

研究報告書

「分裂様式の操作による細胞運命の制御と個体構築原理の追究」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 清光 智美

1. 研究のねらい

複雑で神秘的な多細胞体も、元を辿れば1つの受精卵が分裂を繰り返し、秩序立って細胞の数と種類を増やすことで形成されている。従って、多細胞体形成の基礎を理解するためには、細胞コピーを増やす「対称分裂」と、細胞種を増やす「非対称分裂」のそれぞれの仕組みや意義、両者の変換メカニズムを正確に理解することが必要となる。

これまでの研究から、細胞分裂の対称性・非対称性制御の鍵は、染色体分配装置である紡錘体の配置制御にあることが明らかとなってきた。なぜなら、紡錘体は細胞分裂面を決めるシグナルを発信するため、紡錘体の向きや細胞内配置が、細胞運命を担う極性因子の分配や娘細胞サイズの対称性・非対称性を規定し、細胞運命の制御に直結するからである。私たちはこれまで、対称分裂するヒト培養細胞において、紡錘体の配置は、主に細胞皮層ダイニンによる紡錘体の牽引力と、細胞皮層ミオシンによる細胞膜の収縮力によって制御されることを明らかにしてきた。またその過程において、これらの制御因子群の局所的な局在制御こそが、紡錘体配置制御の本質を担うとの着想に至った。

よって、本研究では、まず近年開発された光遺伝学ツールを用いて、ダイニンやミオシン制御因子群の分裂期での局所的な局在操作を行い、人為的に機能的なダイニンやミオシン複合体を細胞内で再構成することによって、それらの機能の十分性や、紡錘体配置制御における役割を理解することを目的とした。また、非侵襲的に任意の1細胞の紡錘体の向きや配置を自在に操作する技術を確認できれば、それを組織や個体中の1細胞にも応用することで、生理的環境下における紡錘体配置の制御メカニズムやその意義の理解にも貢献できると考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

局所光照射と高精細な生細胞観察が可能な顕微鏡システムを整備し、光照射依存的なタンパク-タンパク相互作用の誘導系 iLID(improved Light-induced dimer, Guntas et al., PNAS 2015)を改良することによって、分裂期の細胞皮層で自在な局在操作を可能にした。また iLID とCRISPR/Cas9によるゲノム編集を融合し、ダイニン制御因子の細胞皮層局在を光操作することで、分裂期の細胞で紡錘体の向きや位置を操作することに成功した。さらにダイニンのみならず細胞皮層ミオシンの制御因子の局在操作にも成功し、紡錘体配置制御に間接的に関与する細胞膜の収縮力を一部操作できるようになった。また同領域の鐘巻将人研究者との共同研究により、効率的なゲノム編集技術やダイニン複合体のオーキシン誘導デグロンヒト細胞株を確立することができ、ヒト細胞で任意の内在性遺伝子産物の可視化、分解、操作を自在にできる道が拓けた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「分裂期における局所的局在操作ツールの最適化と顕微鏡システムの構築」

2009 年頃から光照射依存的なタンパク-タンパク相互作用誘導ツールが相次いで報告されている。4種類の光操作ツールを検討した結果、CRY2-CIBN(Kennedy et al., Nat Methods 2010) ^{研究成果リスト¹⁰}、および iLID(improved Light-induced dimer, Guntas et al., PNAS 2015)が分裂期のヒト培養細胞でよく機能することを確認した。その後最適条件を検討する中で、iLID がより条件に合うことを見出し、以降の実験では iLID をベースに光操作の実験を行った。また局所照射可能な顕微鏡装置として Mosaic3 (Andor 社)を導入した。さらにタイムラプス撮影中に任意の場所を任意のタイミングで光照射できるように Metamorph ソフトウェア(Molecular devices 社)のマクロを構築した。この顕微鏡システムを用いて、分裂期の細胞皮層を局所的に照射すると、細胞質にある mCherry タンパク質(光操作タグ付き)を光照射した細胞皮層領域に局在化させることに成功した。また様々な照射パターン(1点照射、2点同時照射、多点経時間照射、1点経時照射)を試すことにより、細胞皮層での非対称局在化、対称局在化、回転操作、持続的局在化にも成功した ^{研究成果リスト^{5,6,7}}。

研究テーマ B 「分裂期における細胞皮層ダイニン制御因子の局在操作」

4.1G/R タンパク質に保存されたカルボキシル末端ドメイン(CTD)は、分裂期後期においてダイニンの細胞皮層局在化に十分である(Kiyomitsu and Cheeseman Cell 2013) ^{研究成果リスト³}。そこで、まずこのドメインと光操作タグの融合タンパク質を恒常的に発現する培養細胞を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて樹立した。この細胞株と上記成果 1 で確立した照射法を用いて、分裂期後期の細胞皮層において光操作を行ったところ、4.1G-CTD タンパク質の非対称局在化を実現でき、紡錘体配置の偏りが誘導される様子が観察された。しかし紡錘体の偏りにもかかわらず、極端な不等分裂(異なるサイズの娘細胞に分裂)には至らなかった。その原因を解析したところ、紡錘体に近い細胞膜領域が伸長し、細胞境界が拡張されるために、操作による紡錘体配置の偏りが部分的に抑圧されることを見出した。この現象は等分裂細胞が有する紡錘体中央配置化のバックアップ機構として知られる現象であり ^{研究成果リスト^{1,3}}、ヒト培養細胞のように比較的小さい等分裂細胞が不等分裂に移行するためには、細胞皮層ダイニンの非対称化のみでは不十分であり、細胞膜の伸長を抑圧するその他の要素が必要となることが示唆された ^{研究成果リスト^{5,6,7}}。一方、もう一つのダイニンの細胞皮層レセプター(Gai-LGN-NuMA 経路)の光操作を分裂期中期の細胞で行ったところ、紡錘体の配置や方向を操作することに成功した。

研究テーマ C 「分裂期における細胞皮層ミオシン制御因子の局在操作」

上記の理由により、極端な娘細胞サイズの非対称性を誘導するには、ダイニンによる紡錘体の牽引のみならず、ミオシンによる細胞膜の伸長も同時に制御する必要が考えられた。よって、次に細胞皮層ミオシンに依存した細胞膜の収縮力を光操作することにも挑戦した。細胞皮層ミオシンの収縮力を制御する経路の最上流因子として RhoA の GEF である Ect2 が知ら

れている。そこで光操作タグを融合した Ect2 を発現できる細胞株を樹立し、分裂期の細胞において光操作を行った。分裂期中期においては局所的な光照射に依存して、Ect2 の非対称な局在化が誘導され、その後細胞膜の収縮と細胞の変形が観察された。一方、分裂期後期の極側の細胞皮層領域に Ect2 を局在化させると、それほど顕著な収縮はみられなかったが、わずかに不等なサイズの娘細胞が誘導される様子が観察された。これらの結果から、分裂期中期と後期の細胞皮層ではミオシン依存的な収縮力の発生機構に違いがあること、また等分裂するヒト細胞においてはミオシン制御因子の非対称化のみでも極端な不等分裂を誘導するには不十分であることが示唆された^{研究成果リスト 5,6,7}。

研究テーマ D 「分裂期における内在性ダイニンの可視化と分解操作」(鐘巻将人研究者との共同研究)

光遺伝学的手法以外の方法を用いて分裂様式の操作を行うため、同領域の鐘巻将人研究者と共同してオーキシン誘導デグロン(AID)法の検討を行った。手始めに、ダイニンのモーター活性を担うダイニン重鎖(DHC, 約 500kDa)遺伝子に mClover(蛍光タンパク質)と mAID タグ(分解誘導タグ)の融合遺伝子をノックインし、内在性ダイニンの可視化とオーキシン依存的分解操作を行った。この方法を用いることによって、初めて内在性ヒトダイニンの細胞内局在を生細胞で可視化することに成功し、またオーキシン添加依存的に DHC タンパク質を分解することにも成功した(Natsume et al., Cell Reports 2016)^{研究成果リスト 2,4,5,6}。この方法では内在性ダイニンのタンパク質量を mClover の蛍光としてモニターしつつ、細胞の表現型を解析できるため、これまでの siRNA による mRNA の発現抑制実験よりもより確実な表現型解析を実現できる。またオーキシンをパルス的に添加することにより、一時的なタンパク質分解を誘導できるため、ダイニンレセプターである LGN と 4.1G/R タンパク質を標的にすれば、これまでの siRNA に依存した方法(Kiyomitsu and Cheeseman Cell 2013)とは異なる方法で不等分裂を誘導できると考えられる。またヒト培養細胞において、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集と蛍光タンパク質、オーキシン誘導デグロン法、あるいは光操作技術を組み合わせることによって、任意のヒト内在性遺伝子産物の可視化、分解、操作を自在にできる道が拓けた。

3. 今後の展開

本研究により、分裂期のヒト培養細胞において、光操作技術を任意のタンパク質に適用する基本技術を確立することができた。また細胞皮層のダイニン制御因子群の局在を時空間的に自在に操作することによって、紡錘体配置の操作を行う目処が立った。しかし、娘細胞サイズを自在に操作する段階にはまだ至っていない。本研究成果を元に、ダイニンやミオシン制御因子の同時局在操作や操作条件の最適化を行うことによって、娘細胞サイズを自在に操作する技術の確立につなげたい。本研究で用いた光操作技術は組織や個体にも応用可能なため、一旦最適な技術が確立できれば、それを対称分裂するガン細胞などの培養細胞のみならず、自己複製する幹細胞やマウス初期胚、細胞極性を持つ組織中の細胞等に適用し、より生理的環境下における対称分裂の基本原則とその意義の理解に貢献できると考えている。

またダイニンに代表されるように、紡錘体の形成や配置に関与する因子の多くは、細胞周期を通じて様々な異なる機能を担っている。鐘巻将人研究者が開発されたオーキシン誘導デグロン(AID)法とゲノム編集を組み合わせると、急速(半減期約 20 分)に内在性タンパク質そのものを時期特異的に分解できるため、細胞周期のある時期特有の機能をより正確に解析することができる。例えば、ダイニンを分裂期中期特異的に分解することによって、分裂期中期の紡錘体極でのダイニンの機能を明らかにすることや、間期で核-細胞質輸送に関与する Ran 関連因子群の分裂期機能を理解することが期待できる。また AID 法は一時的な標的タンパク質の分解操作が可能のため、ダイニンの表層レセプター(LGN, 4.1G/R)を一時的に分解できれば、従来の RNAi 法とは異なる方法で不等分裂を誘導でき、娘細胞サイズ維持の仕組みや生理的意義の多角的な理解にも貢献できると考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

0から顕微鏡装置のセットアップや光操作、ゲノム編集に取り組んだため、操作ツール、操作条件の最適化に予想以上に時間がかかってしまったが、昨年(2015年)公開されたツール(iLID)の素早い導入や改良、同領域の鐘巻将人研究者との共同研究など、最新技術や領域内での協力を最大限に活かすことにより、最終的に分裂期細胞で標的タンパク質の局在を自在と言ってよいレベルまで操作することができた。また細胞皮層のダイニンやミオシン複合体の光操作を実現し、紡錘体の方向や配置の操作を通じて、細胞分裂の対称性・非対称性の操作に目処が立ったこともある程度評価できる。個体レベルの解析は研究期間中に達成はできなかったが、本成果は個体への応用も可能な技術であるため、最適化した技術を今後速やかに応用することで、効率的に研究を展開して行きたい。

これまで分子モーター複合体を分裂期の細胞皮層で再構成し、紡錘体のような巨大な細胞内構造物の配置を操作した例はない。操作分子の機能解析や、操作後の細胞の表現型解析を進めることで、これまでとは異なる知見や、新奇の細胞特性の発見につながることを期待できる。また本研究が焦点にしている、任意の内在性遺伝子産物の可視化・分解・操作は極めて汎用性が高い基礎技術であるため、その他の研究分野や技術開発メーカーへの波及効果も期待できる。さらに、細胞分裂の対称性・非対称性の制御の破綻は、初期発生の異常や神経疾患等との関連が示唆されているため(Yu et al., Nat Commun 2014, Noatynska et al., J Cell Biol. 2012)、今後の進展により、原因不明とされている初期発生の異常や神経疾患の対処法の開発などにも貢献できる可能性も考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

光照射依存的なタンパク-タンパク相互作用の誘導系 iLID を改良することによって、分裂期の細胞皮層で自在な局在操作を可能にした。また iLID と CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を融合し、ダイニン制御因子の細胞皮層局在を光操作することで、分裂期の細胞で紡錘体の向きや位置を操作することに成功した。さらにダイニンのみならず細胞皮層ミオシンの制御因子の

局在操作にも成功し、紡錘体配置制御に間接的に関与する細胞膜の収縮力を一部操作できるようになった。このように周辺技術を駆使して、細胞の局在操作を着実に実証してきた功績は、大いに評価される。予定外の成果として、同領域の鐘巻将人研究者との共同研究により、効率的なゲノム編集技術やダイニン複合体のオーキシン誘導デグロンヒト細胞株を確立することができたことは、さきがけ研究ならではの大きな成果と注目したい。今回開発した技術を使って、さらに何を解析していくのか、興味が尽きない。今後の展開に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Kiyomitsu T. Analyzing Spindle Positioning Dynamics in Cultured Cells. <i>Methods in Molecular Biology</i> 誌. 2016 年, 1413 号, 239-252 頁 |
| 2. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, and Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. <i>Cell Reports</i> 誌. 2016 年, 15 巻 1 号, 210-218 頁 |
| 3. Kiyomitsu T. Mechanisms of daughter cell-size control during cell division. <i>Trends in Cell Biology</i> 誌. 2015 年, 25 巻 5 号, 286-295 頁 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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)

【学会発表】

1. 仁科桃子、夏目豊彰、鐘巻将人、清光智美「ヒト細胞質ダイニン複合体による紡錘体二極構造の維持」第 39 回日本分子生物学会年会 横浜 2016.11.30
2. Kiyomitsu T, “Manipulation of cytoplasmic dynein during mitosis” 第 54 回生物物理学学会年会 つくば 2016.11.25
3. 清光智美、「デグロン及び光操作による細胞質ダイニンの分裂期局所機能の解析」、第 6 回分子モーター討論会 大阪 2016.7.25
4. 清光智美、「細胞が等分裂する仕組みとその意義の理解に向けて」、第 24 回日本バイオイメージング学会 東京 2015.9.27
5. Kiyomitsu T, “Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase“, Dynein 2013 International Workshop 神戸 2013.10.31

【受賞】

1. 平成28年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 2016.4.20

【著作物】

1. 清光智美「分裂様式の操作による細胞運命制御」*生体の科学* 65(5).10 月号 特集 生命動態システム