

紡錘体微小管の生成メカニズムに関する微細構造学的解析

Ultrastructural Insights into Augmin-Dependent Microtubule Nucleation in the Spindle

釜崎 とも子^a, 上原 亮太^b

Tomoko Kamasaki and Ryota Uehara

^a名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻細胞内ダイナミクスグループ^b東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

要旨 紡錘体は染色体を正しく二分するための構造である。機能的な紡錘体は、分裂期に微小管が高度に組織化されることにより形成される。これまでに、紡錘体微小管を生成する微小管形成中心として、中心体と染色体が知られてきた。近年、これらに加えて、紡錘体内部の微小管自身も、紡錘体微小管の生成・増幅に重要であることが分かってきた。このような微小管依存的微小管生成過程で中心的な役割を果たすのが“オーグミン複合体”である。我々はごく最近、ヒト紡錘体を電子線トモグラフィーおよび三次元モデリングにより解析した。その結果、オーグミン依存的な新規微細構造“エンドリンク”を介して微小管の枝分かれが形成されていることを突き止め、紡錘体における微小管依存的微小管生成過程に関する重要な知見を得た。

キーワード：有糸分裂紡錘体、微小管、オーグミン、電子線トモグラフィー、三次元モデリング

1. はじめに

細胞分裂は生命を受け継ぎ、維持するために必須の現象である。紡錘体は主に微小管により構成され、染色体を分配して細胞を正しく二分する役割を持つ^{1,2)}。微小管は真核細胞に存在する直径約 25 nm の管状のタンパク質繊維で、そのサブユニットであるチューブリンの重合・脱重合により動的に伸長・短縮する。細胞内では、種々の微小管結合タンパク質によって、このような微小管の動態が制御されている。また、微小管は方向性のある構造で、チューブリンが付加しやすいプラス端と、チューブリンが解離しやすいマイナス端がある。

有糸分裂前中期に入ると、分離した中心体が細胞の両極に移動し、双極性の紡錘体が形成される。1882年、Walther Flemmingによる著書に、当時の光学顕微鏡観察をもとにした紡錘体のスケッチが記載されて以来、細胞分裂に関する研究は顕微鏡技術の進歩に牽引されるかたちで発展してきた。特に透過電子顕微鏡は、これまで40年以上の間、紡錘体の基本構造を知る上で重要な貢献を果たしてきた。

紡錘体は動原体微小管および非動原体微小管と呼ばれる2種類の微小管から構成されている(図1A)。動原体微小管は、両極に位置する中心体から主に伸長しており、姉妹染色体の動原体に結合することにより、姉妹染色体の整列および分配

を司る。非動原体微小管とは、動原体と結合していない微小管のことである。非動原体微小管のうち、両極方向から伸びた微小管が紡錘体の中央で重なり合っているものを極間微小管と呼び、これは紡錘体の双極性を維持するのに重要である。また、中心体から紡錘体の外部に向かって放射状に伸びている星状体微小管は、細胞表層との相互作用を通して、細胞内における紡錘体の位置制御に関わっている。これらの基本構造が、微小管の動態や組織化を制御する様々な因子と共に紡錘体を形成している。

紡錘体は膨大な本数の微小管によって形作られており、ヒト紡錘体では数十万本に達すると想像される。これらの微小管がどこでどのように生成されるか明らかにすることは、紡錘体の形成メカニズムを理解する上で重要な課題である。これまでに、紡錘体微小管は1) 中心体、2) 染色体近傍、3) 紡錘体内部の3種類の微小管形成中心(microtubule organizing center; MTOC)から生成されることが示されている(図1B)。本稿では、まずこれらのMTOCからの微小管生成について概説する。次に、その中でも、筆者らが主に研究を行ってきた、紡錘体内部における微小管依存的微小管生成^{1,3)}のメカニズムに関してさらに詳細に解説する。最後に、紡錘体形成の分子基盤を研究する上で微細構造学的解析が貢献した一例として、我々の最新の研究成果を紹介する。

2. 紡錘体における3つの微小管生成経路

2.1 中心体依存的微小管生成

中心体は、一対の中心小体をコアとして、その周りを、微小管重合核形成因子である γ -チューブリン複合体を含む中心

^a 〒466-0822 愛知県名古屋市千種区不老町
TEL & FAX: 052-788-6174
E-mail: tkamasaki@bio.nagoya-u.ac.jp
2013年6月3日受付

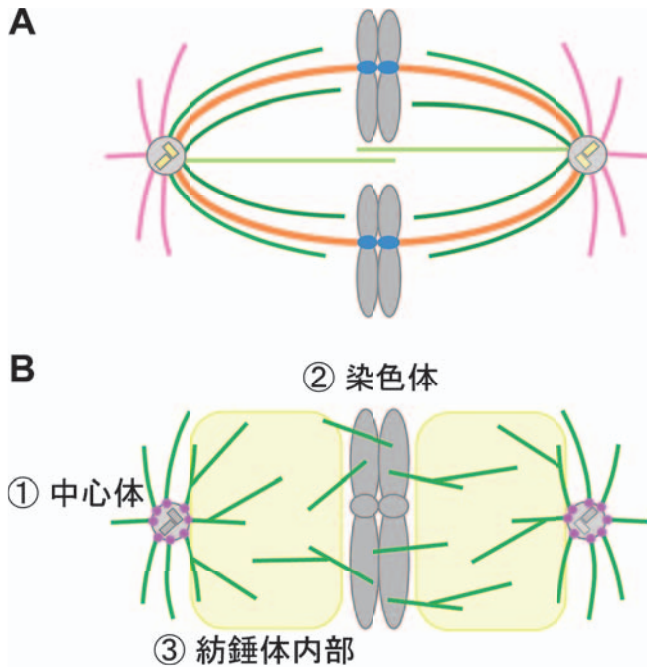


図1 紡錘体の基本構造

(A) 中期紡錘体の模式図。紡錘体は動原体微小管（橙色）と非動原体微小管（緑色、黄緑色）から構成される。非動原体微小管のうち、両極方向からの微小管が紡錘体の中央で重なり合っているものを極間微小管（黄緑色）という。中心小体（黄色）をコアに持つ中心体から細胞表層に向かって星状体微小管（桃色）が伸長している。青色：動原体。(B) 紡錘体形成における微小管形成中心 (microtubule organizing center; MTOC)。3種類のMTOCである①中心体、②染色体、③紡錘体内部からの微小管生成により、紡錘体が形成・維持される。緑色：微小管、桃色： γ -チューブリン、灰色：中心体と染色体、黄色：紡錘体内部。

小体周辺物質が取り囲んだ構造で、細胞周期を通して微小管生成能を有する。分裂期に入ると、中心体の γ -チューブリン局在量が増えて、それに伴い微小管生成能が上昇する。一般的に、中心小体の周囲には、盛んな微小管生成を反映して、生成された微小管の“根元”に相当するマイナス端が多く見られる(図1B①)²⁾。長い間、中心体は紡錘体における唯一のMTOCであると考えられてきた。しかし近年、実験的に中心体を除去した場合にも機能的な紡錘体が形成されることが示され⁴⁾、中心体以外にもMTOCが存在することが分かってきた。

2.2 染色体依存的微小管生成

中心体を持たないカエル卵母細胞の抽出液を用いた実験系を中心に、染色体近傍からの微小管生成(図1B②)が紡錘体形成に寄与することが明らかにされた²⁾。染色体を足場にして活性化する低分子量Gタンパク質やリン酸化酵素が、種々の微小管結合因子を制御し、染色体近傍で局所的に微小管の安定化を促すことで、紡錘体形成に必要な微小管が供給されると考えられている²⁾。

2.3 微小管依存的微小管生成

既存の微小管を足場にして新しい微小管を生み出す、微小管依存的微小管生成は、蛍光顕微鏡を用いた間期（非分裂期）

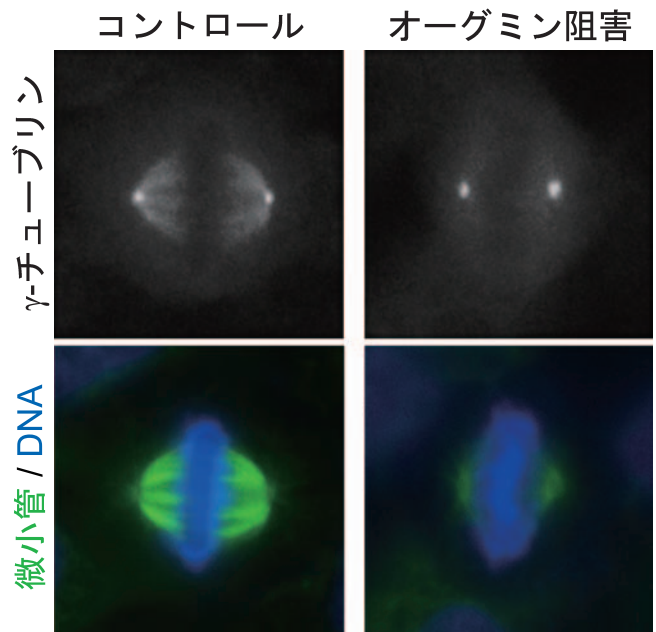


図2 オーグミンをノックダウンした有糸分裂中期のヒト培養細胞コントロール細胞において、 γ -チューブリンは中心体および紡錘体内部に見られた。オーグミンを阻害すると紡錘体内部の γ -チューブリンのみが特異的に消失し、紡錘体内部の微小管が劇的に減少した。

の分裂酵母、タバコ培養細胞、シロイヌナズナ細胞表層の高解像度生細胞観察によって見出されてきた^{5~7)}。これらの細胞では、既存の微小管の側面に重合核形成因子である γ -チューブリンが局在し、そこから新しい微小管が生成される様子が観察された^{5~7)}。また分裂期の動物体細胞では、中心体や染色体近傍以外の紡錘体内部にも γ -チューブリンが局在し、微小管生成が起こっていることから⁸⁾、上記の間期細胞と同様に、微小管依存的微小管生成が行われる可能性が示唆された(図1B③)。しかし、間期細胞の表層に比べて、紡錘体では微小管が密に、かつ複雑に配向するため、蛍光顕微鏡を用いた生細胞観察によって微小管依存的微小管生成を実証することは困難であった。さらに、紡錘体における微小管依存的微小管生成の生理的意義や分子基盤に関しては、全く明らかにされていなかった。

3. 微小管依存的微小管生成の鍵を握るタンパク質複合体“オーグミン”

3.1 オーグミンの発見

近年、ショウジョウバエ培養細胞を用いた全ゲノムRNAiスクリーニングにより、紡錘体における γ -チューブリンの局在化に必要な新規遺伝子Dgtが発見された⁹⁾。Dgt遺伝子の機能をRNAiにより阻害すると、 γ -チューブリンの中心体への局在は保たれるが、紡錘体内部の局在のみが特異的に消失した(図2)。これに伴って、紡錘体内部の微小管が減少したため、Dgt遺伝子は紡錘体内部の微小管生成に寄与することが示された。さらに、細胞内において8つのDgt遺伝子産物が複合体を形成していることが明らかになり、その新規

タンパク質複合体は“オーグミン”と名付けられた¹⁰⁾。この名称は、オーグミンが紡錘体微小管を増幅する機能を持つことから、ラテン語で“増やす”を意味する“augmentare”に由来している。オーグミンは、動植物で広く保存されたタンパク質複合体である^{11~13)}。

3.2 オーグミン依存的微小管生成の紡錘体形成における寄与

ヒト培養細胞では、RNAiによりオーグミンを阻害すると、分裂期の停止や細胞分裂異常といった重い障害が見られた¹¹⁾。これはオーグミンを介した微小管増幅が、それ以外のMTOCからの微小管生成を強く相補して、正常な紡錘体形成および細胞分裂に重要な役割を果たしていることを示している。

動植物細胞に共通して、オーグミンは分裂期前中期から中期にかけて、紡錘体内部の微小管と同様の局在パターンを示す。オーグミン複合体のうち、微小管もしくは γ -チューブリンに結合するサブユニットがそれぞれ同定されていることから^{11,14)}、オーグミンはそれらのサブユニットを介して既存の微小管の側面に結合し、 γ -チューブリンをリクルートすることによって、そこから新しい微小管が生成されると推測される。さらにこれらの相互作用は、Cdk1およびPLK1などの分裂期キナーゼによりリン酸化制御されることが明らかになり、オーグミン依存的微小管形成が細胞内で高度に調節されている可能性が示唆された^{11,15,16)}。

4. オーグミンの機能解明に向けた微細構造学からのアプローチ

上述のような分子・細胞生物学的解析から、オーグミン依存的な微小管の補填が、機能的な紡錘体形成に重要であることが示され、この微小管生成は微小管の分岐形成を通して行われることが推測された。この仮説を検証するためには、蛍光顕微鏡では可視化することが難しいオーグミン依存的微小管が、紡錘体内部のどこに、どのように分布しているかを微細構造レベルで解析する必要がある。そこで我々は、この十数年来、紡錘体を対象とした研究にも応用されている電子線トモグラフィーと三次元モデリング^{17,18)}に注目した。これらの手法により、微小管末端の形態に基づいて決定される細胞内の微小管一本一本の方向性や、微小管末端の正確な配置を明らかにすることができる。しかしこれまで、オーグミンを有する生物種の紡錘体に対してこのような解析が行われたことがなかったため、オーグミン依存的に形成される紡錘体内部の微細構造は明らかでなかった。

ごく最近、我々はヒト紡錘体を対象として、広範囲にわたる電子線トモグラフィーおよび三次元モデリングを行った¹⁹⁾(図3)。未処理(コントロール)もしくはオーグミンをRNAi法によりノックダウンしたヒト培養細胞を加圧凍結・凍結置換固定し、樹脂包埋後、分裂中期の細胞の連続準超薄切片を作製した。このうち、紡錘体の一部を電子線トモグラフィーにより撮影し、さらに連続切片~3枚分のトモグラムを合体させ

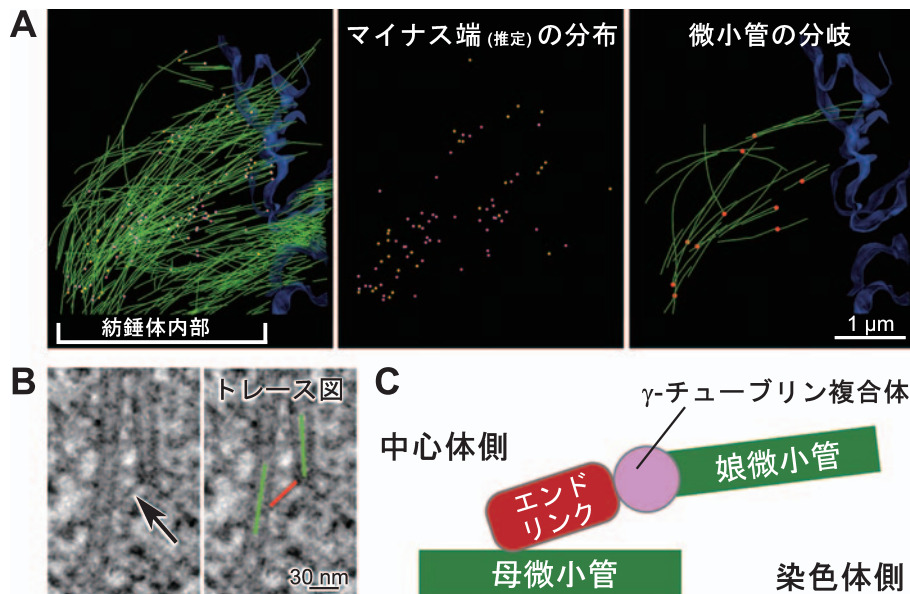


図3 ヒト紡錘体における微小管マイナス端の配置と微小管の分岐

(A) 電子線トモグラフィーおよび三次元モデリングにより得られた、中期紡錘体の部分再構築像。微小管の推定マイナス端(中心体側を向いている末端:桃・黄色の点)は紡錘体内部に分布していた(中央)。キャップされたマイナス端を持つ微小管の一部は、近傍の微小管と分岐を形成していた(右)。緑色:微小管, 桃色の点:キャップされたマイナス端, 黄色の点:中心体側を向いて且つキャップが無い末端(=推定マイナス端), 白色の点:染色体側を向いている末端(=推定プラス端), 赤色の点:紡錘体微小管の分岐点, 青色:染色体の輪郭。中日新聞(2013年7月20日朝刊34面)より転載。(B) オーグミン依存的に形成される棒状エンドリンク。トモグラムから抽出した、厚さ1.4 nmのスライス像(左)とそのトレース像(右)。(C) オーグミン依存的微小管生成のモデル図。

ることにより、解析用の画像（ $\sim 4 \mu\text{m} \times \sim 6 \mu\text{m} \times \sim 0.7 \mu\text{m}$ ）を作製した。これは、紡錘体の約 1.3% のボリュームに相当する。続いて、解析用の画像に含まれる微小管をトレースし、また微小管の末端などの位置を記録することによって三次元モデリングを行い、紡錘体の部分再構築像を作製した。コントロール細胞の中期紡錘体において、微小管のマイナス端は中心小体周辺のみならず紡錘体内部にも分布しており（図 3A）、紡錘体内部にある微小管のマイナス端は、オーグミン依存的に配置されることを見出した¹⁹⁾。さらに、 γ -チューブリン複合体によりキャップされたマイナス端のうち約 9% の末端は、その近傍の微小管壁との間に新規結合構造“エンドリンク”を持つことを発見した。エンドリンクの形態は 2 種類に分類され、長さ約 29 nm の棒状エンドリンク（図 3B）と、キャップされたマイナス端と近傍の微小管壁が直接結合している直接型エンドリンクがあった。これらのエンドリンクで繋がれた紡錘体微小管は $\sim 20^\circ$ の角度をなした枝分かれを形成しており、この分岐構造もまたオーグミン依存的に形成されることが明らかになった。これまで細胞骨格繊維の分岐としては、葉状仮足における Arp2/3 とアクチン繊維による $\sim 70^\circ$ の分岐²⁰⁾や、間期の分裂酵母細胞における $\sim 180^\circ$ （逆平行）の分岐⁵⁾、タバコ培養細胞の表層における $\sim 40^\circ$ の分岐⁶⁾が報告されている。これらの分岐とは異なり、オーグミン依存的に形成される紡錘体微小管の分岐はほぼ平行だった。最近、カエル卵抽出液を用いた試験管内の解析でも、ほぼ平行（ $\sim 20^\circ$ ）に配向した微小管の分岐形成にオーグミンが関与することが示された²¹⁾。この系では、Arp2/3 とアクチン繊維による枝分かれと類似して、微小管が樹状に枝分かれし、扇形に広がった微小管構造が形成された。しかし、我々の行った細胞内の解析結果はこれと異なり、一本の母微小管が、ただ一本の娘微小管を持っているケースが大半であった（図 3A 右, B, C）。このことから、娘微小管は次にそこから新たな微小管が重合し始める前に、母微小管から離れることが推測される。以上の解析から、紡錘体内部の微小管は、オーグミン依存的なエンドリンクを介した微小管の分岐形成によって効率よく増幅していることが強く示唆された。また本研究により、微細構造レベルの遺伝子機能解析の重要性や意義を示すことができたものと思われる。

5. 今後の展望

今後は、精製オーグミンを用いた解析により、オーグミン

依存的エンドリンクがオーグミン自身なのか否かを検証することや、エンドリンクを介した微小管増幅過程を明らかにすることなどが紡錘体における微小管依存的微小管生成過程の理解を大いに助けると考えられる。

謝 辞

今回、この原稿を執筆する機会をくださった名古屋大学理学研究科 生命理学専攻細胞内ダイナミクスグループ 五島剛太教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Meunier, S. and Vernos, I.: *J. Cell Sci.*, **125**, 2805–2814 (2012)
- 2) Walczak, C.E. and Heald, R.: *Int. Rev. Cytol.*, **265**, 111–158 (2008)
- 3) Goshima, G. and Kimura, A.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 44–49 (2010)
- 4) Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R. and Rieder, C.L.: *Curr. Biol.*, **10**, 59–67 (2000)
- 5) Janson, M.E., Setty, T.G., Paoletti, A. and Tran, P.T.: *J. Cell Biol.*, **169**, 297–308 (2005)
- 6) Murata, T. et al.: *Nat. Cell Biol.*, **7**, 961–968 (2005)
- 7) Nakamura, M., Ehrhardt, D.W. and Hashimoto, T.: *Nat. Cell Biol.*, **12**, 1064–1070 (2010)
- 8) Mahoney, N.M., Goshima, G., Douglass, A.D. and Vale, R.D.: *Curr. Biol.*, **16**, 564–569 (2006)
- 9) Goshima, G. et al.: *Science*, **316**, 417–421 (2007)
- 10) Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N. and Vale, R.D.: *J. Cell Biol.*, **181**, 421–429 (2008)
- 11) Uehara, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6998–7003 (2009)
- 12) Nakaoka, Y. et al.: *Plant Cell*, **24**, 1478–1493 (2012)
- 13) Ho, C.M. et al.: *Plant Cell*, **23**, 2606–2618 (2011)
- 14) Wu, G. et al.: *Mol. Cell Biol.*, **28**, 3652–3662 (2008)
- 15) Luders, J., Patel, U.K. and Stearns, T.: *Nat. Cell Biol.*, **8**, 137–147 (2006)
- 16) Johmura, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11446–11451 (2011)
- 17) O’Toole, E.T. et al.: *J. Cell Biol.*, **163**, 451–456 (2003)
- 18) O’Toole, E.T., Winey, M. and McIntosh, J.R.: *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2017–2031 (1999)
- 19) Kamasaki, T. et al.: *J. Cell Biol.*, **202**, 25–33 (2013)
- 20) Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6181–6186 (1998)
- 21) Petry, S., Groen, A.C., Ishihara, K., Mitchison, T.J. and Vale, R.D.: *Cell*, **152**, 768–777 (2013)