総説

分裂期紡錘体のマイクロメカニクス

島本勇太, 高木 潤 国立遺伝学研究所新分野創造センター

The microtubule-based metaphase spindle is subjected to a variety of mechanical forces during cell division. Despite the accumulated knowledge of spindle components and their interactions, we still do not know how this micron-sized structure generates and responds to forces while maintaining its overall integrity, due primarily to the lack of an experimental tool to dissect its system-level mechanics. We have recently developed a biophysical assay that allows for applying and measuring forces in the vertebrate metaphase spindle. Our data reveal the spindle's remarkable physical property and suggest how it can be advantageous for error-free cell division.

Mitosis / Spindle apparatus / Microtubule / Mechanical force / Micromanipulation / Microneedle / Xenopus egg extracts

1. 有糸分裂と力

有糸分裂は、遺伝情報を細胞世代間で正確に継承するために真核生物が備えた巧妙な染色体分配メカニズムである。分配を駆動する紡錘体は、微小管を基礎とした μm サイズのポリマー集合体であり、細胞内で多くの力を発生し、また受容しながらその機能を果たしている^{1), 2)} (図 1)。これらの力は、紡錘体の双極構造形成や細胞内での位置決定、染色体の輸送など、分裂期のイベントに応じてさまざまな大きさ、方向、時間スケールで作用する。過去数十年の分子細胞生物学的解析を中心として、微小管の架橋、運動や重合活性を制御する因子が次々と同定され、その力学特性の詳細が明らかにされてきた³⁾。しかしながら、これら分子の相互作用は複雑かつ動的であり、従って、生命の連続性を保証するこのポリマー集合体の力発生と応答の性質は明らかになっていない。

細胞骨格が形成するシステムは、一般的な材料とは異なる興味深い物理特性を示すことが広く知られている⁴⁾。例えば、アクチンフィラメントを基礎とした架橋ネットワークは、力の作用する大きさや速さに依存して非線形にその硬さを増大させる。また変形の種類も一意には決まっておらず、弾性的（＝復元力を出して形を保とうとする固体的な性質）、粘性的（＝抵抗力を出しながらも時々刻々とその形を変える流体的な性質）な振舞いがネットワークの構造や架橋分子の動態に応じてダイナミックに変化する。このような特性は、これまで精製タンパク質を用いた *in vitro* 再構成系を中心に解析が進められてきた。しかしながら、紡錘体のように細胞内に自己組織化する構造物の力学特

図 1
紡錘体に働くさまざまな力。微小管（緑）とその架橋分子（水色、赤）を基礎として分裂期の細胞内に集合する紡錘体は、さまざまな力に晒され、またそれを利用しながら染色体（青）分配を達成する。代表的な力の例を (a)-(c) に示す。紡錘体の力発生と応答の物理メカニズムは分かっていない。

性を解析するツールは未だ発展途上の段階にあり、従って現象論を超えた定量的メカニクスの解明には至っていない。

2. チャレンジ

このような背景に基づいて我々は、紡錘体の力発生と応答の性質を直接、定量的に計測・操作することができる実験技術を数年前から開発している。紡錘体は細胞質中の可溶性分子とダイナミックに要素交換しながら構造形成・維持するシステムであり、その物理特性の決定には、可能な限り維持された細胞質環境下での計測が必須となる。さらに、1) 一過的現象である有糸分裂イベントを安定に観察できること、2) 力計

Micromechanics of the Metaphase Spindle

Yuta SHIMAMOTO and Jun TAKAGI

Center for Frontier Research, National Institute of Genetics

測プローブで対象に直接アクセスできること、3) 分子メカニズム同定に必要な生化学的阻害ツールが充実していること、が必要条件とされた。しかしながら、培養細胞を初めとする実験系は細胞膜の干渉が物理化学操作の障害となり、また光ピンセットやAFMに代表される既存の力計測プローブは水溶液中での計測に最適化されたものがほとんどであったことから、これらの条件を十分に満たさなかった。

そこで我々は、微細加工を施したガラスファイバーと細胞周期が制御された細胞質抽出液を用いてこれらの問題を克服した(図2)^{5),6)}。この実験系は、以前に我々が開発したカンチレバーシステム⁷⁾をより単純化したものであり、直径1 μm 、長さ100 μm 程の2つのマニピュレーション端子から構成される。一方のプローブ先端は非常に硬く、根元に接続したピエゾ素子の動きに連動してnm精度の変位で駆動される。もう一方のプローブ先端は柔らかく Hookean バネとして振舞うため、あらかじめ較正された弾性定数とその屈曲変位から、作用する nN オーダーの力を検出することができる。力の検出には強い電磁エネルギーを必要とせず、従って光毒性や熱発生を最小限に抑えた高解像度の蛍光観察が可能である。

細胞質抽出液はアフリカツメガエルの卵を遠心破碎して無希釈で調製されるものであり、紡錘体形成を初めとする多くの細胞イベントの解析に用いられている⁸⁾。この系は細胞周期がCSFと呼ばれる生化学活性によって分裂中期で停止しており、また Ca^{2+} 濃度の調節によって分裂期移行のタイミングを制御することができる。さらには、力学プローブや生化学試薬の導入を非侵襲的に行うことができる。これらの特徴を利用して、細胞質環境での直接的な力学計測が実現された。

図2 紡錘体の力学計測システム。(A) 我々が開発した力学アッセイの模式図。2本のガラス製マイクロファイバーを紡錘体の赤道面付近に挿入し、顕微鏡下で力の計測と操作を行う。(B) はファイバー先端の像。(C) 明視野像(上)とそれに対応する蛍光コンフォーカル像(下)。プローブ先端の位置を矢印で示す。赤は微小管、青は染色体。図は紡錘体短軸方向の測定例。スケールバーは全て10 μm 。文献6の図より一部転載。

3. 紡錘体の粘弾性レオロジー

紡錘体が異なる大きさや方向、時間スケールの力に対していかに応答するかを定量的に決定するため、我々は、材料科学の分野で確立されているレオロジー手法を応用した。レオロジーは構造の変形と流れを定量化する学問であり、その中でも動的測定と呼ばれる手法は、正弦波状に与えた力とそれに対する変形応答の振幅比と位相差から、構造の硬さと粘弾性を即座に決定する⁹⁾。さらに振幅と周波数を変化させることで、異なる力の大きさと時間スケールでの変形の性質を決定することができる。計測は、2本のプローブ端子を注目する力の方向に沿って配置し、硬いニードルの運動によって加わった力を柔らかいニードルで検出、生じた変形を2つのニードル間の距離変化から見積もることで行った(図2C)。

我々の計測は、この動的な構造物が細胞質と比べて100倍以上も硬く、またその硬さは変形の大きさに依らずほぼ一定に保たれることを明らかにした。一方で、入力する力の周波数と方向に対しては高い感受性を示し、その違いに応じて粘弾性特性を顕著に変化させることが分かった。具体的には、紡錘体短軸方向の応答はミリ秒から数分(周波数: $\sim 0.001\text{--}10 \text{ rad/s}$)の幅広い時間スケールで圧倒的に弾性的であり、構造を元の状態へ戻そうとする復元力を発生した。しかしながら、その中間の数十秒($\sim 0.01\text{--}0.1 \text{ rad/s}$)の時間スケールにおいては顕著な流動性を示し、構造の再編成を伴う粘性的な変形を生じることが明らかとなった(図3A)⁵⁾。他方、長軸方向における応答はどの時間スケールにおいても常に粘性が支配的であった。これまで報告されている細胞骨格ネットワークのレオロジーは多くが等方的で、速い力に対して固体的に、遅い力に対してより流体的な振舞いを示す⁴⁾。これに対して紡錘体は、固体的・流体的の性質が力の方向と時間スケールに応じダイナミックに変化する、特徴的な物理特性を持つことが明らかとなった。

4. 分子メカニズムの探索

決定された紡錘体のメカニクスがいかなる分子とその相互作用に起因する特性であるかを決定するため、我々は、弾性要素の存在を示す機械バネと粘性要素の存在を示す粘性ダンパーの組み合わせによってこれを説明することを試みた。その結果、図3Bに示す2つのバネと1つのダンパーが結合した3要素モデルが、紡錘体短軸方向の力学応答を単純かつ的確に説明することが分かった⁵⁾。このモデルは、高周波側と低周波側で弾性的に、その中間の周波数でより粘性的な振舞いを示す。これは、粘性ダンパーが高周波側で硬化す

図 3 紡錘体の力学的可塑性と安定性. (A) レオロジー計測により、分裂中期紡錘体は変形の周波数依存的に硬さと流動特性を顕著に変化させることが明らかとなった。パネルは短軸方向にかけた力に対する硬さ（上）と粘弾性成分比（下）。(B) 得られた力学応答特性を再現する機械要素モデル。異なる弾性定数を持つ2つのバネ (k_s , k_p) と1つの粘性ダンパー (γ_s) から構成される。モデルが描く応答曲線を、(A) の実測データに重ねて赤線で示す。文献5の図を改変。

るため直列バネ k_s が応答し、逆に低周波側では軟化して並列バネ k_p が応答するためである。中間の速さの力に対しては、ダンパー自体の応答がより支配的となり、粘性的な振舞いが最も顕著になる。一方、長軸方向の応答は、1つのダンパーで示すことができる比較的単純なものであった。

この機械モデルに対応する分子要素を同定するため、卵抽出液が提供するさまざまな生化学摂動ツールを用いて紡錘体構成分子の活性を阻害し、それが各機械要素に与える影響を定量的に評価した。我々は初めに、ATPの低速加水分解アナログであるAMPPNPの効果进行测试した。この化合物は紡錘体キネシンに特に親和性が高く、それらを微小管上に強く繋ぎ止める効果を示す⁹⁾。その結果、未処理の紡錘体で観察された流体的な性質はAMPPNP存在下でほぼ完全に消失し、広く弾性的な振舞いを示すことが分かった。特筆すべきことに、この変化に伴って紡錘体の硬さは時間スケールに非依存的となり、またその大きさは2つのバネの弾性定数の和 ($k_s + k_p$) と同程度であった。これは図3Bのモデルからダンパーを取り除いたことに相当し、従って紡錘体の粘性要素は分子モーターの加水分解活性に依存することが示された。

次に我々は、紡錘体の弾性バネに対応する要素を探索した。紡錘体の骨格を形成する微小管は数mmもの持続長を持ち、細胞スケールの変形に対して大きな復元力を発生することが期待される。そこで微小管の重合安定性を低下させることで知られるタンパク質Op18¹⁰⁾を抽出液に添加して紡錘体メカニクスを計測したところ、速い時間スケールの弾性はOp18の濃度に依存して減弱した一方で、遅い時間スケールで現

る弾性への効果はほとんど見られなかった。この変化は、モデルにおいて直列バネ k_s が減弱したことに相当する。ツメガエルの紡錘体は、極間微小管と呼ばれる平均寿命が短くダイナミックな画分と、動原体微小管と呼ばれる染色体に結合して束化した安定な画分を持ち、Op18はこのうち極微小管を優先的に不安定化することが知られている¹⁰⁾。従って、直列バネはこの分子摂動によって影響を受けた極微小管のメカニクス、並列バネは顕著な変化が見られなかった動原体微小管のメカニクスに対応づけられることが示唆された。

5. 染色体輸送と紡錘体メカニクス

細胞質環境下での力計測と生化学摂動実験の融合により、紡錘体が機械的な頑強性と柔軟性を兼ね備えた特徴的な力学システムであることが明らかとなった。興味深いことに、紡錘体が粘性を顕著に現す時間スケールは、染色体運動の典型的な時間スケールと良く一致していた。染色体は微小管ネットワークの平均メッシュサイズよりも十分大きく、従ってその輸送過程において紡錘体内部にあらゆる方向の変形を誘起する（図1b）。長軸方向に生まれる歪みは、紡錘体の粘性的性質によってどの時間スケールでも直ちに緩和される。一方で短軸方向の歪みは、中間的な時間スケールでのみ緩和され、それ以外は変形量に比例した反発力を生む。紡錘体は、弾性的性質によってその構造を幅広い時間スケールの力に対して安定に維持しながらも、粘性領域を利用することで染色体の効率的な輸送を実現する、巧妙に設計された細胞装置であることが予見される。

6. 紡錘体のサイズ決定メカニクス

卵抽出液内で形成される紡錘体は、同じ反応液内であっても数十%を超える幅広いサイズで分布する。一方、我々の実験で明らかになった紡錘体の弾性的性質、すなわち復元力を発生して元の形を保とうとする性質は、そのサイズが細胞質環境下で一意に決定されることを示唆している。このサイズのばらつきと安定性の関係を明らかにするために我々は、ガラスファイバーの技術を応用して紡錘体を強制的に伸長し、その長さや幅がいかに応答するかを定量的に解析した（図4A, B）¹¹⁾。その結果、紡錘体は長軸方向の力に対して反応液内での分布幅に相当する30%以上の伸長を示すことができるにも関わらず、力を取り除くと徐々に元の大きさと形に回復することが分かった。この回復の時間スケールは紡錘体の機械モデルから予測された値と良く一致し、ポリマーの剛性と架橋分子の動的特性を基礎として、構造が特定のサイズに安定化

図 4

紡錘体のサイズと形態の安定性。(A, B) 紡錘体の伸長実験。2本のガラスファイバーによって極間方向に伸長された紡錘体は、元の定常サイズに回復する。ファイバー先端の位置を点線(桃色)で示す。(C) 紡錘体の分断実験。短軸方向への過度の伸長は紡錘体を2つに分離するが、それぞれの断片は一定時間後にその形態を回復する。画像(微小管蛍光)上の時間は全て分:秒。スケールバーは10 μm。文献11, 12の図より転載。

されていることが示唆された。

さらに紡錘体ごとに異なるサイズで安定化する仕組みを明らかにするため、紡錘体を短軸方向に過度に伸長し、その構造を2つに分断する実験を行った¹²⁾(図4C)。驚くべきことに、分断された紡錘体の各断片は、分断直後の歪んだ形態から長さと幅を徐々に回復させ、数分後に新しい2つの紡錘体へと成長した。このときそれぞれの形は分断前の‘親’紡錘体と高い相似性を保っていたが、そのサイズは10%程小さくなっていた。さらに蛍光チューブリンの信号強度から見積もった微小管の含有量は紡錘体サイズに非常に良くスケールされており、小さい紡錘体ほど微小管量が少なくなっていることが分かった。微小管の重合安定性はDNA量と相関することが報告されており¹³⁾、分断で生じた染色体数の違いが紡錘体ごとに異なるサイズを規定していることが示唆される。

7. まとめと展望

我々の開発した力計測・操作システムによって、これまで遺伝的・生化学的阻害と形態観察を中心に解析されてきた紡錘体の構造形成と安定性のメカニズムを、物理的・定量的に理解することが可能となった。紡錘体は、分子より数千倍も大きなサイズで機能する最も複雑な細胞装置の1つである。動作原理のさらなる理解には、システムと分子の間に存在するメソスコピック領域の力学を実験的に明らかにすることが必須であろう。これには、ここで紹介した力計測と分子摂動を組み合わせたトップダウン的アプローチに加えて、再構成手法や微細加工技術を駆使したボトムアッ

プ的アプローチによる階層に渡った理解が重要であると考え、生物物理と物性物理、細胞生物学の融合によって、生命の持つ多様な機械制御メカニズムが明らかにされることを期待する。

謝 辞

この研究に多大な支援と助言を下された、Tarun Kapoor 教授、Albert Libchaber 教授(共にロックフェラー大学)、石渡信一教授(早稲田大学)とそのラボメンバーの方々に心から感謝致します。

文 献

- 1) Mitchison, T. J., Salmon, E. D. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, E17-E21. DOI: 10.1038/35050656.
- 2) Scholey, J. M. *et al.* (2003) *Nature* **422**, 746-752. DOI: 10.1038/nature01599.
- 3) Gadde, S., Heald, R. (2004) *Curr. Biol.* **14**, R797-R805. DOI: 10.1016/j.cub.2004.09.021.
- 4) Gardel, M. L. *et al.* (2008) *Methods Cell Biol.* **89**, 487-519. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)00619-5.
- 5) Shimamoto, Y. *et al.* (2011) *Cell* **145**, 1062-1074. DOI: 10.1016/j.cell.2011.05.038.
- 6) Shimamoto, Y., Kapoor, T. M. (2012) *Nat. Protoc.* **7**, 959-969. DOI: 10.1038/nprot.2012.033.
- 7) Itabashi, T. *et al.* (2009) *Nat. Methods* **6**, 167-172. DOI: 10.1038/nmeth.1297.
- 8) Murray, A. W. (1991) *Methods Cell Biol.* **36**, 581-605.
- 9) Sawin, K. E., Mitchison, T. J. (1991) *J. Cell Biol.* **112**, 941-954. DOI: 10.1083/jcb.112.5.925.
- 10) Houghtaling, B. R. *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 15338-15343. DOI: 10.1073/pnas.0902317106.
- 11) Takagi, J. *et al.* (2014) *Biophys. J.* **106**, 735-740. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.12.033.
- 12) Takagi, J. *et al.* (2013) *Cell Rep.* **5**, 44-50. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.021.
- 13) Dinarina, A. *et al.* (2009) *Cell* **138**, 502-513. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.027.

島本 勇太

島本 勇太 (しまもと ゆうた)

国立遺伝学研究所新分野創造センター准教授(テニュアトラック)・JST さきがけ研究者
2007年早稲田大学大学院理工学研究科修了, 博士(理学)。ロックフェラー大学にて博士研究員を経て14年より現職。

研究内容: 細胞の物性と機械受容メカニズム

E-mail: yuta.shimamoto@nig.ac.jp

高木 潤

高木 潤 (たかぎ じゅん)

国立遺伝学研究所博士研究員
2012年早稲田大学大学院先進理工学研究科博士後期課程単位取得退学, 博士(理学), 早稲田大学助手, 早稲田大学招聘研究員を経て, 14年より現職。

研究内容: 細胞分裂のミクロ力学解明