

特集：観て考える，考えて観る—細胞内オルガネラの空間構造変化

染色体分配のための紡錘体極のかたち作り

大杉美穂, 押森直木

細胞内オルガネラの多くは分裂期に大きな形態変化を生じる。劇的な変化を見せるオルガネラの一つが微小管であり、分裂期には染色体分配を担う装置、紡錘体を形成する。細胞内の微小管は γ -チューブリンを含む複合体 (γ -TuRC) を主な重合核としている。動物体細胞では多くの γ -TuRCが局在する中心体が細胞周期を通して主な微小管形成中心として機能しており、分裂期には紡錘体の極を形成する中心器官となる。更に、分裂期には染色体近傍からも微小管が重合する。正確な染色体分配のためにはこれらの微小管を、二つの集束した極をもつ双極紡錘体へと形づくる必要があり、モーター分子を含む多くの微小管結合タンパク質による微小管動態の制御や微小管架橋が必須の役割を果たしている。また、中心体には染色体運動に伴い極に加わる力に対抗し、双極性を維持する機構も備わっている。

はじめに

細胞分裂期に入ると、細胞内の多くのオルガネラにはその構造や細胞内配置に大きな変化が起こる。細胞骨格の一つである微小管は大きな変化を見せるオルガネラの一つであり、分裂期には染色体を分配するための装置である紡錘体を形成する。紡錘体の構造は生物種によって異なる部分もあるが、染色体分配が正しく行われるための必須条件として微小管の双極性配列の構築と維持があげられる。すなわち、微小管のマイナス端が2箇所に集まった“極”を形成し、双方の極由来の微小管のプラス端が中央部分で染色体と結合する、あるいはプラス端同士重なりあう構造をとる。紡錘体極の形成には、微小管モータータンパク質や微小管結合タンパク質群による、微小管のマイナス端を集束する力が不可欠である。更に、動物体細胞においては中心体が紡錘体極形成の中心器官として働いており、紡錘体極

の数や位置の決定には中心体の数や状態、細胞内局在が大きく影響する。

本稿では紡錘体の双極性の確立と維持の機構について、特に中心体が果たす役割に焦点を当て、我々が近年見いだした知見も交えて概説する。

1. γ -チューブリン複合体と微小管形成中心 (MTOC)

試験管内ではフリーのチューブリン二量体からの重合核形成と、それを土台とした微小管の伸長形成が可能である。しかし、細胞内ではそのような自然発生的な重合核の形成はほとんど起こらず、新規の微小管形成の多くは微小管重合核として働くタンパク質複合体から開始される。主要な重合核は γ -チューブリンであり、GCPs (gamma complex proteins; γ -チューブリンをGCP1とし、分子量に従って順に番号がつけられている) と呼ばれる複数のタンパク質からなる巨大な複合体として存在する¹⁾。この複合体は電子顕微鏡観察ではリング状の形態を示すことから γ -チューブリンリング複合体 (γ -TuRC; γ -tubulin ring complex) と呼ばれる。複合体に含まれる γ -チューブリンが微小管の重合核となり、微小管のプラス側が伸長していく。更に、 γ -TuRCは微小管のマイナス端をキャッピングし、脱重合から守ることによって微小管を安定化する役割ももつ。つまり、細胞内のほとんどの微小管はマイナス端に γ -

東京大学医科学研究所癌細胞シグナル分野 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

The mechanisms of spindle pole formation for the proper chromosome segregation

Miho Ohsugi and Naoki Oshimori (Division of Oncology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

チューブリン (あるいは γ -TuRC) が結合した状態で存在していると考えられている。微小管形成中心 (MTOC; microtubule organizing center) はもともと、顕微鏡観察で見いだされた、微小管の重合伸長・配列形成の起点となっている細胞内の部位あるいはオルガネラを示す呼称である。近年の知見を総合すると、その実態は γ -TuRCなど γ -チューブリンを含む複合体が集積している部位・オルガネラであると言えるだろう。動物体細胞では中心体がMTOCとしての役割をもつ代表的なオルガネラである。そのため、中心体とMTOCという語が同意に用いられている例があるが、正しくは中心体はMTOCとしての役割をもつオルガネラの一つであるに過ぎない。中心体をもたない卵細胞などはもちろん、中心体が存在する動物体細胞においても中心体以外のMTOC (例えばゴルジ体など) が存在するし、中心体はMTOC以外の役割も担う。

2. 中心体の構造と構成分子

中心体を電子顕微鏡観察すると、中心小体と呼ばれるシリンダー状の構造物が明瞭に見える。中心小体のシリンダー構造は九つの短い微小管トリプレットから構成されており、一つの中心体には互いに直角に配置している二つの中心小体が存在する (図1)。更に、中心小体周囲には形の不明瞭な雲のようなものとして観察されるタンパク質の凝集体があり、総称として中心体周辺物質 (PCM; pericentriolar material) と呼ばれる (図1)。PCMの構成分子にはpericentrin/kendrin やCG-NAP/AKAP-450といったコイルドコイル領域に富んだ高分子量のタンパク質が含まれており²⁾、これらの分子が網状構造を構築していると考えられ

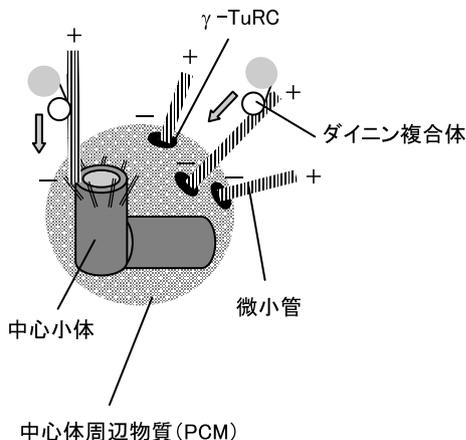


図1 中心体の構造

中心体はL字型に配置する二つの中心小体とそれを取りまくように存在する中心体周辺物質 (PCM) からなる。成熟した母中心小体には appendages と呼ばれる突起状の付属物ができる。PCM構成分子の少なくとも一部はダイニン複合体によって中心体へ運ばれる。PCMに存在する γ -TuRCが微小管形成開始点として働き、中心体側をマイナス端に向けて微小管が配置する。一部の微小管は appendages に結合している。

ているが、実体はまだ解明されていない。更に、これらの分子を含むPCM構成タンパク質との結合を介し、多くの γ -TuRCがPCMに局在する。間期細胞での微小管のマイナス端の一部は、中心小体に存在する突起状の構造物 (appendages) に結合している。しかし、 γ -TuRCは主にPCMに存在しており、中心体のMTOCとしての機能の本体は中心小体ではなくPCMにあると考えられる (図1)。

中心体はしばしば模式的に図1に示すように描かれる。しかし、電子顕微鏡で“不明瞭な雲”のように見えるPCMが、実際にどのように中心小体を取り囲んでいるかについてはまだはっきりしない部分が多い。高解像度な蛍光免疫染色顕微鏡観察の結果からは中心小体を包むようなチューブ状の構造も提唱されているが³⁾、使用した抗体が全てのPCM構成要素を認識するものではないため、詳細な構造の解明には、更なる観察結果を待つ必要があるだろう。後述の中心体成熟の過程を含め、どのようにしてPCM構成分子が中心小体のまわりに運ばれ、どのようにしてMTOCとして機能的なPCMが構築されるかについては未知な部分が多く、今後の重要な研究課題と言える。

3. 中心体の成熟

分裂期紡錘体を形成するためには多くの新たな微小管形成が必要である。間期の動物細胞には中心体から細胞中へと伸びる、安定で長い微小管の大規模なネットワークが存在する。このネットワークは分裂前期にはほぼ消失し、代わって中心体をMTOCとする活発な星状体微小管形成 (aster形成) が起こる。この中心体からの活発な微小管形成に先立ち、中心体には“中心体成熟”と呼ばれるPCMの拡大が起こる。PCMの拡大に伴い、そこに局在する γ -TuRCの数も増え、紡錘体形成に必要な数の微小管の形成や微小管の結合が可能になる⁴⁾。PCMの拡大は、間期中心体を構成していたPCMに加え、細胞質中に散在していたPCMの構成分子が更に集積することで起こる。PCM構成分子の集積にはダイニン複合体がモーター分子として関わる“微小管依存的メカニズム”と“微小管非依存的メカニズム”の両方が報告されているが、詳細については不明な部分が多い (図1)。また、中心体成熟に伴い、中心体にはリン酸化タンパク質の増加が見られるが、実際この過程は複数の分裂期キナーゼ (Aurora A, Plk1 など) やホスファターゼ (PP4 など) によるリン酸化制御が不可欠である⁵⁾。

4. 染色体からの微小管形成

分裂前期における成熟したPCMからの微小管形成に加え、核膜崩壊後には分裂期染色体をMTOCとする微小管形成が起こる (図2分裂前中期)。この染色体からの微小管形成にも γ -チューブリンが必須であることが示されている。更に、分裂期染色体近傍での微小管形成には低分子量

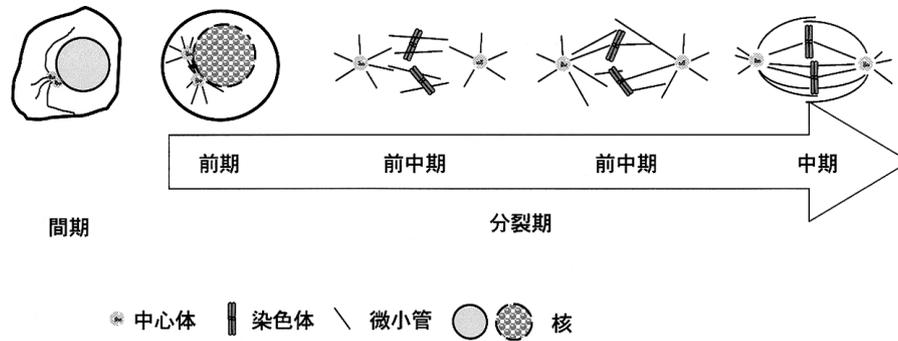


図2 双極紡錘体形成過程

間期細胞がもつ微小管ネットワークは分裂前期にほぼ消失し、代わりに成熟した中心体からの星状体微小管形成が始まり、中心体の移動が起こる(図3参照)。核膜崩壊後、中心体から伸びる微小管は、染色体を捕らえると共に、染色体近傍など中心体以外のMTOCから形成された微小管を中心体へと運ぶレールとしても働く(図4参照)。中心体からの微小管、中心体以外のMTOCからの微小管が統合され、中期の双極紡錘体が形成される。簡略化のため分裂前中期以降の細胞膜は描かれていない。

GTPaseであるRanによる制御機構が重要である⁶⁾。RanGTPaseの活性化因子であるRcc1は分裂期染色体に結合して存在するため、染色体近傍には活性型Ranがもっとも高濃度に存在する。この活性型Ranにより様々な微小管制御因子が活性化されることで、紡錘体近傍での微小管形成が促進・安定化される。現在のところRanによる直接の γ -チューブリンあるいは γ -TuRCの制御については報告がなく、不明である。

5. 紡錘体極の形成

中心体をもつ細胞では、主に上述の中心体から伸長した微小管と染色体近傍に形成された微小管とが統合されて紡錘体が形成される。この統合の過程は完全には解明されていないが、多くの微小管結合分子とモーター分子が生み出す動力によって担われていることがわかっている。

5-1. 中心体の移動

双極紡錘体形成へ向けた運動の第一歩として、まず成熟した中心体の移動が起こる。S期に複製された二つの中心体はC-NAP1 (centrosomal-Nek2-associated protein 1)を含むタンパク質複合体を介して結合しているが、G₂期後半にはリン酸化などの制御を受けて解離する。解離後二つの中心体には、中心体から伸長する微小管を介して複数の力が働き、互いに離れる方向へと移動していく。中心体から細胞膜や核膜に向かって伸びる微小管と細胞膜内側(cortex)のアクチン繊維や核膜との接点には、モーター分子ミオシンIIおよびダイニン複合体が局在しており、中心体を引き離す力を生み出している(図3)。また、中心体から伸びる微小管の一部は二つの中心体の中央の位置で重なりあうが、Eg5/キネシン-5はそのプラス端同士が重なりあう位置に局在し、中心体を押し離す方向の力を生み出している(図3)。Eg5/キネシン-5は核膜崩壊後も中央領域

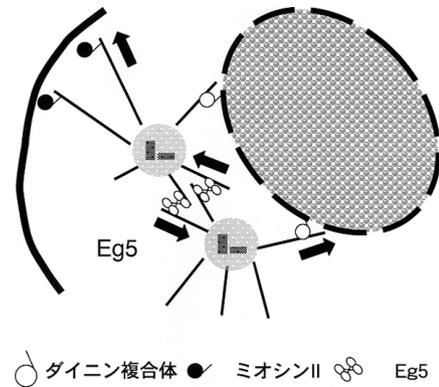


図3 分裂前期に中心体を動かし双極性を生み出す力

細胞膜内側や核膜と微小管との接点に局在するモーター分子(ミオシンII、ダイニン複合体など)により、中心体を引き離す力が生み出されている。また、中心体間でプラス端同士が重なりあう位置で働くモーター分子、Eg5/キネシン-5により、二つの中心体を押し離す力が生じている。矢印は結合するモーター分子の力によって微小管が動く方向を示す。

で重なりあう微小管のプラス端に局在して極を離す力を生み出し続け、双極性の維持にも寄与している(図4)。Eg5の阻害剤を分裂期開始前に細胞に添加すると中心体の移動がほとんど起こらず、ごく近傍に存在する二つの中心体を中心とした単極の紡錘体が形成されるが、双極紡錘体が形成された後に阻害剤を添加した場合にも双極性が維持されなくなり、単極紡錘体へと移行してしまう。したがって、Eg5/キネシン-5は中心体が存在しない細胞での双極紡錘体の形成・維持にも重要である。

5-2. 微小管の統合と微小管マイナス端の集束

中心体から伸長する微小管は染色体の“search and capture (探索と捕獲)”を行うが、近年の研究結果から染色体近傍など中心体以外の場所で形成された微小管も捕獲され、中心体へと輸送(search and transport)されることが

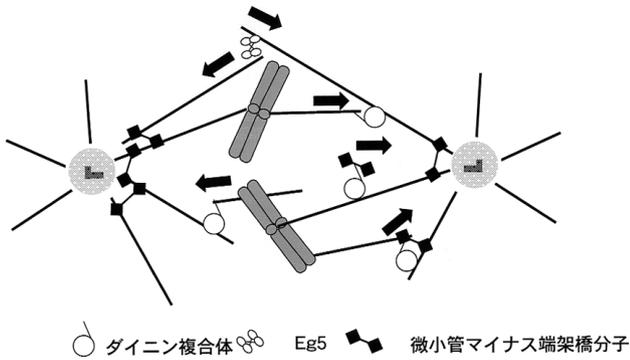


図4 微小管の統合と双極紡錘体形成

中心体から伸びる微小管の一部は直接染色体に結合する。中心体から伸びる微小管をルールとして、染色体近傍など中心体以外の部位で形成された微小管や、微小管に結合してマイナス端の安定化や架橋を担う分子 (NuMA, TPX2, ch-TOG など) がダイニン複合体の働きにより中心体の方向へ運ばれ、微小管マイナス端が中心体の位置に集束する。中央で重なり合う微小管プラス端に局在する Eg5/キネシン-5 は両極を押し離し、双極性を維持する。矢印は Eg5/キネシン-5 やダイニン複合体の力によって微小管や架橋分子が動く方向を示す。

明らかになった⁷⁾ (図4)。つまり、中心体は多くの微小管を形成する MTOC として機能すると共に、他の MTOC 由来の微小管のマイナス端をよせ集め、統合することによって紡錘体の双極形成を担う。

微小管のマイナス端を中心体を集めて固定し、安定した

双極紡錘体をつくるためには、微小管のマイナス端側を束ねる力も必要である (図4)。動物細胞では、微小管結合タンパク質である NuMA, TPX2, ch-TOG および、これらの分子や微小管そのものを紡錘体極へと運ぶダイニン複合体、キネシン-14 ファミリーに属するモーター分子が紡錘体微小管マイナスの統合過程と、マイナス端集束化を担っている⁸⁾。これらの分子の発現や機能を抑制あるいは亢進させた細胞では、PCM や γ -TuRC 構成タンパク質を含む極が複数でき、多極紡錘体が形成されてしまうことが報告されている。

6. Kizuna による成熟した PCM の保護

これまでに述べて来たように、紡錘体極として機能する際、中心体には微小管を介して様々な力がかかる。まず核膜崩壊前には中心体の移動に伴う力がかかるが、例えば中心小体の構造が不安定化した状態の細胞では、中心体が移動する時期に中心小体が崩壊・断片化し、中心小体の断片を含む複数の極が形成されてしまう⁹⁾。さらに、核膜崩壊後は PCM に結合する微小管の数が更に増加し、染色体の整列運動に伴う力も加わる。我々が分裂期キナーゼ Pik1 の基質分子として同定した Kizuna (Kiz) は、紡錘体形成時の拡大した PCM をこれらの力を受けても崩壊しないように守る機能をもつ¹⁰⁾ (図5)。

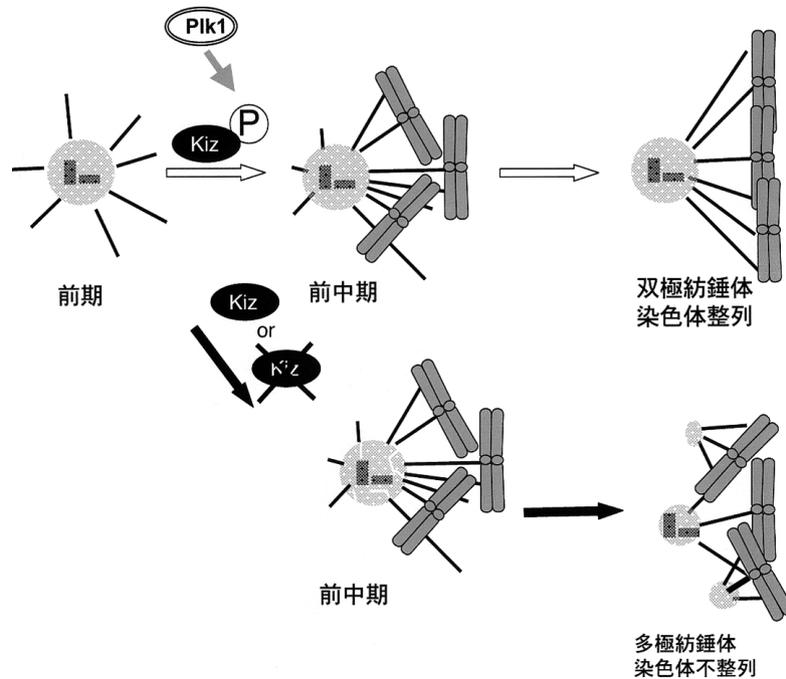


図5 Kizuna による M 期中心体の安定化

Pik1 によりリン酸化された Kiz は、中心体成熟により拡大化した PCM を安定化させる機能をもつ。Kiz が無い、あるいはリン酸化されていない細胞では、染色体整列時に中心体に力がかかると PCM が断片化し、中心小体から解離してしまう。断片化した PCM がそれぞれ極を形成する結果、多極紡錘体となる。簡略化のため紡錘体の半分のみを示した。

RNAiによりKizの発現を抑制したHeLa細胞でもPCMの拡大、中心体の移動は起こる。つまり、Kizは中心体の解離、中心体成熟、分裂前期の星状体微小管形成には必要ではない。しかし、核膜が崩壊して分裂前中期に入ると、拡大したPCMが断片化して中心小体から解離し、最終的に中心小体の周りに存在するPCMの量は間期と同程度まで減ってしまう(図5)。Kizを発現抑制した場合でも、PCMの断片化は核膜崩壊前には見られない。つまり、分裂前期に中心体が動く際に中心体にかかる力だけではPCMの断片化は起こらない。逆に、Kizを発現抑制した細胞にEg5の阻害剤を加えて中心体移動を抑制してもPCMの断片化が起こるが、染色体整列に寄与するモーター分子であるクロモキネシンKid¹¹⁾をKizと同時に発現抑制して染色体の運動を抑制すると、PCMの断片化が抑制される。すなわち、Kiz発現抑制細胞では染色体整列運動に伴うより大きな力によって、PCMの断片化が起こる。断片化したPCMの近傍にはTPX2やNuMAが局在しており、微小管のマイナス端が集束されている。つまり、それぞれのPCM断片が極として十分機能的であるため、多極紡錘体が形成されてしまう。面白いことに、Kiz発現抑制によって多極紡錘体が形成されても分裂期はやや遅延するものの停止はせず、多くの細胞は分裂期を終了する。このとき、各染色体に注目すると、それぞれの姉妹染色分体は微小管を介して複数存在する極のうちのいずれかに結合し、極に向かって引っばられていると考えられる。その結果、紡錘体チェックポイント機構がオフになり、染色体はそれぞれいずれかの極に向かって移動するようだ。実際、Kiz発現抑制細胞では分裂期からの細胞死も起こるが、最終表現型として多核細胞の増加が顕著に見られる。

KizがPCMを崩壊から守るためには、Plk1によってThr379がリン酸化されることが必須である。免疫沈降実験の結果から、Kizがリン酸化されるとpericentrin/kendrinとの会合が増強されることが示唆されている。しかし、直接的な結合の増加なのか、間接的な影響なのかも含めKizがどのようにしてPCMを崩壊から守っているのか、そのメカニズムは明らかになっていない。

おわりに

本稿では紡錘体の極形成と双極性の維持機構について中

心体の役割を中心に述べてきたが、中心体は紡錘体形成に必須のオルガネラではない。高等植物細胞には中心体が存在しないし、動物卵細胞やマウスの初期胚にも中心体は存在しない。さらに、中心体依存的な紡錘体極形成を行っている動物体細胞でも、機械的に中心体を取り除かれれば中心体なしで機能的な双極紡錘体を形成し得る¹²⁾。しかし紡錘体極の位置を決定することにより分裂面の向きを決定する機構は、多細胞生物の個体発生過程には必須であり、中心体の必要性の一つはそこにあると考えられる。動物細胞は中心体をもつことにより、微小管の統合効率を高めて双極紡錘体形成を促進できたと考えられるが、同時に中心体の数や質の異常による多極紡錘体形成の危険性が高まってしまったとも言える。動物細胞にとって中心体の数と質の制御は染色体を正確に分配するための必須の機構である。まだ多く残る機能が未知の中心体構成タンパク質の解析を通し、染色体分配のための紡錘体極のかたち作りを担う巧妙なしくみが明らかになるだろう。

文 献

- 1) Wiese, C. & Zheng, Y. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 4143–4153.
- 2) Takahashi, M., Yamagiwa, A., Nishimura, T., & Ono, Y. (2002) *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3235–3245.
- 3) Ou, Y., Zhang, M., & Rattner, J.B. (2004) *Cell Motil. Cytoskel.*, **51**, 1–7.
- 4) Blagden, S.P. & Glover, D.M. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 505–511.
- 5) Fry, A.M., Mayor, T., & Nigg, E.A. (2000) *Curr. Top. Dev. Biol.*, **49**, 291–312.
- 6) Ciciarello, M. & Lavia, P. (2005) *EMBO Rep.*, **6**, 714–716.
- 7) Wadsworth, P. & Khodjakov, A. (2004) *Trends Cell Biol.*, **14**, 413–419.
- 8) Goshima, G., Nédélec, F., & Vale, R.D. (2005) *J. Cell Biol.*, **171**, 229–240.
- 9) Abal, M., Keryer, G., & Bornens, M. (2005) *Biol. Cell*, **97**, 425–434.
- 10) Oshimori, N., Ohsugi, M., & Yamamoto, T. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1095–1101.
- 11) 大杉美穂, 山本 雅 (2004) 実験医学, **22**, 2619–2625.
- 12) Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., & Rieder, C.L. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 59–67.