



# 細胞分裂面決定機構と分裂シグナルの ライブイメージング

## Cleavage Signal Induced by the Mitotic Spindle; Insights from Live Cell Imaging

上条 桂樹

Keiju Kamijo

<sup>a</sup>東北大学大学院医学系研究科・細胞組織学分野

**要旨** 細胞質分裂は、染色体間の細胞表層に収縮環が形成されて、その収縮によって細胞がくびれることで進行する。紡錘体を構成する微小管が分裂面を決定し収縮環形成を導く“分裂シグナル”を供給すると考えられてきたが、その分子の実体は長く不明のままだった。本稿では、Rhoとその調節因子複合体が、分裂シグナルの分子の実体として働くことを論じるとともに、ライブイメージングによる分裂シグナルの可視化について紹介する。

**キーワード**：細胞質分裂，収縮環，低分子量 G タンパク質 Rho，微小管，分裂期キネシン

### 1. はじめに

細胞分裂は、染色体の分離とそれに引き続く細胞質分裂、すなわち、細胞質と細胞膜、オルガネラなどの分離過程からなる。細胞質分裂によって2つの娘細胞が分離し、細胞分裂が完了することから、細胞質分裂は細胞増殖に必須であるとともに、生命の連続性の源となっている。動物細胞の細胞質分裂は、収縮環が収縮して細胞がくびれることで進行する(図1)。収縮環は、分裂後期にアクチンとミオシンの線維が細胞表層にリング状に集積して形成される。染色体や細胞質が娘細胞に均等に分配されるためには、収縮環が正しい時間—染色体の分離後—に、正しい位置—染色体間の細胞表層—に形成されなければならない。顕微操作実験などを通じて、分裂後期の微小管が収縮環の位置(分裂面)を決定し、収縮環形成を導く“分裂シグナル”を供給すると考えられるようになったが、分裂シグナルの実体は長く不明のままだった。近年、RNA 干渉法(RNAi)による遺伝学的解析が可能になり、低分子量 G タンパク質 Rho とその調節因子(ECT2, MgcRacGAP, MKLP1)が分裂シグナルの分子の実体として働くことが明らかになった。本稿では、分裂後期微小管によ

る分裂面決定・収縮環形成機構について Rho シグナルを中心に議論するとともに、筆者らのライブイメージングによる分裂シグナル可視化の取り組みを紹介する。

### 2. 微小管による分裂面決定モデル

微小管が伝える分裂シグナルは大きく分けて、細胞表層を収縮させるシグナル(正の分裂シグナル)と弛緩させるシグナル(負の分裂シグナル)の2つが想定されている<sup>1)</sup>。正の分裂シグナルモデルでは、染色体間の微小管(中央紡錘体および星状体微小管の一部)が、分裂面決定・収縮環形成を促進する分裂シグナルを供給すると考える(図2A)。このモデルは、主要な分裂シグナルを供給する微小管が中央紡錘体か星状体微小管かで、さらに2つに分類されることもあるが、本稿では1つにまとめて扱う。なお、中央紡錘体は、染色体分離後(分裂後期)に染色体間に束化する中央にオーバーラッピング構造を持つ微小管構造である(図1)。

これに対して負の分裂シグナルモデルでは、星状体微小管が収縮環形成を抑え、細胞表層を弛緩させる負の分裂シグナルを供給すると仮定する。染色体間の細胞表層は星状体からもっとも遠く、負の分裂シグナルが少なくなるために分裂面

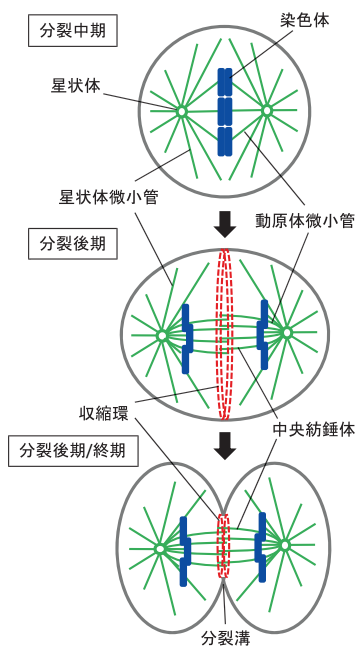


図1 動物細胞の細胞質分裂過程と分裂装置。分裂後期に染色体が分離すると、染色体間の細胞表層に収縮環が形成され、その収縮により細胞がくびれて分裂溝が形成される。

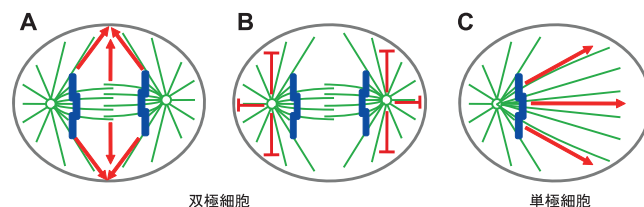


図2 微小管によって制御される分裂面決定・収縮環形成モデル。(A)中央紡錘体と星状体微小管の一部による正の分裂シグナルモデル。(B)星状体微小管による負の分裂シグナルモデル。(C)単極細胞モデル。単極細胞(C)では、染色体を越えて伸びる微小管が正の分裂シグナルを供給する。

<sup>a</sup>〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1  
TEL: 022-717-8027; FAX: 022-717-8030  
E-mail: kkamijo@ja3.so-net.ne.jp  
2009年3月3日受付

となるというモデルである (図 2B)。これらの 2 つのモデルは、必ずしも排他的ではない。事実、細胞質分裂では、染色体間の細胞表層が収縮環によって収縮するのに対し、染色体の外側 (両極付近) では、細胞が進展する現象が同時に起こっている。つまり、染色体を挟んで内側の微小管は正の分裂シグナルを、外側は負の分裂シグナルを供給すると考えると、実際の細胞質分裂とよく一致する。

Canman らは単極紡錘体細胞で細胞質分裂を誘導すると、染色体を越えて安定化した微小管が伸び、その先端近傍に分裂溝が誘導されることを見出した<sup>2)</sup>。この結果から、染色体が微小管に分裂溝を誘導する何らかの因子を供給するというモデルが提唱された (図 2C)。おもしろいことに、この単極紡錘体のモデルを 2 つ向き合わせると、図 2A と相同となり、染色体間の微小管が細胞質分裂を正に制御することをうまく説明できる。こうした、分裂装置のトポロジーによって分裂面が決定される“分裂シグナルモデル”が、これまでに数多く提唱されてきたが、分裂シグナルの分子実体はなかなか捉えることができなかった。

### 3. 低分子量 G タンパク質 Rho による分裂面決定・収縮環形成制御

1990 年代はじめに、細胞骨格制御の分子スイッチとして働く低分子量 G タンパク質 Rho が細胞質分裂に必須であることが示された<sup>3)</sup>。しかし、Rho は、通常の固定・染色法では細胞質全体が染まり分裂溝に局在が認められない。myc, HA, GFP などタグとした融合タンパク質として発現しても分裂溝に局在しない。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) でも分裂溝に Rho の活性化が認められないなど、Rho が収縮環形成を直接制御していることを示す証拠はなかなか捉えられなかった<sup>4)</sup>。このため、Rho による収縮環形成制御は細胞内のアクチンなどの細胞骨格制御を介した間接的なものとする考えもあった。

Yonemura らは、トリクロロ酢酸 (TCA) 固定法を用いることで Rho が分裂溝に局在することを示した<sup>5)</sup>。筆者らは、この TCA 固定法により、Rho が染色体の分離後、分裂溝形成に先立って、細胞質から将来の分裂面である染色体間の細胞表層に移行することを見出した (図 3, 分裂後期)。さらに、Rho 特異的阻害剤ボツリヌス毒素 C3 で Rho の活性化を抑えると、Rho の染色体間の細胞表層への局在化が失われて、アクチンとミオシンが集積せず、収縮環形成が阻害されることも明らかになった<sup>6,7)</sup>。Bement らは、活性型 Rho と結合する Rho エフェクター分子 Rhotekin の Rho 結合部位と GFP の融合タンパク質をプローブとして、活性型 Rho が、分裂溝形成に先立って染色体間の細胞表層に分布することを示した<sup>8)</sup>。これらの結果から、活性型 Rho が染色体間の細胞表層に局在することが分裂面決定・収縮環形成に必須であることが明らかになった。

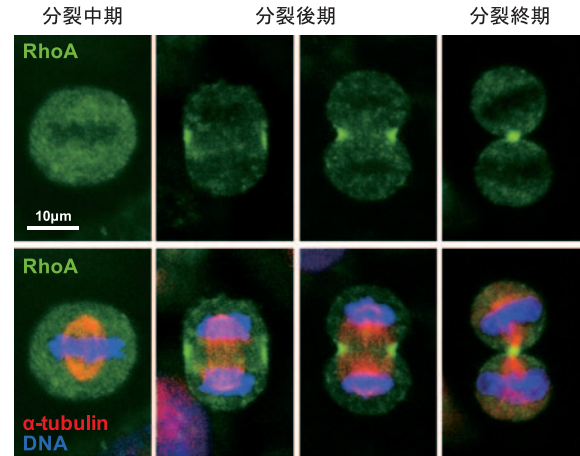


図 3 HeLa 細胞の分裂期における低分子量 G タンパク質 Rho の局在。Rho は染色体分離直後に、細胞質から将来の分裂面となる染色体間の細胞表層に移行し、その位置に収縮環が形成される。

### 4. 微小管上の Rho 調節因子による Rho 局在制御

活性型 Rho は将来の分裂面となる染色体間の細胞表層に移行するが、その局在はどのように制御されているのだろうか？ GDP と結合した不活性型の Rho は、Rho 活性化因子 (Rho GDP/GTP 交換因子, RhoGEF) によって、GDP が放出され、GTP に置換されることで活性型の Rho となる。ショウジョウバエでは、Pebble (Pbl) と呼ばれる RhoGEF が染色体間の細胞表層に局在し収縮環形成に関与することが報告されていた<sup>9)</sup>。しかし、前述のように、細胞質分裂中の Rho の局在がはっきりしていなかったこともあって、Pbl が実際に Rho を活性化し、その局在を制御しているかどうかは不明のままだった。哺乳動物の Pbl オルソログは ECT2 である。ECT2 は、分裂後期に、細胞質から染色体間の微小管、主に中央紡錘体のオーバーラッピング域に移行する (図 4A)<sup>10)</sup>。筆者らは、ECT2 に対する siRNA を HeLa 細胞にトランスフェクトして ECT2 をノックダウンした。この結果、Rho の染色体間の細胞表層への局在が失われ、分裂溝も形成されなかった (図 4B)。ミオシン調節軽鎖-GFP を発現する HeLa 細胞 (図 5A) で ECT2 をノックダウンし、ライブイメージング観察を行ったところ、染色体間の細胞表層へのミオシンの集積が抑えられて、収縮環形成が阻害された (図 5B)。こうしたことから、微小管上の RhoGEF ECT2 が、Rho を活性化し、活性型の Rho が、染色体間の細胞表層に集積することにより収縮環の形成を制御していることが明らかになった<sup>6)</sup>。

中央紡錘体には、ECT2 だけでなく、Rho 不活性化因子 (Rho GTPase activating protein, RhoGAP) とされる MgcRacGAP が局在している (図 4A)。MgcRacGAP は、分裂期キネシン MKLP1 (図 4A) とモル比で 2:2 の複合体 (centralspindlin) を形成し中央紡錘体の形成と娘細胞間切断に関わるとされている<sup>11)</sup>。ショウジョウバエでは centralspindlin は、Rho 不活性化因子 RacGAP50C/Cyk4 およびキネシン Pavarotti/Zen-4

で構成されている。Somersらは、RacGAP50C/Cyk4とRhoGEF Pblが直接結合することを見出し、微小管上のcentralspindlinが細胞表層のPblを介してRhoを活性化し、収縮環形成を制御するというモデルを提唱した<sup>12)</sup>。筆者らは、HeLa細胞で、MgcRacGAPまたはMKLP1のRNAiを行うと、RhoGEF ECT2が中央紡錘体に局在できなくなるとともに、Rhoの染色体間の細胞表層への集積が失われ、収縮環形成も阻害されることを見出した。さらに、免疫沈降実験やTwo-hybrid法などの結果から、ECT2はMgcRacGAPと結合することでcentralspindlinと中央紡錘体上で複合体を形成することも明らかになった<sup>6)</sup>。

以上の結果は、染色体間の微小管が制御する正の分裂シグナルモデル(図2A)とよく一致する。相前後して、複数のグループから同様の結果が報告され<sup>7,13,14)</sup>、分裂シグナルの分子の実体として、“微小管→MKLP1・MgcRacGAP(centralspindlin)→ECT2(RhoGEF)→Rho(活性型)→収縮環形成”というRhoシグナル経路が働くことが確認された(図4C)。

### 5. 分裂シグナルのライブイメージング

MKLP1・MgcRacGAP・ECT2によるRho活性化機構は正の分裂シグナルの条件をよく満たしている。そこで、筆者ら

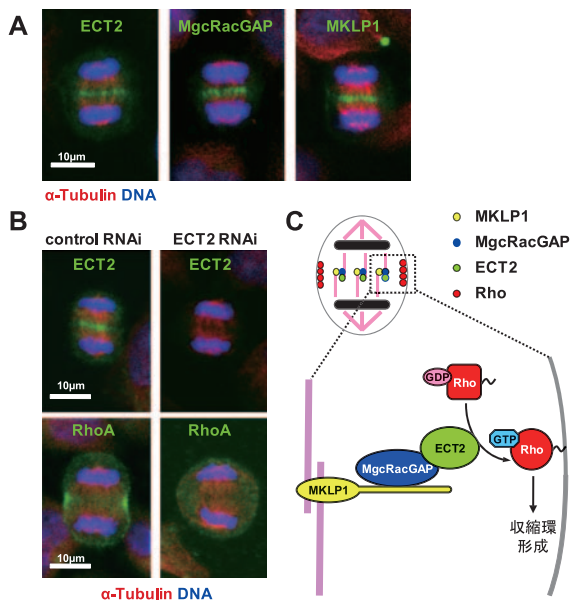


図4 Rhoの局在は微小管上のECT2(Rho活性化因子)、MgcRacGAP(Rho不活性化因子)、MKLP1(分裂期キネシン)により制御される。(A)分裂後期のECT2、MgcRacGAP、MKLP1の局在。(B)Rho活性化因子(RhoGEF)ECT2のRNAiによる、Rhoの染色体間の細胞表層への局在の阻害。(C)Rhoシグナルによる分裂面決定モデル。分裂後期にECT2・MgcRacGAP・MKLP1からなるRho活性化因子複合体が染色体間の微小管(中央微小管と星状体微小管の一部)に局在し、Rhoを活性化する。活性型Rhoは、染色体間の細胞表層に集積し、Rhoキナーゼ、Citronキナーゼ、mDiaなどRhoエフェクター分子を介してミオシンとアクチンを集積させて収縮環を形成する。

は、Rhoシグナル分子とGFPの融合タンパク質を発現させることで、分裂シグナルの動態を可視化することを試みた。まず、キネシンMKLP1とGFPの融合タンパク質(EGFP-MKLP1)をLLC-PK1細胞で安定的に発現する細胞株を樹立した(LLC-PK1はフラットな状態で分裂するので分裂装置の観察が容易である)。さらに、この細胞に、mCherry- $\alpha$ -tubulinの発現ベクターをトランスフェクトし、MKLP1と微小管の動態を同時に観察できる安定発現細胞株を樹立した。蛍光顕微鏡下でライブイメージング観察を行ったところ、MKLP1は、分裂中期まで細胞質に局在するが、染色体分離直後に染色体間の微小管(中央紡錘体および染色体間の星状体微小管)に移行し、その後、中央紡錘体のオーバーラップ域に集積した(図6A)。これは、図2Aのモデルとよく一致しており、EGFP-MKLP1を指標とすることで、微小管が供給する正の分裂シグナルを可視化できることが示された。

分裂後期には、動原体微小管、星状体微小管、中央紡錘体など、多くの微小管構造が存在するのに、なぜ、MKLP1は染色体間の微小管(中央紡錘体と星状体微小管の一部)に特異的に集積するのだろうか?中央紡錘体の微小管は、中央にオーバーラップ域を持つので、これがMKLP1の局在に重要なかもしれない。一方、微小管のオーバーラップ構造を取りえない単極細胞でも、染色体を越えて伸びる微小管先端近傍に分裂溝が誘導されることから(図2C)、オーバーラップ

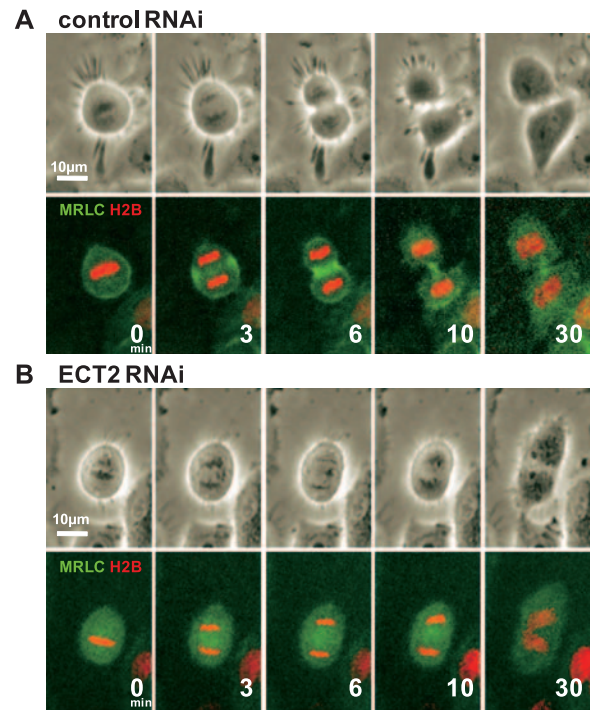


図5 Rho活性化因子ECT2のRNAiによる収縮環形成阻害。(A)コントロールRNAi。染色体分離後、ミオシン調節軽鎖(MRLC: MRLC-EGFP, 緑色)が、染色体間の細胞表層に集積し、細胞がくびれて2つの娘細胞が生じる。(B)ECT2 RNAi。染色体は正常に分離するが、ミオシン調節軽鎖の集積が認められず、細胞もくびれない。赤色(H2B: mCherry-Histone H2B)。数字は分裂後期開始からの時間(分)。

構造はMKLP1の局在には必須でない可能性もある。そこで、筆者らは単極細胞で分裂シグナルの動態を観察することを試みた。EGFP-MKLP1発現細胞をモノスタロール（キネシンEg5阻害剤）処理して星状体の分離を阻害し、単極細胞とした。しかし、このままでは、紡錘体チェックポイントの活性化により細胞周期が進行しない。双極細胞では、分裂後期にCyclin Bが分解されてCdk1の活性が低下する。この状態を模倣するために、単極細胞にCdk1阻害剤を作用させてみたところ、紡錘体チェックポイントを乗り越えて細胞質分裂が誘導され、分裂溝が形成されることがわかった。これを利用して、単極細胞でライブイメージングを行った結果が図6Bである。Cdk1阻害剤処理により、染色体近傍で、MKLP1は染色体を越えて伸びる微小管と結合し、そのプラス端に集積して、周囲の細胞表層に分裂溝が形成された。これは、MKLP1が、微小管のオーバーラッピング構造を認識しているのではなく、染色体を越えて伸びる微小管に何らかのメカニズムで結合することを示している。図2Cのモデルでは、染色体が微小管に分裂シグナルを供給すると仮定しているが、MKLP1は微小管に結合する前は細胞質に局在しているので、染色体にMKLP1の微小管への結合を制御する因子が存在することが推定された。候補のひとつとして考えられたのはAurora Bキナーゼ（Aurora B）である。Aurora Bは分裂期キナーゼのひとつで染色体パッセンジャータンパク質とも呼ばれ、分裂中期には染色体の動原体に局在する。そこで、単極細胞で細胞質分裂を誘導する際に、Cdk1阻害剤と同時にAuroraキナーゼ阻害剤を作用させたところ、MKLP1の微小管への結合が失われるとともに、分裂溝の形成も抑えられた。Aurora BのRNAiでも、同様の結果が得られている。また、正常の双極細胞でも、染色体分離直後にAuroraキナー

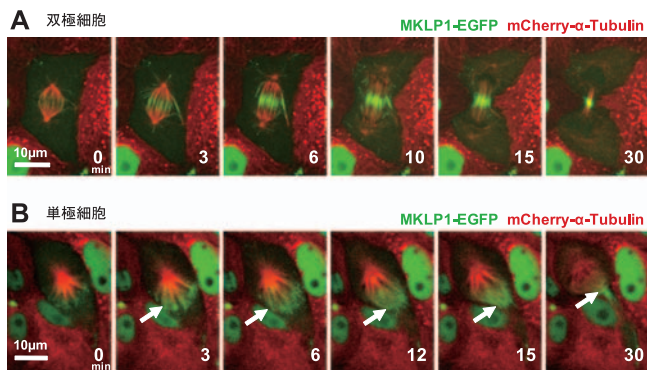


図6 分裂シグナルの可視化。MKLP1-EGFP（緑）およびmCherry- $\alpha$ -tubulin（赤）の融合タンパク質を安定的に発現するLLC-PK1細胞における細胞質分裂のライブイメージング。(A) 双極細胞では、MKLP1は、分裂中期まで細胞質に局在するが、染色体の分離（分裂後期の開始）とともに染色体間の微小管に集積する。(B) 単極細胞では、Cdk1の不活化で分裂後期を誘導すると、MKLP1は、染色体近傍で染色体を越えて伸びる微小管と結合し、微小管先端付近（矢印）に集積する。MKLP1が集積した近傍の細胞表層がくびれ、分裂溝が形成される。数字は分裂後期開始からの時間（分）。

ゼ阻害剤処理を行うと、MKLP1の染色体間の微小管への局在が失われ、分裂溝の形成も阻害されることが観察された。こうしたことから、Aurora Bの活性が、MKLP1の収縮環形成を制御する微小管（双極細胞では染色体間、単極細胞では染色体を越えて伸びる微小管）への結合を制御していることが明らかになった。

## 6. おわりに

長く謎であった微小管が制御する正の分裂シグナルの実体として、Rhoシグナルすなわち、細胞表層の活性型Rhoと微小管上のRho調節因子複合体（MKLP1・MgcRacGAP・ECT2）がその条件をよく満たすことが明らかになった。また、MKLP1などのRhoシグナル分子を指標とすることで、分裂シグナルを可視化でき、このライブイメージング系を用いてAurora Bが、MKLP1の収縮環を誘導する微小管への局在を制御していることも示された。MKLP1は、Aurora Bの基質となることから、Aurora Bによるリン酸化がMKLP1の微小管への結合を直接制御している可能性もある。今後、筆者らの確立した分裂シグナルのライブイメージング系を用いると、微小管がどのように分裂シグナルを細胞表層に伝えるのか解明が進むことが期待される。

本研究の一部は科学研究費補助金を受けて行われた。

## 文 献

- 1) Eggert, U.S., Mitchison, T.J. and Field, C.M.: *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 543–566 (2006)
- 2) Canman, J.C., Cameron, L.A., Maddox, P.S., Straight, A., Tirnauer, J.S., Mitchison, T.J., Fang, G., Kapoor, T.M. and Salmon, E.D.: *Nature*, **424**, 1074–1078 (2003)
- 3) Mabuchi, I., Hamaguchi, Y., Fujimoto, H., Morii, N., Mishima, M. and Narumiya, S.: *Zygote*, **1**, 325–331 (1993)
- 4) Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R.E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K. and Matsuda, M.: *J. Cell Biol.*, **162**, 223–232 (2003)
- 5) Yonemura, S., Hirao-Minakuchi, K. and Nishimura, Y.: *Exp. Cell Res.*, **295**, 300–314 (2004)
- 6) Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J.S. and Miki, T.: *Mol. Biol. Cell*, **17**, 43–55 (2006)
- 7) Nishimura, Y. and Yonemura, S.: *J. Cell Sci.*, **119**, 104–114 (2006)
- 8) Bement, W.M., Benink, H.A. and von Dassow, G.: *J. Cell Biol.*, **170**, 91–101 (2005)
- 9) Prokopenko, S.N., Brumby, A., O’Keefe, L., Prior, L., He, Y., Saint, R. and Bellen, H.J.: *Genes Dev.*, **13**, 2301–2314 (1999)
- 10) Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I. and Miki, T.: *J. Cell Biol.*, **147**, 921–928 (1999)
- 11) Mishima, M., Pavicic, V., Gruneberg, U., Nigg, E.A. and Glotzer, M.: *Nature*, **430**, 908–913 (2004)
- 12) Somers, W.G. and Saint, R.: *Dev. Cell*, **4**, 29–39 (2003)
- 13) Yüce, Ö., Piekny, A. and Glotzer, M.: *J. Cell Biol.*, **170**, 571–582 (2005)
- 14) Zhao, W.M. and Fang, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13158–13163 (2005)