

研究報告書

「有糸分裂紡錘体におけるミクロな力学反応の再構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 島本 勇太

1. 研究のねらい

有糸分裂紡錘体は、複製された遺伝情報を正確に娘細胞に分配するために真核生物が備えた染色体の分配装置である。微小管を基礎としたこの細胞骨格装置の異常はがんや遺伝病と関連し、早急かつ本質的な動作原理の解明が必要とされている。近年の網羅的な分子生物学的アプローチによって紡錘体の集合と機能を制御する因子の解析は本質的に完了し、さまざまな分子が同定され、またその機能が推定されてきた。しかしながら、これまでの研究は一分子の生化学・構造解析、もしくは細胞の動態観察に特化したものがほとんどであり、分子レベルの特性からいかにシステムレベルの機能が生み出されているかはほとんど分かっていなかった。紡錘体形成のキープレイヤーとなるのは、微小管ベースの分子モーターである。そこで本研究では、特にキネシン5と呼ばれる有糸分裂に必須のモータータンパク質に注目し、*in vitro* 再構成系による定量的な力学計測と数理モデルによって、この分子がいかに発生力を調節しながら紡錘体の微小管を集団で運動させるかを明らかにすることを目標とした。力学的観点から紡錘体システムの動作原理を理解することで、有糸分裂の論理的な動態制御の基盤を確立することをねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

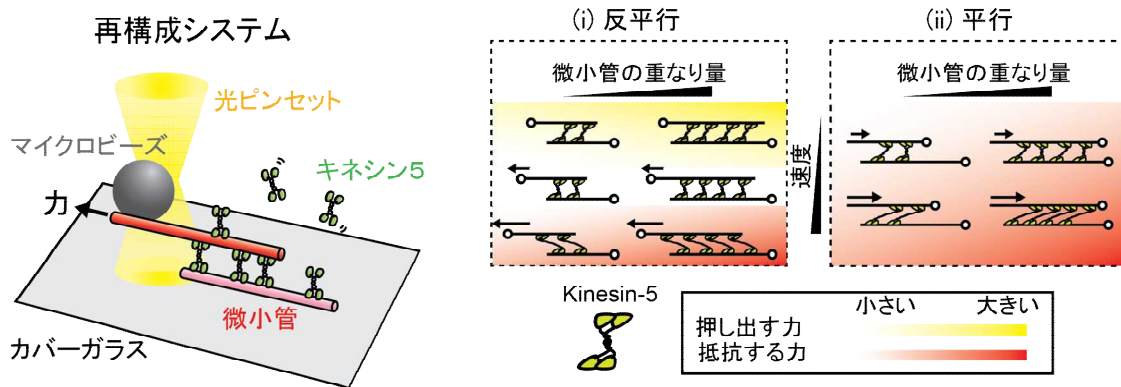
キネシン5は、真核生物に高度に保存された微小管ベースの四量体分子モーターであり、有糸分裂紡錘体の形成に必須である。本研究は、再構成手法と力計測技術、数理解析を用いて、この分子モーターが紡錘体の形態を安定に維持するための本質的な力発生特性を持つことを明らかにした。具体的には、2本の微小管とキネシン5からなる‘小さな紡錘体’が出す力を定量解析できる再構成システムを開発し、微小管の幾何学的配置や運動速度に応じてキネシン5が集団で発生する力を自律的に調節する様子を捉えることに成功した。さらに、これらのデータを数理モデルに統合することによって、紡錘体の構造を安定に維持するために重要と考えられている力の可算性がキネシン5のいかなる分子物性に起因するかを明らかにした。また、これまで知られていなかった、もしくは不明瞭であったキネシン5の新しいいくつかの機能について、*in vitro* 計測によってその存在を実証することができた。以下に成果の詳細を記述する。

(2) 詳細

2-1) キネシン5が2本の微小管を架橋しながら発生する力がいかに制御されているかを明らかにした

光ピンセットと一分子蛍光イメージングを融合した計測系を開発し、2本の微小管とキネシン5から再構成した‘小さな紡錘体’において、キネシン5の集団が細胞骨格の幾何学的情報に依

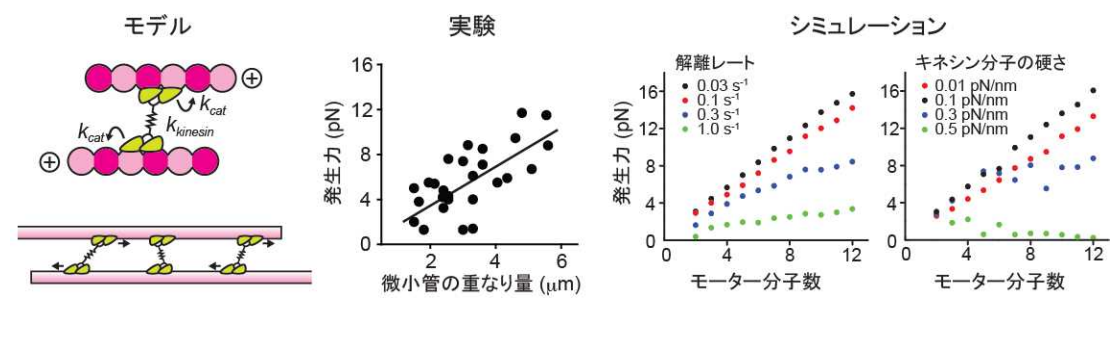
じていかに発生力を調節するかを明らかにした。具体的には、紡錘体の赤道面付近で見られるような反平行の微小管束においては、キネシン5は隣接する微小管の重なり量にスケールされた可算的な力を発生し、紡錘体の極間距離を制御する特性を持つことが明らかとなった。一方、相互作用角度が 180° 異なる平行微小管束では、分子数に依存しない一定の力を出しながらも微小管同士を安定に架橋することがわかった。さらに、隣接する微小管が高速で運動すると、キネシン5はその運動速度に応じた抵抗力を発生する分子ブレーキとして機能することが明らかとなった。すなわち、キネシン5は多機能モーターであり、微小管の幾何学的特徴や運動動態に応じて多分子で出す力の大きさと方向を自律的に調節し、構造コンテキストに応じてその機能を使い分けられることがわかった。下章に述べる数値シミュレーションの結果と合わせて、一連の結果を論文発表した。研究提案の内容は全て達成され、さらにアッセイ系を改良することによって当初は予測していなかった新たな分子機能の発見につながった。



2-2) 微小管運動と重合に対するキネシン5の制御機能を解析するためのアッセイ系を開発した

顕微鏡下で微小管の重合ダイナミクスを再現し、重合活性を保持した微小管上でキネシン5が発生力をいかに制御するかを解析可能なアッセイ系を構築することを目指した。はじめに、確立された方法によって微小管の重合ダイナミクスをインビトロ再構成した。具体的には、観察用フローセルに精製したチューブリンと GTP を共存させ、温度チャンバーを用いて反応系を 32°C まで暖めることで、GMPCPP によって形成した安定な重合核を種としたダイナミックな微小管の重合を実現した。これにキネシン5と ATP を共存させることで重合活性を持った微小管が定常的に運動することが確かめられた。さらに、キネシン5存在下で微小管の重合活性がコントロールと比べて有意に変化することが観察され、この分子モーターが微小管の重合動態を制御する因子としての機能も持ち合わせていることが示唆された。しかしながら、重合・脱重合を繰り返す微小管を光ピンセットで安定に捕捉して発生力を計測することが難しく、従って当初目標としていた上記の‘小さな紡錘体’システムとの融合は実現されなかった。微細加工によって作成した溝に微小管を衝突させ、その曲げの量から力を計測する方法が報告されており、光ピンセットとは異なる方法を使って解決することを考えている。

2-3) 数値シミュレーションによってキネシン5の集団的力発生の制御メカニズムを解析した。キネシン5が多分子で発生する力を自律的に調節する様子を解析可能な数理モデルを作成し、シミュレーションを用いて分子メカニズムを定量的に明らかにした。モデルは、二量体分子モーターに一般的な負荷依存的酵素活性と微小管との親和性(結合・解離速度)を仮定し、これを線形の弾性バネで結合して四量体分子を構成することで、キネシン5の力発生を再現可能なモデルを構築した。これにより、キネシン5が反平行微小管を架橋したときに示す力の加算性は、キネシン5が持つ分子の硬さと微小管への親和性に依存することが示された。さらに、平行・反平行微小管における力学特性の変化は、各キネシン5がそれぞれの発生する力を集団の中で積算、相殺することで実現されていることが示された。計画は順調に進展し、この成果は上述の力計測実験の結果と合わせて論文成果発表を行った。



3. 今後の展開

本研究から、分子モーターキネシン5が、細胞生物学で長年に渡って提唱されてきた紡錘体のサイズ決定メカニズムに必須の力発生機能を持つことが示された。高等生物の初期胚発生において、細胞のサイズは分裂ごとに指数関数的に減少するが、このとき紡錘体のサイズは細胞サイズに正確にスケールされる。発生が進行するにつれて、キネシン5や微小管には翻訳後修飾を初めとしたさまざまな生化学的変化が生じることが知られている。今後は、キネシン5が微小管や細胞質環境の生化学状態をいかに認識して力の出力を調節し、紡錘体の集合と機能に寄与しているかを、開発した再構成系を中心として明らかにしていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究で提案した再構成力計測法の開発については、当初の目的を達成することができ、微小管の幾何学的配置や運動動態を制御しながらキネシン5の発生力を定量的に解析する方法を確立することができた。この方法を用いて得られた結果の一つは、紡錘体研究において長年提唱されてきたモデルを実証したものであり、細胞生物学的にも意義のある研究となったと考えている。さらに当初の計画からアッセイ系に改良を加えることでキネシン5の新たな微小管運動制御機能を発見し、生物学に対する示唆を与えることができた。一方で、キネシン5が微小管の重合動態に与える効果については、予備データは得ていたものの、論文発表には至らなかった。さらに、鍵となる結果が他のグループに先行して報告された。研究機関の移動

によりアッセイ系の再セットアップに時間を費やしたことが一因と考えている。今後は、論文をまとめるタイミングや情報収集の方法も含めて、より包括的に研究を進めていきたい。

(2) 研究総括評価

真核生物の微小管にある四量体分子モーター、キネシン5が隣接する微小管の間で発生する力を計測可能なインビトロ再構成システムを独自に開発し、これを用いて、微小管細胞骨格の幾何学的特徴に応じてキネシン5が多分子で協調的にその発生力を調節することを明らかにしたことを、高く評価します。この調節は、キネシン5が持つ分子の最適な弾性的硬さと微小管への親和性によって実現されていることを、初めて示唆しました。これらの成果を、一連の論文で発表し、完成度の高いさきがけ研究に仕上げられた。

この功績により平成27年度文部科学大臣表彰若手科学者賞、受賞し、招待講演も多く行われ、研究活動が活発に進められていることを評価します。

今後は、細胞分裂の全プロセスについて、同じ志をもつ研究者ネットワークをリードして、タンパク質分子の力学的な解析がなされることを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shimamoto, Y., Forth, S., Kapoor, T. M. Measuring pushing and braking forces generated by ensembles of kinesin-5 crosslinking two microtubules. *Dev Cell* 34, 669–681 (2015)
2. 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. *Biophysical Journal*;106(3):735–40. (2014)
3. 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)

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 受賞

平成27年度文部科学大臣表彰若手科学者賞

受賞テーマ:「有糸分裂紡錘体の集合と機能を制御する細胞内物理化学の研究」

2. 招待講演

1) Yuta Shimamoto. “Motor protein mechanics and spindle size regulation” Japanese Society for Quantitative Biology (Japan Q-Bio Week), NIG International Symposium (Mishima symposium), Mishima, Japan. 2016年1月12日

2) 島本勇太 「有糸分裂紡錘体の自己組織化メカニズム」 生命動態システム科学四拠

点合同シンポジウム:生命動態の分子メカニズムと数理 京都大学 2015年3月16日

3) 島本勇太 「力計測から見えてきた分裂期紡錘体の可塑性と安定性」 自然科学研究機構プロジェクト合同シンポジウム「機能生命科学における揺らぎと決定」、生理学研究所明大寺キャンパス 2015年3月11日

4) 島本勇太 「力計測から見えて来た紡錘体の可塑性と安定性」 理研和光キャンパス 2015年3月4日

5) Yuta Shimamoto, “Examining the micromechanical properties of the vertebrate metaphase spindle” The 38th Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan. 2014年11月25日

6) 島本勇太 「紡錘体のマイクロメカニクス計測」 第90回日本生理学大会 タワーホール船堀 2013年3月27日

3. 学会発表

1) Yuta Shimamoto, Scott Forth and Tarun M. Kapoor. Examining mitotic functions of bipolar kinesin Eg5 in a reconstituted minimal microtubule network. The 52nd Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, Sapporo, Japan. 2014年9月25日

2) Yuta Shimamoto, Yusuke Maeda, Albert Libchaber, Shin'ichi, and Tarun M. Kapoor. Insights into the micromechanical properties of the metaphase spindle. Biophysical Society 50th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 2013年2月5日

4. 著作物

1) 島本勇太 「モータータンパク質 kinesin-5 が隣接する微小管を架橋しながら集団で発生する力の制御」 ライフサイエンス新着論文レビュー(オンラインジャーナル)

2) 石渡信一、福田紀男、島本勇太 「横紋筋のメカノバイオフィジックス:マクロからマイクロへ」メカノバイオロジー 曾我部正博編 第12章 p.159-171 化学同人

3) 島本勇太、高木潤 「分裂期紡錘体のマイクロメカニクス」生物物理 55, p.255-258

4) 島本勇太 「紡錘体の力学特性」細胞工学、細胞分裂131年目の真実:分子から動態へ 杉本亜砂子編 Vol. 32, p.275-279 学研メディカル秀潤社