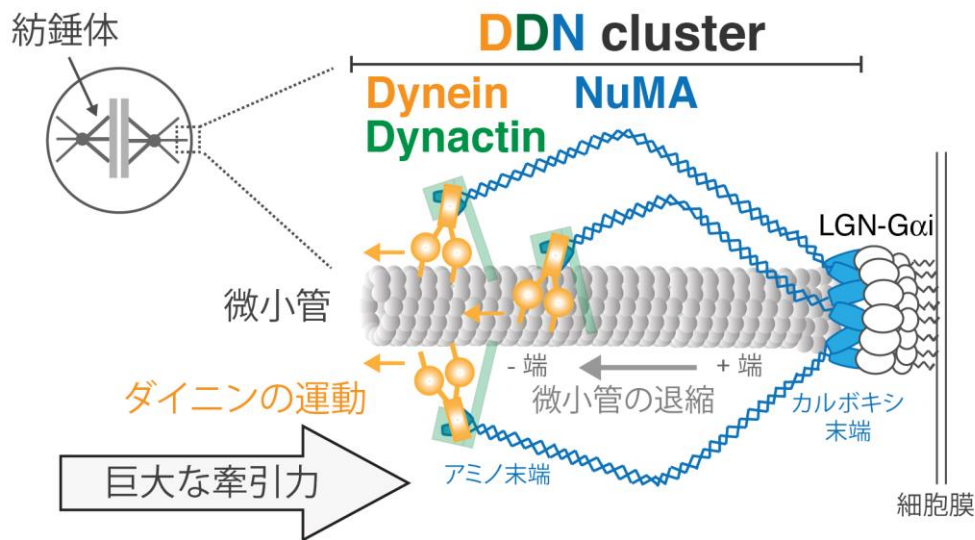


## 紡錘体牽引装置のコア構造(DDN cluster)モデル



## 世界初！光で細胞分裂装置の操作に成功 ～体作りに重要な細胞分裂の仕組みの理解促進に期待～

このたび、名古屋大学大学院理学研究科の 清光 智美 助教の研究グループは、情報・システム研究機構国立遺伝学研究所の 鐘巻 将人 教授、夏目 豊彰 助教との共同研究で、光を用いてヒトの内在性タンパク質の局在を自在に操作する技術を開発し、細胞分裂装置(紡錘体<sup>1)</sup>)の配置を光で操作することに世界で初めて成功しました。紡錘体の配置は細胞分裂の方向や娘細胞のサイズを決めるため、母細胞が2つの同じ娘細胞に分裂するのか、それとも2つの異なる娘細胞に分裂するのかを決める重要な役割を担います。従って、紡錘体を適切に配置する仕組みは、私たちの体を作る基礎となりますが、どのようにして紡錘体を動かす力が生み出されるのかは、理解されていませんでした。私たちは、今回新たに開発した技術を用いて複数の候補因子の局在を操作したところ、紡錘体牽引力の生成に十分なヒト遺伝子を同定することに成功しました。この発見は、細胞分裂の対称性・非対称性制御の仕組みを理解する上で極めて重要な手がかりとなり、細胞分裂が私たちの体作りに果たす役割や、その破綻と疾患との関連について理解が進むことが期待されます。

この研究成果は、平成30年5月31日(日本時間)に英国科学雑誌「eLife」オンライン版に掲載されました。

なお、この研究は、科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 さきがけ、ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム(HFSP)、文部科学省科学研究費助成事業等の支援のもとで行われたものです。

## 【ポイント】

- 光を用いて、ヒトの内在性タンパク質の局在を自在に操作する技術を開発した。
- 紡錘体牽引装置の構成因子である NuMA<sup>2)</sup>の細胞膜への局在操作が、紡錘体牽引力を生み出すのに十分であることを実証した。
- NuMA は分子モーターであるダイニン(Dynein)<sup>3)</sup>や、その活性化因子のダイナクチン(Dynactin)<sup>4)</sup>と集合体を形成することで、機能的な牽引力を生み出すことを発見した。
- 本研究で同定した紡錘体牽引力の生成に必要なかつ十分な分子複合体を、Dynein-Dynactin-NuMA (DDN) cluster と命名した。

## 【研究背景と内容】

私たちヒトの成人の体は約 40 兆個、200 種類以上の細胞から構成されると考えられています。しかし、たった 1 つの細胞(受精卵)に端を発するわけですから、発生過程や、その後の維持の間、細胞は分裂を繰り返すことによって、その数と種類を適切に増やさなければなりません。体細胞分裂は大きく分けて 2 つに分類されます。1 つは、2 つの等しい娘細胞を生む対称分裂で、もう 1 つは、2 つの異なる娘細胞を生む非対称分裂です。対称分裂は皮膚の表皮など均質な細胞コピー集団を増やすために必要ですし、非対称分裂は異なる種類の細胞を生むために必要です。これまでの研究から、これらの細胞分裂の様式は分裂装置である紡錘体<sup>4)</sup>の配置(位置や向き)によって制御されることが明らかとなってきました(図 1)。また、その破綻はガンや発生異常など、様々な疾患にも関連すると考えられています。

この紡錘体の細胞内配置制御で鍵となるのが、分裂期の細胞膜上に形成される紡錘体牽引装置です(図 1、黄色)。特に、分子モーターであるダイニン(Dynein)は牽引装置の主要因子であり、紡錘体の極から伸びた微小管の先端をとらえ、それを引っ張ることで紡錘体牽引力を生み出すと考えられています。これまでの私たちやその他のグループの研究結果から、ダイニンはダイナクチン(Dynactin)と結合し、NuMA-LGN-Gai という膜結合のタンパク複合体によって細胞膜に局在化されることが明らかとなりました。しかし、細胞膜上を拡散しがちな紡錘体牽引装置が、どのようにダイナミックに伸縮する微小管の先端を効率良くとらえ、機能的な紡錘体牽引力を生み出しているのか、その分子的な仕組みはほとんど理解されていませんでした。

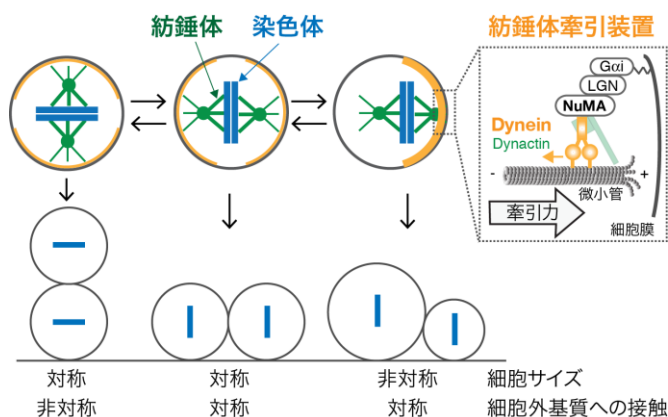


図 1 細胞分裂の模式図

紡錘体(緑)は微小管から構成される紡錘型の構造体であり、染色体の分配、および細胞分裂面の位置を決める役割を担う。また紡錘体の位置や方向は、細胞膜上に形成される紡錘体牽引装置(黄色)によって制御される。紡錘体の配置制御は、娘細胞のサイズや位置の対称性・非対称性の制御につながるため、娘細胞の運命制御に重要となる。

## 【光を用いて、ヒト内在性タンパク質の局在を自在に操作する技術の開発】

清光助教らのグループは、光誘導式ヘテロ 2 量体形成ツール(iLID)<sup>5)</sup>と CRISPR/Cas9<sup>6)</sup>によるゲノム編集技術を組み合わせることにより、任意のヒトの内在性タンパク質の局在を自在に操作する技術の開発に成功しました。さらに、この技術を内在性の牽引装置の除去と組み合わせることにより、人為的に紡錘体牽引装置の一部を細胞膜上に再構成し、それらの紡錘体牽引能力を評価できる実験系を開発しました(図 2A)。その結果、NuMA の局在操作は紡錘体の牽引に十分であること、しかし、ダイニンの局在操作は紡錘体の牽引に十分ではないことが分かりました。

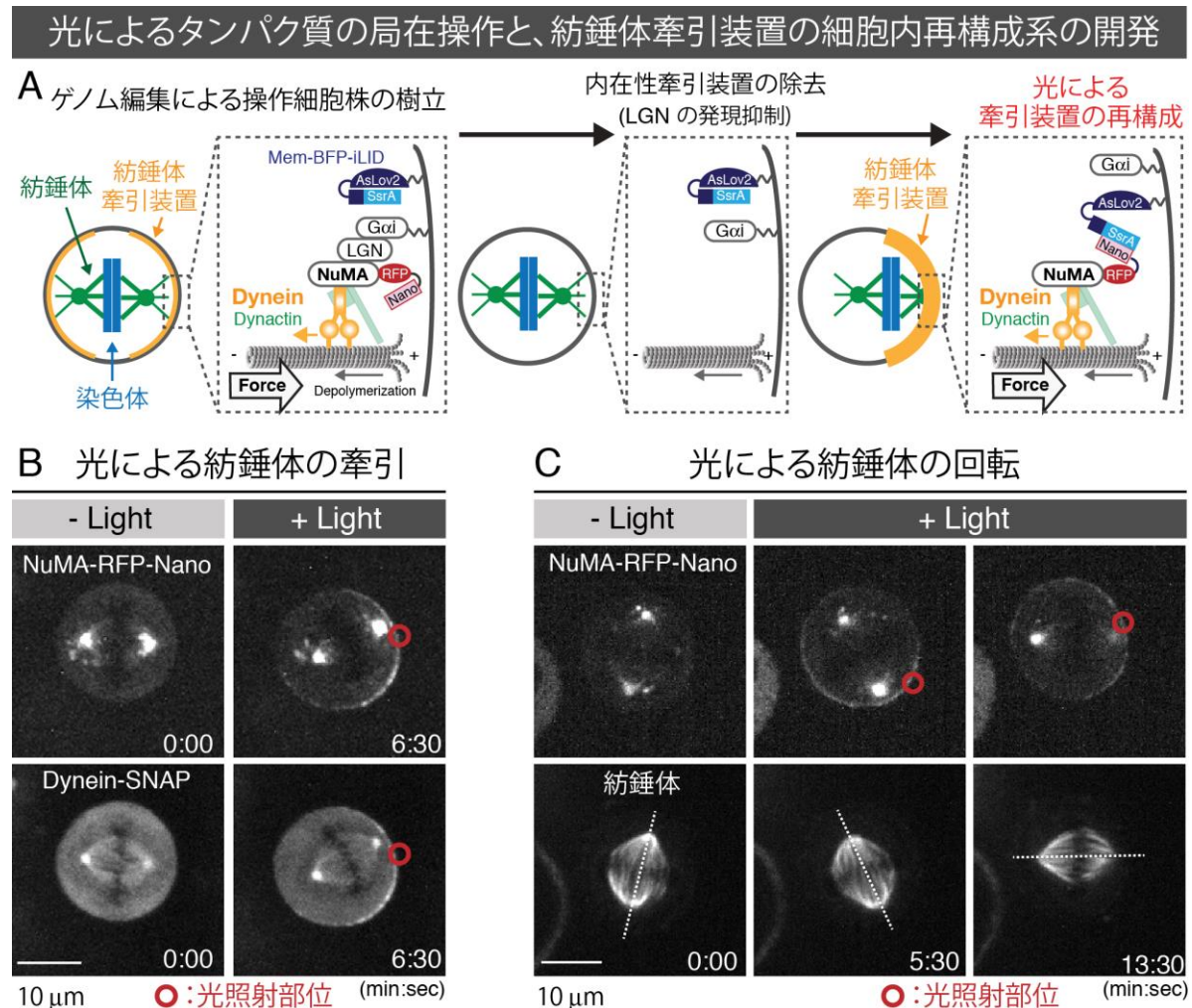


図 2 光によるタンパク質の局在操作と紡錘体配置の光操作

(A) 光によるヒト内在性タンパク質の局在操作の模式図。まず膜局在型の iLID(Mem-BFP-iLID)、RFP-Nano を融合した NuMA(NuMA-RFP-Nano)の 2 つを発現する細胞株を樹立した。RNA 干渉法(RNAi)<sup>7)</sup>をもちいて NuMA の上流因子 LGN を発現抑制した後、赤丸領域を光照射することによって、NuMA-RFP-Nano を細胞膜へと局在操作した。光照射によって iLID は構造を変え、Nano と結合するため、NuMA-RFP-Nano を膜上へと局在化できる。(B) 光による紡錘体の牽引の様子。上段; NuMA-RFP-Nano 像。下段; SNAP タグを融合した Dynein-SNAP 像。赤丸で記した領域に光を照射すると、NuMA およびダイニンはその領域近くの細胞膜に局在化し、その後、その方向に紡錘体が引き寄せられていく。(C) 光による紡錘体の回転操作の様子。光照射部位を回転させると、NuMA 局在の回転に伴い、紡錘体が回転する様子が観察された。上段: NuMA-RFP-Nano 像。下段: 紡錘体像。点線は紡錘体の長軸を表す。



### 【NuMA は 4 つの異なる機能をもち、紡錘体牽引力生成の土台として機能する】

NuMA の局在操作が紡錘体牽引力の生成に十分であることを踏まえ、次に NuMA の部分断片を発現・局在操作し、NuMA のどの領域が力生成に必要なのかを検討しました。これまでの研究から、NuMA は 2 分子が結合し、図 3 に示すように、細長い全長約 200 nm の棒状構造をもつことが明らかとなっていました(図 3)。各種 NuMA 変異体の局在を光で操作し、それらの紡錘体牽引能を調べた結果、まず、NuMA が頭部(アミノ末端)領域で、ダイニン、ダイナクチンを局在化させることが、力生成に必要であることを明らかにしました(図 3①)。また、NuMA の中央領域の長い棒状構造(図 3②)や、尾部(カルボキシル末端)領域での微小管結合能(図 3③)も力生成に必要であることも実証しました。そして、最後に NuMA が自己集合能(図 3④)を持つことを発見し、その自己集合が牽引力生成に必要であることも明らかにしました。

### 牽引力の生成に必要な、NuMA の 4 つの機能

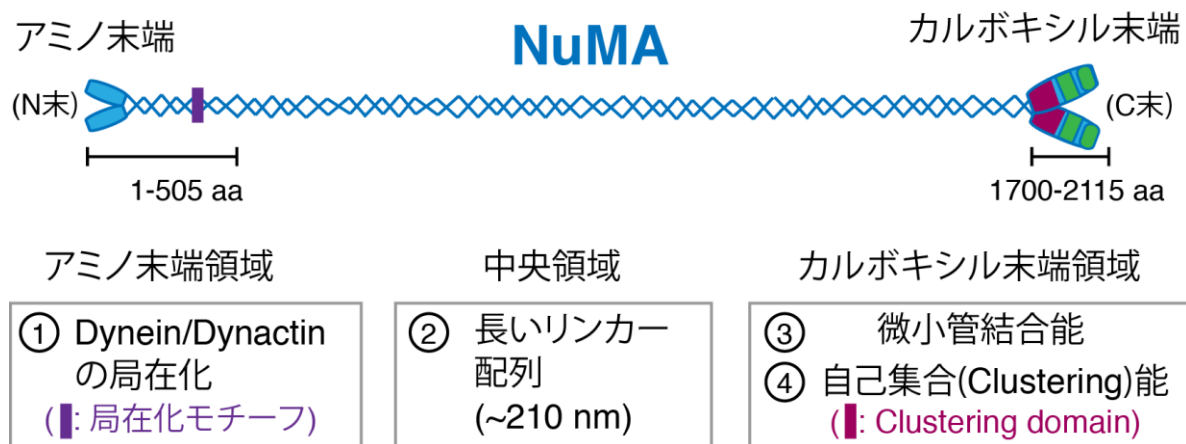


図 3 NuMA の機能領域

NuMA は 4 つの機能領域をもち、その全てが紡錘体牽引力の生成に必要である。

### 【Dynein-Dynactin-NuMA cluster は紡錘体牽引の中枢装置として機能する】

私たちが開発した光操作による細胞内再構成系の結果から、NuMA は自己集合し、かつ、長い腕のような構造の先端でダイニン、ダイナクチンを局在化させることが、紡錘体牽引力の生成に必要かつ十分あることがわかってきました。では、NuMA はどのような高次構造を形成し、動的な微小管末端を捕捉し、牽引することができるのでしょうか。

他のグループの研究成果から、NuMA は試験管内において自己集合し、環状構造をとることが明らかとなっています。また、NuMA の微小管結合領域は縮む微小管の末端にも結合できることも示されていました。そこで、これらの知見を統合し、私たちは Dynein-Dynactin-NuMA の集合体が、まるで人の手のような形を作り、紡錘体を引っ張る力を生み出しているというモデルを提唱しました(図 4)。

## 紡錘体牽引装置のコア構造(DDN cluster)モデル

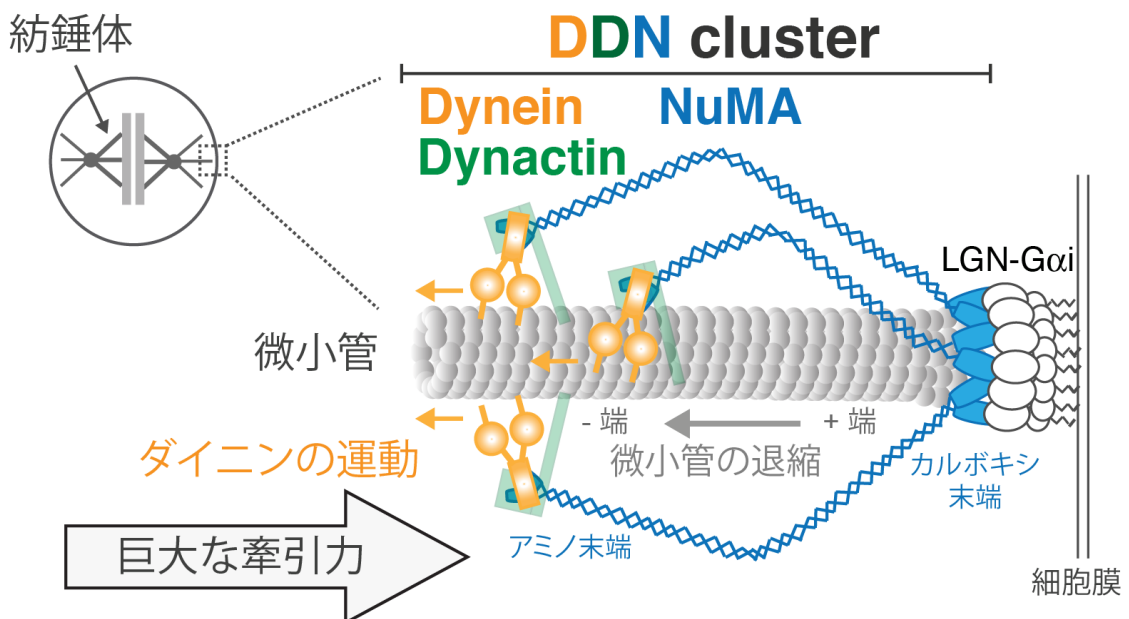


図 4 紡錘体牽引装置の構造モデル

NuMA は尾部(カルボキシル末端)の自己集合ドメインを介して環状構造を形成し、かつ微小管結合ドメインを用いて、微小管の先端に結合することで、微小管の退縮エネルギーを牽引力に変換する。また NuMA の頭部(アミノ末端)領域によって局在化された複数のダイニン、ダイナクチン分子は微小管の側面に結合し、ダイニンのマイナス端への運動エネルギーを用いて大きな微小管牽引力を生み出す。このようにダイニン、ダイナクチン、NuMA が cluster 構造(Dynein-Dynactin-NuMA (DDN) cluster と命名)をとることによって、まるで人の手のような形をつくり、より効率的に微小管を捕らえ、紡錘体牽引力を生成できると考えられる。

### 【成果の意義】

これまでの細胞生物学の中心は、標的タンパク質を壊して、その異常を解析することにより、タンパク質がもつ機能の必要性を理解することでした。近年、試験管内で特定のタンパク質(複合体)を精製し、その機能を直接理解する試みも報告されていますが、紡錘体のような数百以上のタンパク質からなる巨大な構造を標的にした試験管内再構成は技術的な限界があります。しかし、今回、私たちは光を用いてタンパク質の局在を操作し、機能的な構造体を細胞内で再構成することにより、操作分子の機能の十分性を理解することに成功しました。この方法は、原理的には任意のタンパク質に応用可能ですので、NuMA やダイニンに限らず、様々なタンパク質の機能の十分性を生きた細胞の中で理解することが可能になると期待できます。

また、これまで細胞分裂の方向性や娘細胞のサイズ、位置を光を用いて自在に操作する方法はありませんでした。今回開発した方法を用いれば、原理的には組織中の細胞であれ、任意の細胞を 1 細胞レベルで操作することが可能です。今回開発した方法をさらに改良することにより、今後は生体内での細胞分裂の対称性・非対称性の制御の仕組みやその意義、また、それらの破綻と疾患との関連について、分子的な理解が進むと期待されます。

### 【用語説明】

- 1) 紡錘体：微小管から構成される紡錘型の構造体であり、分裂期の染色体の分配および細胞分裂面の位置を決める役割を担う。また紡錘体の極から伸びた微小管が、細胞膜上に形成される紡錘体牽引装置によって引っ張られることにより、紡錘体の配置が調整される。
- 2) NuMA : Nucleus and mitotic apparatus protein。全長約 2000 アミノ酸のタンパク質で、ホモ 2 量体を形成し、分裂期に紡錘体極や細胞皮層に局在し、ダイニンと共に機能する。
- 3) Dynein : ダイニン。微小管のマイナス端方向に移動する分子モーター。複数のタンパク質から構成される分子複合体。ダイナクチンや cargo adaptor と呼ばれるタンパク質と 3 者複合体を形成することによって、運動能が活性化される。キネシンモーターとは異なり、単独では 0.5 pN 程度の力しか生むことができないため、近年の研究から、ダイニンは細胞内では集合して巨大な力を生み出すと考えられている。
- 4) Dynactin : ダイナクチン。複数のタンパク質から構成される分子複合体。ダイニンと結合し、ダイニンの運動能を活性化すると考えられている。
- 5) iLID : improved light-induced dimer の略。青色光に反応して構造を変える LOV ドメインに SsrA ペプチドが融合されている。従って、青色光照射後、SsrA ペプチドが外部からアクセス可能になるため、その結合相手である Nano タグを融合したタンパク質は、光照射依存的に iLID と結合することができる。Brian Kuhlman 博士らによって開発されたツール。
- 6) CRISPR/Cas9 : clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins の略。DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる新しい遺伝子改変技術ゲノム編集システム。
- 7) RNAi : RNA interference (干渉)の略。mRNA を分解し、遺伝子発現を抑制するシステム。

### 【論文情報】

雑誌名 : eLife

論文タイトル : Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble

著者 : 奥村雅子、夏目豊彰、鐘巻将人、清光智美

DOI : [10.7554/eLife.36559](https://doi.org/10.7554/eLife.36559)