

67. 細胞分裂装置・スピンドルの形成機構

五島 剛太

Key words : 細胞分裂, スピンドル, 微小管,
オーグミン

名古屋大学 大学院理学研究科
生命理学専攻 機能調節学講座

緒言

真核細胞の分裂期には、微小管を主体とする分裂装置・スピンドルが形成され、染色体の姉妹細胞への均等な分配に必須の機能を果たす。スピンドルを構成する微小管の形成異常は染色体分配エラーを引き起こし、これが癌や初期流産、一部の脳疾患の要因であるとされている。ヒトを含む動物の体細胞においては、一般に、スピンドル微小管は主に中心体で生成されるとされてきた。しかし近年、スピンドルの内部において中心体には依存せず、既存の微小管に依存して微小管が生成されることが見出され、この過程に必須の微小管結合タンパク質複合体・オーグミンが発見された^{1,2)}(図1)。オーグミン機能が欠損した細胞では微小管重合因子 γ -tubulin の局在異常、スピンドル微小管数の減少が認められ、分裂期における染色体の分配に欠損が生じた。すなわち、微小管依存性の微小管生成経路が、細胞分裂に必須の役割を果たしていることが明らかになった。元々中心体を有さない陸上植物のヒメツリガネゴケにおいても、オーグミン依存的な微小管生成がスピンドル形成に必須であることも示された³⁾。一方、線虫では中心体が、酵母では SPB (Spindle Pole Body: 菌類における中心体に相当する構造体) が発達しており、スピンドル形成、染色体分配、細胞質分裂において、十分な数の微小管が中心体および SPB から生成されるので、オーグミン依存的な微小管生成機構は必要ないと考えられる。実際、これらの生物種のゲノム配列の検索からは、オーグミンを構成するサブユニットと相同性のある遺伝子が見つかっていない。また酵母における電子線トモグラフィーによる解析から、全てのスピンドル微小管は SPB から生成することが示されている⁴⁾。

しかしながら、酵母と同様に SPB (中心体様構造体) が発達している糸状菌においては、オーグミン複合体の構成因子 Aug6 と相同な遺伝子が見出された⁵⁾。本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の Aug6 遺伝子の解析をすることを通じて、進化上保存されたオーグミンの機能の解明を目指した。さらに、動物個体発生におけるオーグミン機能は不明な点が多かったため、哺乳類個体におけるオーグミンの機能も追究した。

方法、結果および考察

1. 糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるオーグミン複合体の同定
糸状菌 *A. nidulans* を用いた細胞生物学実験を行った。

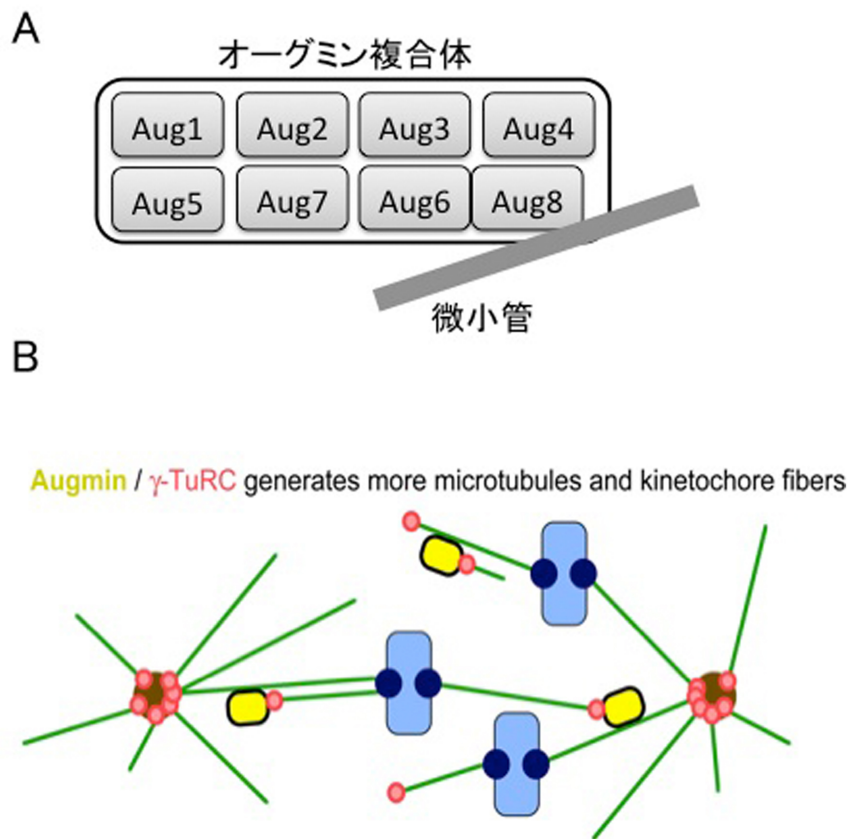


図1. スピンドル内部におけるオーグミン依存的な微小管生成.

A) オーグミン複合体. 動植物では保存された Aug1-Aug8 の8つのサブユニットよりなる. Aug8 サブユニットには微小管結合能が報告されている. B) 中心体を有する動物体細胞のスピンドルにおけるオーグミン依存的な微小管生成機構. オーグミン複合体 (黄) がスピンドル内部の既存の微小管 (緑) 上に結合し, 微小管重合核形成因子 γ -tubulin 複合体 (γ TuRC: 赤) を局在化することで, スピンドル内部に新たな微小管が形成される. 図は文献 1) より転載.

まず, Aug6 は分裂期特異的に SPB に強く局在し, さらにスピンドルの微小管上に弱く局在することを見出した (図 2 B). 次に, 微小管との共沈降実験により, Aug6 が直接, 若しくは間接的に微小管と結合しうることを確認した. さらに, ゲルろ過クロマトグラフィーにより, Aug6 がストークス半径 8.5 nm 以上の巨大な複合体に含まれていることが示唆された. そこで, *A. nidulans* において Aug6 と相互作用する因子を免疫沈降・質量分析により探索した. すると, PSI-BLAST による検索で, Aug1 (AN3724), Aug2 (AN6003), Aug3 (AN5826), Aug4 (AN10254) と弱い相同性を持つタンパク質が同定された (図 2 A). これらはいずれも Aug6 との共局在が観察された (図 2 B).

A

```

AnAug1 7 SPAKARQAAIQAKDWAYVNSLNRRYAEN--DVPEFERKSDPIRITLALTAANEADSEAAMLHAREDTIEGFKAREA-----285 aa
NcAug1 13 SPVVAARAAASAKDWSYVDSWLAHAKYTDLHLKVPSEERDPELKAALALATANEADDPDQQLDLESADQVKLNTSNA-----356 aa
HsAug1 1 -----MEPQERETQVAANLKKIFGD--HHPQDQEVNPRFTEILHHLSERLNRVDRDVLVITFDIKKASQVPSBA-----279 aa
PpAug1 4 NGATGQGVFDLQQVADVAKALRGAFEAQVGEVPEPEYTPRPRVAHLHNLAVLSQHRQTSAITIVADLRRAAEFRSQ-----293 aa

AnAug2 341 RSPPEPPEVLSYASDVLHPMSKIQRSI-----ALQKF--YLSGMLAKKSTLRRM-----537 aa
HsAug2 63 RNLSELELKLKEDTADVHHPFLAQKCH-----TLQSMNHLAVLKEKRSRDRIT-----235 aa

AnAug3 74 YVEVWVQEHLSDTLLSQEETLELVTKIKDSC-----549 aa
NcAug3 151 LVDVWVTHISSDTLLSVDEMDOVAALERAG-----654 aa
DmAug3 31 FFKFLSGNITDANLITERQVLEREEMQRRG-----565 aa
HsAug3 38 FLKWFVCGNVNEQNVLSERETEAFSITQKSG-----603 aa
PpAug3 38 LLDFLCTNLRPSNVLSLPELLOVNEIKAEG-----616 aa

AnAug4 227 VVYLPERT-----KFGAMARATKANAEHLAAVARGLECKLRVMRQDAIAAIHPEVNAATSHYFQHLRNARERLEERRRLVDETKAV-----352 aa
NcAug4 248 IIKTVEA-----KHGPHASLEFNASETLLAEKAEKESELAVLGVKREVVYVPEVRKCI GEYKKWLVGEERRIRGEIERGEEVIGG-----408 aa
HsAug4 242 IYTKLQRLQEHRLKQTS--ELDRINAGVTEVKCGAMILKLRMELKIKTSQIVYVSKVEVHRLIRDRLEGRTHLQEQDMNSROWNSV-----363 aa
PpAug4 304 FAVLLRVRKPKLQIQH--DYDGMRRQMLCKRCQTNNAKLRVLEHLLLRDITVTCESIPATHKIRHLVPAWEBAATAAYNRAVTRIREV-----433 aa

```

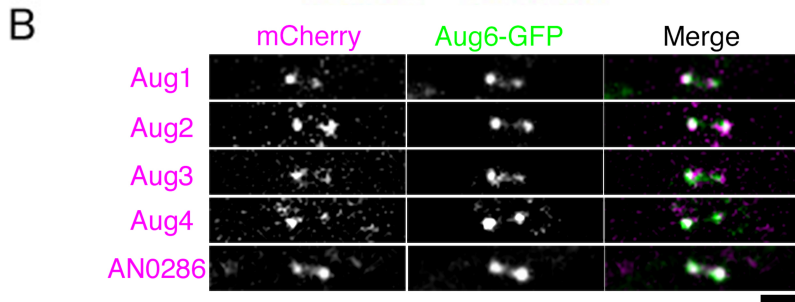


図2. 糸状菌におけるオーグミン複合体同定.

A) 新たに同定された糸状菌 *A. nidulans* の Aug1, Aug2, Aug3, Aug4 相同遺伝子. *A. nidulans* の Aug6 様タンパク質を免疫沈降後, 共沈物を質量分析により同定した. B) Aug1 – Aug4 およびもうひとつの新規 Aug6 相互作用因子 AN0286 はいずれも SPB 近傍で Aug6 と共局在した. 画像はいずれも分裂中期のものである. Scale bar: 2µm. 図は文献 6) より転載.

さらに, 共沈降することがわかった新規の AN0286 タンパク質についても, オーグミンのいずれのサブユニットとも相同性を見出すことができなかったが, Aug6 と共局在することが観察された. これらの結果から, *A. nidulans* にもオーグミン複合体が存在することが強く示唆された.

A. nidulans におけるオーグミンの機能を解析するため, 相同組換えを利用して, *Aug6*, *Aug3*, *AN0286* 遺伝子を破壊した. いずれの破壊株も得られることができ, 野生型の生長速度と差異はなかった. さらに, Aug6 破壊株において γ -tubulin の分裂期 SPB への局在化に異常がないかを調べた. 抗 γ -tubulin 抗体で免疫染色し, 分裂期 SPB における γ -tubulin のシグナル強度を測定したところ, 野生株と破壊株で有意差はなかった (図3 A, B).

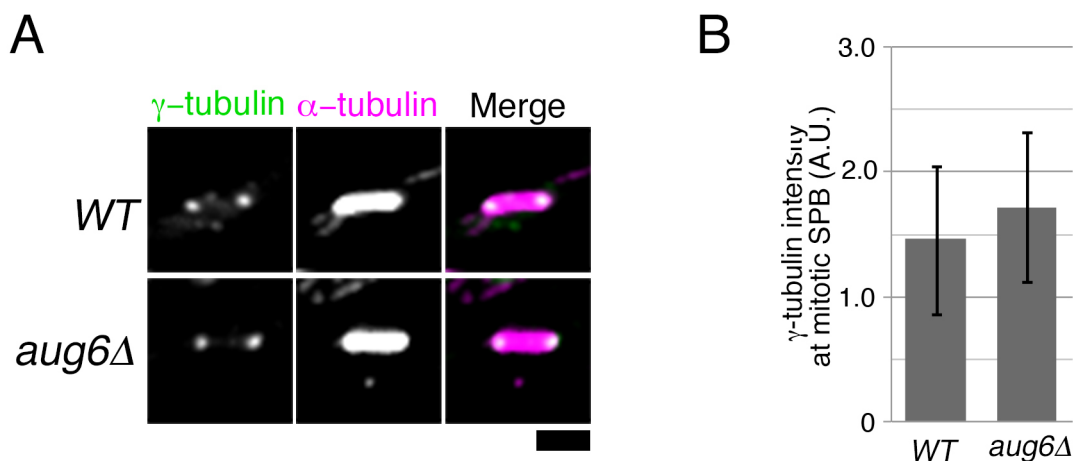


図3. 糸状菌においては γ -tubulin の局在はオーグミンに依存しない。

A, B) *Aug6* 遺伝子を破壊した株を作製, γ -tubulin の局在を調べたが, 野生株と比べて SPB への局在量に変化はなかった. スピンドルの形態や細胞分裂期の進行にも影響はなかった. Scale bar: 2 μ m. エラーバーは標準偏差を表す. 図は文献 6) より転載.

このことは, *Aug6* が分裂期 SPB への γ -tubulin の局在に必要でないことを示し, オーグミンが *A. nidulans* において γ -tubulin の局在化以外の機能を有することが示唆された⁶⁾. 今後, オーグミン遺伝子破壊株の生育に影響が出る遺伝的背景や培養条件を見つけ出すことができれば, オーグミンの新機能の発見につながるかもしれない.

2. オーグミンの哺乳類における生理的役割の発見

ショウジョウバエの S2 培養細胞, ヒトの HeLa 細胞における RNAi ノックダウン実験では, オーグミンが細胞の増殖に必要であるとの知見が得られたが, 一方, ショウジョウバエ個体やゼブラフィッシュの変異体解析からは, オーグミンがなくても動物の個体発生は起こりうることを示唆されている^{7,8)}. 哺乳類におけるオーグミンの生理的意義を調べるため, 常法に従い, オーグミン遺伝子に対するノックアウトマウスを作出した. 遺伝子破壊ホモの個体は初期発生時に致死となったが, 共焦点顕微鏡でスピンドル (GFP-tubulin および EBI-GFP で可視化) をライブ観察したところ, 興味深いことに, 微小管形成中心が 3 つ以上存在するスピンドルが蓄積していた. この欠損が γ -tubulin 局在化異常が原因となって引き起こされたものなのか, あるいはオーグミンが従来知られている機能とは別に, 微小管形成中心を 2 つに集約する機能を有しているのか, 現時点では不明である. 今後, 部分欠損オーグミン変異体によるレスキュー実験等を通して, この点を明らかにし, 哺乳類発生過程におけるオーグミンの機能について結論を出したい.

以上, 本研究を通じ, 細胞分裂制御因子・オーグミンの進化上の保存性や機能についての知見が得られた.

文 献

- 1) Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N. & Vale, R. D. : Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J. Cell Biol.*, **181** : 421-429, 2008.
- 2) Uehara, R., Nozawa, R. S., Tomioka, A., Petry, S., Vale, R. D., Obuse, C. & Goshima, G. : The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106** : 6998-7003, 2009.
- 3) Nakaoka, Y., Miki, T., Fujioka, R., Uehara, R., Tomioka, A., Obuse, C., Kubo, M., Hiwatashi, Y. & Goshima, G. : An inducible RNA interference system in *Physcomitrella patens* reveals a dominant role of augmin in phragmoplast microtubule generation. *Plant Cell*, **24** : 1478-1493, 2012.
- 4) Winey, M., Mamay, C. L., O'Toole, E. T., Mastronarde, D. N., Giddings, T. H., Jr., McDonald, K. L. & McIntosh, J. R. : Three-dimensional ultrastructural analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, **129** : 1601-1615, 1995.
- 5) Lawo, S., Bashkurov, M., Mullin, M., Ferreria, M. G., Kittler, R., Habermann, B., Tagliaferro, A., Poser, I., Hutchins, J. R., Hegemann, B., Pinchev, D., Buchholz, F., Peters, J.-M., Hyman, A. A., Gingras, A.-C. &

- Pelletier, L. : HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. *Curr. Biol.*, **19** : 816-826, 2009.
- 6) Edzuka, T., Yamada, L., Kanamaru, K., Sawada, H. & Goshima, G. : Identification of the augmin complex in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, **9** : e101471, 2014.
 - 7) Meireles, A. M., Fisher, K. H., Colombie, N., Wakefield, J. G. & Ohkura, H. : Wac: a new augmin subunit required for chromosome alignment but not for acentrosomal microtubule assembly in female meiosis. *J. Cell Biol.*, **184** : 777-784, 2009.
 - 8) Du, L., Xu, J., Li, X., Ma, N., Liu, Y., Peng, J., Osato, M., Zhang, W. & Wen, Z. : Rumba and Haus3 are essential factors for the maintenance of hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish hematopoiesis. *Development*, **138** : 619-629, 2011.