×, or 40×対物レンズ (Uplan FL N 10×/0.30, UplanApo 20×/0.70, or UPlanFI 40×/0.75 Ph2, Olympus)

カメラ：iXon3 (DU-897E-CS0-#BV, Andor Technology)

画像取得ソフト：LabVIEW (National Instruments)

2.3.2 共焦点顕微鏡

IX71 (倒立顕微鏡、Olympus)

対物レンズ：40×対物レンズ (UPlanFL N 40×/1.30 Oil, PlanApo 40×/0.90W LSW, or UPlanFI 40×/0.75 Ph2, Olympus)

カメラ：iXon3 (DU-897E-CS0-#BV, Andor Technology)、iXon+ (DU-888E-C00-#BV, Andor Technology)、Hamamatsu ORCA AG (Hamamatsu Photonics)

画像取得ソフト：LabVIEW (National Instruments)、Andor iQ (Andor Technology)

共晶点ユニット：CSU10 (YOKOGAWA)

光源：空冷 ArKr レーザー (488/568)

2.4 図

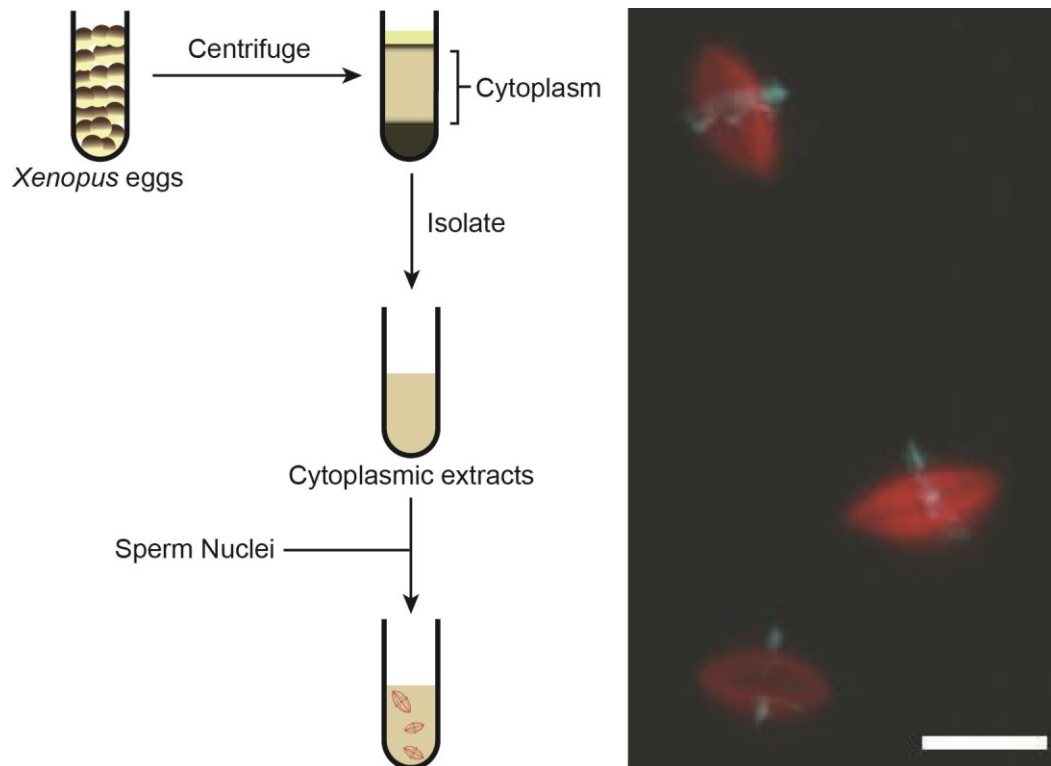


図 2-1 アフリカツメガエルの卵抽出液系

(左) 卵抽出液調製の概略図。(右) 卵抽出液中で自己組織化した紡錘体。赤が微小管、シアンが染色体。スケールバー：30 μm

2. 実験材料と方法

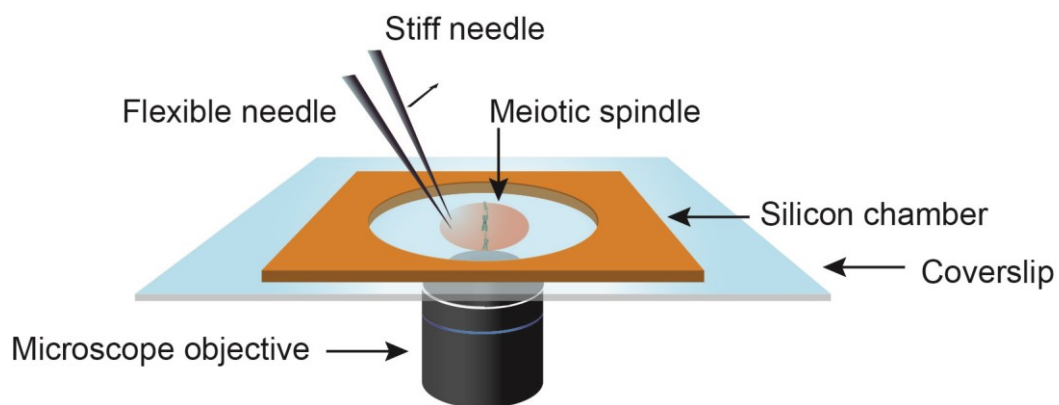


図 2-2 微小ガラス針による、紡錘体極領域の直接変形と弾性測定

硬い針のみを紡錘体の短軸方向に動かして、極領域を広げる。

3 紡錘体のミクロ力学

3.1 序論

細胞内での紡錘体の位置や方向は厳密に制御されており、これらの制御には微小管の重合・脱重合、分子モーターによる滑り運動によって生じる力が重要であると考えられている (Walczak *et al.*, 1998, Goshima *et al.*, 2005, Scholey *et al.*, 2003)。例えば、体細胞では星状体微小管が細胞膜を押し出すことで、紡錘体の位置と方向が決定され (McIntosh *et al.*, 2012, McNally, 2013)、卵母細胞では、オルガネラに結合したダイニンが星状体微小管を引っ張ることで、紡錘体は細胞の中央へと移動する (Kimura K & Kimura A, 2011)。これらの事実から、紡錘体極は力を特に受けている領域であると考えられる。つまり、極構造はこれらの力に堪えうる力学的強度を有しているはずだが、力学特性の計測は未だ報告がない。

極構造ではなく、紡錘体構造全体の力学特性の計測が近年行われている。これらの計測は、カンチレバーや微小ガラス針による力学的摂動に対する紡錘体の応答を調べることで実施されている (Itabashi *et al.*, 2009, Shimamoto *et al.*, 2011, Itabashi *et al.*, 2013, Takagi *et al.*, 2013)。こういった計測によって、極構造は紡錘体構造全体の弾性にも寄与している可能性が示されている。ダイニンの機能阻害によって極構造が失われると、紡錘体全体の弾性は著しく低下するが、さらに Eg5 の機能を阻害すると極構造が回復し、それに伴って全体の弾性も回復することが知られている (Shimamoto *et al.*, 2011)。

上記の力学摂動を与える実験は、紡錘体の力学特性だけでなく、紡錘体が外力に対して独特な応答を見せることも明らかにした。カンチレバーで挟むことによって紡錘体の幅を減少させた場合、紡錘体はアスペクト比が変形前と同等程度にまで長さが自発的に減少した (Itabashi *et al.*, 2009)。また、2本の微小ガラス針によって紡錘体を長さ方向に伸長させた場合には、紡錘体の幅が自発的に増加し、大きさは異なるが形はほぼ等しい紡錘体が形成された (Takagi *et al.*, 2014)。紡錘体には、外力に適応するように形や大きさを制御する機構が存在するものと考えられる。この機構に関する詳細は不明だが、微小管密度を維持するようにして形

3 紡錘体のマイクロ力学

状を保っていることが示唆されている (Takagi *et al.*, 2013, Takagi *et al.*, 2014)。

以上のように、極構造は細胞機能や紡錘体構造全体の維持に重要な役割を担っているにも関わらず、極構造の力学特性は明らかにされていない。そこで本研究では、極領域の形や弾性、微小管密度を計測した。なお、力学特性の計測には先行研究 (Shimamoto *et al.*, 2011) のような、動的測定を適用して弾性、粘性を同時に計測することが最適ではあるが、中央領域とは異なって、極領域はガラス針のサイズと比べて非常に小さく、動的測定を適用することが困難である。また、極領域を広げる方向に力を加えると、微小管の配列故か、ガラス針が滑ってしまい、適切に力を加えること、そして計測することが難しかった。こういった困難があり、本研究では、極領域の変形は最小限に留め、弾性のみを計測することにした (変形の程度や弾性の定義の詳細は後述する)。

3.2 結果と考察

3.2.1 極領域の定義と、紡錘体の左右対称性の定量的な評価

紡錘体の内部構造は、主に極構造と中央紡錘体 (紡錘体の赤道面付近) に分けられているが、この厳密な境界は定義されていない。その理由の1つとして、極構造や中央を特徴付ける MAPs の分布に勾配があり、かつその勾配は MAPs の種類によって異なるため (Walczak *et al.*, 1998)、合理的に境界を決定することが困難だからである。そこで、本研究では、紡錘体の形から境界を定めることができないかと考え、紡錘体の幅を、二極間距離の 5-50% の範囲で計測した (50% は、紡錘体の赤道面の位置)。その結果、極から 20% の位置で、紡錘体の長さに対する幅のプロットの傾きが変化することがわかった (図 3-1 A)。そこで、極から二極間距離の 20% までの領域を”極領域”と定義した。なお、この領域では、微小管フラックス (flux) の速度が 20-50% の領域と比較して低下していることが明らかになっている (Yang *et al.*, 2008)。次に、極領域の 2 次元的な形を特徴づけるため、極領域のアスペクト比 (aspect ratio : 縦横比) と γ 値を定義した (アスペクト比: W_p/L_p , γ 値: $S/(W_p \times L_p) \times 2$; ここで W_p , L_p , S はそれぞれ、極領域

3.2 結果と考察

の幅 (Pole width)、長さ (Pole length)、面積 (Pole area) を示す)。定義については、図 3-1 A も参照されたい。これらの定量的な解析の結果、アスペクト比と γ 値はそれぞれ、 0.51 ± 0.08 、 1.31 ± 0.09 (平均値 \pm SD、図 3-1B、C) であることがわかった。つまり、紡錘体極領域の 2 次元的な形が、楕円形に近いことが判明した。これらの結果から、アスペクト比と γ 値が平均値 $\pm 3 \times$ SD の範囲にある紡錘体を、正常な形をした紡錘体であると定義した (すなわち、アスペクト比: 0.27–0.75、 γ 値: 1.04–1.58。この範囲の数値を持つ、典型的な紡錘体の例を図 3-2 に示した)。なお、SD の 3 倍という値は、観察した紡錘体のアスペクト比や γ 値の 95%以上がその範囲に入るように設定した数字である (これらのパラメーターのばらつきがガウス分布に従うことは、正規性検定により確認した)。また、これらの形状パラメーターは両極領域でほぼ等しく、紡錘体が左右対称的な形をしていることを、定量的に示すことができた。

3.2.2 極領域の弾性

極領域の弾性を計測するために、十分に硬い針と、弾性定数を較正済みの柔らかい針を極領域に挿入し、硬い針のみを紡錘体の幅方向に $1 \mu\text{m/s}$ の速さで移動させた (図 3-3A–C、動画 3-1)。計測終了後、2 本の針を速やかに引き抜き、もう一方の極領域に挿入し、同様の弾性計測を行った。一方の極領域の弾性計測から次の極領域の弾性計測までは、1 分以内に行った。弾性計測の際、一時的に針によって広げられた極領域の形は、針を引き抜いて 2、3 秒で回復したことから (動画 3-1 の左側の極領域の時間変化を参照されたい)、弾性計測は極構造を破壊してしまうような変形ではないと考えられる。変形時の力は、柔らかい針のたわみから見積もった。極領域の弾性は、極領域を広げていくのに必要な、単位長さ当たりの力として定義した。全ての実験において、2 本の針の間の距離 d が $2 \mu\text{m}$ 増加するまでは、見積もった力と d の関係が線形であった (図 3-3D)。これは、この程度までの変形時間 (< 10 秒) や針の移動速度では、極領域が弾性的な振る舞いをしていることを示しており、先行研究の結果と一致している (Shimamoto *et al.*, 2011)。したがって、 $1 \mu\text{m/s}$ という移動速度は弾性計測に適していると判断

3 紡錘体のマイクロ力学

し、弾性は力と d のプロットの傾きとして求めた (d の範囲は $0\text{--}2\ \mu\text{m}$)。小さな変形であるためか、このようにして求めた極領域の弾性は、紡錘体の大きさ (図 3-3E、F) や極領域の形状 (図 3-3G、H) に依存しなかった。極領域の弾性は、 $0.84 \pm 0.40\ \text{nM}/\mu\text{m}$ (平均値 \pm SD、 $n = 39$ 極領域 (39 個の紡錘体の、一方の極領域のみ)) であり、この値は紡錘体全体の弾性のオーダーに等しい (Itabashi *et al.*, 2009, Shimamoto *et al.*, 2011, Takagi *et al.*, 2013)。また、両極領域において、弾性が等しいことが明らかになった (図 3-3I)。

3.2.3 極領域の弾性に対する、ダイニン、Eg5 の役割

ダイニンはダイナクチン (dynactin) と複合体を形成することで、重なり合った微小管の架橋、あるいは MAPs の極への輸送を行う (Heald *et al.*, 1996, Walczak *et al.*, 1998)。したがって、ダイニンの機能阻害による極構造の形成阻害 (図 3-4A 中央の顕微画像; cf. Gaetz *et al.*, 2004) は、微小管を架橋する力の喪失に起因していると考えられている。最初に、このようにダイニンの機能が完全に阻害されている条件下での弾性を計測しようと試みたが、構造が脆すぎるためか、柔らかい針から力を検出することができなかった。そこで、完全阻害ではなく、部分阻害時の弾性の計測を行うことにした。ダイニンの阻害剤として p150-CC1 (ダイナクチンとダイニンの結合を競合阻害; cf. Gaetz *et al.*, 2004) を使用したところ、p150-CC1 の濃度が $400\ \text{nM}$ のときには、90%以上の紡錘体で極構造の形成が阻害されていたが、 $100\ \text{nM}$ では、75%の紡錘体が正常な二極構造を維持していた (図 3-4B 左図)。そこで、p150-CC1 の濃度は $100\ \text{nM}$ とし、正常な形態を維持したままの紡錘体を選び、極領域の弾性を計測した。このような条件下では、極領域の形はコントロールと見分けがつかず、形の対称性も維持されたままだったが (図 3-5A、B 左側; アスペクト比、 γ 値における相関係数がそれぞれ、 0.48 、 0.53 、 $n = 35$)、弾性の平均値は 73%低下していた (図 3-5C、 0.84 から $0.23\ \text{nN}/\mu\text{m}$ へ減少)。このように減少しながらも、両極領域における弾性は対称的に保たれていた (相関係数 $r = 0.60$ 、図 3-5D)。弾性の低下は架橋する力の減少を反映していると考えられることができる。また、弾性が低下しても形やその対称

3.2 結果と考察

性は保たれたままだったことは、紡錘体には、自身に加わる力の変化に適応して形態を維持できる補償機構 (compensation mechanism) が備わっていることを示唆している。

ダイニン機能の完全な阻害は極構造を破壊するが、Eg5 を追加で阻害するか、あるいは Eg5 を免疫沈降法により除去した状態でダイニンの機能を阻害すると、極構造が回復する (Mitchison *et al.*, 2005)。この事実から、Eg5 はダイニンとは反対に、極構造を弱めるように機能していることが推測される (Charlebois *et al.*, 2011)。この推測を定量的に検討するため、Eg5 の阻害剤である monastrol の存在下で極領域の弾性を計測した。Monastrol は、Eg5 による ATP の加水分解で生成する無機リン酸 (Pi) の放出をアロステリックに阻害する化合物であり、Eg5 の滑り力を減少させる (つまり、Eg5 を、微小管同士の架橋はできるが、滑り運動はできない状態にする ; cf. Kapoor *et al.*, 2000, Kwok *et al.*, 2006)。Eg5 の完全阻害条件下では、紡錘体は単極構造となってしまう (図 3-4A 上)、本研究での極領域の定義が適用できないほど形が異なってしまう。そのため、Eg5 機能の阻害の効果ではなく形の違いが弾性計測に反映される可能性がある (通常、弾性定数は形に依存する)。そこで、ダイニンの機能阻害実験のときと同様、二極構造を維持した紡錘体が存在しうる monastrol 濃度を調べた。その結果、monastrol が 100 μM 存在するときには、90%以上の紡錘体が単極構造となったが、25 μM のときには 75%の紡錘体が二極構造を維持していた。したがって、monastrol が 25 μM で存在している条件下で、正常な二極構造を保っている紡錘体だけを選択し、形の対称性や弾性の計測を行った。このような条件下では、形の対称性は維持されていた (図 3-5 A、B 中図 ; アスペクト比 : 相関関数 $r=0.72$, γ 値: $r=0.43$)。一方、 γ の平均値はコントロールと同程度であったが ($p > 0.3$, Student's *t*-test)、アスペクト比は 0.51 から 0.47 に低下していた ($p < 0.05$, Student's *t*-test, 図 3-5A 中図)。しかしながら、本研究の計測方法では、元々極領域のアスペクト比に弾性は依存しないため (図 3-3G)、この程度の差であれば弾性計測への影響は無視できるものと判断した。予想していた通り、monastrol による Eg5 の機能阻害時には、弾性の平均値が 33%増加した (0.84 から 1.12 $\text{nN}/\mu\text{m}$ に増加、図 3-5C)。また、弾性は両極領域においてほぼ等しかった (相関係数 $r=0.44$ 、

3 紡錘体のマイクロ力学

図 3-5D)。弾性の増加の原因を、Eg5 の微小管への結合状態の変化から推測するのは難しい。なぜなら、X 線結晶構造解析の結果が、monastrol と ADP が結合した Eg5 は強結合状態の Kif1a (Kikkawa et al., 2001) に構造がよく似ていることを示している一方で (Yan et al., 2004)、運動性解析 (motility assay) の結果は逆に、monastrol と ADP が結合した Eg5 は弱結合状態にあることを示唆しているからである (Crevel et al., 2004)。弾性増加の別の原因としては、紡錘体内の微小管の流動性の変化が挙げられる。Monastrol が 25 μ M 存在している条件下では、微小管フラックスの速度がおよそ半分に低下していることが報告されている (Miyamoto et al., 2004)。したがって、極領域の弾性の増加は、アクチン-ミオシンネットワークで示されているように (精製したアクチン繊維とミオシンで構成されるネットワークは、ATP 枯渇条件下でミオシンによる滑り運動が生じない状態になると、弾性が増大する ; cf. Humphrey et al., 2002)、微小管の流動性の低下に起因するものと考えられる。

ダイニンの阻害に加えて Eg5 の機能を阻害すると、極構造だけでなく、紡錘体構造全体の弾性も回復する (Shimamoto et al., 2011)。この結果は、極構造が紡錘体構造全体の弾性に関係していることを示唆しているが、極領域自体の弾性が回復しているのかどうかは明らかではない。そこで、p150-CC1、monastrol がそれぞれ 100 nM、25 μ M 存在する条件下で、極領域の形や弾性を計測した。その結果、アスペクト比の平均値が 0.51 から 0.48 へと若干低下したが (図 3-5C)、monastrol 存在下での実験の場合と同様、この程度の差では弾性計測への影響は無視できると判断した。形の対称性に関しては、アスペクト比の対称性は維持されていたものの (相関係数 $r=0.69$ 、図 3-5A)、 γ 値の対称性は他の条件 (コントロール、またはダイニン、Eg5 のどちらか一方のみを阻害) と比較して損なわれていた ($r=0.09$ 、図 3-5B)。この結果は、ダイニンと Eg5 はお互いに補うようにして形の対称性を維持する機構を備えていることを、暗示しているのかもしれない。一方、極領域の弾性はコントロールと同等程度にまで回復していた (図 3-5C、 0.81 ± 0.40 nN/ μ m、平均値 \pm SD、 $n=40$ (40 個の紡錘体の、片方の極領域のみ)、コントロールは、 0.84 ± 0.40 nN/ μ m)。

3.2 結果と考察

次に、極領域との比較のため、紡錘体の赤道面付近の弾性計測を行った。まず、紡錘体の赤道面から二極間距離の $\pm 10\%$ 以内の領域を、“中央領域”と定義した。中央領域においても、弾性の計測や阻害剤の濃度調整は極領域の場合と同様に行った(図 3-6A)。中央領域の弾性は 0.49 ± 0.32 nN/ μm であり、極領域と比較して有意に小さかった($p < 0.05$, Mann-Whitney *U* test)。また、中央領域の弾性も、極領域の弾性と同様、紡錘体の大きさ(図 3-6B、C)や極領域の形(図 3-6D、E)に相関がなかった。ダイニンの機能の完全な阻害は極構造を大きく変化させてしまう一方で、紡錘体の幅自体は変化させない(図 3-4A 中央)。この結果より、ダイニンの機能阻害は、紡錘体の赤道面付近では極領域よりも効果が低いのではないかと推測した。予想通り、ダイニンの機能阻害時には、極領域では 73%弾性の平均値が減少したにも関わらず(0.84 から 0.23 nN/ μm に減少、図 3-5C)、中央領域での減少は 50%であった(0.49 から 0.24 nN/ μm に減少、図 3-6F、G)。次に、Eg5 の機能阻害時の中央領域の弾性計測を行った。極領域の弾性の際に考察したように、もし流動性の低下が弾性の増加につながっているのだとすると、中央領域では極領域と比べて微小管フラックスの速度が速いため、monastrol による弾性増加の効果は、中央領域の方が高いことが考えられる。実際、極領域では弾性の平均値が 33%増加したが(0.84 から 1.12 nN/ μm に増加、図 3-5C)、中央領域では 83%の増加を示した(0.49 から 0.89 nN/ μm に増加、図 3-6F、G)。同時阻害の際には、極領域の弾性とは異なり、中央領域の弾性の平均値は有意に増加していた(0.49 から 0.78 nN/ μm 、図 3-6F、G)。この結果は、p150-CC1 の弾性低下効果は中央領域で低く、逆に monastrol による弾性増加の効果は中央領域で高いことを反映しているのだと考えられる。

3.2.4 極領域における、弾性と微小管密度の関係

紡錘体構造全体の弾性は、微小管密度に依存していることが示されている(Shimamoto *et al.*, 2011)。この事実は、本研究で明らかにした、阻害剤存在下での極領域の弾性変化が、次のような機構で生じたものである可能性を示唆する。阻害剤によってダイニン、Eg5 の架橋動態が

3 紡錘体のマイクロ力学

変化し、微小管密度を変化させたことが、弾性の変化につながったという可能性である。したがって、弾性計測を行ったときの阻害剤の濃度で、微小管密度が変化するのかを調べるため、以前に高木潤博士が確立した手法を用いて(Takagi, *et al.*, 2013, Takagi *et al.*, 2014)、紡錘体極領域の微小管密度を概算した。紡錘体を3次元蛍光観察し、体積 V と、蛍光標識されたチューブリンの量 M を蛍光強度から計測する。微小管密度 D は、 $D = M/V$ から計算する。このようにして計算した微小管密度は、あくまで相対値であり、実際の微小管密度とは異なることに注意されたい。この式で求めた極領域における微小管密度は、弾性と類似した変化を見せた。つまり、ダイニンの機能を阻害した際には平均値が25%低下し(79 から 59 a.u./ μm^3 に低下)、Eg5の機能を阻害した際には43%増加した(79 から 113 a.u./ μm^3 に増加、図3-7A)。同時阻害の際には、ほぼ元の値にまで回復した(コントロール、同時阻害ともに平均値は79 a.u./ μm^3 、図3-7A)。また、両極領域における微小管密度は、阻害剤の有無に関わらず、ほぼ等しかった(図3-7B)。もし、弾性が微小管の剛性にのみ依存する場合(つまり、ダイニンとEg5は単に微小管密度を制御するのみで、架橋が弾性に寄与していない場合)、微小管密度と弾性は線形関係になる(Claessens *et al.*, 2006)。この可能性を検証するため、極領域の弾性の微小管密度依存性を、 D^b (D : 微小管密度)でフィッティングし、 b の値を決定した(図3-7C)。その結果、 b の値は1.91であり、先行研究の結果と一致した(Shimamoto *et al.*, 2011)。この結果は、極領域の弾性が微小管の弾性だけでなく、タンパク質による架橋にも依存していることを示唆している(Claessens *et al.*, 2006)。例えば、ダイニンの機能阻害の場合、p150-CC1は架橋タンパク質の個数を減少させることで、弾性を低下する。このような効果に加えて、p150-CC1は微小管密度を低下させることで、弾性低下を引き起こす。

弾性が架橋タンパク質に依存しているという、本研究のこれまでの結果を踏まえると、極領域と中央領域の弾性の相違は、架橋タンパク質の分布の相違に起因していることが考えられる。実際、微小管密度は極領域と中央領域でほぼ等しいにも関わらず(極領域: 79 ± 12 a.u./ μm 、中央領域: 78 ± 16 a.u./ μm 、 $n = 39$ 紡錘体)、弾性は中央領域の方が有意に小さい(極領域: 0.84

3.2 結果と考察

± 0.34 a.u./ μm 、中央領域： 0.49 ± 0.32 a.u./ μm 、 $n = 39$ 紡錘体)。阻害剤存在下でも、同様の傾向が見られた（図 3-6G、3-8）。極領域と中央領域の弾性が紡錘体の形に依存していなかったことから（図 3-3E、F、3-6B、C）、この結果は、極領域と中央領域の形の相違を反映している可能性は低い。むしろ、極領域と中央領域での架橋タンパク質の分布の相違を反映している可能性が高く、架橋タンパク質が弾性の決定に寄与しているという本研究の結論を支持するものであると考えられる。

3.2.5 力学特性や形における、紡錘体の対称性維持

これまで、両極領域の形、弾性、微小管密度は、個々の紡錘体において対称であることを示してきた。次に、このような対称性が動的に維持されているものなのかどうかを調べるため、紡錘体の一方の極領域を 2 本のガラス針で広げた状態に維持し続け、もう一方の極領域の形や弾性、微小管密度がどのように変化するかを調べた。一方の極領域のみを広げた状態に維持し続ける際、紡錘体が焦点面から傾いて観察ができなくなることを防ぐため、もう一方の極領域に、できるだけガラス面に平行にセットしたガラス針を置いた（挿入はしていない）。一方の極領域（変形側）のみを広げ続けると（図 3-9A 0 min、B 左図）、もう一方の極領域（非変形側）が自発的に広がっていき、樽型の構造を形成した（図 3-9A 11 min、B 左図）。紡錘体が樽型の構造となったとき、変形側と非変形側の極領域の γ 値の比は 1.00 ± 0.13 （平均値 \pm SD、 $n = 15$ 紡錘体）であった。これは、紡錘体が外力による非対称変形に適応するように、新たな対称性を獲得したことを示している。

先行研究通り、針を挿入し続けると、紡錘体は針から自発的に抜けてしまった（Gatlin *et al.*, 2010）。針から抜けて 10 分以内に、変形側の極構造は回復した（図 3-9A 21 min、B 左図）。そして、変形側の回復に伴い、非変形側の極構造も回復した（図 3-9A 43 min、B 左図）。極構造の回復過程は、2 つの紡錘体が 1 つに融合する過程に類似していた（Gatlin *et al.*, 2009, Takagi *et al.*, 2013）。この紡錘体の融合はダイニンの機能によって起こっていることが知られているた

3 紡錘体のマイクロ力学

め (Gatlin *et al.*, 2009)、本研究で観察された極構造の回復には、ダイニンが関与している可能性が考えられる。極領域の形だけでなく、蛍光強度から見積もった微小管密度も同様の変化を示した。一方の極領域を広げた状態で維持すると、この変形側の微小管密度は減少した (図 3-9B 右図 0 min)。この減少に伴い、もう一方の極領域の微小管密度も減少していた (図 3-9B 右図 5 min)。この他、2つの紡錘体の例を、図 3-10 に示す)。特筆すべき結果として、どの例においても (図 3-9、3-10)、非変形側の微小管密度の低下は、 γ 値の増加より早く起こっていたことである。つまり、変形を加えていない側の極領域が広がったのは、微小管密度の低下によって、構造として弱くなった結果ではないかと考えられる。さらに、これらの結果から、対称性維持に関して以下の様なことが推測できる (図 3-11)。2本の針で広げたことが、微小管同士の間隔を広げ、架橋タンパク質の解離が生じる。このような解離が紡錘体の長さ方向にほぼ一定の速度で伝搬されていく (非変形側でも、変形側と同様の微小管密度低下が時間の遅れを伴って起こったことからの推測)。このような推測は、紡錘体が樽型の構造となるまでの時間が、紡錘体の幅ではなく長さに依存していたという結果によって支持される (図 3-9C)。

微小管密度と弾性には強い相関があるため、広げた状態を維持し続けた場合、変形側も非変形側も弾性が低下するのではないかと期待した。予想通り、樽型の構造が形成されたとき、変形側の弾性は低下し (図 3-9D、open circles)、非変形側の弾性も、低下した変形側の値とほぼ等しかった (図 3-9D、closed circles)。変形したことによって弾性が変化してしまう可能性があるため、非変形側については、樽型になる前には計測を行っていない。つまり、非変形側の弾性が元から低かったのか、それとも変形側の弾性低下に適応して低下したのかは、実験的には示されていない。しかしながら、両極領域の弾性が等しいという結果 (図 3-3I) から、後者の可能性が高いと判断した。まとめると、これらの結果は、紡錘体には形、弾性、微小管の両極領域における対称性を、動的に維持する機構が存在することを示唆している。

3.2 結果と考察

3.2.6 対称性維持機構における、ダイニン、Eg5 の寄与

形の対称性は、ダイニンと Eg5 を同時に阻害した際には、他の条件と比較して低下していた (図 3-5B 右)。この結果は、対称性を維持する紡錘体の能力が損なわれていたことに起因していた可能性がある。この推測を検証するため、100 nM の p150-CC1 と 25 μ M の monastrol が存在する条件下で (図 3-5 の右図の実験と同じ条件)、紡錘体の一方の極領域のみを広げた状態で維持した。その結果、非変形側の γ 値は変化しなかった (図 3-12 A 22、32 min、B 左図)。つまり、コントロールの結果とは異なり、紡錘体の動的対称構造維持機構は損なわれていた。変形側の微小管密度は、コントロールと同様 (図 3-9B 右図)、広げるといふ変形から数分以内に減少した。一方、非変形側は、微小管密度の減少は 20 分以上後になってから開始された (図 3-12 B 右図)。コントロールでは、非変形側の密度減少は 5 分以内に開始していたことと比較すると (図 3-9B 右図、3-10B 右図)、非常に遅くなっている。先行研究により、紡錘体に一過的に変形を加えた場合、微小管密度が変形前の値に回復し、この回復に伴って形の回復が起こることが示されている。この結果は、微小管密度の制御が形態維持に重要であることを示唆している (Takagi *et al.*, 2014)。この先行研究の結果と、微小管密度減少の開始時間の遅れという本研究の結果から、ダイニンと Eg5 の両者を阻害すると、紡錘体の微小管密度を動的に制御する能力が損なわれ、その結果、形の対称性が維持されにくくなったのではないかと考えられる。

3.3 本章のまとめ

本章では、紡錘体極領域の形と力学特性を明らかにしてきた。紡錘体極領域の形や弾性、微小管密度は、紡錘体ごとに固有の値を持ち、ばらつきがあるにも関わらず、個々の紡錘体ではこれらのパラメーターが両極領域において対称的であることが明らかになった。また、これらのパラメーターは、ダイニンやEg5といった分子モーターの機能を阻害すると大きく変化したが、対称性はほとんどの場合維持されたままだった。

特筆すべき結果としては、ダイニンとEg5の機能が正常に働いているときには、こういった対称性が動的に保たれていたことである。紡錘体は対称的な形をしているということは一般的に受け入れられている事実であることや、従来行われてきた生化学的阻害では非対称な摂動を与える事自体が困難であったためか、「紡錘体の対称性はどのようにして維持されているのか?」といった、基本的な疑問が提示されることはほとんどなかった。紡錘体は、非常に多くの分子が、互いに相互作用しながら構築される、極めて複雑な構造体である。そのため、本章の結果だけでは、その分子機構にまで踏み込んで説明することはできないが、紡錘体内の微小管密度の制御が鍵となることを示唆する結果が得られた。紡錘体内で微小管密度を制御するタンパク質は既によく知られているものが多数あり (Kif2a, MCAK, Augmin, Op18 など; cf. Gaetz *et al.*, 2004, Desai *et al.*, 1999, Goshima *et al.*, 2008, Belmont *et al.*, 1996)、これらの機能阻害や動態観察と非対称変形を組み合わせることで、紡錘体の対称性維持機構の詳細が明らかになる可能性がある。

紡錘体の対称性維持機構の、機能的な意義について考察する。紡錘体のもっとも重要な機能の1つは、染色体を2つの娘細胞に、正確かつ同時に分配することである。分裂後期において、染色体は紡錘体の内部を移動していく。この事実から、形状や力学的性質が左右で対称的であることは、赤道面から両極へと向かう染色体対が、同じ速さで移動するのに役立つのではないかと推測できる。

3.4 図

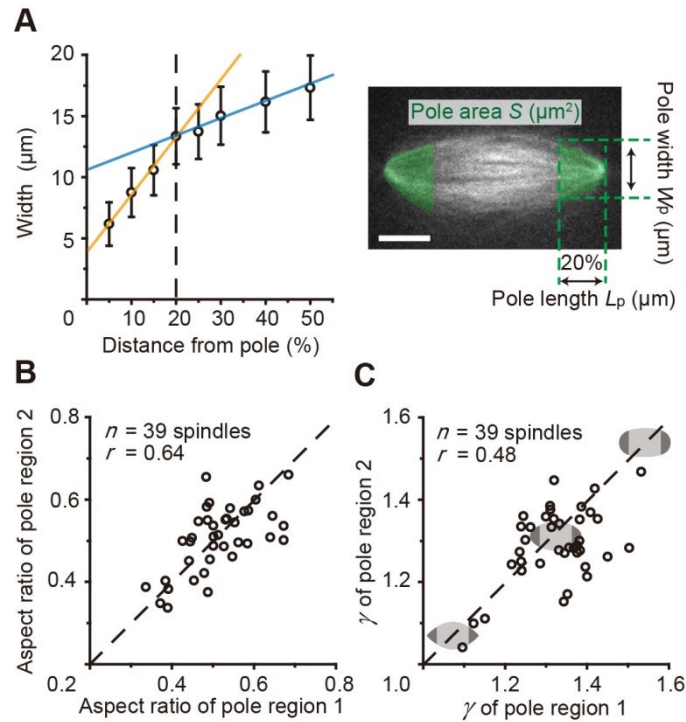


図 3-1 紡錘体の形状対称性

(A) 極からの距離に対する紡錘体の幅の関係と (左図)、極領域の幅 W_p 、長さ L_p 、面積 S の定義 (右図)。左図では、極からの距離を紡錘体の二極間距離で規格化している (つまり、50%は赤道面での紡錘体の幅を意味している)。各プロットは、28 個の紡錘体の平均値で、エラーバーは SD。オレンジと青の直線は、それぞれ距離が 5-20%、20-50%のときのプロットに対するベストフィットを表し、傾きはそれぞれ、0.47、0.14 である。右図のスケールバーは、10 μm 。

(B, C) 両極領域のアスペクト比 (B)、 γ 値 (C) の比較。アスペクト比、 γ 値はそれぞれ、 W_p/L_p 、 $S/(W_p \times L_p) \times 2$ という式から計算した。軸ラベルの 1、2 という表記はそれぞれ、紡錘体の左側、右側の極領域を表す。なお、形態に異常があると判断した紡錘体 (つまり、平均値から SD の 3 倍以上の値を持つ紡錘体) はこの図には含まれていない。そのような異常な形態の紡錘体の多くは、そもそも二極構造をしていないか (単極、数百個に 1 個ほどは三極)、あるいは γ 値が 2 に近い紡錘体であった。アスペクト比、 γ 値の平均値 \pm SD

3 紡錘体のマイクロ力学

はそれぞれ、 0.51 ± 0.08 、 1.31 ± 0.09 (39 個の紡錘体の、78 個の極領域)。(C) 中のイラストは、その座標における γ 値を持つ紡錘体の形状を模式的に表している。 γ 値と極領域の形の関係は、以下の通りである。 $\gamma = 1.0$; 三角形、 $\gamma = 1.57$; 半円、 $1.0 < \gamma < 1.57$; 半楕円。

3.4 図

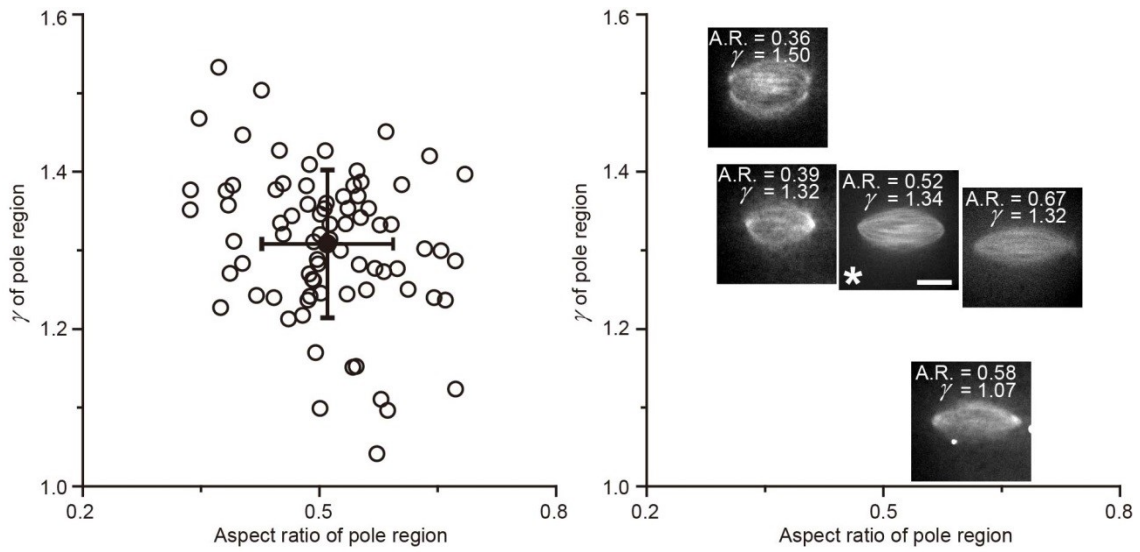


図 3-2 様々なアスペクト比と γ 値を持つ、典型的な紡錘体の例

(左図) 極領域のアスペクト比と γ 値の関係。黒丸は平均値であり、エラーバーは SD を表している。相関係数 $r = -0.29$ (39 個の紡錘体の、78 個の極領域)。

(右図) 観察された中で、最大、最小に近いアスペクト比や γ 値を持つ紡錘体の顕微画像。画像の中央が、個々の紡錘体の両極領域のアスペクト比と γ 値の平均値に対応している。アスタリスク記号がついている画像は、典型的な形状の紡錘体の例であり、アスペクト比と γ 値の両極領域の平均値はそれぞれ0.52と1.34である。これらの数値は、全ての紡錘体の平均値に近い(0.51、1.31)。スケールバーは15 μm 。

3 紡錘体のマイクロ力学

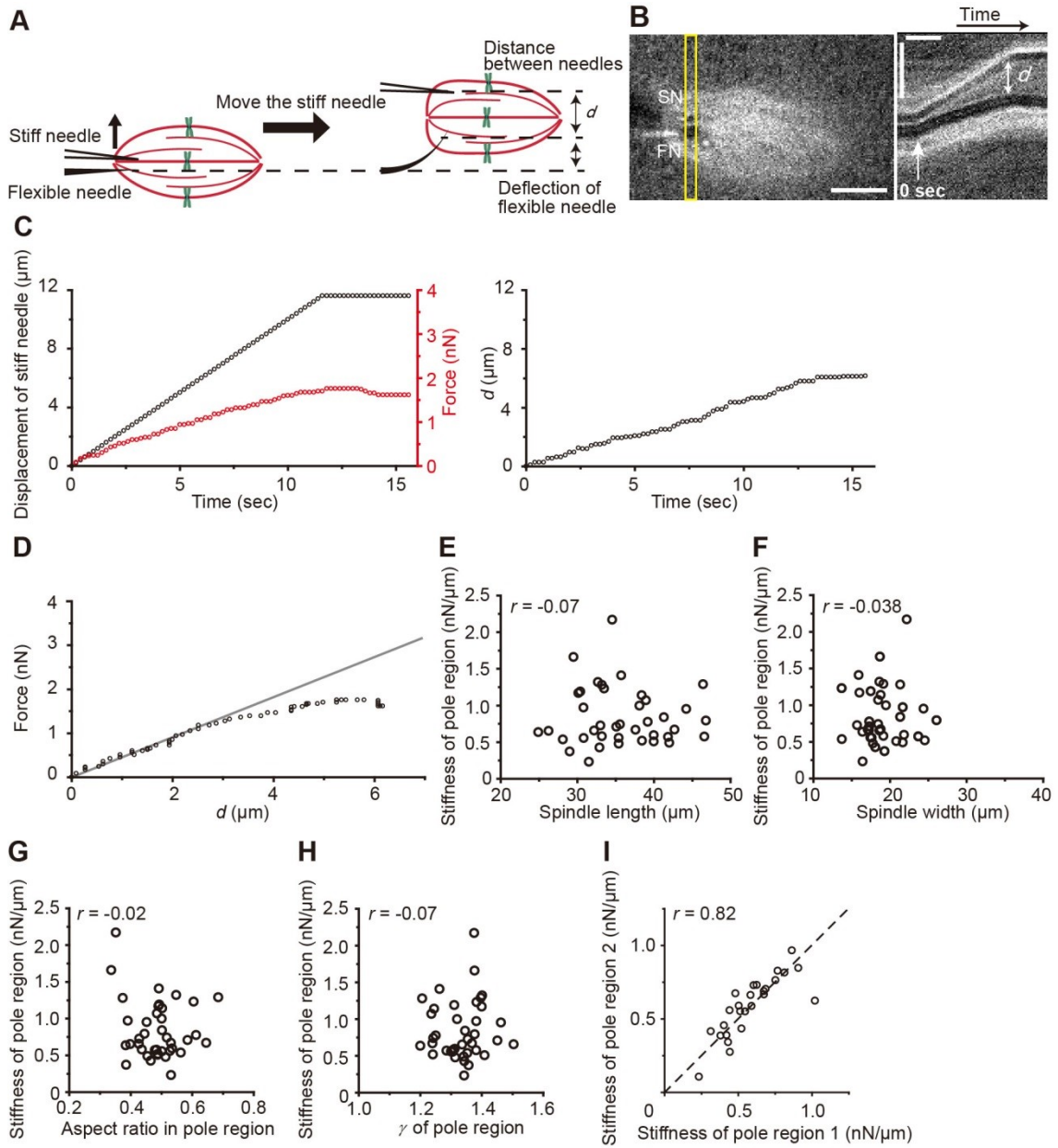


図3-3 両極領域の弾性

- (A, B) 微小ガラス針を用いた紡錘体極領域の弾性計測の模式図 (A) と、顕微画像 (B)。 (B) において、SN、FN はそれぞれ、硬い針 (Stiff Needle) と柔らかい針 (Flexible Needle) を表す。 (B) の右図は、左図の黄色の四角形の領域のカイモグラフである。スケールバーは、 $10 \mu\text{m}$ (左図の水平バーと右図の垂直のバー)、 4 s (右図の水平のバー) である。
- (C) (B) の実験から得られた、硬い針の移動と (左図)、針の間の距離 d (右図) の時間経過。左図の赤いプロットは、柔らかい針のたわみから見積もった力を表し、黒いプロットは硬

3.4 図

い針の移動を表す。

(D) (B) の実験から得られた、 d と力の関係。灰色の直線は、 d が 0–2 μm の範囲におけるプロットのベストフィットを表す。

(E–H) 極領域の弾性の、紡錘体の長さ (E)、幅 (赤道面での紡錘体の幅) (F)、極領域のアスペクト比 (G)、 γ 値 (H) への依存性。 r は相関係数を表し、これらは 39 個の紡錘体の、39 個の極領域のデータである。

(I) 両極領域の弾性の比較。軸ラベルの 1、2 という表記はそれぞれ、紡錘体の左側、右側の極領域を表す。

3 紡錘体のマイクロ力学

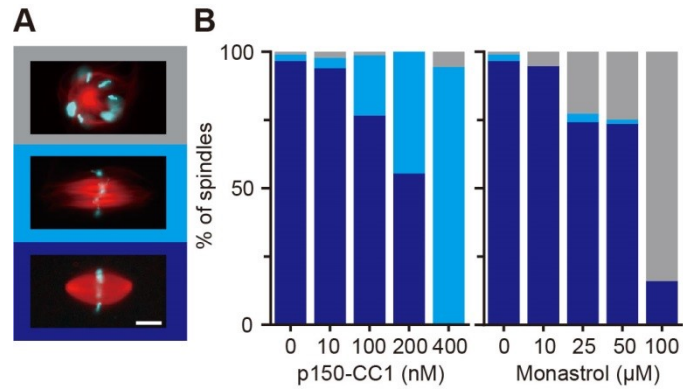


図 3-4 p150-CC1、monastrol の紡錘体形状への影響

- (A) 上図、中図、下図はそれぞれ、単極紡錘体、極構造のない紡錘体、正常な紡錘体の蛍光顕微画像である。これらの紡錘体はそれぞれ、25 μM monastrol 存在下、100 nM p150-CC1 存在下、そして阻害剤を加えていない卵抽出液中で形成された紡錘体である。顕微画像の中で、赤は微小管、シアンは染色体を表している。染色体は、50 nM Sytox Green Nucleic Acid Stain (S7020、Life Technologies) で可視化した。スケールバーは、15 μm。
- (B) p150-CC1 (左図)、monastrol (右図) の紡錘体形状への影響と、その濃度依存性。灰色、水色、青色はそれぞれ、単極紡錘体、極構造のない紡錘体、正常な紡錘体を表す。それぞれのバーは、90–236 個の紡錘体を含む。

3.4 図

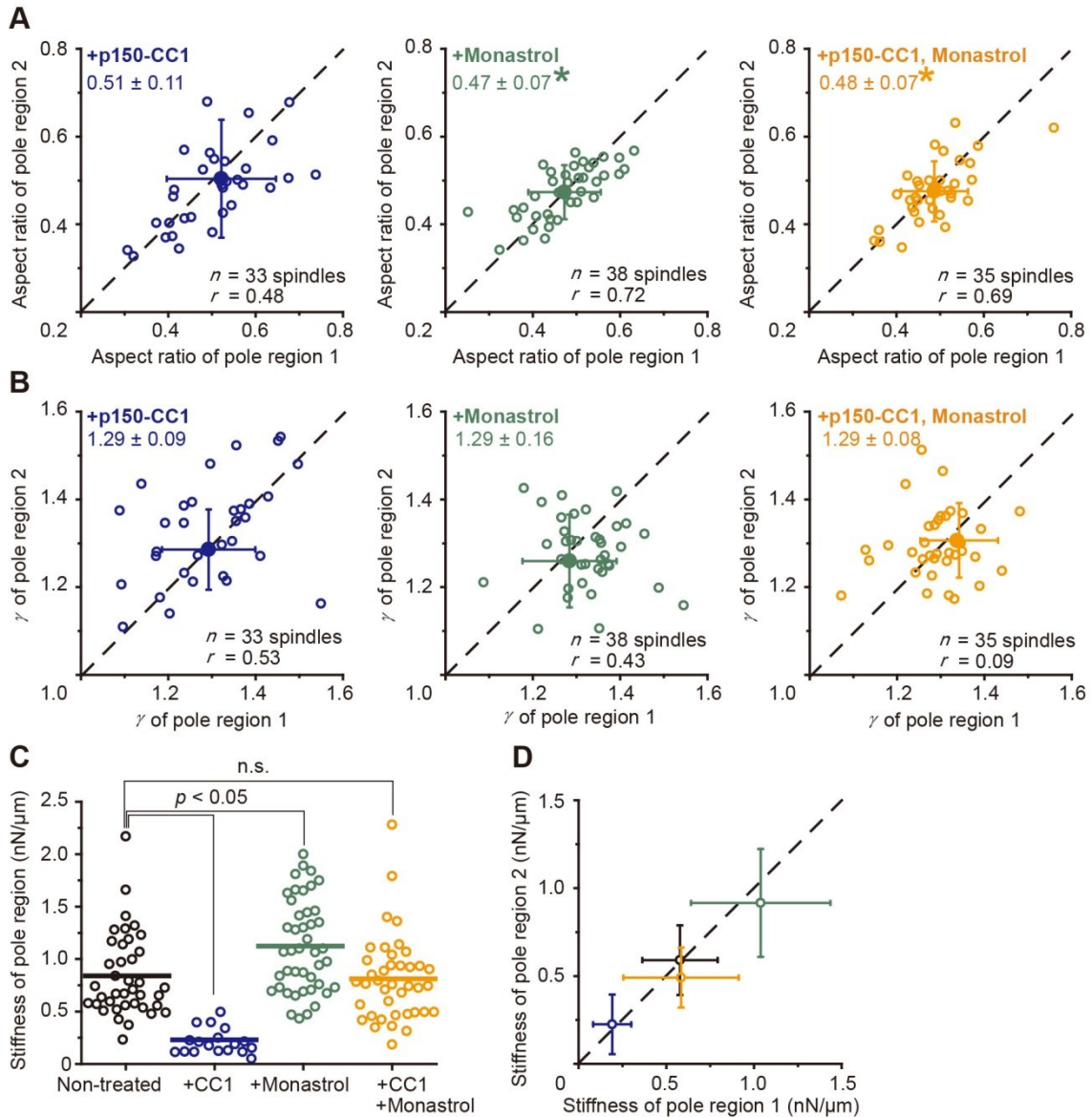


図3-5 極構造の力学的強度におけるダイニン、Eg5の役割

全ての図において、青、緑、オレンジはそれぞれ、p150-CC1存在下、monastrol存在下、そして両方の阻害剤存在下でのデータであることを表す。

(A, B) 阻害剤存在下での、両極領域のアスペクト比 (A)、 γ 値 (B) の比較。軸ラベルの1、2という表記はそれぞれ、紡錘体の左側、右側の極領域を表す。平均値 ± SD は、図中の左上に表記されている。アスタリスク記号がついている値は、阻害剤が存在しない条件下での値と有意に異なっていることを表している ($p < 0.05$ by Student's *t*-test)。中を塗りつぶしたプロットは、平均値を示している。

3 紡錘体のマイクロ力学

(C) 阻害剤存在下での、極領域の弾性。実線は平均値を表している。

平均値 \pm SD はそれぞれ、 0.84 ± 0.40 (阻害剤が存在下しない条件下)、 0.23 ± 0.14 (p150-CC1 存在下)、 1.12 ± 0.44 (monastrol 存在下)、 0.81 ± 0.41 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

n 数はそれぞれ、39 (阻害剤が存在下しない条件下)、18 (p150-CC1 存在下)、44 (monastrol 存在下)、40 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

検定は Mann-Whitney *U* test によって行い、n.s.は not significant ($p > 0.1$) を表す。

(D) 両極領域における弾性の比較。

n 数はそれぞれ、26 (阻害剤が存在下しない条件下)、15 (p150-CC1 存在下)、15 (monastrol 存在下)、11 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

相関係数はそれぞれ、0.82 (阻害剤が存在下しない条件下)、0.60 (p150-CC1 存在下)、0.44 (monastrol 存在下)、0.80 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

3.4 図

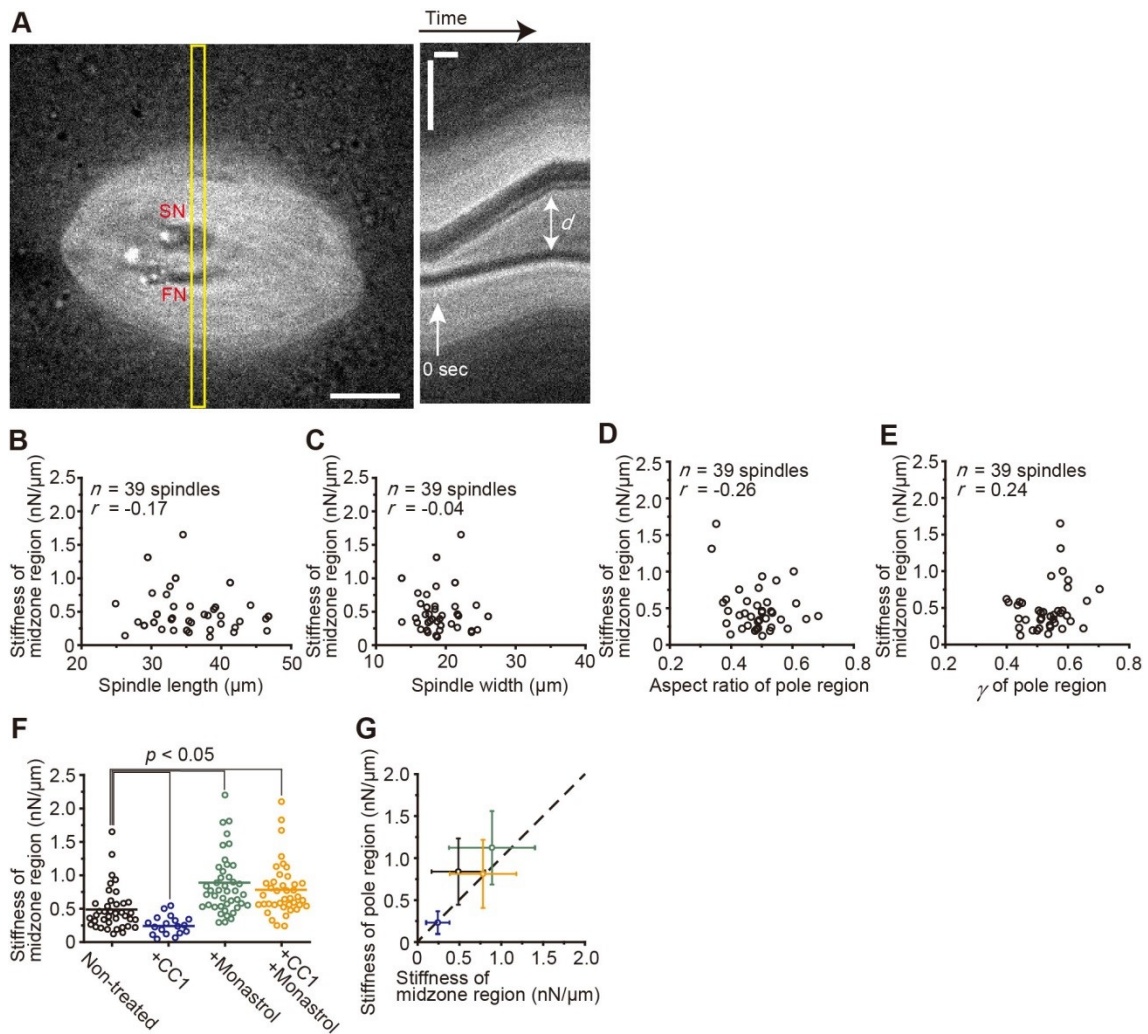


図 3-6 中央領域の弾性

(A) 微小ガラス針を用いた紡錘体中央領域の弾性計測の顕微画像。SN、FN はそれぞれ、硬い針 (Stiff Needle) と柔らかい針 (Flexible Needle) を表す。右図は、左図の黄色の四角形の領域のカイモグラフである。スケールバーは、10 μm (左図と右図の垂直のバー)、4 s (右図の水平のバー) である。

(B-E) 中央領域の弾性の、紡錘体の長さ (B)、幅 (赤道面での紡錘体の幅) (C)、極領域のアスペクト比 (D)、 γ 値 (E) への依存性。 r は相関係数を表し、これらは 39 個の紡錘体の、39 個の極領域のデータである。

(F) 阻害剤存在下での、中央領域の弾性。実線は平均値を表している。

平均値 \pm SD はそれぞれ 0.49 ± 0.32 (阻害剤が存在下しない条件下)、 0.24 ± 0.14 (p150-CC1

3 紡錘体のマイクロ力学

存在下)、 0.89 ± 0.51 (monastrol 存在下)、 0.78 ± 0.40 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

n 数はそれぞれ、39 (阻害剤が存在下しない条件下)、18 (p150-CC1 存在下)、44 (monastrol 存在下)、40 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

検定は Mann-Whitney *U* test によって行った。

(G) 中央領域と極領域の弾性の比較。黒、青、緑、オレンジはそれぞれ、阻害剤が存在しない条件下、p150-CC1 存在下、monastrol 存在下、そして両方の阻害剤存在下でのデータであることを表す。

3.4 図

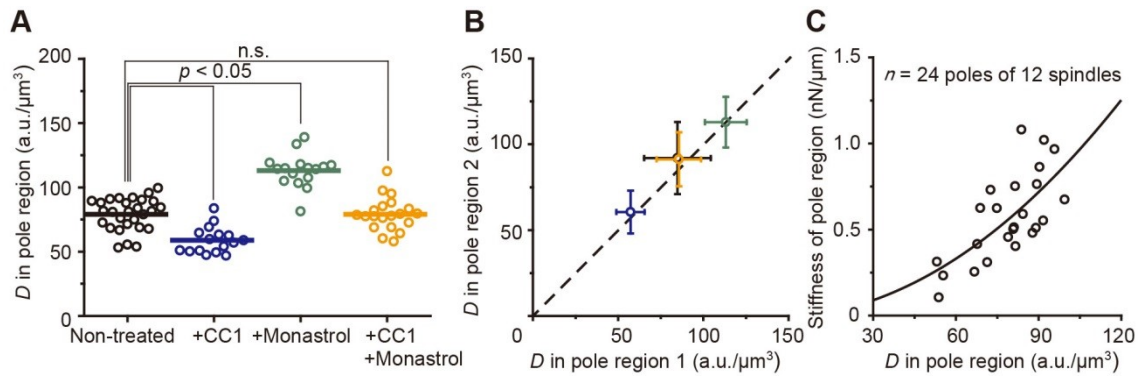


図 3-7 阻害剤の、極領域の微小管密度への影響

全ての図において、黒、青、緑、オレンジはそれぞれ、阻害剤が存在しない条件下、p150-CC1 存在下、monastrol 存在下、そして両方の阻害剤存在下でのデータであることを表す。

(A) 極領域の微小管密度 D 。

n 数 (極領域の数) はそれぞれ、28 (阻害剤が存在しない条件下)、14 (p150-CC1 存在下)、16 (monastrol 存在下)、10 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。検定は Student's t -test によって行い、n.s.は not significant ($p > 0.1$) を表す。

(B) 両極領域の微小管密度の比較。軸ラベルの 1、2 という表記はそれぞれ、紡錘体の左側、右側の極領域を表す。

n 数 (紡錘体の数) はそれぞれ、19 (阻害剤が存在しない条件下)、8 (p150-CC1 存在下)、8 (monastrol 存在下)、10 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。エラーバーは SD を表している。

(C) 極領域における、微小管密度 D と弾性の関係。実線は、ベストフィットを表す ($a \times D^b$ 、 $a = 1.34 \times 10^{-4}$ 、 $b = 1.91$)。

3 紡錘体のマイクロ力学

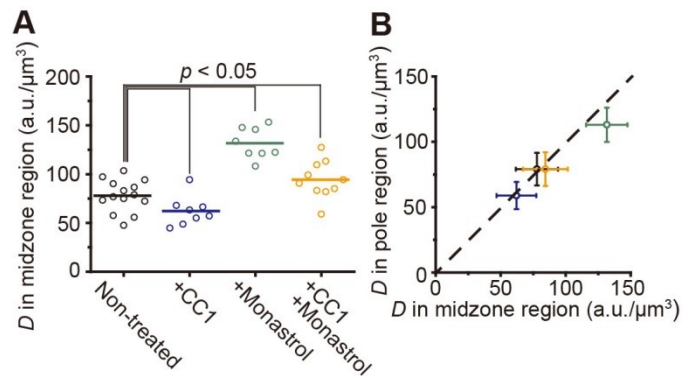


図 3-8 中央領域の微小管密度への、阻害剤の影響

(A, B) 中央領域の微小管密度への、p150-CC1、monastrol の影響 (A) と、極領域の微小管密度との比較 (B)。

平均値 \pm SD はそれぞれ 78 ± 16 (阻害剤が存在下しない条件下)、 62 ± 15 (p150-CC1 存在下)、 132 ± 16 (monastrol 存在下)、 84 ± 17 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

n 数はそれぞれ、14 (阻害剤が存在下しない条件下)、8 (p150-CC1 存在下)、8 (monastrol 存在下)、10 (p150-CC1、monastrol が両方存在している条件下)。

3.4 図

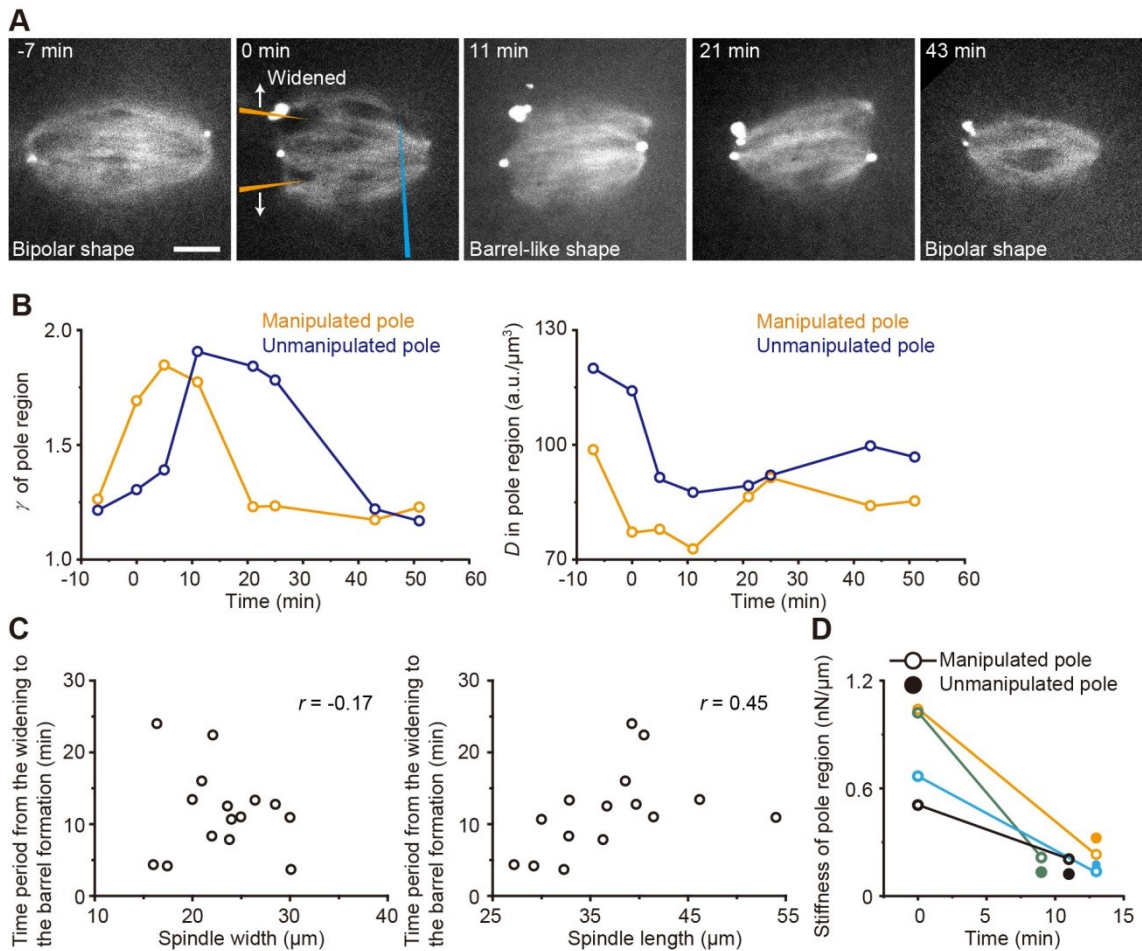


図 3-9 非対称変形に対する、紡錘体の応答

- (A) 微小ガラス針によって、左右非対称に変形され、そのまま 10 分間維持された紡錘体のタイムラプス画像。0 min が、変形された時間である。オレンジの棒が変形のための針を表しており、青色の棒が、紡錘体が焦点面から傾くのを防ぐための針を表している。スケールバーは、10 μm 。
- (B) (A) の実験から得られた、極領域の γ 値 (左図) と微小管密度 D (右図) の時間経過。
- (C) 非対称変形の際に、変形を加えていない側の極領域 (Unmanipulated pole) の γ 値が最大になるまでの時間と、紡錘体の幅 (左図)、長さ (右図) との関係。なお、変形を加えていない側の γ 値が最大になったときには、全ての紡錘体が樽型の構造になっていた。15 個の紡錘体の結果をプロットしており、 r は相関係数を表している。

3 紡錘体のマイクロ力学

(D) 非対称変形前後の、極領域の弾性変化。同色のプロットは、同じ紡錘体であることを表す。また、中を塗りつぶしているプロットは、変形を加えていない側、塗りつぶしていないプロットは変形を加えた側の極領域の弾性である。4個の紡錘体の結果をプロットしている。

3.4 図

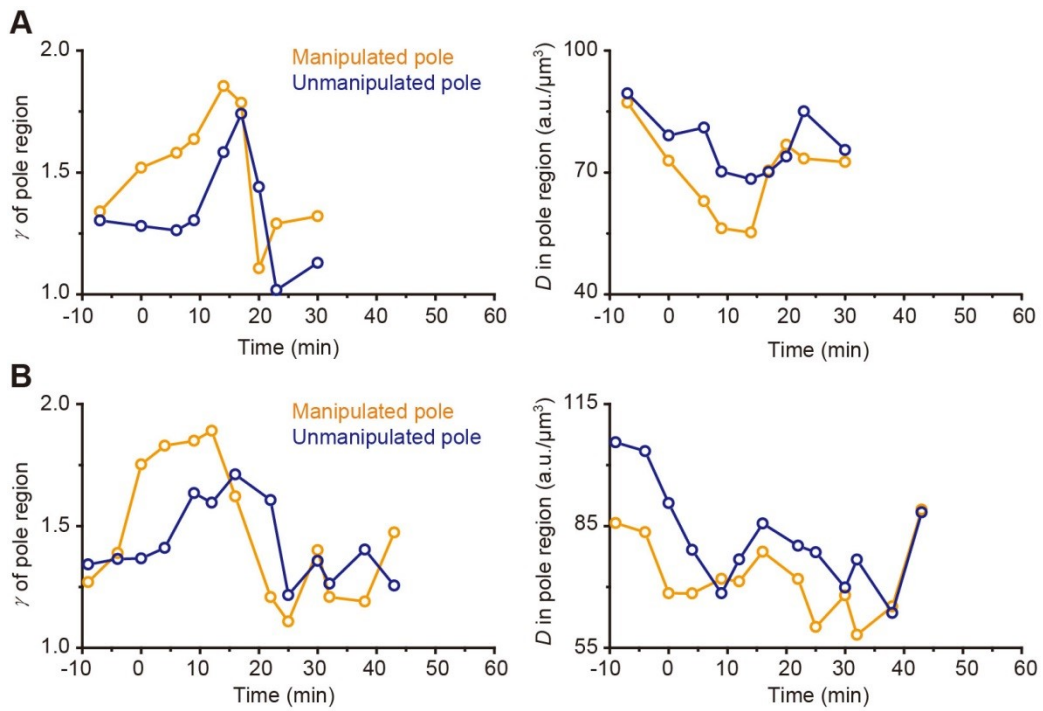


図 3-10 非対称変形によって樽型の構造を形成した紡錘体の典型例

(A, B) 極領域の γ 値 (左図) と微小管密度 D (右図) の時間経過。(A) と (B) は、異なる紡錘体の時間経過を示している。

3 紡錘体のマイクロ力学

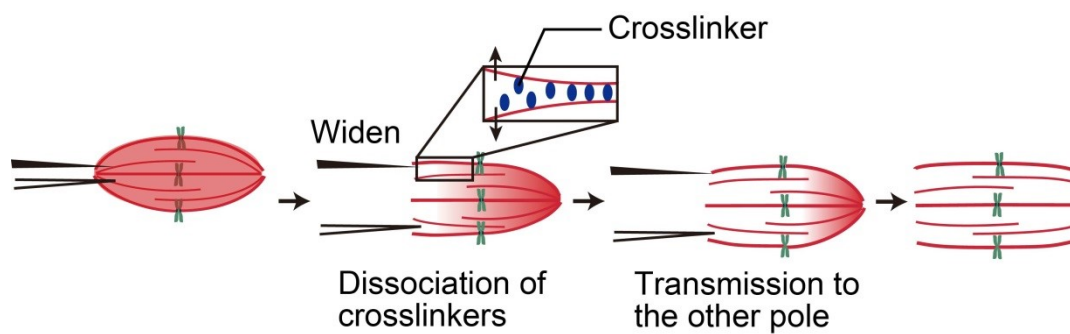


図 3-11 紡錘体の左右対称性維持機構モデル

3.4 図

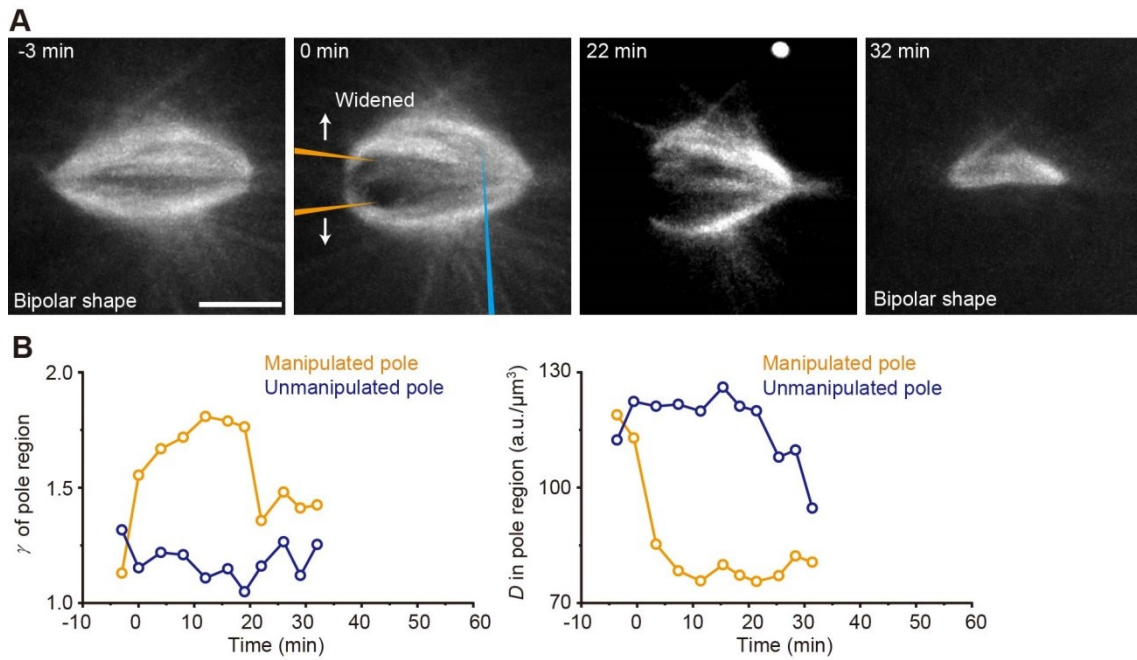


図 3-12 ダイニン、Eg5 同時阻害条件下での、非対称変形に対する紡錘体の応答

(A) ダイニン、Eg5 同時阻害条件下で、微小ガラス針によって左右非対称に変形され、そのまま 10 分間維持された紡錘体のタイムラプス画像。0 min が、変形された時間である。オレンジの棒が変形のための針を表しており、青色の棒が、紡錘体が焦点面から傾くのを防ぐための針を表している。スケールバーは、10 μm 。

(B) (A) の実験から得られた、極領域の γ 値 (左図) と微小管密度 D (右図) の時間経過。

この例の他に、3 つの紡錘体で同様の応答が観察されたことを確認している。

4 微小管渦構造による細胞質流動

4.1 序論

多くの生態システムにおいて、方向性のある流動が観察されている。例えば、魚の群れ (school of fish、数 10 m オーダー、cf. Katz *et al.*, 2011) から、バクテリアの懸濁液 (bacterial suspension、数 10 μm オーダー、cf. Dombrowski *et al.*, 2004, Sokolov *et al.*, 2012, Wioland *et al.*, 2013, Lushi *et al.*, 2014) まで、様々な長さスケールで観察されている。このような方向性のある流動は、細胞内では主に微小管やアクチン線維ネットワークのようなアクティブな細胞骨格ネットワーク (cytoskeletal network) によって引き起こされており、細胞質流動 (cytoplasmic streaming) と呼ばれている (cf. Corti, 1774, Schroeder *et al.*, 1985, Theurkauf *et al.*, 1994, Serbus *et al.*, 2005, Ueda *et al.*, 2010, Woodhouse *et al.*, 2012, Woodhouse *et al.*, 2013, Yi *et al.*, 2013, Goldstein *et al.*, 2015)。細胞質流動の生物学的な役割は未だ未解明な部分もあるが、オルガネラのようなミクロンオーダーの細胞内構造体を、長距離輸送するために必要なものだと考えられている (Serbus *et al.*, 2005, Goldstein *et al.*, 2015)。

アクチン線維ネットワークによって駆動されている細胞質流動は、よく調べられている (Ueda *et al.*, 2010, Woodhouse *et al.*, 2012, Woodhouse *et al.*, 2013, Yi *et al.*, 2013, Goldstein *et al.*, 2015)。バクテリアの懸濁液で観察される渦流 (vortex flow) で明らかにされているように (Dombrowski *et al.*, 2004, Sokolov *et al.*, 2012, Wioland *et al.*, 2013, Lushi *et al.*, 2014)、最近の実験的 (Ueda *et al.*, 2010)、理論的 (Woodhouse *et al.*, 2013) 研究は、以下に説明するように、アクチン線維間の流体力学的相互作用が重要であることを示している。アクチン線維の上を、オルガネラに結合したミオシンが移動することで周囲の媒体に流動が生じ、近接したアクチン線維を配向する。その結果、秩序だったアクチン線維ネットワークが形成され、アクチン線維の長さスケールを上回る大規模な流動を引き起こす。

アクチン線維ネットワークによる細胞質流動と比較して、微小管ネットワークによる流動は未知な部分が多い。微小管ネットワークによる流動は様々な種の胚、卵母細胞などで観

4.1 序論

察されているが (Schroeder *et al.*, 1985, Theurkauf *et al.*, 1994, Serbus *et al.*, 2005)、その機構は未
解明である。例えば、これらの流動には渦状に配列した微小管構造体の形成が同時に観察され
るが、どのようにしてこのような構造体が構築されるのかは、明らかでない。アクチン線維ネ
ットワークと同様に、流体力学的相互作用が重要であることが期待される一方で、細胞膜が物
理的境界 (physical boundary) として機能することで、大規模な流動につながっていることも
考えられる。なぜなら、微小管の持続長 (細胞質中において 1–2 mm ; cf. Keller *et al.*, 2008) は、
細胞サイズ (一般には、10–1000 μm) と同等か、それ以上だからである。実際、アクチン駆動
の流動における近年の理論的研究は (Woodhouse *et al.*, 2013)、円筒形の細胞ではアクチン線維
が自身の弾性エネルギーを最小とする方向に配列することで (つまり、円周方向ではなく長軸
方向)、流動の方向性を決定付ける可能性を示している。微小管の剛性はアクチン線維よりも
遥かに高いため (Gittes *et al.*, 1993, Isambert *et al.*, 1995)、物理的な境界と微小管の間の力学的
相互作用が、流動の発生においてより強力に作用することが期待される。

本研究では、細胞質のモデル系としてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵抽出
液を採用し (Desai *et al.*, 1999)、微小管ネットワークがどのようにして方向性のある流動を生
じうるのかを調べた。なお、断りがない限り、本章の実験では、微小管ネットワークの形成と
蛍光観察のため、蛍光色素で標識されているタキソール (Oregon green-labeled taxol ; OG-taxol)
が 100 nM の濃度で加えられている。このタキソール濃度では、微小管の脱重合速度は減少す
るが、カタストロフィ (catastrophe : 急激な脱重合相) の頻度には影響がないことが明らかに
されている (Derry *et al.*, 1995)。また、アクチンネットワークの動態による影響を排除するた
め (Field *et al.*, 2011, Pinot *et al.*, 2012)、アクチンの脱重合促進剤であるサイトカラシン D
(cytochalasin D) が 2 μM の濃度で加えられている。

4.2 結果と考察

4.2.1 溶液空間における渦流

まず初めに、微小管にとって境界がないとみなせるほど広い空間（溶液空間：bulk space）における微小管ネットワークの形成を観察した。卵抽出液を、面積 $20 \times 20 \text{ mm}^2$ 、高さ約 $100 \mu\text{m}$ のフローチャンバーに流し込み、蒸発による人為的な流動を防ぐために密封した。これらの操作は氷上で行い、顕微鏡下で 20°C に温めることで、微小管重合を促した。重合が進むにつれて、複数の微小管星状体があったところで形成され、それらが連結された格子構造が組織化された（図 4-1A）。星状体の形成にはダイニンが関与していることがよく知られているため（Verde *et al.*, 1991）、この格子構造にもダイニンが重要な役割を果たしているものと推測した。予想通り、ダイニンの阻害剤である p150-CC1（Quintyne *et al.*, 1999, Gaetz *et al.*, 2004）を加えると、格子構造ではなく、微小管束のランダムネットワークが形成された（図 4-1B）。卵抽出液中の顆粒に対して PIV による解析を行うと、この状態の溶液空間では、複雑な流動が生じていること（図 4-1C）、そして流速が $0.36 \pm 0.26 \mu\text{m}/\text{min}$ （平均値 \pm SD、図 4-1D）であることが明らかになった。また、直径数 $10 \mu\text{m}$ オーダーの渦流が、様々な場所で局所的に生成・消滅を繰り返していることがわかった（図 4-1C、青線の四角の中）。この渦流は、生成されてから 1 分以内には消滅してしまう、時間的に不安定な流動であった（溶液空間全体での、局所的な渦流を含む複雑な流動そのものは、少なくとも数時間続いた）。実際、流動の時間相関は 1 分以内であった。次に、流動の空間的な相関を調べるため、以下のような空間相関関数 $C(r, t)$ を定義した。

$$C(r, t) = \left\langle \frac{\vec{v}(\vec{x} + \vec{r}, t) \cdot \vec{v}(\vec{x}, t)}{|\vec{v}(\vec{x} + \vec{r}, t)| |\vec{v}(\vec{x}, t)|} \right\rangle_{x, \theta}$$

この関数において、 $\langle \rangle_{x, \theta}$ は空間平均、そして \vec{r} の角度に対する平均を示している。なお流速を規格化しているため、流速の大きさは考慮されておらず、流動の方向性のみの相関を表している。その結果、 $C(r, t)$ は指数関数的に減衰し、およそ $50 \mu\text{m}$ でほぼゼロとなることが明らかになった（本研究では、この距離を相関長と定義する；図 4-1E）。また、この相関長は、個々

4.2 結果と考察

の微小管長 ($14.5 \pm 6.4 \mu\text{m}$ 、平均値 \pm SD、 $n = 121$) よりも、微小管束の平均長 ($34.4 \pm 10.1 \mu\text{m}$ 、平均値 \pm SD、 $n = 63$) の長さに近いことが判明した。これらの結果と、溶液空間中の微小管束が伸長する様子から (動画 4-1)、微小管束の伸長が周囲を押し出すように流動を生み出し、流体力学的相互作用によって渦流が局所的に発生していたことが示唆される。

4.2.2 閉鎖空間における細胞質回転流動

次に、空間的境界の効果を調べるため、卵抽出液を様々な大きさの油中液滴に封入した (図 4-2A)。卵抽出液の質量密度の高さ故か、油中液滴はガラス面に沈降し、Z 軸方向に幾分押しつぶされるように (お供え餅のように) 変形していた (液滴の直径に対する高さの比であるアスペクト比は、 0.465 ± 0.050 、平均値 \pm SD、 $n = 25$)。ダイニンの阻害剤存在下では、液滴の中で細胞質回転流動が生じることがわかった (図 4-2B、C、動画 4-2、4-3)。前述した、Z 軸方向の変形のためか、Z 軸方向への回転流動は数%程度しか観察されず、また生じても 30 分程度で焦点面内 (ガラス基板と平行な面内) の回転流動に方向が変化した (動画 4-4)。そのため、本研究においては、Z 軸方向の流動は解析から除外している。本研究で発見した細胞質回転流動は、胚や卵母細胞で観察されているものと類似している (流動の長さスケールや、ダイニンの機能阻害条件下で回転流動が生じたことなど; cf. Schroeder *et al.*, 1985, Theurkauf *et al.*, 1994, Serbus *et al.*, 2005)。溶液空間で生じた渦流と比較して、10–100 倍ほど長時間にわたって回転流動が続いた (図 4-2D)。このような流動は、p150-CC1 以外のダイニン機能阻害剤 (抗ダイニン抗体; Ab70.1) でも生じたが (図 4-3A)、タキソールが存在しない場合や、微小管脱重合促進剤であるノコダゾール存在下では観察されなかった (図 4-3B、C)。そのため回転流動の発生には、十分な密度の微小管が必要であることが示唆される。以上より、円形の閉鎖空間は、ダイニン機能が阻害された条件下で時間的に安定な回転流動を誘起することが判明した。

回転流動は、直径 100–700 μm の液滴内で生じており、溶液空間での渦流と比べて長さスケールが 10 倍以上大きい (図 4-4A)。そして、個々の液滴における流動の角速度の平均

4 微小管渦構造による細胞質流動

値が、液滴の半径の逆数に比例した (図 4-4A)。この結果は、液滴境界付近の流速は液滴の大きさに抛らずほぼ一定であることを示唆している。実際、PIV による解析を行った結果、液滴内の角速度に領域依存性はあるものの (図 4-4B、C)、液滴境界付近の流速 (半径の 80% 以上の領域の流速の平均値を、境界付近の流速と定義) は、液滴の半径にほとんど依存しなかった (図 4-4D)。直径が 100 μm 以下の液滴では、微小管束が皮層様構造を形成しており (図 4-5A)、これは精製した微小管やアクチンが液滴内で形成する構造体と類似していた (微小管の場合: Sanchez *et al.*, 2012, Keber *et al.*, 2014, アクチンの場合: Claessens *et al.*, 2006)。図 4-4A の横軸と、フィッティングラインの交点から、回転流動を生じる液滴の最大直径が 800 μm であると予測でき、この直径は実際に一方向性の流動が観察された液滴の最大直径とほぼ一致する。直径が 700 μm を超える液滴では、多方向性の流動が観察された (図 4-5B、動画 4-5)。以上の結果より、閉鎖空間は、時間スケールだけでなく、空間スケールにおいても大きな流動を生じさせることがわかった。

4.2.3 回転する微小管渦構造の形成

どのような機構で微小管が回転流動を生み出しているのかを調べるため、共焦点顕微鏡を用いて微小管の挙動を詳細に観察した。液滴やセルの作製は氷上で行い、顕微鏡下で 20°C に温めることで、微小管の重合を開始した。微小管の重合が始まると、方向がランダムな微小管束のネットワークが形成された (図 4-6A 11 min)。その後、境界付近の微小管束が次第に同じ方向に傾き始め、ネットワーク全体が回転を始めた (図 4-6A 15 min)。最終的には、多くの微小管束が回転方向に傾き、渦状構造を形成した (図 4-6A 27 min、動画 4-6)。この渦構造は、様々な動物種の胚、卵母細胞、卵細胞などで観察されている微小管の螺旋配列に類似していた (Schroeder *et al.*, 1985, Theurkauf *et al.*, 1994, Serbus *et al.*, 2005, Harris *et al.*, 1980)。精製した微小管と人工的なキネシンクラスターでも同様の構造体が形成されるが (Nédélec *et al.*, 1997)、本研究で形成された構造体とは異なり、回転をしない、非常に静的な構造体である。卵抽出液

4.2 結果と考察

とこの *in vitro* の系には様々な違いがあるが、MAPs のような静的な架橋タンパク質が後者には含まれていないことが、大きな違いの 1 つである。ネットワーク全体が回転するには、ネットワーク自体に弾性が必要となるため、このような違いが、先行研究と本研究の違いを生んでいるのかもしれない。

回転する渦構造体の中で、一端が境界に接している微小管束は、伸長していき、屈曲することが観察された (図 4-6B で示された微小管束の右半分)。この過程において、境界に接している一端は滑ることがなかったため、微小管束と境界の間には摩擦が存在していたことが推測される。摩擦が存在した理由としては、次のようなことが考えられる。リン脂質の親水基に電荷があるため (本研究ではホスファチジルコリンを使用しており、この親水基はプラスに帯電する)、微小管束が静電相互作用により直接的、または他のタンパク質を介して間接的に結合した可能性がある (内在性の顆粒や、流動解析のための蛍光ビーズが液滴境界上で静止することがしばしば観察されたことから、このような推測ができる)。また、上述したように、境界付近の流速は液滴の大きさに依存しない (図 4-4D)。これらの結果は、伸長する微小管束が境界を押し出すことで、ネットワーク全体の回転力を生み出していることを示唆している。

4.2.4 回転流動の駆動力：分子モーターによる微小管の滑り運動

前項 4.2.3 での仮説を検証するため、2 枚のカバーガラスで厚み 5–10 μm にまで圧縮した液滴内で、個々の微小管束の挙動を詳細に観察した (図 4-7)。圧縮した液滴内では回転流動は生じていなかったが、微小管束の挙動を 2 次元に制限できるため、微小管束の動態を詳細に観察することができるようになった。その結果、微小管束は伸長していき、境界に接触すると屈曲する様子を捉えることができた (図 4-7A、B、動画 4-7)。伸長速度は $3.58 \pm 1.61 \mu\text{m}/\text{min}$ (平均値 \pm SD、 $n = 19$ 、図 4-7C) であり、境界付近の流速 ($3.19 \pm 0.63 \mu\text{m}/\text{min}$) に近い値となった。圧縮した液滴と (厚み 5–10 μm)、圧縮していない液滴 (厚み 50 μm 以上) では流体力学的相互作用 (とくに液滴上面での粘性抵抗) に相違がある可能性があるが、この結果は微小管束の伸

4 微小管渦構造による細胞質流動

長がネットワーク全体の回転を駆動しており、細胞質回転流動を引き起こしたことを示唆している。

微小管束の伸長には、2つの可能性が考えられる。1) 微小管重合と、2) キネシンによる微小管の滑り運動である (Sanchez *et al.*, 2011, Keber *et al.*, 2006)。まず始めに、微小管の重合力が回転流動を駆動しているのかどうかを調べるため、タキソール濃度を 50 nM から 500 nM まで変化させた。タキソールは濃度依存的に微小管の重合速度、脱重合速度を減少させるため (タキソール濃度が 100 nM、500 nM のときには、50 nM のときと比較して、微小管の重合速度が約半分になる ; cf. Derry *et al.*, 1995)、タキソール濃度の増加によって回転流動の角速度が減少することを期待した。しかしながら、タキソール濃度を増加させても、回転流動の角速度は減少しなかった (図 4-4A)。一方、ATP 加水分解酵素であるアピラーゼによって抽出液の内在性 ATP を枯渇させたり、非加水分解性の ATP アナログである AMP-PNP を加えたときには、微小管束は形成されているにも関わらず、回転流動は生じなかった (図 4-8)。また、どちらの条件においても、形成された微小管束の伸長は観察されなかった。以上の結果より、回転流動の駆動力は、微小管の重合ではなく、主にキネシンによる微小管の滑り運動によってもたらされていることが示唆された。

4.2.5 細胞質回転流動の発生モデル

これまでの結果から、閉鎖空間における細胞質回転流動のモデルを提唱する (図 4-9A)。微小管の重合とともに、MAPs やキネシンによって、微小管束が形成される (Phase 1)。これらの微小管束は、架橋タンパク質 (MAPs、キネシン) のよって架橋され、ランダムネットワークを形成する (Phase 2)。個々の微小管束は、キネシンによって伸長する。この、伸長する微小管束が境界へと到達したとき、ネットワーク全体に対して回転力を発生する (Phase 3)。個々の微小管束によって発生する回転力の大きさや方向は様々であること、そして微小管束自体の密度が少ないことから (約 0.0002 本/ μm^3 、図 4-6A 27 min から概算)、時計周り と 反時計周り

4.2 結果と考察

の力のつり合いは、容易に崩れる。この対称性の破れがネットワーク全体の一方向への回転を促し、細胞質回転流動を開始させる (Phase 4)。流動は微小管束を渦状に配向し、微小管の配向が流動を促進する。このような正のフィードバック・ループが、数十分における、一方向性の流動を維持する (Phase 5)。このような機構では、回転方向は一意的に決定されないはずである。事実、回転方向は決まらないという本研究の結果と一致している (時計周り 51%、反時計周り 49% ; $n = 47$)。

流動の方向は、時々変化した (図 4-2D、4-9B、動画 4-8)。方向変化の原因は、微小管束が形成と分解を繰り返すという観察結果から (図 4-7)、以下のように推測できる。微小管束の密度が低いと、新たに形成された微小管束の発生する力が、既存の微小管束の発生する力に、容易に打ち勝つことができる可能性がある。実際、タキソール濃度を増加させて微小管束を安定化させると、方向変化の頻度が減少した (図 4-9C)。この結果は、本研究で提唱するモデルによく一致する。

4.2.6 渦構造形成における力学的相互作用の役割

卵抽出液を液滴に封入することで、サブミリメートル規模の回転流動が生じた。これは、溶液空間における渦流の 10 倍大きい。このような長さスケールの相違は、微小管束と境界の間の力学的相互作用によって生じている可能性がある。まず、卵抽出液中の微小管ネットワークは、以下の理由から、流体力学的相互作用よりも長距離に渡って力を伝達できる弾性を備えている。卵抽出液で形成される微小管の長さは $14.5 \pm 6.4 \mu\text{m}$ (平均値 \pm SD, $n = 122$) であり、これは微小管の持続長 (細胞質中で 1–2 mm ; cf. Keller *et al.*, 2008) と比較して十分に短い。つまり、卵抽出液における微小管は、硬い棒として振る舞う。そして、MAPs が微小管同士を結合することで、ネットワーク全体の弾性を増加させる。したがって、境界に接触した微小管束が伸長することで発生する押す力が、ネットワークに伝わって、ネットワーク全体を動かすことができると考えられる。流体力学的相互作用が微小管束の渦状配列に寄与していることは十分に考え

4 微小管渦構造による細胞質流動

られるが、流体力学的相互作用だけでは不十分である。液滴内で観察される微小管束の平均長は $21.9 \mu\text{m}$ であり、この平均的な長さの微小管束が、分解するまでに流体力学的相互作用によってのみ 0° から 60° (60° ; 渦状に配列した微小管束の典型的な角度) まで傾くには、最低でも $0.05/\text{min}$ の流速勾配が必要となる (微小管束が流速と同じ速度で流される、という前提の基で)。したがって、溶液空間での流速の平均が $0.36 \mu\text{m}/\text{min}$ であり、勾配は $0.033/\text{min}$ にしかならず ($0.36 \mu\text{m}/\text{min} \times 2/21.9 \mu\text{m}$) ならず、 60° まで傾くには 31.9 分かかってしまうという計算になる (微小管束のライフタイム: 20.9 分、図 4-7D)。以上より、大規模な渦構造の形成には、微小管束の間の力学的相互作用が重要であると考えられる。

回転流動は、溶液空間で生じた渦流と比較して、空間スケールだけでなく時間スケールも 10 倍から 100 倍長かった。このような時間スケールの差は、前項 4.2.5 で説明した、正のフィードバック・ループ (流動が微小管束の配向を促し、配向された微小管束が流動を促進する) で説明できる。さらに、一度渦構造体が形成されると、力学的な相互作用により、ランダムネットワークよりも安定的に維持される可能性がある。なぜなら、渦構造体を形成する微小管束は主に平行に配列しているため、架橋タンパク質が架橋できる領域が広がるからである。対照的に、ランダムネットワークでは、微小管束同士の交点でしか架橋できないため、流動や、微小管束自身が発生する伸長力によって容易に再構築されてしまうことが考えられる。したがって、空間スケールの相違だけでなく、時間スケールの相違においても、力学的相互作用の寄与が大きいことが考えられる。

最後に、アクティブ流体 (active fluid) として最近特に注目されている、バクテリア懸濁液で得られている結果と比較する。本研究で観察された、液滴内での回転流動や、溶液空間での渦流はバクテリア懸濁液で観察される流動のパターンに非常によく似ている (Wioland *et al*, 2013, Lushi *et al*, 2014)。システムの最小単位が微小管束とバクテリアという違いはあるものの、どちらも長細い形状をもち、長軸方向に周囲の流体を押し出すことで流動を生じる単位 (pusher force dipole) として働くという点では共通している。さらに、空間的境界の存在に

4.2 結果と考察

よって、時間的に安定的な渦流が発生するという点で一致している。しかしながら、細菌懸濁液では、閉鎖空間内でも溶液空間内でも、渦流の空間スケールは同一である (Wioland *et al.*, 2013)。この相違は、細菌同士に結合が存在しないことから生じていると考えられる。液滴に封入された細菌懸濁液では、境界に接触している細菌は移動しないが、その内側の細菌は、これら移動しない細菌に接触しつつ円周方向に移動し続ける。これは、細菌同士に強い摩擦や結合が存在しないことを示唆している。細菌懸濁液と比べて、微小管渦構造体はほぼ一体となって回転しており、微小管束同士が結合していることが強く示唆される。したがって、これらの結果は、本研究での主張の1つである、微小管束同士の力学的相互作用が、空間的スケールの大きい回転流動を発生するのに重要であるという結論を支持するものだと考えられる。以上の結果を基に考察をまとめると、微小管ネットワークは、流体力学的相互作用に加えて、微小管架橋タンパク質や物理的境界から得られる力学的相互作用を利用することで、時空間的に大きな細胞質流動を発生していることが示唆される。

4 微小管渦構造による細胞質流動

4.3 本章のまとめ

本章では、ダイニンの機能阻害時には、細胞質中で伸長性の微小管束が形成されること、そしてこの微小管束のネットワークが、空間的境界の有無に応じて時空間スケールの異なる流動を発生することを示してきた。これらの結果の中には、一見全く異なるシステムである、バクテリア懸濁液との間に共通する現象が含まれており、*pusher force dipole* によって構成されるアクティブ流体の普遍的な特徴の存在が示唆される。

液滴内で生じた細胞質回転流動は、発生条件が *in vivo* で観察される回転流動とよく似ている。例えば、卵母細胞などでは、ダイニンの機能やアクチンの重合が阻害されている条件下で流動が生じることや、流動が発生する液滴の大きさが細胞の大きさに近いこと、そして流速が細胞で計測されるものとほぼ等しいことである。卵母細胞などにおいて、渦状に配列した微小管の上を、キネシンが結合したオルガネラが移動することで流動が生じるというモデルが提唱されている (Serbus *et al.*, 2005)。しかしながら、そもそもどのようにして微小管が渦状に配列するのか、といった問いには答えられていない。本研究で提唱している渦構造形成のモデルは、この疑問に答えうる1つのヒントになると考えられる。つまり、本研究の結果は、卵母細胞などにおいても、微小管同士、そして微小管と細胞膜の間の力学的相互作用が渦構造の形成に重要である可能性を示している。

4.4 図

4.4 図

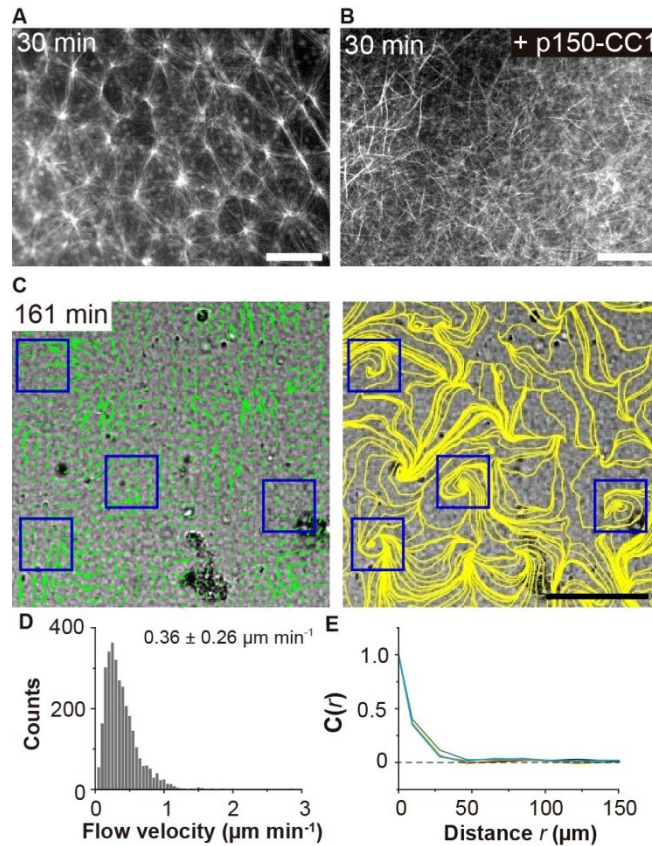


図 4-1 溶液空間での微小管ネットワーク、渦流の形成

- (A, B) 溶液空間における、微小管ネットワーク形成。(A)、(B) はそれぞれ、ダイニンの阻害剤 p150-CC1 が非存在下、存在下で観察された画像である。スケールバーは、100 μm 。
- (C) PIV (グリッドサイズ: 9.5 μm) によって得られた流れ場。左図と右図は、同じ時刻の同じ位置の明視野像に、それぞれベクトル、ストリームラインを融合させた画像である。青い四角形は、典型的な渦流を囲っている。見やすくするため、ベクトルの本数は減少させている。
- (D) (C) の解析から得られた、流速分布。
- (E) 空間相関関数 $C(r, t)$ と、 r の関係。黒、オレンジ、緑、シアンの実線はそれぞれ、155、161、167、171 分の時点での空間相関関数を表している。全ての画像において、0 min はチャンバーの温度を温め始めた時刻である。

4 微小管渦構造による細胞質流動

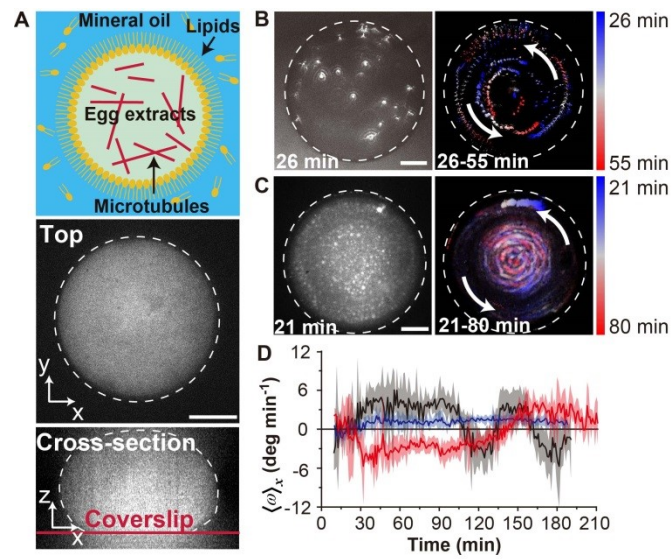


図 4-2 液滴内で生じた、細胞質回転流動

(A) 卵抽出液を封入した液滴の模式図と、共焦点顕微鏡画像。

(B, C) 細胞質回転流動中の、PEG 被膜 $0.25 \mu\text{m}\phi$ ビーズ (B) と、オルガネラ (C) のタイムプロジェクション画像。矢印は、回転方向を表している。0 min はチャンバーの温度を温め始めた時刻である。なお、(C) では、 $[\text{OG-taxol}] = 200 \text{ nM}$ である。

(D) ビーズの挙動解析から得られた角速度 $\langle \omega \rangle_x$ の時間経過。3 つの液滴の時間経過を示している。実線は平均値、その周囲の領域は SD を表している。

全ての画像において、点線は液滴境界を表し、スケールバーは $30 \mu\text{m}$ である。

4.4 図

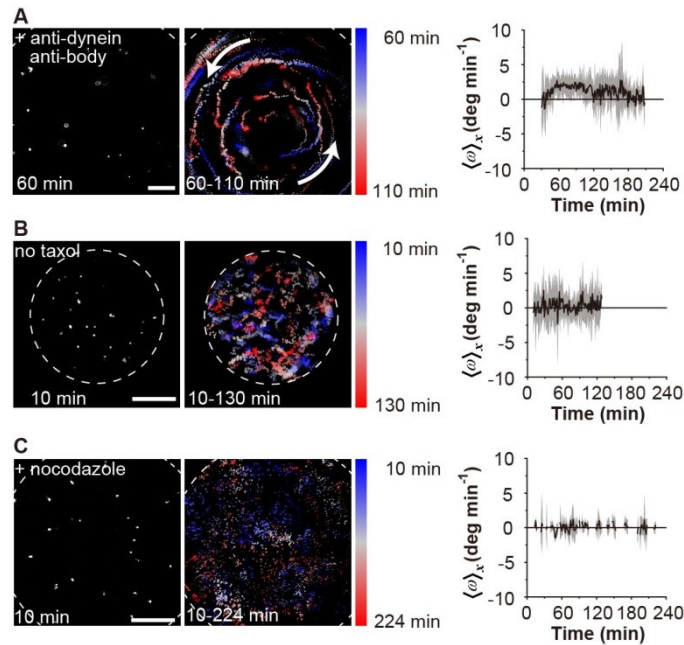


図 4-3 ダイニンの機能阻害と、十分な微小管密度が回転流動に必要であることの検証

様々な条件下での、液滴内の PEG 被膜ビーズの画像 (左図)、ビーズのタイムプロジェクション画像 (中図)、そしてビーズの角速度 $\langle \omega \rangle_x$ の時間経過 (右図)。実線は平均値、実線の周囲の領域は SD を表している。

(A) p150-CC1 の代わりに、抗ダイニン抗体 (Ab70.1) を 0.5 mg/ml 加えた液滴。この抗体は、p150-CC1 と同様に、ダイニン/ダイナクチン複合体の形成を阻害する。ビーズ直径は 0.25 μm であり、p150-CC1 を加えた場合と同様、回転流動が生じた。

(B) タキソールが存在しない条件下の液滴。12 個全ての液滴の中で、回転流動が生じなかった。十分な微小管密度が必要であることを示唆している。ビーズ直径は 2.0 μm 。この画像は、[p150-CC1] = 1000 nM の液滴のものだが、800 nM、2000 nM でも回転流動が生じなかったことを確認している。

(C) 50 μM のノコダゾール存在下での液滴。7 個全ての液滴の中で、回転流動が生じなかった。ビーズ直径は 0.25 μm 。

全ての画像において、点線は液滴境界を表している。スケールバーは 30 μm であり、0 min は液滴を作製した時刻である。

4 微小管渦構造による細胞質流動

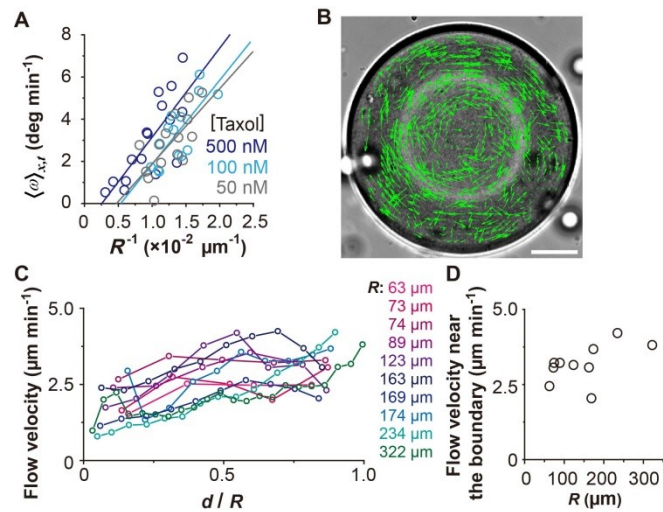


図 4-4 細胞質回転流動の大きさ依存性と、PIV による解析

- (A) 液滴半径 R と、回転流動の角速度 $\langle \omega \rangle_{x,t}$ の関係 ($[\text{p150-CC1}] = 400, 800, \text{ or } 2000 \text{ nM}$ のデータを、区別することなく含んでいる。p150-CC1 の濃度の相違が、回転流動の頻度や角速度に影響を与えないことは、確認済みである)。 $\langle \omega \rangle_{x,t}$ は、角速度の時間的、空間的平均値の絶対値である。時間経過の図から、一定の角速度で回転していると判断した時間帯の角速度の平均値を算出した。
- (B) PIV によって得られた、細胞質回転流動の流れ場。見やすさのため、ベクトルの本数は減少させて表示している。スケールバーは $30 \mu\text{m}$ 。
- (C) PIV から得られた、様々な大きさの液滴の流速と、液滴中心からの距離の関係。液滴中心からの距離 d を、液滴半径 R で規格化した。
- (D) 液滴半径 R と、境界付近の流速 ($d/R > 0.8$ の領域の流速の平均値) の関係

4.4 図

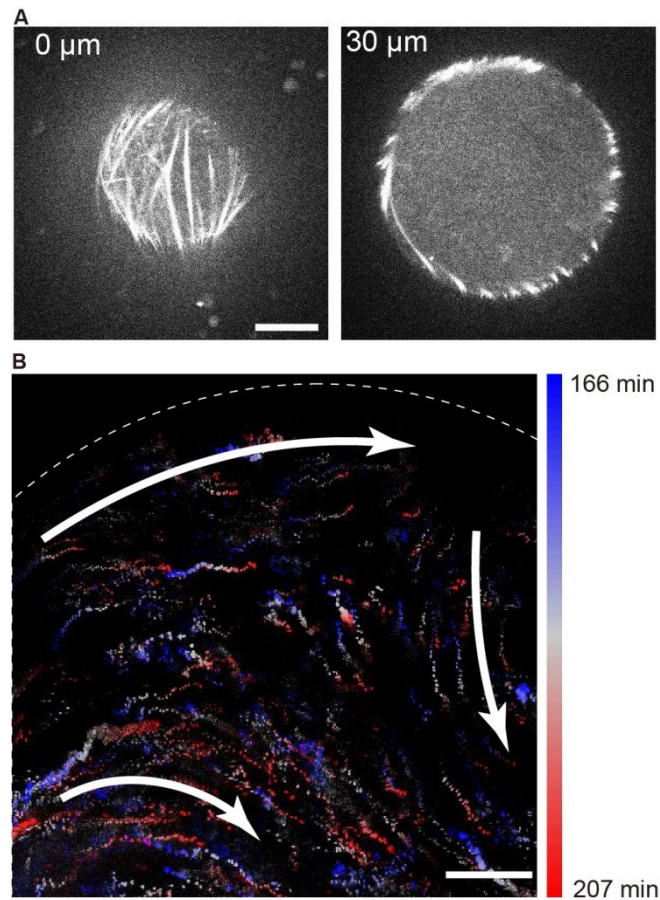


図 4-5 小さい液滴内での皮層様構造形成と、非常に大きな液滴での多方向性流動

(A) 直径 $60\ \mu\text{m}$ の液滴内の、微小管の共焦点顕微画像。左図は液滴の底（液滴はガラス面に接触している）、右図は赤道面付近（ガラス面から高さ $30\ \mu\text{m}$ ）の画像。直径 $100\ \mu\text{m}$ 以下の液滴では、微小管束が液滴境界に局在し、皮層様構造を形成していた。このような構造の形成は、精製したアクチンでも確認されているが、直径 $13\ \mu\text{m}$ 以下の場合に限られる (Claessens *et al.*, 2006)。このような液滴の大きさの差は、微小管とアクチンの持続長の違いに起因するものと考えられる。スケールバーは、 $15\ \mu\text{m}$ 。

(B) 直径 $700\ \mu\text{m}$ 以上の液滴における、 $0.25\ \mu\text{m}\phi$ PEG 被膜ビーズのタイムプロジェクション画像（動画 4-5）。多方向性の流動が観察された。矢印は、流動の方向を表している。スケールバーは $60\ \mu\text{m}$ であり、 $0\ \text{min}$ は液滴を作製した時刻である。

4 微小管渦構造による細胞質流動

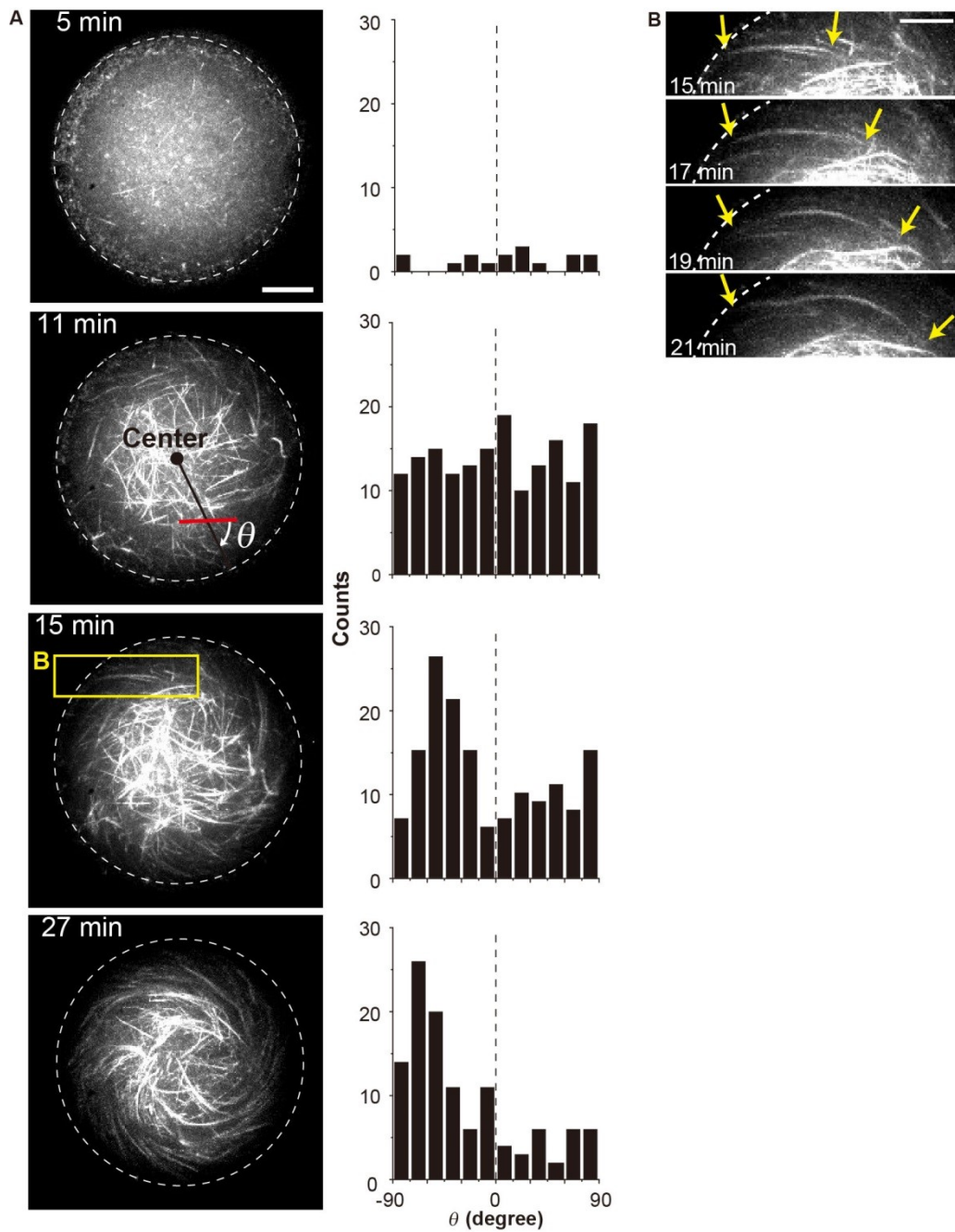


図 4-6 液滴内での微小管渦構造形成

(A) (左図) 共焦点顕微鏡によって観察された、微小管渦構造形成。各画像は、Z 軸方向の最大輝度投影画像である (赤道面の、 $\pm 20 \mu\text{m}$ の範囲)。(右図) 左図から得られた、微小管束の角度 θ のヒストグラム。微小管束の角度 θ は、液滴中心と微小管束の中点を結ぶ線と、微小管束の間の角度で定義した。11 min の画像に、例を示している (この例では、 $\theta = -63^\circ$)。スケールバーは、 $30 \mu\text{m}$ 。

4.4 図

(B) 液滴境界付近で、伸長微小管束のタイムラプス画像 ((A) の画像の、黄色の四角形で囲まれた領域)。矢印は微小管束の両端を示している。スケールバーは 20 μm 。

全ての画像において、点線は液滴境界を表し、0 min はチャンバーの温度を温め始めた時刻である。

4 微小管渦構造による細胞質流動

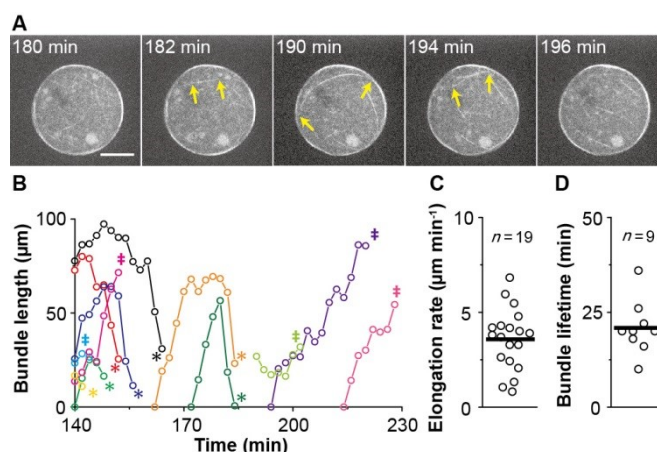


図 4-7 微小管束の挙動

- (A) 圧縮した液滴内での微小管束の、共焦点顕微鏡画像。各画像は、Z 軸の最大輝度投影画像。定常状態における微小管束の挙動を調べるため、液滴形成から 2-4 時間の間で観察を行った。この時間は、多くの液滴が回転流動を発生していた時間に相当する。矢印は微小管束の両端を示している。スケールバーは 30 μm であり、0 min はチャンバーを温め始めた時刻である。
- (B) 圧縮した液滴内での、微小管束の長さの時間経過。アスタリスク (*)、ダガー (‡) 記号はそれぞれ、微小管束が分解された時刻、他の微小管束と融合した時刻を示している。
- (C, D) 微小管束の伸長速度 (C) と、ライフタイム (微小管束が形成されてから、分解されるまでの時間として定義) (D) の分布。実線は、平均速度、平均ライフタイムを表している。(D) には、途中で融合した微小管束は含まれていない。

4.4 図

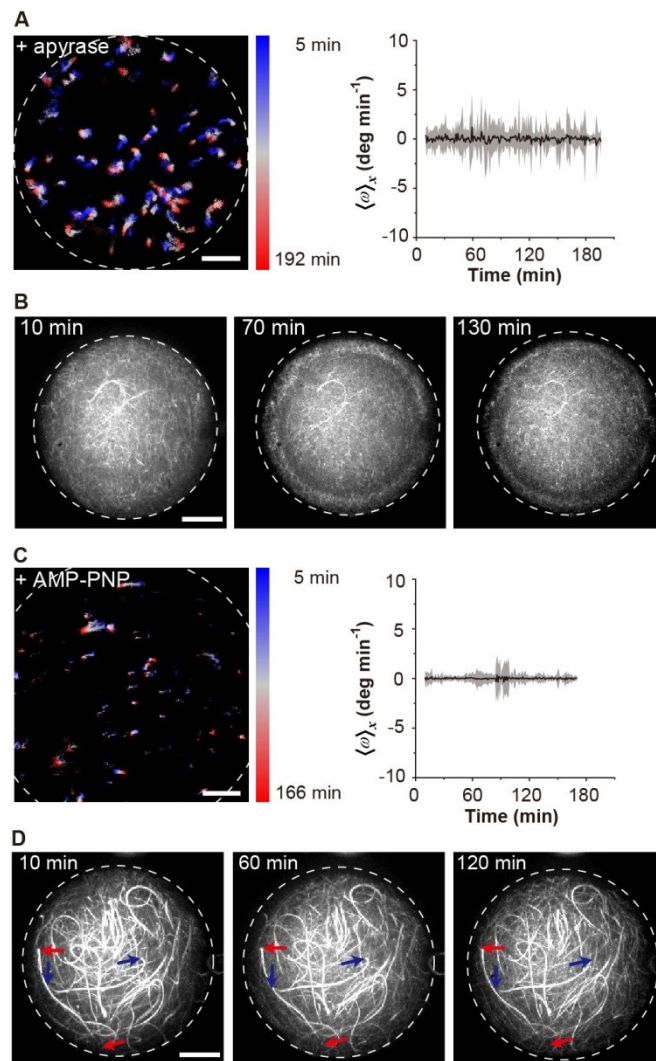


図 4-8 ATP 枯渇条件下、キネシンの ATP 加水分解阻害条件下での流動と
微小管ネットワークの形成

- (A) 10 U/mL アピラーゼ存在下での、PEG 被膜 $0.25 \mu\text{m}\phi$ ビーズのタイムプロジェクション画像と (左図)、ビーズの角速度 $\langle \omega \rangle_x$ の時間経過 (右図)。実線は平均値、その周囲の領域は SD を表している。
- (B) 10 U/mL アピラーゼ存在下での、微小管の共焦点顕微画像。各画像は、Z 軸の最大輝度投影画像。微小管ネットワークの構造は 2 時間以上に渡って、変化がなかった ($n = 10$ 液滴)。
- (C) 3 mM AMP-PNP 存在下での、PEG 被膜 $0.25 \mu\text{m}\phi$ ビーズのタイムプロジェクション画像と (左図)、ビーズの角速度 $\langle \omega \rangle_x$ の時間経過 (右図)。実線は平均値、その周囲の領域は SD

4 微小管渦構造による細胞質流動

を表している。アピラーゼを加えた場合と同じく、回転流動は観察されなかった ($n = 12$ 液滴)。

(D) 10 U/mL アピラーゼ存在下での、微小管の共焦点顕微画像。各画像は、Z 軸の最大輝度投影画像。微小管束の長さは2時間以上に渡って、変化がなかった (矢印が、典型的な微小管束の両端を示している)。この結果は、微小管束の伸長がキネシンによる滑り運動であることを強く示唆している。

全ての画像において、点線は液滴境界を表している。また、微小管を明確に観察するため、500 nM の OG-taxol 存在下で観察を行った。スケールバーは 30 μm であり、0 min は液滴を形成した時刻である。

4.4 図

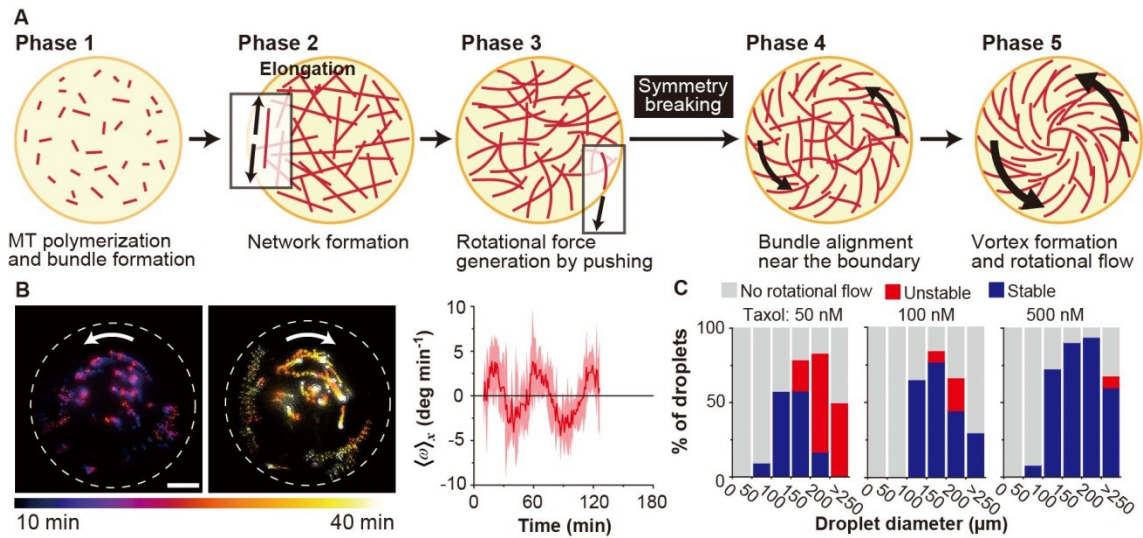


図 4-9 細胞質回転流動のモデルと、回転方向の安定性

(A) 細胞質回転流動の機構の模式図。

(B) PEG 被膜 $0.25 \mu\text{m}\phi$ ビーズのタイムプロジェクション画像と (左図)、ビーズの角速度 $\langle \omega \rangle_x$ の時間経過 (右図)。実線は平均値、その周囲の領域は SD を表している。スケールバーは $30 \mu\text{m}$ 。

(C) 安定的な回転流動 (stable)、不安定な回転流動 (unstable ; 30 分に最低でも 1 回は回転方向が変化する流動として定義)、回転以外の流動 (no rotational flow ; $\langle \omega \rangle_{x,t} < 0.1 \text{ deg/min}$ の流動) の分布。それぞれ、青、赤、灰色で表示されている。各バーは、10–44 個の液滴のデータを含んでいる。

5 まとめ

5.1 本研究のまとめ

細胞機能を担う微小管ネットワークの特徴として、秩序だった構造体であることと、一方向性の運動を生み出すことが挙げられる。本研究では、そのような微小管ネットワークとして、紡錘体と渦構造体を対象として研究を行った。アフリカツメガエル卵の抽出液中で自己組織化された紡錘体については、その形状や弾性を対称的に維持する機構が存在することを示した。そして、詳細な分子機構は未解明だが、一方の極領域での微小管密度の変化が、もう一方の極領域へと伝播することで、形状や弾性が維持された可能性を示す結果を得た。渦構造体の研究においては、円形の空間的境界と微小管束の力学的相互作用が、ネットワーク全体に伝播することによって、渦構造体の形成や細胞質回転流動が引き起こされることを示す結果を得た。

紡錘体と渦構造体は、それぞれ異なる細胞機能を担う構造体である。しかしながら、本研究で得られた結果は、局所的に生じた力学的なパラメーターの変化が、全体に伝播することが、これらの構造体の形成・維持に関与していることを示している。力学的なパラメーターとは、紡錘体においては微小管密度であり、渦構造体においては、微小管束の伸長によって生じる、円形の液滴界面を押し出す力（pushing force）である。本研究で提唱するモデルが正しければ、これらのパラメーターの伝播には、微小管同士を架橋する架橋タンパク質だけでなく、微小管の剛性そのものが寄与していることが推測される。微小管の曲げ強度が小さい場合には、紡錘体を局所的にガラス針で広げたとしても、その領域の微小管が曲がるだけであり、別の領域の微小管同士の間隔は広がりやすく、微小管密度の変化が伝播しないであろう（おそらく、すぐに微小管の重合によって変形された部分の微小管密度が回復するはずである）。また、曲げ強度の小さい微小管ネットワークでは、押し出す力が伝播しない。以上のことから、紡錘体や渦構造体は、微小管の力学的特徴をうまく利用して細胞機能を実現しているものと結論される。

5.2 課題と今後の展望

5.2 課題と今後の展望

まずは紡錘体、渦構造体に共通する課題と今後の展望を記述し、次にそれぞれに関して記述する。

本研究では、分子モーターとして、ダイニン、キネシンに着目した。ダイニンの機能阻害時には極構造が脆弱になり、キネシンの機能阻害時には極構造が強固になったことから、ダイニンは紡錘体の両端で微小管を束化して収束させる方向に、そしてキネシンは発散させる方向に力発生を行なっているとみなすことができる。つまり、ダイニン、キネシンはそれぞれ紡錘体の極領域において、紡錘体の幅方向（微小管軸に垂直な方向）に収縮力、伸長力を発生していると言い換えることができる。また、微小管軸に平行な方向に関しても、先行研究の結果から同様のことが考えられている。Eg5を不活性化すると、2つの極が近づいていき、1つになることで単極紡錘体となる（つまり、長さ方向の収縮、と解釈できる；cf. Kapoor *et al.*, 2000）。ダイニンの同時阻害はこのような収縮を阻害するため、Eg5、ダイニンはそれぞれ紡錘体を長さ方向に収縮力、伸長力を発生しているとみなされている（Goshima *et al.*, 2005）。これは、渦構造体においても同様である。キネシンによる伸長力に関しては、第4章で説明した。ダイニンが収縮力を発生しているかどうかについては、次のような予備的な実験結果がある。ダイニンの阻害剤を加えない場合には、液滴内においてランダムな微小管ネットワークが形成され、その後すぐに収縮することが観察されている。これらの結果から、ダイニン、キネシンは微小管ネットワークに対してそれぞれ収縮力、伸長力を発生している可能性がある（収縮に伴い、微小管密度が急激に増加するため、個々の微小管の挙動はわからない。したがって、微小管軸に平行、垂直、どちらの方向に対して収縮力が働いているのか、などの詳細は不明）。一般的にダイニンは微小管のマイナス端指向性、キネシンはプラス端指向性モーターであるが、それだけではなぜこれらの分子モーターが微小管ネットワークに対して反対方向の力を発生するのか、説明ができない。この疑問に答えるためには、集団的としてだけでなく、個々のダイニン、キネシンが微小管ネットワーク内において、どのような挙動を示しているのかを詳細に観

察する必要がある。量子ドットを染色体結合性キネシン (*chromokinesin*) に結合させることで、個々の染色体結合性キネシンの挙動を観察することに成功した我々の先行研究があり (Takagi *et al.*, 2013)、この方法を他の種類のキネシンやダイニンに適用することで、個々の分子モーターを詳細に観察できると期待される。

次に、紡錘体と渦構造体について、それぞれの課題と今後の展望を、記述する。

5.2.1 紡錘体

微小管密度が伝播することで紡錘体の形状対称性が維持されるという分子機構を検証するために、紡錘体内の微小管密度変化をより詳細に計測する必要がある。本研究では、紡錘体の形態変化が数 10 分という時間スケールで生じていたため、数分おきに紡錘体の形状と構造を計測したが、変形を加えていない側での微小管密度の変化は、変形から 5 分以内に起こっていたため、まずはより短いインターバルでの観察をしなければならない。これに加えて、架橋タンパク質の動態を蛍光観察し、実際にこれらが微小管から解離しているかどうかの確認も必要である。また、本研究では変形によって微小管密度を変化させたが、微小管脱重合促進剤をマイクロインジェクション法によって紡錘体に局所的に吹きかけるなどして、局所的な微小管密度の減少を再現することも、分子機構の検証に有用である。さらに、今後の展望として、本研究とは逆に、微小管密度を局所的に増加させるとどのようなようになるのか、といったことも探していきたい。予備的な実験から、p150-CC1 存在下で極構造のない紡錘体の一端を針で狭めると、もう一端が自発的に狭まっていき、極構造を回復して二極構造を取り戻すという結果が得られている。この際、紡錘体の両端で一時的に微小管密度が増加することが確認できている。この結果は、生化学的な作用で破壊された構造が、力学的な作用で回復できることを示唆している。また、回復した構造は安定的であったことから、紡錘体の“形成”と“維持”には独立した機構が存在している可能性がある。実際、p150-CC1 は、本研究のように紡錘体の形成前に加えれば極構造のない紡錘体が形成されるが、形成後に加えると、極構造は破壊されず、紡錘体が伸長し続けることが報告されており (Gaetz *et al.*, 2006)、ダイニンの役割が紡錘体の形成と維

5.2 課題と今後の展望

持において異なっていることが示唆されている。このように、今後は、微小管密度伝播機構の検証だけでなく、紡錘体の形成と維持の分子機構についても踏み込んだ研究を行っていきたい。

5.2.2 渦構造体

回転流動を引き起こすのに、力学的相互作用と流体力学的相互作用ほどの程度寄与しているのか、という定量的な解析が必要である。この解析のためには、微小管を束化するタンパク質の特定や、微小管束1本が周囲にどのような流動を発生しているのかについて、詳細な解析が必要になる。これらは実験だけでは困難なため、流体力学を考慮したシミュレーションモデルの構築も目指したい。

本研究で提唱した回転流動のモデル（図4-9）を検証するためには、境界付近での力発生に重要な、リン脂質膜と微小管束の間の摩擦の有無についてさらに調べる必要がある。本研究での観察結果以外にも、2つの予備的な実験結果が、摩擦の存在を支持している。1つ目は、液滴ではなくリポソーム（liposome；リン脂質二重膜で覆われたカプセル）を用いた予備実験の結果である。卵抽出液を内包したリポソームで回転流動を生じさせると、膜が細胞質の流動とは逆方向に回転した。2つ目は、膜と微小管束の相互作用を変化させるために、ホスファチジルコリンの代わりに、Cithrol DPHS（親水基がPEGの界面活性剤であり、タンパク質との非特異的吸着を防ぐことが期待される）を用いた実験の結果である。Cithrol DPHSで覆われた液滴では、時間的に不安定な多方向性の流動が観察された。この流動の詳細な解析と、境界付近での微小管束の挙動を観察することで、間接的ではあるが、微小管束と境界との間で摩擦の有無や、回転流動における摩擦の重要性について解明することができると期待される。

本研究により、キネシンによる微小管の滑り運動が回転流動の駆動力であることが示唆されたが、これはAMP-PNPやアピラーゼを加えた実験結果から導かれたものである。

AMP-PNPはキネシンに特に親和性が高いことが示されているが（Sawin & Mitchison, 1991）、他の様々なタンパク質の活性にも影響してしまう。また、どのキネシンファミリーが駆動力を

5 まとめ

発生しているのかも判断することができない。キネシンの抗体を作製し、免疫沈降法によって特定のキネシンのみを除去して流動や微小管束の様子を観察することが必要である。ただし、免疫沈降法では、標的とするキネシン以外のタンパク質の濃度も低下させてしまう恐れがある（非特異的結合によって）。そのため、免疫沈降法を適用した卵抽出液で流動や微小管束の挙動が変化した際には、標的としたキネシンを追加することで、これらの挙動が回復するかどうか可能な限り試したい。

液滴の形状がどのように流動に影響するのか、といった点が未解明である。本研究では2次元で流動モデルを構築したが、実際の液滴には高さがあり、この高さは流動の発生に関与している。アスペクト比（液滴直径に対する、高さの比）が0.4を下回ると、回転流動が生じないことが予備的な実験によって判明している。微細加工技術によって型を作製し、そこに液滴を埋め込むことで液滴形状を制御し、流動の解析を行うことで、より厳密に高さの影響を定量化することがまずは必要である。

以上のような、細胞質をアクティブ流体とみなした場合の解析だけでなく、今後は細胞質流動の再構成系としての活用も模索していきたい。現在の実験系でも実際の卵母細胞などの環境に近いが、より再現性を高めるため、まずは、微小管束の端をリン脂質膜に結合させるといった工夫を行いたい（ショウジョウバエの卵母細胞では、微小管の端が細胞膜直下のアクチン表層に埋め込まれている（Theurkauf *et al.*, 1992））。このようにして構築した再構成系の利点（構成要素を定量的に変更可能であること、そして細胞では困難な、大きさの制御が可能であることなど）を生かし、発生過程で重要な現象であるにも関わらず未解明な部分が多い、細胞質流動発生機構の解明に寄与する研究を進めていきたい。

動画

動画

3-1 微小ガラス針を用いた、紡錘体極領域の弾性計測

各フレームは明視野像と共焦点蛍光像を同時観察することで得られた画像。硬い針の移動速度は $1 \mu\text{m/s}$ 。スケールバー： $10 \mu\text{m}$ 、 0 sec ：観察開始時刻。

4-1 溶液空間での微小管束の伸長

各フレームは、共焦点蛍光画像の、Z 軸方向の最大輝度投影画像。矢印は、伸長する微小管束の両端を示す。スケールバー： $30 \mu\text{m}$ 、 0 min ：温め始めた時刻。 $[\text{OG-taxol}] = 100 \text{ nM}$ 、 $[\text{p150-CC1}] = 800 \text{ nM}$ 。

4-2 液滴内の細胞質回転流動

微小管 (左)、 $0.25 \mu\text{m}\phi$ PEG 被膜ビーズ (中央；Z 軸方向の最大輝度投影画像)、明視野像 (右)。各フレームは、落射型顕微鏡で取得された画像。スケールバー： $30 \mu\text{m}$ 、 0 min ：液滴作製時刻。 $[\text{OG-taxol}] = 100 \text{ nM}$ 、 $[\text{p150-CC1}] = 800 \text{ nM}$ 。

4-3 細胞質回転流動時の、オルガネラの挙動

各フレームは、共焦点顕微画像。オルガネラは、 $0.1 \mu\text{M}$ オクタデシル ローダミン B (R18；O-246、Molecular Probes) で染色。スケールバー： $30 \mu\text{m}$ 、 0 min ：液滴作製時刻。 $[\text{OG-taxol}] = 200 \text{ nM}$ 、 $[\text{p150-CC1}] = 800 \text{ nM}$ 。

4-4 Z 軸方向の回転流動

$0.25 \mu\text{m}\phi$ PEG 被膜ビーズ (左；Z 軸方向の最大輝度投影画像)、明視野像 (右)。各フレームは、落射型顕微鏡で取得された画像。最初の 40 分は Z 軸方向の回転流動だが、その後回転面が焦点面に平行となった。スケールバー： $30 \mu\text{m}$ 、 0 min ：液滴作製時刻。 $[\text{OG-taxol}] = 100 \text{ nM}$ 、

動画

[p150-CC1] = 800 nM。

4-5 直径 700 μm を超える液滴での流動の様子

0.25 $\mu\text{m}\phi$ PEG 被膜ビーズ (Z 軸方向の最大輝度投影画像)。各フレームは、落射型顕微鏡で取得された画像。スケールバー : 60 μm 、0 min : 液滴作製時刻。[OG-taxol] = 100 nM、[p150-CC1] = 800 nM。

4-6 液滴内での渦構造体形成

各フレームは、共焦点蛍光画像の Z 軸方向の最大輝度投影画像。微小管重合の開始から観察するため、液滴やチャンバーの作製は氷上で行った。スケールバー : 30 μm 、0 min : 温め始めた時刻。[OG-taxol] = 500 nM、[p150-CC1] = 800 nM。

4-7 厚み 5–10 μm にまで圧縮した液滴内での、微小管束の挙動

各フレームは、共焦点蛍光画像の Z 軸方向の最大輝度投影画像。矢印は、伸長している微小管束の両端 (黄色の矢印は、図 4-6A で示されている微小管束の両端)。スケールバー : 30 μm 、0 min : 温め始めた時刻。[OG-taxol] = 100 nM、[p150-CC1] = 800 nM。

4-8 液滴内での、不安定な細胞質回転流動 (unstable flow)

0.25 $\mu\text{m}\phi$ PEG 被膜ビーズ (Z 軸方向の最大輝度投影画像)。各フレームは、落射型顕微鏡で取得された画像。スケールバー : 30 μm 、0 min : 液滴作製時刻。[OG-taxol] = 100 nM、[p150-CC1] = 800 nM。

参考文献

Abu Shah, E. & Keren, K. Symmetry breaking in reconstituted actin cortices. *eLife* 3, e01433 (2014).

Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 309–322 (2008).

Belmont, L. D. & Mitchison, T. J. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* 84, 623–631 (1996).

Charlebois, B. D., Kollu, S., Schek, H. T., Compton, D. A. & Hunt, A. J. Spindle pole mechanics studied in mitotic asters: dynamic distribution of spindle forces through compliant linkages. *Biophys. J.* 100, 1756–1764 (2011).

Chiba, M., Miyazaki, M. & Ishiwata, S. Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method. *Biophys. J.* 107, 346–354 (2014).

Claessens, M. M. A. E., Tharmann, R., Kroy, K. & Bausch, A. R. Microstructure and viscoelasticity of confined semiflexible polymer networks. *Nat. Phys.* 2, 186–189 (2006).

Claessens, M. M. A. E., Bathe, M., Frey, E. & Bausch, A. R. Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. *Nat. Mater.* 5, 748–753 (2006).

Corti B. Osservazione Microscopiche sulla Tremella e sulla Circolazione del Fluido in una Pianta

参考文献

Acquajuola, Appresso Giuseppe Rocchi, Lucca, Italy (1774).

Crevel, I. M-T. C., Lockhart, A. & Cross, R. A. Weak and strong states of kinesin and ncd. *J Mol Biol.* 257, 66–76 (1996).

Crevel, I. M., Alonso, M. C. & Cross, R. A. Monastrol stabilises an attached low-friction mode of Eg5. *Curr. Biol.* 14, R411–412 (2004).

Goshima, G., Wollman, R., Stuurman, N., Scholey, J.M. & Vale, R.D. Length control of the metaphase spindle. *Curr. Biol.* 15, 1979–1988 (2005).

Derry, W. B., Wilson, L. & Jordan, M. A. Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* 34, 2203–2211 (1995).

Desai, A., Murray, A., Mitchison, T. J. & Walczak, C. E. The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function in vitro. *Methods Cell Biol.* 61, 385–412 (1999).

Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J. & Walczak, C. E. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96, 69–78 (1999).

Dombrowski, C., Cisneros, L., Chatkaew, S., Goldstein, R. E. & Kessler, J.O. Self-concentration and large-scale coherence in bacterial dynamics. *Phys. Rev. Lett.* 93, 098103 (2004).

Drescher, K., Dunkel, J., Cisneros, L. H., Ganguly, S. & Goldstein, R. E. Fluid dynamics and noise

参考文献

in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10940–10945 (2011).

Dumont, S. & Mitchison, T. J. Force and length in the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 19, R749–761 (2009).

Field, C.M., Wuhr, M., Anderson, G. A., Kueh, H. Y., Strickland, D. *et al.* Actin behavior in bulk cytoplasm is cell cycle regulated in early vertebrate embryos. *J. Cell Sci.* 124, 2086–2095 (2011).

Gaetz, J. & Kapoor, T. M. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.* 166, 465–471 (2004).

Gatlin, J. C., Matov, A., Danuser, G., Mitchison, T. J. & Salmon, E. D. Directly probing the mechanical properties of the spindle and its matrix. *J. Cell Biol.* 188, 481–489 (2010).

Gatlin, J. C., Matov, A., Groen, A. C., Needleman, D. J., Maresca, T. J., Danuser, G. *et al.* Spindle fusion requires dynein-mediated sliding of oppositely oriented microtubules. *Curr. Biol.* 19, 287–296 (2009).

Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J. & Howard, J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120, 923–934 (1993).

Glotzer, M. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 9–20 (2009).

参考文献

Gordon, M. B., Howard, L. & Compton, D. A. Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J. Cell Biol.* 152, 425–434 (2001).

Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N. & Vale, R. D. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J. Cell Biol.* 181, 421–429 (2008).

Goldstein, R. E. & van de Meent, J. W. A physical perspective on cytoplasmic streaming. *Interface Focus* 5: 20150030 (2015).

Goshima, G., Nédélec, F. & Vale, R. D. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J. Cell Biol.* 171, 229–240 (2005).

Harris, P., Osborn, M. & Weber, K. A spiral array of microtubules in the fertilized sea-urchin egg cortex examined by indirect immunofluorescence and electron-microscopy. *Exp. Cell Res.* 126, 227–236 (1980).

Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. *et al.* Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 382, 420–425 (1996).

Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques* 2nd Edition, pp215–223 (2008).

Humphrey, D., Duggan, C., Saha, D., Smith, D. & Käs, J. Active fluidization of polymer networks

参考文献

through molecular motors. *Nature* 416, 413–416 (2002).

Hyman, A., Drechsel, D., Kellogg, D., Salser, S., Sawin, K., Steffen, P. et al. Preparation of modified tubulins. *Method Enzymol.* 196, 478–485 (1991).

Isambert, H., Venier, P., Maggs, A. C., Fattoum, A., Kassab, R. et al. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 11437–11444 (1995).

Itabashi, T., Takagi, J., Shimamoto, Y., Onoe, H., Kuwana, K., Shimoyama, I., et al. Probing the mechanical architecture of the vertebrate meiotic spindle. *Nat. Methods* 6, 167–172 (2009).

Itabashi, T., Takagi, J., Suzuki, K. & Ishiwata, S. Responses of chromosome segregation machinery to mechanical perturbations. *BIOPHYSICS* 9, 73–78 (2013).

Kalab, P., Weis, K. & Heald, R. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295, 2452–2456 (2002).

Kalab, P., Pralle, A., Isacoff, E. Y., Heald, R. & Weis, K. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* 440, 697–701 (2006).

Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L. & Mitchison, T. J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* 150, 975–988 (2000).

参考文献

Katz, Y., Tunstrom, K., Ioannou, C.C., Huepe, C. & Couzin, I.D. Inferring the structure and dynamics of interactions in schooling fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18720–18725 (2011).

Keber, F. C. et al. Topology and dynamics of active nematic vesicles. *Science* 345, 1135–1139 (2014).

Keller, P. J., Pampaloni, F., Lattanzi, G. & Stelzer, E. H. K. Three-dimensional microtubule behavior in *Xenopus* egg extracts reveals four dynamic states and state-dependent elastic properties. *Biophys. J.* 95, 1474–1486 (2008).

Kikkawa, M. et al. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature* 411, 439–445 (2001).

Kimura, K. & Kimura, A. Intracellular organelles mediate cytoplasmic pulling force for centrosome centration in the *Caenorhabditis elegans* early embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 137–142 (2011).

King, S. J., Brown, C. L., Maier, K. C., Quintyne, N. J. & Schroer, T. A. Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell* 14, 5089–5097 (2003).

Kwok, B. H., Kapitein, L. C., Kim, J. H., Peterman, E. J., Schmidt, C. F., Kapoor, T. M. Allosteric inhibition of kinesin-5 modulates its processive directional motility. *Nat. Chem. Biol.* 2, 480–485 (2006).

Lee, K., Gallop, J. L., Rambani, K. & Kirschner, M. W. Self-assembly of filopodia-like structures

参考文献

on supported lipid bilayers. *Science* 329, 1341–1345 (2010).

Lockhart, A. & Cross, R. A. Kinetics and motility of the Eg5 microtubule motor. *Biochemistry* 35, 2365–2373 (1996).

Lushi, E., Wioland, H. & Goldstein, R. E. Fluid flows created by swimming bacteria drive self-organization in confined suspensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 9733–9738 (2014).

Ma, L., Cantley, L.C., Janmey, P. A. & Kirschner, M. W. Corequirement of specific phosphoinositides and small GTP-binding protein Cdc42 in inducing actin assembly in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 140, 1125–1136 (1998).

McIntosh, J. R., Molodtsov, M. I. & Ataullakhanov, F. I. Biophysics of mitosis. *Q. Rev. Biophys.* 45, 147–207 (2012).

McNally, F. J. Mechanisms of spindle positioning. *J. Cell Biol.* 200, 131–140 (2013).

Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J. D. & Cleveland, D. W. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 87, 447–458 (1996).

Mitchison, T. J., Maddox, P., Gaetz, J., Groen, A., Shirasu, M., Desai, A. *et al.* 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 (2005).

参考文献

Mitchison, T. J., Nguyen, P., Coughlin, M. & Groen, A. C. Self-organization of stabilized microtubules by both spindle and midzone mechanisms in *Xenopus* egg cytosol. *Mol. Biol. Cell* 24, 1559–1573 (2013).

Miyamoto, D. T., Perlman, Z. E., Burbank, K. S., Groen, A. C. & Mitchison, T. J. The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J. Cell Biol.* 167, 813–818 (2004).

Miyazaki, M., Chiba, M., Eguchi, H., Ohki, T. & Ishiwata, S. Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings *in vitro*. *Nat. Cell Biol.* 17, 480–489 (2015a).

Miyazaki, M., Chiba, M. & Ishiwata, S. Preparation of cell-sized water-in-oil droplets for *in vitro* reconstitution of biological processes in cellular compartments. *Protoc. Exch.* doi:10.1038/protex.2015.029 (2015b).

Murray, A. W. Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* 36, 581–605 (1991).

Nédélec, F. J., Surrey, T., Maggs, A. C. & Leibler, S. Self-organization of microtubules and motors. *Nature* 389, 305–308 (1997).

Needleman, D. J. *et al.* Fast microtubule dynamics in meiotic spindles measured by single molecule imaging: evidence that the spindle environment does not stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell* 21, 323–333 (2010).

参考文献

Newmeyer, D. D., Lucocq, J. M., Burglin, T. R. & De Robertis, E. M. Assembly *in vitro* of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmin accumulation. *EMBO J.* 5, 501–510 (1986).

Oshimori, N., Ohsugi, M. & Yamamoto, T. The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nat. Cell Biol.* 8, 1095–1101 (2006).

Oshimori, N., Li, X., Ohsugi, M. & Yamamoto, T. Cep72 regulates the localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation. *EMBO J.* 28, 2066–2076 (2009).

Pinot, M., Steiner, V., Dehapiot, B., Yoo, B. K., Chesnel, F. *et al.* Confinement induces actin flow in a meiotic cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 11705–11710 (2012).

Quintyne, N. J., Gill, S. R., Eckley, D. M., Crego, C. L., Compton, D. A. *et al.* Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J. Cell Biol.* 147, 321–334 (1999).

Sawin, K. E. & Mitchison, T. J. Poleward microtubule flux mitotic spindles assembled *in vitro*. *J. Cell Biol.* 112, 941–954 (1991).

Sanchez, T., Chen, D. T. N., DeCamp, S. J., Heymann, M. & Dogic, Z. Spontaneous motion in hierarchically assembled active matter. *Nature* 491, 431–434 (2012).

Scholey, J. M., Brust-Mascher, I. & Mogilner, A. Cell division. *Nature* 422, 746–752 (2003).

参考文献

Schroeder, T. E. & Battaglia, D. E. Spiral asters and cytoplasmic Rotation in sea-urchin eggs - induction in *Strongylocentrotus-purpuratus* eggs by elevated-temperature. *J. Cell Biol.* 100, 1056–1062 (1985).

Serbus, L. R., Cha, B.J., Theurkauf, W. E. & Saxton, W.M. Dynein and the actin cytoskeleton control kinesin-driven cytoplasmic streaming in *Drosophila* oocytes. *Development* 132, 3743–3752 (2005).

Shimamoto, Y., Maeda, Y. T., Ishiwata, S., Libchaber, A. J. & Kapoor, T. M. Insights into the micromechanical properties of the metaphase spindle. *Cell* 145, 1062–1074 (2011).

Shimamoto, Y. & Kapoor, T. M. Microneedle-based analysis of the micromechanics of the metaphase spindle assembled in *Xenopus laevis* egg extracts. *Nat. Protoc.* 7, 959–969 (2012).

Sokolov, A. & Aranson, I.S. Physical properties of collective motion in suspensions of bacteria. *Phys. Rev. Lett.* 109, 248109 (2012).

Takagi, J., Itabashi, T., Suzuki, K., Kapoor, T. M., Shimamoto, Y. & Ishiwata, S. Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size. *Cell Rep.* 5, 44–50 (2013).

Takagi, J., Itabashi, T., Suzuki, K., Kapoor, T. M., Shimamoto, Y. & Ishiwata, S. Micromechanics of the vertebrate meiotic spindle examined by stretching along the pole-to-pole Axis. *Biophys. J.* 106, 735–740 (2014).

参考文献

Theurkauf, W. E., Smiley, S., Wong, M. L. & Alberts, B. M. Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* 115, 923–936 (1992).

Theurkauf, W. E. Premature microtubule-dependent cytoplasmic streaming in Cappuccino and Spire mutant oocytes. *Science* 265, 2093–2096 (1994).

Thielicke, W. & Stamhuis, E. J. PIVlab – Towards user-friendly, affordable and accurate digital particle image velocimetry in MATLAB. *J. Open Res. Softw.* 2(1), p.e30. (2014).

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

Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K. et al. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 6894–6899 (2010).

Uchida, K., Hoshino, Y., Tamura, A., Yoshimoto, K., Kojima, S. et al. Creation of a mixed poly(ethylene glycol) tethered-chain surface for preventing the nonspecific adsorption of proteins and peptides. *Biointerphases* 2, 126–130 (2007).

Verde, F., Berrez, J.M., Antony, C. & Karsenti, E. Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein. *J. Cell*

参考文献

Biol. 112, 1177–1187 (1991).

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

Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. & Vernos, I. TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J. Cell Biol.* 149, 1405–1418 (2000).

Wioland, H., Woodhouse, F. G., Dunkel, J., Kessler, J. O. & Goldstein, R.E. Confinement stabilizes a bacterial suspension into a spiral vortex. *Phys. Rev. Lett.* 110, 268102 (2013).

Woodhouse, F. G. & Goldstein, R. E. Spontaneous circulation of confined active suspensions. *Phys. Rev. Lett.* 109, 168105 (2012).

Woodhouse, F. G. & Goldstein, R. E. Cytoplasmic streaming in plant cells emerges naturally by microfilament self-organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 14132–14137 (2013).

Yan, Y., Sardana, V., Xu, B., Homnick, C., Halczenko, W., Buser, C. A. *et al.* Inhibition of a mitotic motor protein: where, how, and conformational consequences. *J. Mol. Biol.* 335, 547–554 (2004).

Yang, G., Cameron, L. A., Maddox, P. S., Salmon, E. D. & Danuser, G. Regional variation of microtubule flux reveals microtubule organization in the metaphase meiotic spindle. *J. Cell Biol.* 182, 631–639 (2008).

参考文献

Yi, K., Rubinstein, B. & Li, R. Symmetry breaking and polarity establishment during mouse oocyte maturation. *PHILOS. T. ROY. SOC. B* 368, 20130002 (2013).

謝辞

謝辞

本研究をご指導してくださいました、石渡信一名誉教授に感謝申し上げます。これほど自由に、そして楽しんで研究を行うことができたのは、石渡先生のおかげです。本当にありがとうございました。本研究の遂行、博士論文作成にあたり、貴重なご意見をくださっただけでなく、様々なご配慮をしてくださいました安田賢二教授に深く感謝いたします。大変お忙しい時期であるにも関わらず、お世話になりました。ありがとうございました。博士学位審査を通じて、貴重なご意見をくださいました上田太郎教授、高野光則教授に、心より感謝いたします。セミナーを通じて、多くの議論をしてくださいました、故・木下一彦教授に感謝申し上げます。アフリカツメガエルの卵抽出液系に関して、そして論文改訂に際してご助言をくださいました、Tarun Kapoor 教授 (The Rockefeller University) に感謝いたします。

基礎的な実験技術から論文作成にいたるまで、様々なご指導をくださいました板橋岳志博士、高木潤博士 (国立遺伝学研究所) に深く感謝いたします。お二人の研究を知ったことが、私が石渡研究室を希望した大きな理由の1つでした。卵抽出液系は非常に魅力的な実験系ではあるものの、一方で大変難しく、安定的に実験を行えるようになるまで何年もの試行錯誤が必要となりましたが、お二人のご指導のおかげで研究を遂行することができました。ありがとうございました。渦構造の研究において、実験系のデザインや論文作成に多くのご助力を頂きました、宮崎牧人博士に感謝申し上げます。私にとって未知の分野での研究でしたが、宮崎博士のおかげで論文としてまとめることができました。ありがとうございました。

本研究の遂行にあたり、多大なご協力を頂きました、寺菌英之博士、服部明弘博士、松浦賢志博士、尾高正朗研究助手、谷田部聡様、千葉雅隆様、田邊優敏様、菊池隆仁様、高橋直樹様、中田吉紀様、岩村萌絵様に感謝いたします。皆様のご尽力なしには本研究の遂行と本論文の作成はできませんでした。本当に、ありがとうございました。

活発な議論をしてくださった、早稲田大学 石渡研究室卒業生の皆様に、感謝申し上げます。

研究業績

論文

Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata

Spatial confinement of active microtubule networks induces large-scale rotational cytoplasmic flow

***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press (2017).**

Kazuya Suzuki, Takeshi Itabashi and Shin'ichi Ishiwata

Mechanical properties of spindle poles are symmetrically balanced.

***Biophys. Physicobiol.*, 14: 1–11. (2017).**

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.

***Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, in press. (2016).**

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.

***Biophys. J.* 106:735-740. (2014).**

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 Rep. 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.

Sci. Rep. 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).

講演 (国際会議)

(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

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

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

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.

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.

講演 (国内会議)

(招待講演) 鈴木和也

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、

研究業績

(ポスター) 鈴木和也、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

(ポスター) 田邊優敏、宮崎牧人、鈴木和也、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

(口頭) 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・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

(ポスター) 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.

研究業績

第 48 回 日本生物物理学会、仙台、2010 年 9 月

(口頭) 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・ポスター) 鈴木 和也、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