

研究課題：電子線トモグラフィーおよび三次元モデリングによる有糸分裂紡錘体構築メカニズムの解析

釜崎 とも子

申請時の所属：名古屋大学大学院 理学研究科

現在の所属：北海道大学 創成研究機構；女性研究者支援室

博士研究員

発表要旨：

細胞分裂は生命を受け継ぎ、維持するために必須の現象である。紡錘体は染色体を分配することで細胞を正しく二分する役割を担っている。紡錘体は膨大な本数の微小管からなるが、これらの微小管がどこで、どのように生成され、機能的な紡錘体が形作られるかは不明だった。本研究では、電子線トモグラフィーおよび三次元モデリングによって、紡錘体内部における微小管生成メカニズムを微細構造学的に明らかにすることを目的とした。

近年、紡錘体内部における γ -チューブリンの局在化に必要な新規タンパク質複合体 “オーグミン” が単離・同定され、紡錘体内部におけるオーグミン依存的微小管生成が、機能的な紡錘体形成に重要であることが示された。ところが蛍光顕微鏡技術では紡錘体内部の微小管一本一本を詳細に可視化することが不可能であるため、オーグミン依存的微小管生成の実態は明らかにされていなかった。そこで申請者は、細胞内の微小管一本一本の方向性や、微小管末端の配置を明らかにすることができる、電子線トモグラフィーと三次元モデリングに注目した。未処理（コントロール）もしくはオーグミンを RNAi 法によりノックダウンしたヒト培養細胞を加圧凍結置換固定し、樹脂包埋後、分裂中期の細胞の連続準超薄切片を作製した。このうち、紡錘体の一部を電子線トモグラフィーにより可視化し、紡錘体の約 1% のボリュームに相当する解析用の画像を作製した。続いて、このような画像に含まれる微小管やそれらの末端などの位置を記録することによって三次元モデリングを行い、中期紡錘体の部分再構築像を作製した。コントロール細胞の紡錘体において、微小管のマイナス端は中心小体周辺のみならず紡錘体内部にも分布しており、紡錘体内部にある微小管のマイナス端は、オーグミン依存的に配置されることを見出した。さらに、 γ -チューブ

リン複合体でキャップされたマイナス端のうち約 9%の末端は、その近傍の微小管壁との間に、オーグミン依存的な新規結合構造“エンドリンク”を持つことを発見した。エンドリンクで繋がれた紡錘体微小管は約 20 度の角度をなした枝分かれを形成していた。これらの結果から、紡錘体内部の微小管は、オーグミン依存的なエンドリンクを介した微小管の分岐形成によって、効率よく増幅していることが強く示唆された。本研究により、詳細な微細構造レベルの遺伝子機能解析の重要性を示すことに成功した。