

博士論文審査報告書

論文題目

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

A study on the micromechanics and dynamic structure of
microtubule network:
Focusing on the spindle symmetry and cytoplasmic flow

申請者

鈴木	和也
Kazuya	SUZUKI

物理学及応用物理学専攻 実験生物物理学研究

2017年3月

生物固有の様々な機能は、生物を構成する細胞機能の統合として現れる。そして、細胞機能は生体分子機械と呼ばれる様々なタンパク質・遺伝子集合体によって担われている。本研究は、その細胞機能を担う実態として、細胞骨格と呼ばれるタンパク質重合体のうち、微小管に着目し、それと相互作用する分子モーター（キネシンやダイニン）と微小管からなるネットワークのダイナミクスを調べたものである。そして、具体的な研究対象として、細胞機能の中でも最も重要なものの一つ、染色体分配を担う分子装置「紡錘体」の、2つの極領域における力学動態と、多くの細胞内で見られる細胞質の回転流動（渦）現象を取り上げ、そこでの微小管動態の仕組みを探ったものである。前者については、とくに紡錘体形状の対称性に着目し、形状だけでなく、両極領域における微小管密度や弾性率などの物性を計測することで、その動的安定性を探った。従来、紡錘体の力学特性は詳細に調べられていたが、極構造の力学特性は定量化されていなかった。また、紡錘体の形状や力学特性の左右対称性に着目した研究も存在しなかった。後者については、油中液滴という、人工細胞に模した、リン脂質膜で包まれた閉鎖空間内で形成される微小管ネットワークの動態を顕微計測し、細胞内に見られる回転流動の仕組みを推測した。

第1章は、本研究の背景と目的、本論文の概要をまとめた序論である。

第2章では、本研究で用いた実験材料とそれらの調製法（アフリカツメガエル卵抽出液の調製法や、紡錘体の自己組織化法、油中液滴の形成法など）、そして光学顕微鏡（落射型・共焦点蛍光顕微鏡）法や、紡錘体の顕微操作に用いたガラス微小針の操作法や弾性計測法、微小管動態の解析法などがまとめられている。

第3章では、紡錘体、とくに極領域のミクロ力学や、紡錘体形状の対称性の維持に関する独自のアプローチがまとめられている。まず紡錘体の形状を定量化し、それに基づいて、極から二極間距離の20%までの範囲を極領域と定義した。そして、求めた領域の形状パラメーターをもとに紡錘体が両極で対称であることを定量的に確認した。次に、十分硬いガラス針と、曲げの弾性率（バネ定数： $1\text{nN}/\mu\text{m}$ 程度）を較正済みの柔らかいガラス針を極領域に挿入し、紡錘体の垂直方向に、針の間を広げるように硬い針を移動し、それに伴う柔らかい針の曲げの大きさから、極領域に加わる力を計測した。こうして、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」と定義して求めた。この手法により、紡錘体は形状だけでなく力学特性も左右対称であることを明らかにした。そして、二極構造の形成に重要とされている微小管分子モーターの機能を、特異的な阻害剤を用いて阻害すると、紡錘体の弾性が、ダイニン分子モーターの場合には低下し、キネシン-5 (Eg5) 分子モーターの場合には増大すること、そして、両者とも阻害すると、コントロールと同程度まで回復することを見出した。この結果は、二極紡錘体形状の維持において、ダイニンとキネシン-5が拮抗関係にあることを示している。次に、両極領域における微小管密度を計測し、弾性との相関性を調べた。

その結果、両極で微小管密度はほぼ等しく、弾性は架橋タンパク質に強く依存し、さらに微小管密度に関しても、ダイニンとキネシン-5の間に拮抗関係が存在した。以上で紡錘体の両極領域は、形状、弾性、微小管密度に関して対称的であることが示されたが、これらがどのように動的に維持されているかを検討した。すなわち、一方の極領域を広げて保持したときに、他方の極領域がどのように応答するかを調べた。その結果、他方の極領域がある時間遅れで広がり、最終的にタル型の紡錘体が形成された。広げた極領域では微小管密度も弾性もともに大きく低下したが、他方の極領域でもこれらの値が5分以内に低下した。この極領域が応答する時間は、紡錘体のサイズに依存していた。これらの結果は、形状や力学特性を両極で対称的に維持する動的機構を、紡錘体が備えていることを示唆している。対称性維持機構としては、次のようなことが考えられる。広げるという変形によって微小管同士の間隔が増加し、微小管架橋タンパク質が解離する。この過程が、広げた極領域から他方の極領域へと連鎖的に伝播し、最終的に他方の極領域も広がる。次に、ダイニンとキネシン-5を同時阻害した紡錘体を非対称変形してその応答性を調べたところ、他方の極領域の形状は応答しなかった。微小管密度の低下はみられたが、低下し始めるまでに20分以上かかった。このことは、微小管同士を架橋する分子モーター機能が変わったことで、微小管密度の伝搬能力が低下し、形状の対称性を維持する能力が低下したものと推測される。紡錘体の構造は、微小管ネットワークの間を架橋し微小管同士の滑り運動を引き起こす分子モーターによって動的に維持されている。紡錘体の形状は、微小管束が両極で閉じられ、染色体が整列する中央付近で束ねられていることで維持されているが、本研究によって、微小管を動的に架橋している分子モーターの役割が浮き彫りになったといえる。

第4章では、「微小管渦構造による細胞質流動」について述べられている。細胞質流動は、主に大きな細胞内構造体（オルガネラ）の運搬に利用されている。細胞質流動は、駆動する繊維状重合体によって、2種類に分類される。1つが微小管であり、もう1つがアクチン繊維である。アクチン駆動の流動は、これまでよく研究されてきた。しかし、微小管駆動の流動は、回転流動を生み出すのが特徴であり、未解明な部分が多かった。そこで本研究では、アフリカツメガエルの卵抽出液を封入した油中液滴において、微小管が流動を起こしうるかどうかを調べた。まず、十分広い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。アクチン重合を抑制した溶液条件下で、微小管の重合を促進する薬剤 Taxol を加えると、幾つもの星状体が連結した格子構造が形成された。そこで、この星状体形成にはダイニンが必須であることが知られているため、ダイニン阻害剤を加えたところ、格子構造ではなく、微小管のランダムネットワークが形成された。そして、このような条件下では、直径数 $10 \mu\text{m}$ 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、Particle Image Velocimetry (PIV) 解析によって明らかになった。これを共焦点顕微鏡で観察・解析すると、微小管の束が伸長していることが

確認された。伸長は周囲に流動を発生することから、渦流は、微小管束同士の流体力学的相互作用によって生じている可能性が示唆された。これは、高密度のバクテリア懸濁液で観察される渦流に非常に現象や機構が類似している。次に、油中液滴に封入すると、直径 100-700 μm において、伸長する微小管束が自発的に渦状に配列し、細胞質回転流動を引き起こすことを発見した（流動が発生する直径は、卵母細胞や胚の直径に近い）。キネシンの加水分解能を阻害すると、流動が全く生じなかったことから、微小管束の伸長はキネシンによる微小管同士の滑り運動によることが判明した。溶液空間での渦流と比較して、時間的、空間的に 10-100 倍安定だった。溶液空間での実験結果や、よく調べられているバクテリアの懸濁液の研究、そして境界に端が接している微小管束が、伸長しながら屈曲することから、安定な流動が生じた要因として、微小管束同士の流体力学的相互作用の他に、微小管束と液滴境界の力学的相互作用の重要性が考えられた。つまり、液滴境界に到達した微小管束が微小管ネットワークを押し出すことで回転力を発生し、回転流動を生じる。この回転流動が、さらに渦構造への微小管束の配列を促す、という正のフィードバックループを生じさせ、安定的な流動が発生するものと推測された。

第 5 章では、本研究のまとめと、今後の研究の課題と展望が述べられている。

以上で述べたように申請者は、細胞内運動に果たす細胞骨格のダイナミクスに興味を持ち、微小管動態に着目して、次の 2 つの再構成系の研究を行った。1) 染色体分配装置である紡錘体の対称的形状の動的維持機構、2) 細胞内で見られる回転流動である。その結果、1) については微小管ネットワーク内での微小管同士の間隔に依存した分子モーターの架橋能・運動能が重要な因子であること、2) については、細胞に模した円形の閉鎖空間の中で、微小管・分子モーター集合体が回転流動を発生することを発見し、その要因が、微小管束が円形周辺を押し出す力であることを示した。これらの成果は、紡錘体対称構造の制御機構と、微小管・キネシンネットワークの渦形成機構について新たな知見を与えたものであり、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

2017 年 2 月

審査員 主査 早稲田大学教授 博士（理学）早稲田大学 安田賢二

早稲田大学教授 博士（学術）東京大学 高野光則

早稲田大学教授 理学博士 東京大学 上田太郎

早稲田大学名誉教授 理学博士 名古屋大学 石渡信一