HOKUGA 北海学園学術情報リポジトリ

学校法人北海学園 北 海 学 園 大 学 北 海 斎 科 大 学

タイトル	超重力環境下における分裂酵母の細胞分裂とオルガネ ラ分布
著者	中山,椋太; 髙橋,考太; Nakayama, Ryota; Takahashi, Kohta
引用	工学研究:北海学園大学大学院工学研究科紀要(24): 31-48
発行日	2024-09-30

超重力環境下における 分裂酵母の細胞分裂とオルガネラ分布

中山椋太*·高橋考太**

Cell division and organelle distribution in fission yeast under hypergravity

Ryota Nakayama* and Kohta Takahashi**

要 旨

ヒトと同じ真核細胞である分裂酵母をモデル生物にして、白色矮星クラスの超重力がかかった時に細胞が どのような反応を起こすのかを調べた.18.800Gの重力加速度がかかる条件で細胞を遠心培養することで. 過酷な過重力(超重力)に対する分裂酵母の細胞反応を解析するための標準プロトコルを作成した.次に細 胞内構造が過重力により受ける影響を査定するために、さまざまな細胞内局在を示すマーカータンパク質を GFP タグすることで可視化し、標準プロトコル条件下の遠心によりその局在が変化するかどうかを検討し た.細胞質タンパク質,小胞体,間期の微小管,隔壁,アクチンなどの局在は,遠心に抵抗性を示した.こ れに対し核、ミトコンドリア、ゴルジ体、M期前半の短いスピンドル微小管は、遠心培養により細胞端に偏 在化する傾向にあることがわかった.また液胞はこれらと逆方向に偏在化する.細胞内構造物に明らかな偏 りが生じるにもかかわらず、遠心培養中は細胞周期の進行に顕著な遅延は見られず、細胞は増殖することが できる. M 期前半の細胞ではスピンドル微小管の偏りが起こるが, 微小管はそのまま細胞の長軸方向に伸長 を続けるため、遠心状態にあっても核を娘細胞に均等に分配することができる。これに対しミトコンドリア は、細胞の片方に偏ったまま細胞が分裂する結果、明らかな分配異常を示す、細胞を遠心後、通常の培養に 戻したところ (リリース). 一時的な隔壁形成率の上昇がみられた. 隔壁形成の上昇に先立って短いスピンド ル微小管の形成率の上昇がみられたので、遠心培養からリリースすると M 期前半で何らかの不具合が起こ り、細胞分裂の遅延が生じるらしい、ミトコンドリア分配異常が頻出する mmb1 遺伝子破壊株でもリリー ス後の隔壁形成率の上昇パターンには変化がなかったので、ミトコンドリアの均等分配を監視する細胞周期 チェックポイントが存在する可能性は低い.またリリース後の細胞では、通常の培養時には観察されない細 胞の短軸方向に傾いた短いスピンドル微小管が観察された。この時期の微小管はミトコンドリアを足場にし て伸長方向を安定化させることが示唆されているが、リリース後の細胞ではミトコンドリアが遠心培養によ り細胞端に偏ったためにスピンドル微小管の伸長方向の決定に遅延が生じている可能性がある.

1. 序論

地球上で進化したすべての現存の生物の細胞 は、地球の重力に適応している.重力が変化した 時に、どのような影響が生物個体や細胞に生じる かは、たいへん興味深い研究テーマであるが、統 一的な理解が進んでいるとは未だ言い難い状況で ある. 有人宇宙探査の現実性が高まる中, これま では主にアストロバイオロジー(宇宙生物学)と いう研究分野で, 過重力と微小重力環境が生物に 与える影響についての研究結果が報告されてき た¹⁾. 生物に対する微小重力の影響については, 動物の行動や発生といった限定的な分野では多く の研究成果がある²⁾. 宇宙空間における長期滞在

*北海学園大学工学部生命工学科, 2019年度卒業

Graduated in 2019, Department of Life Science and Technology, Faculty of Engineering, Hokkai-Gakuen University ** 北海学園大学大学院工学研究科電子情報生命工学専攻

Graduate School of Engineering (Electronics, Information, and Life Science Eng.), Hokkai-Gakuen University

株名	遺伝型	オリジナルソース
CY132	h ⁻ leul-32 cox4-GFP:LEU2 mCherry-atb2:hygr	PT2244
NS135	h ⁻ leul-32 mmb1::kanr cox4-GFP:LEU2 mCherry-atb2:hygr	PT2244
SP316	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 SPBC19c7.04c-GFP-HA:kanr	PT2246, FY14993
SP318	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 psh3-GFP-HA:kanr	PT2246, FY15350
SP319	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 abc4-GFP-HA:kanr	PT2246, FY15390
SP320	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 hcs1-GFP-HA:kanr	PT2246, FY14950
SP326	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 rps101-GFP-HA:kanr	PT2246, FY14930
SP352	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 glo3-GFP-HA:kanr	PT2246, FY15249
SP590	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 GFP-atb2:kanr lys3 ⁺ :NLS-BFP2:kanr	PT2246, FY38495
SP592	h ⁻ leul-32 cox4-RFP:LEU2 ade6 ⁺ :LifeAct-GFP:bsdr lys3 ⁺ :NLS-BFP2:kanr	PT2246, FY38518, FY38495

表1. 本研究で使用した分裂酵母株

などの微小重力への継続的曝露は、この非日常的 な物理環境にともなう生理的ストレスと適応反応 を生体に誘起し、個体レベルおよび細胞レベルで 生体にさまざまな全身的変化をもたらすことが知 られている³⁾. 無重力あるいは微小重力状態の研 究例が比較的豊富であるのに比べ、過重力環境が 生物個体に与える影響,とりわけ細胞レベルの変 化を調べた研究例は少ない。例えば個体レベルと 遺伝子発現レベルでは、過重力実験を行うために 大口径遠心機(100 rpm, 3G に相当)を設計し, ゼブラフィッシュ (Danio rerio) を用いて, 発生, 行動,遺伝子発現,エピジェネティクスの変化に 対する過重力の影響を調べた研究例がある4). そ の研究によると、胚を受精後5日間、過重力環境 下に曝露した結果、生存率は有意に低下するが、 孵化率に有意な変化は見られないこと,魚の位置, 運動頻度、遊泳行動などの生理学的・形態学的変 化が見られたことなどが報告されている. 微小重 力や過重力におけるネガティブな変化のほとんど は細胞レベルで起こるが、変化した重力を受容し て細胞の適応パターンを形成するメカニズムはま だ十分に解明されておらず、重力が変化したとき に初期胚で発生した不具合のほとんどが、新しい 個体が誕生する頃に消失してしまう現象について の理解も乏しいのが現状である5.多細胞生物を 使った重力変化の生理学的研究が一定の知見をも たらしているに対し、単細胞生物や培養細胞を用 いた研究例は少なく、培養細胞などは過重力負荷 が大きすぎると細胞自体が潰れてしまうので. 1,000Gを超えるような重力負荷を細胞に与えて その反応を解析した報告はほとんど存在しない. そこで本研究では、ヒトと同じ真核生物に属する 優れたモデル細胞で, 強固な細胞壁を有する分裂 酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)を用いて, 10,000 G 以上の極めて大きな過重力(超重力)が, 真核細胞に与える影響について調べることのでき る実験系を構築することを目指した.

2. 材料と方法

2.1 細胞株と培地

本実験で使用した分裂酵母の組換え株および遺 伝子破壊株は表1の通り. それぞれの蛍光タンパ ク質融合遺伝子および mmb1 破壊遺伝子が由来 する分裂酵母株(オリジナルソース)は、ナショ ナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の酵 母遺伝資源センター(FY から始まる株)および ペンシルベニア大学の Phong T Tran 博士(PT から始まる株)⁶⁾ から分与いただいた. それらの 株を適宜,既存の株と掛け合わせて,必要な遺伝 型を有する細胞株をランダムスポア法⁷⁾ により選 択分離した.液体培地と固形培地には EMM2 と YPD を使用し,胞子形成培地には MEA を用い た⁷⁾.

2.2 高速遠心機を用いた過重力負荷実験

2.0~4.0×10⁶ cells/ml の細胞濃度になるよう に 26℃で一晩振とう培養した分裂酵母をマイク ロチューブに 1.5 ml とり, 15,000 rpm で 90 min, 26℃に温度設定した遠心機で遠心培養した. 高速 遠心機は日立の微量高速遠心機(CF15RX II)に アングルローター(T15AP31)を装着したものを 用いた. 遠心加速度は, 回転数から以下の式で計 算できる. 遠心加速度=1,118 x 回転半径(cm) x 回転速度² (rpm)x10⁻⁸

この遠心機と上記のローターを使った場合,1 min間の回転数(rpm)と加速度(G)の関係は, 以下の通りである.

15,000 rpm	\Leftrightarrow	18,800 G
12,500 rpm	\Leftrightarrow	13,100 G
10,000 rpm	\Leftrightarrow	8,400 G

必要に応じて、適宜遠心の回転数、時間、温度 を変えた、遠心直後の生細胞観察は、遠心終了後、 マイクロチューブの底に沈殿した細胞を軽くピ ペッティングし、1.5 µl 量をスライドガラス上に スポットして、速やかに観察と撮影を行った。

過重力負荷からのリリース実験では,EMM2 で対数増殖期まで培養した細胞を遠心培養した 後,通常の重力下での培養にリリースし,一定時 間間隔で細胞をサンプリングした.細胞培養液 は,複数本のマイクロチューブに分注し,15,000 rpm,26℃で90min遠心して過重力を負荷した 状態で培養する.その後,チューブ中の酵母細胞 をボルテックスにより培地中に再懸濁して50ml のコニカルチューブに戻し,26℃で30~120min 振とうしながらリリース培養した.生細胞観察す る際には,リリースの各タイムポイントで酵母細 胞をマイクロチューブに1.5mlとり,遠心機に かけ集菌(15,000 rpm, 1 min, 26℃)した.

2.3 細胞内構造の蛍光観察

ライカマイクロシステムズ社製のインテリジェ ント正立型蛍光顕微鏡 (DM5000B) あるいはライ ブセルイメージング倒立型蛍光顕微鏡 (DMi8) を 使って, EMM2 培地中で生細胞観察を行った.

2.4 細胞同調率および細胞生存率の測定

蛍光顕微鏡で撮影した画像のうち微分干渉 (DIC)画像から,隔壁が存在する細胞の割合(%) を 算 出 し た. ま た GFP-Atb2 も し く は mCherry-Atb2の蛍光画像から,5μm 以下の短 めのスピンドル (Short Spindle; S.S.) 微小管が存 在する細胞の割合(%)を算出した.分裂酵母では 一般的に,分裂期前期から中期にかけて現れるお およそ2μm 以下の少し太い微小管構造をショー トスピンドル微小管と呼んでいるが、本研究では 分裂期後期前半に存在するもう少し長いスピンド ル微小管までを含んだ5µm以下の「短め」のス ピンドル微小管をSS. 微小管と呼び、解析の対象 とした. これは細胞内で偏在化を受けやすい長さ のスピンドル微小管の割合を分析したかったため である. それぞれ1サンプルにつき200細胞以上 を無作為に抽出して解析した. カウントする細胞 の無作為抽出にあたっては、撮影画像内に細胞外 形のすべてが写っているものを選び、細胞の一部 が欠けているものは選択しないように留意した. また、分裂が始まって隔壁部分がくびれ始めてい る細胞は、隔壁有の細胞としてカウントせず2細 胞として扱った.

細胞の生存率は、培養液中の細胞濃度を自動細 胞計数装置(CDA-1000B,ヤマト科学株式会社) で算出した後、EMM2 培地で適宜希釈し、YPD 固形培地上にスポットして 26℃で4日間静置培 養、コロニー形成能を比較することで測定した。

3. 結果

3.1 高速遠心機を用いた過重力負荷実験の 標準プロトコルの作成

分裂酵母細胞に対する過重力負荷の影響分析を 行うために、高速遠心機を利用して、細胞周期1 サイクル程度以下の時間スケール(0~180 min) で細胞に遠心力を継続的にかける実験(過重力負 荷実験)と、過重力環境から解放された後の細胞 を観察するための実験(過重力負荷からのリリー ス実験)の標準プロトコルを作成した. 遠心力の 影響と実験の再現性を確認するために, Cox4-GFP 遺伝子組換え株を用いてミトコンドリ アを可視化してその偏在化を指標にした. 実験条 件としてパラメータを検討したのは、① 遠心時 間、② 遠心力(回転数)、③ 遠心中の培養温度の 3つである. リリース実験については. リリース 後に隔壁形成率の上昇がみられることがわかった ので(後述),リリース後の隔壁形成率を新たな指 標として, ④ 再現性よく高頻度で隔壁形成が起 こるリリース時間を探した.以上の実験で使用し た培養液はすべて EMM2 である.

① 遠心時間

遠心力(回転数)を当該遠心機の最高回転数で



図1 遠心時間,遠心力,温度を変えた遠心培養におけるミトコンドリア偏在化 遠心力 15,000 rpm,温度 26℃で,遠心時間は 30 min(A),60 min(B),90 min(C), 120 min(D).遠心時間 30 min,温度 26℃で,遠心力は 12,500 rpm(E),10,000 rpm (F).遠心力 15,000 rpm,遠心時間 30 min で,温度は 10℃(G),4℃(H).緑: Cox4-GFP,赤:mCherry-Atb2.使用株は CY132.

ある 15,000 rpm, 遠心中の培養温度を 26℃に固 定し, 遠心時間を 30 min (図 1A), 60 min (図 1B), 90 min (図1C), 120 min (図1D) に変えて実験, それぞれのミトコンドリアの偏在化の程度を観察 したところ極端な差は見られなかった.野生株細 胞(CY132)の場合、おおよそ5割の細胞で明ら かなミトコンドリアの偏在が観察された. 遠心中 の細胞は遠心方向に対しさまざまな配向をとると 考えられる. ミトコンドリアが片方の細胞端に 偏っている細胞(図中の三角矢印▽)は、遠心方 向に対し長軸がほぼ平行に配向して回転したとき に、最大の偏りを示すと推測される. 一方、ミト コンドリアが片側の細胞壁に「へばりつく」よう に見えている細胞(図中の矢印↓)は、おそらく 遠心方向に対して長軸がほぼ垂直に配向して回転 したケースなのであろう. 一見ミトコンドリアの 分布に異常がみられないような細胞についても. 観察する角度を変えればミトコンドリアの偏在化 が確認できる可能性が高い. 今回の実験では、遠 心方向に対し細胞の向きをそろえるような工夫は していないので、細胞がどのような向きで遠心さ れるかはランダムである.以下の実験では片方の 細胞端に偏ってミトコンドリアが偏在化している 細胞を指標にして, 観察と定量化を行った.

② 遠心力(回転数)

遠心時間を 30 min, 遠心中の培養温度を 26℃ で固定し, 遠心力を 15,000 rpm (図 1A), 12,500 rpm (図 1E), 10,000 rpm (図 1F) に変えて観察 したところ, ミトコンドリアの偏在化は 15,000 rpm で遠心したときが最も顕著で, 10,000 rpm や 12,500 rpm で遠心した時は偏在化の頻度が低 く偏在自体も不完全なものが多くみられた.

③ 遠心中の培養温度

遠心力(回転数)を15,000 rpm,遠心時間を30 minに固定し,遠心中の培養温度を26℃(図1A), 10℃(図1G),4℃(図1H)に変えて観察したと ころ,10℃と4℃で遠心した酵母に比べ,26℃で 遠心した酵母はミトコンドリアの偏在化が多く見 られた.特に4℃ではミトコンドリアの偏在化の 程度が低かった.

以上の結果から、26℃の EMM2 培地中でミト コンドリアを偏在化させるには、15,000 rpm(重 力加速度に直すと 18,800 G), 30 min の遠心で十 分であることがわかった.より高い温度について は、今回の実験では検討していない.遠心中の培 養時間については、リリース後の表現型に影響を 与えることがわかったので(後述)、実験の目的に よって遠心時間を決める必要があろう.

④ 再現性よく高頻度で隔壁形成が起こる

リリース時間

遠心力(回転数)を15,000 rpm,遠心中の培養 温度を 26℃に固定し, 遠心時間を 30 min, 60 min, 90 min, 120 min で遠心した細胞サンプルを通常 の培養条件に戻してリリース後、それぞれ30 min, 60 min, 90 min, 120 min 経過した酵母を観 察したところ、遠心時間が長いほど隔壁形成率が 高い傾向があった(後述.図13左).遠心時間90 min と 120 min に大きな差は見られなかった. 遠 心前のコントロールと比較して、リリース後60 min ころから隔壁形成率の上昇が観察されはじ め、90 min で最大となった. リリース後 120 min たつと, 隔壁形成率は減少に転じた. 最も隔壁形 成率が上昇する実験条件は、遠心時間が90~120 min でリリース時間が 90 min のもので, 隔壁形 成率は約17.6%となり、コントロール細胞の 4.3%の約4倍にも上昇した.

①~④の実験結果から、ミトコンドリアの偏在 化を指標として分裂酵母細胞に対する過重力負荷 の影響を調べる際は、26℃で保温しながら15,000 rpmの回転数で90 min 遠心するプロトコルを採 用することとし、以降の実験を行った. ミトコン ドリアの偏在化以外の指標を用いた場合は、異 なったプロトコルとなる可能性があるが、ミトコ ンドリアの配置に影響を与える過重力としては、 当該遠心機の最大回転数の15,000 rpm、重力加 速度に換算して18,800 G もの遠心力が必要で あった.

3.2 過重力環境下における細胞内構造の変化

次にミトコンドリア偏在が観察される標準プロ トコルで採用した過重力環境下で、ミトコンドリ ア以外の細胞内構造にどのような局在変化が生じ ているのかを検討した.まず細胞内のさまざまな 構造に局在するタンパク質に GFP を融合した株 と Cox4-RFP 遺伝子組換え株をランダムスポア 法によって掛け合わせ、ミトコンドリアが赤、特

株名	細胞内構造	マーカー遺伝子名	遺伝子産物の特徴・機能
複数の株	ミトコンドリア	Cox4	シトクローム酸化酵素サブユニットIV
CY132, SP590	微小管	Atb2	α チューブリン微小管構成因子
SP316	隔壁	SPBC19c7.04c	菌類特異的な隔壁局在タンパク質
SP318	小胞体(ER)	Psh3	ER シャペロン SHR3 ホモログ
SP319	液胞膜	Abc4	液胞の ABC ファミリー膜貫通輸送体
SP320	細胞質	Hsc1	アセチル CoA 合成経路に関与する酵素
SP326	細胞質	Rps101	40S リボソームタンパク質 S3a
SP352	ER-ゴルジ体	Glo3	ARF GTP アーゼ活性化タンパク質
SP592	アクチン	Lifeact	アクチンに特異的に結合するペプチド
SP590, SP592	核	NLS	核移行シグナル配列ペプチド

表 2. 細胞内構造を可視化するために利用したマーカー遺伝子

定の細胞内構造が緑で蛍光発色する細胞株を取得 した.GFP 融合株は主に林らによって作製され た分裂酵母 GFP ライブラリー⁸⁰の中から,細胞 内局在が論文上で確認できるものを選び,ナショ ナルバイオリソースプロジェクト酵母遺伝資源セ ンターから分与を受けた.アクチンと核の局在 マーカーは、Vještica らの作製した株に由来す る⁹⁰.作製した株の名称,蛍光発色する細胞内構 造,GFP,RFP あるいは mCherry でタギングし た遺伝子名,遺伝子産物の特徴は,**表2**にまとめ た.遺伝子産物の特徴については,2024年7月末 日現在で,分裂酵母の統合遺伝子データベースで ある PomBase (https://www.pombase.org/)に 登録されている情報をもとに記載した.

以下の遠心実験では、ミトコンドリアが確実に 偏在し、リリース後に隔壁形成率に異常が現れる ことがわかっている15,000 rpm,90 min,26℃の 遠心条件を用いて、遠心直後にミトコンドリアが 細胞端に偏在している細胞の中でさまざまな細胞 内構造の局在を観察した.以下、遠心前のコント ロール細胞の局在と比較して、① 顕著な偏在化 がみられるもの、② 部分的に偏在化する傾向に あるもの、③ ほとんど局在に変化がみられない ものに分類して記述する.

① 顕著な偏在化がみられた細胞内構造

遠心培養後の野生株では、遠心前のコントロー ル細胞に比べて以下に示すように、ミトコンドリ ア、核、ゴルジ体、短いスピンドル微小管、およ び液胞に顕著な偏在化が観察された、遠心前の分 裂酵母細胞では、ミトコンドリアは細胞全体に分 散して分布しているのに対し(図2A, 左パネル)、 遠心直後の細胞では多くのミトコンドリアが細胞





遠心前(左パネル)と遠心直後(右パネル)の野生株 細胞(A, mmb1⁺, CY132)と mmb1 遺伝子破壊株細 胞(B, Δmmb1, NS135).緑:ミトコンドリア(Cox4-GFP),赤:微小管(mCherry-Atb2).遠心条件は 15,000 rpm, 90 min, 26℃.

端に偏在化する(図2A, 右パネル). このような 細胞では、ミトコンドリアの大部分は片方の細胞 端に押し付けられたように凝集していた(矢印↓) が、多くのケースでその一部が細胞の長軸方向に 向かって直線状に取り残されている(三角矢印▽) ように見えることがわかった. このような細胞 は、長軸方向に数本の微小管が配向する典型的な 間期様の微小管構造を有していた. 取り残された ミトコンドリアはこのような間期様微小管の一部 と局在が一致したので、微小管に結合したミトコ ンドリアは過重力による偏在化圧力に対し抵抗性



図3 過重力負荷のミトコンドリアとスピンドル微小管への影響 遠心前(A)と遠心直後(B, C)の野生株細胞(CY132).緑:ミトコンドリ ア(Cox4-GFP),赤:微小管(mCherry-Atb2),遠心条件は15,000 rpm, 26°C.Bは90 min遠心後の短いスピンドル微小管をもつ細胞,Cは60 min遠心後の長いスピンドル微小管を持つ細胞.

を示すことが示唆された. そこで分裂酵母の間期 細胞でミトコンドリアと微小管の結合を仲介して いることが報告されている Mmbl タンパク質の 破壊された mmb1 遺伝子破壊株細胞 $(\Delta mmb1)^{6}$ で遠心実験を行い、取り残されたミトコンドリア が観察できるかどうかを検討した(図2B).遠心 前の*Δmmb1* 細胞の間期のミトコンドリアは,野 生株細胞と比べると凝集して分布異常を示す割合 が多いものの、その多くは細胞全体に分散して存 在している⁶ (図 2B, 左パネル). これに対し, 遠 心直後の間期の △ mmb1 細胞は、偏在化がみられ た場合、取り残されたミトコンドリアは観察され ず、全てのミトコンドリアが微小管構造とは無関 係に片方の細胞端に凝集していることがわかった (図2B, 右パネル). 以上の結果から, ミトコンド リアは間期微小管と結合することにより、過重力 下においても一定程度、細胞内に分散できている ことがわかる.

次に遠心後に微小管構造の異常がみられるかど うかを野生株(CY132)およびΔmmb1細胞株 (NS135)で観察した(図2,図3).間期と思わ れる長軸方向に数本の長い微小管構造が観察され る細胞では、いずれもコントロール細胞と比べて 局在やその構造に大きな違いは見出されなかった (図2).これに対し、分裂期(M期)のスピンド ル微小管を持つ細胞では、いずれの細胞でも通常 は細胞の中央付近に形成されるスピンドル微小管 が細胞端に偏って配置されることが多いことがわ かった(図3B).特にこれは短いスピンドル微小 管を持つ M期前半の細胞で顕著である.細胞長 に近い長さのスピンドル微小管を持つ M 期後半 の細胞では、コントロール細胞に比べて特に異常 はみられない(図3C).

液胞は、ミトコンドリアや短いスピンドル微小



図4 過重力負荷の液胞への影響 遠心前(A)と遠心直後(B)の野生株細胞(SP319). 遠心条件は15,000 rpm,90 min,26℃.赤:ミト コンドリア(Cox4-RFP),緑:液胞(Abc4-GFP).

管とは反対方向に偏在化する傾向にあることがわ かった(図4).遠心前のコントロール細胞では、 液胞は細胞全体に分散分布しているのに対し、遠 心直後の細胞では、液胞がミトコンドリアとは逆 の細胞端側に偏在化しているものが多く見られ た.凝集してコンパクトな領域に偏る傾向にある ミトコンドリアとは異なり、比較的広い領域に分 布して偏在化することが特徴である. ミトコンド リア(赤)とAbc4タンパク質(緑)の蛍光像を合 成したマージ画像では、ミトコンドリアと Abc4 タンパク質の局在が一部重なって黄色になってい る部分が検出される. これは Abc4 タンパク質が 液胞膜だけでなくミトコンドリア膜にも存在して いるタンパク質であるか. あるいはミトコンドリ ア近傍に常に液胞が付随して存在しているかのい ずれかの可能性が高いことを示している.

② 部分的に偏在化する傾向にある細胞内構造

遠心後に核構造の配置異常がみられるかどうか を野生株(SP590)で観察した(図5).遠心前の 間期の細胞核は細胞中央に位置しているのに対 し、遠心後は細胞端方向に少し偏在しているもの



図5 過重力負荷の間期核の細胞内配置への影響 遠心前(A)と遠心直後(B)の野生株細胞(SP590).遠心条件は15,000 rpm, 90 min, 26℃.緑:微小管 (GFP-Atb2),赤:ミトコンドリア(Cox4-RFP),青:核(NLS-BFP).



図 6 過重力負荷のゴルジ体への影響 遠心前(A)と遠心直後(B)の野生株細胞(SP352). 遠心条件は 15,000 rpm, 90 min, 26℃.赤:ミトコ ンドリア(Cox4-RFP),緑:ゴルジ体(Glo3-GFP).

が多いことがわかった.しかしながらミトコンド リアのように細胞の端ぎりぎりまで偏っている核 はなく,中央より片側に少しずれて位置する傾向 にあるという印象である.

ゴルジ体もミトコンドリアと同様に細胞端に凝 集して偏在化する傾向にあった(図6). ミトコ ンドリア(赤)のシグナルとゴルジ体(緑)のシ グナルはほとんど重なっていないため,通常はこ れらに構造上の関連性はあまりないと考えられ る.遠心後はミトコンドリアと同じ細胞端に偏っ て凝集するため,オーバーラップした局在を示す 黄色のシグナルが検出されるが,それぞれの凝集 した形は一致していないので,これらは異なる構 造体を維持しているらしいことがわかる. ミトコ ンドリアと同様,遠心後もすべてのゴルジ体シグ ナルが1カ所に凝集するわけではなく,一部のゴ ルジ体のシグナルは細胞質全域にドット状に分散 している(図6B,三角矢印▽).

小胞体シグナルは、遠心直後の細胞では遠心前の細胞に比べて(図7A)、ミトコンドリアと同じ 方向に偏って分布しているものが多かった(図



図7 過重力負荷の小胞体(ER)への影響 遠心前(A)と遠心直後(B, C)の野生株細胞(SP318). 遠心条件は15,000 rpm,90 min,26℃.赤:ミトコ ンドリア(Cox4-RFP),緑:小胞体(Psh3-GFP).

7B). しかしながら円形のシグナルが遠心後も細胞の中央付近に残存している細胞も多数観察された(図7C). 今回の実験で小胞体シグナルとして利用したPsh3タンパク質は、ERシャペロンとして小胞体に局在することが知られている出芽酵母SHR3タンパク質の分裂酵母オーソログである¹⁰⁾. 小胞体は核膜と物理的につながっていることが知られているが、遠心前のコントロール細胞中央部における円形のシグナルはおそらく核膜付近に付着する小胞体のシグナルと考えられる(図7A、三角矢印▽). この円形シグナル以外に明らかにミトコンドリアシグナルとオーバーラップする線状シグナルも観察される(図7A、矢印↓).



遠心前遠心後 図8 過重力負荷の影響を受けない細胞構造 遠心前(左)と遠心直後(右)の野生株細胞(A: SP592, B:SP316, C:SP320). 遠心条件は 15,000 rpm, 90 min, 26℃. 赤:ミトコンドリア (Cox4-RFP),緑:A:アクチン(Lifeact-GFP), B:隔壁(SPBC19c7.04c-GFP), C:代謝関連酵 素(Hsc1-GFP),青:A:核(NLS-BFP).

これは Psh3 タンパク質が小胞体だけでなくミト コンドリア膜にも存在しているタンパク質である か,あるいはミトコンドリア近傍に常に小胞体が 付随して存在しているかのいずれかの可能性が高 いことを示している.核膜につながった円形の小 胞体シグナルは核の近傍に存在し,遠心後の細胞 では核とともに細胞端付近まで移動する(図7B) のかもしれない.核周辺の円形のシグナルやミト コンドリアと重なるシグナル以外にも細胞全体に ぼんやりとしたシグナルやドット状のシグナルが 観察されるが,これらのシグナルはやや遠心力に 対して耐性を示すようである(図7C).

③ ほとんど偏在化しない細胞内構造

間期の微小管(図2), アクチン(図8A), 隔壁 (図8B), 細胞質局在のタンパク質としてアセチ ルCoA合成経路に関与する酵素(図8C)および 40S リボソームタンパク質 (SP326, データは示さ ない)の局在を観察してみたところ,ミトコンド リアが細胞端に偏った細胞でも,一方の細胞端へ のシグナルの大きな偏りは見られなかった.アク チンに関しては,アクチンパッチと呼ばれる細胞 の成長端に集積するドット状の構造体の分布が, やや乱れて細胞全体に散らばる(あるいはパッチ を形成しない)傾向にあり,これは中程度の過重 力負荷(~2,900G)で報告されている遠心ストレ スによるアクチン分極パターンの乱れと同様の現 象である可能性が高い¹¹⁾.分極バターンに変化が 見られた一方で,ミトコンドリアや核が偏った側 の細胞端にシグナルが濃縮するようなことはな く,遠心方向に依存した偏りは発生しなかった(図 8A).

3.3 超重力環境下での細胞周期進行および 細胞増殖

今回の標準プロトコルによる遠心操作では、細 胞増殖に極めて重要なエネルギー産生を担うミト コンドリアと染色体分配に関わるスピンドル微小 管の双方が偏在化したことから、遠心中の分裂酵 母細胞の分裂と増殖に何らかの異常が生じていな いかを調べる実験を行った.遠心中の細胞の細胞 周期進行をモニターするため,隔壁形成率(図9) 上)と短めのスピンドル(S.S.) 微小管形成率(図) **9下**)を野生株と *Δ mmb1* 株で測定した. いずれ の細胞株においても、26℃の EMM2 液体培地中 で180 min まで遠心培養して観測しても、形成率 にほとんど変化がみられなかった.したがって遠 心中に細胞周期が遅延したり促進されたりするこ とはないと考えられる. さらにそれぞれのタイム ポイントで細胞長の分布を観察したが、長短さま ざまな細胞が存在しており、180 min までの遠心 培養時間の範囲内では、細胞増殖が顕著な影響を 受けている可能性も低いと考えられる.細胞形態 などにも特に異常は見られなかった.

さらに長時間の遠心培養が細胞に与える影響を 調べるための第一歩として、26℃の EMM2 振と う培養の平均的な倍加時間(~4 hr)をを基準に して、細胞周期が数回は進行する 12 hr、24 hr、36 hr のタイムポイントでサンプリングを行い、細胞 の増殖率(図 10A)と生存率(図 10B)を調べた、 遠心をかけないコントロールとして、遠心機内と 同じマイクロチューブに分注して 26℃のイン



図 9 過重力環境下におけるスピンドル微小管および隔壁形成率 EMM2 培地中, 15,000 rpm, 26℃で 30 min~180 min 遠心培養した野生株細胞(青: *mmb1*⁺, CY132) と *mmb1* 遺伝子破壊株細胞(オレンジ: *Δ mmb1*, NS135)の隔 壁形成率(上)と短めのスピンドル(S.S.) 微小管形成率(下). C は遠心時間 (min).



図 10 長時間の過重力環境下における細胞増殖率と生存率 対数増殖期初期の野生株細胞(SP590)を EMM2 液体培地中 26℃で静置培養(青,1G)および 遠心培養(オレンジ,18,800G)し,12 hr ごとに細胞濃度(A)と細胞生存率(B)を測定した.生 存率は,YPD 培地に 10⁴ 細胞,10³ 細胞,10² 細胞ずつ希釈してスポット,遠心実験前(0 hr)か ら 26℃で 4 日間培養してコロニー形成能を比較した.

キュベータで静置培養した細胞を用いた.2x10⁶ cells/mlの初期濃度から始めたコントロールの静 置培養では,12hr後にすでに対数増殖期末期に 相当する1x10⁷cells/mlの細胞濃度に到達してお り,以降の24hrおよび36hr後では増殖飽和期 に入っているため,増殖が鈍化している.これに 比べて,18,800Gの超重力下では,明らかに細胞 の平均分裂速度が低下し,12hr後に2.6倍,24 hr 後に 4.3 倍程度までしか増加しなかった(図 10A). それぞれのタイムポイントで細胞の生存 率を比較したが,この時間スケール内では,超重 力下で有意に生存率が低下することはなかった (図 10B).



遠心直後

リリース後60min

図 11 過重力負荷からリリースした細胞のミトコンドリア 遠心直後(左パネル)と遠心からリリースして 60 min(右パネル)の野生株細胞 (上パネル, *mmb1*⁺, CY132)と *mmb1* 遺伝子破壊株細胞(下パネル, Δ*mmb1*, NS135).緑:ミトコンドリア(Cox4-GFP),赤:微小管(mCherry-Atb2).

3.4 超重力負荷からリリース後の 分裂酵母細胞に現れる M 期異常

野生株 (CY132) と *Ammb1* 株 (NS135) の細胞 を15.000 rpm, 90 min, 26℃の条件で遠心後, 通 常の培養条件に戻してリリースし、時間経過とと もに細胞の表現型を観察した. リリース 60 min 後に観察すると、野生株細胞ではミトコンドリア の偏在化がほとんど見られなくなったのに対し、 △mmb1株ではミトコンドリアが偏在化したまま の細胞が多く見られた(図11).興味深いことに、 リリース後 60~90 min 経過すると、過重力負荷 からの回復期にある細胞で隔壁形成率と短めのス ピンドル微小管(M 期前半に出現する)の形成率 の上昇が見られた(図 12).野生株と*Δ mmb1*株 で隔壁形成率の上昇パターンに顕著な差は見られ なかった(図13). 遠心前のコントロール細胞で は、両株とも隔壁形成率が約5%前後だったが、 遠心後リリースして 60~90 min 経過すると.隔 壁形成率が約4倍にまで上昇した.野生株につい ては、短めのスピンドル(S.S.)微小管の形成率の 変化も計測した(図14).遠心前のコントロール 細胞では, S.S. 微小管の形成率が約4%だったが,

リリース後45~60 min 経過するとS.S. 微小管形 成率が約3倍程度上昇している.

さらにリリース後 60~90 min 経過すると,野 生株および *Δ mmb1* 株細胞のいずれにおいても, 通常の培養条件下では観察されたことがない奇妙 な微小管構造が 6 %前後の高頻度で出現した(図 15,三角矢印▽). M 期初期から中期のスピンド ル微小管のような太く濃い構造を持ち,細胞の中 央に短軸方向に配向した形で現れる.しかしスピ ンドル微小管とは異なり,長軸方向に細い間期様 微小管構造が併存している.時期的に隔壁形成と 関連した構造かもしれない(図 15B)が,その生 理的な実態は不明である.

4. 考察

4.1 分裂酵母を用いた遠心機による 過重力負荷実験の特徴

遠心時間に関しては,30 min 程度の遠心で効果 的なミトコンドリアの偏在化が確認できた.遠心 中も細胞増殖・細胞分裂は進行するので,遠心時 間の長短がリリース後の細胞分裂に影響を与える



図 12 過重力負荷からリリース後の細胞の M 期遅延 遠心直後 (左パネル) とリリース後 60 min (A, C, 右パネル) と 45 min (B, D, 右パネル) の野生株細胞 (A, B, CY132) と mmb1 遺伝子破壊株細胞 (C, D, NS135). ▽は隔壁 (A, C; DIC 像) と短めのスピンドル (S.S.) 微小管 (B, D; mCherry-Atb2) を持つ細胞. 遠心条件は 15,000 rpm, 90 min, 26℃.

可能性がある(図13). 遠心力に関しては,今回 の研究に使用した遠心機の最大回転数である 15,000 rpm までしか加速をしていない. 15,000 rpm で遠心したときの細胞のミトコンドリアに 比べ,10,000 rpm や12,500 rpm で遠心したとき のミトコンドリアは,偏在化の程度が低いことが わかった.15,000 rpm の遠心によって作られる 遠心加速度は18,800 G,12,500 rpm の場合は 13,100 G である. この間の遠心加速度にミトコ ンドリアなどの大型の細胞内小器官を偏在化でき る条件が存在することになる. 超遠心機を使えば 10⁶ G までの遠心加速度は実現できるので,今後 さらに高い過重力環境における細胞のふるまいを 調べることも可能である. 遠心力の細胞内構造へ の影響力を大きく左右した条件は,遠心中のサン プル温度であった. 4℃の遠心では,15,000 G の









図 15 過重力負荷からリリース後に現れる奇妙な微小管構造 野生株 (CY132), 90 min 遠心後 60 min リリースした細胞. 緑:ミトコンドリア (Cox4-GFP),赤:微小管 (mCherry-Atb2). 隔壁の入りかけている細胞(A), 隔壁 のある細胞(B).

過重力を加えても細胞内ミトコンドリアの形態や 局在に大きな変化は見られなかった.10℃の遠心 においても26℃と比べて明らかに偏在化の程度 が低いことがわかった.これは細胞の培養温度が 低くなると細胞質基質の物性が変化しゲル状に なって硬くなるなどして¹²⁾、ミトコンドリアの変 形と移動を妨げているからであろう.

今回の研究では、過重力が細胞に与える影響を 2つの観点から解析するための実験プロトコルの 作成を試みている.1つは過重力に晒されている ときの細胞の挙動、もう1つは過重力環境から解 放された後のいわば回復期にある細胞の挙動であ る.過重力環境中の細胞は少なくとも最初の数時 間は見かけ上正常な細胞分裂を続けるのに対し、

そこから回復期にある細胞には特徴的な細胞周期 の遅延が発生することがわかった、過重力負荷に より、ミトコンドリアやスピンドル微小管といっ た細胞増殖や細胞分裂に必須の構造体が偏在化す ることから、回復期に現れる M 期異常は、これら の細胞内局在が回復するまでの何らかのチェック ポイント機構発動の結果である可能性があるが、 現在までのところそれを示唆するデータは得られ ていない. 遠心時間を 30~120 min の間で変えて 観察しても、ミトコンドリアやスピンドル微小管 の偏在化の程度に有意な差は見られなかったにも かかわらず、遠心時間を伸ばすと明らかに回復期 にある細胞の M 期遅延頻度が増加する. ミトコ ンドリアやスピンドル微小管といった目立った構 造体に隠れて、過重力環境に晒された細胞を時間 経過とともに蝕む未知の原因があるのかもしれな 61.

今回の実験プロトコルは、分裂酵母細胞を培養 液ごと遠心にかけるという簡単な実験の適正条件 を決めたに過ぎないが、実はこのシンプルな解析 系は実験手法として優れた特徴を有していること がわかった.その特徴の1つは、遠心方向に対し て細胞がどの向きをとっているかによって、さま ざまな向きにミトコンドリアなどの偏在マーカー が移動している細胞を観察できることである.ミ トコンドリアが偏在した位置によって細胞にどの ような方向で遠心がかかったか一目でわかり、長 軸方向の端に偏った細胞だけを選択することで、 細胞内構造物が不均等に分配されるときの細胞反 応を解析できる.同時に短軸方向に偏った細胞を コントロールとして解析すれば、有意な差を検出 しやすい実験系である.また酵母のように硬い細 胞壁で覆われた細胞を過重力負荷に対する真核細胞のモデル細胞として使うことで、ヒトやマウスなどの外力に対して弱い培養細胞では実現できないような面白い観察を組み立てることができる. 分裂酵母は、過重力負荷を調べるための生きた試験管(Live Test Tube)としては、たいへん良い形状をしている.均等な分裂を行う筒型の細胞は、遠心により細胞外形に目立った変化は起きず、そのわかりやすい形ゆえに可視化したオルガネラの偏在パターンを分類しやすい.本研究では、細胞への過重力負荷の影響を調べるうえで、分裂酵母は極めて優れたモデル生物だということを示すことができた.

4.2 超重力環境下におけるオルガネラの 偏在化

本研究では、ミトコンドリアの偏在化遠心条件 を15,000 rpm, 90 min, 26℃に最適化し、この条 件では、ミトコンドリアだけでなく細胞内の比較 的大型の構造体である核、ゴルジ体、スピンドル 微小管などが遠心方向に偏在化することを示し た. 液胞は逆方向に偏在化する. これに対し隔 壁, 間期の微小管, アクチン, 細胞質局在のタン パク質などは顕著な偏在を示さなかった. 小胞体 のようにその一部が偏りをみせる構造体もあっ た、ミトコンドリアやスピンドル微小管は、細胞 内では比較的大きな構造なので遠心加速度の影響 を受けやすかったことに加え、他の細胞内構造と の接着・結合が限定的で比較的自由に動ける構造 だったことが、顕著な偏在化につながった理由と 考えられる. 液胞はこれらの偏在化した構造体が 詰まった細胞端を避けて浮き上がり、逆の端へ偏 在化するのだろう. 偏在化が確認されなかった細 胞内構造は、リボソームや代謝系酵素など細胞質 内に浮遊するタンパク質群のようなナノメートル オーダーの小さな対象、アクチンや微小管のよう な細胞骨格系構造、隔壁のような細胞壁と連結し た強固な構造体である.

細胞内膜系の小胞体 (Psh3) やゴルジ体 (Glo3) の偏在化に関しては,面白い観察結果を得た.こ れらの構造は,通常の培養条件下では、ミトコン ドリアのシグナルと部分的に複雑に重なりあって いて,これらのオルガネラ間に構造的な繋がりが あるかどうか判断できない.しかし今回の遠心条 件で過重力負荷をかけることで,強固な結合から 一時的な接触まで複雑に相互作用をしながら細胞 内で混ざり合っていたオルガネラを、単純に「仕 分け」してみることができることがわかった.こ の「仕分け」によってゴルジ体(Glo3)はかなりミ トコンドリアからは独立した構造体らしいこと、 小胞体(Psh3)の一部はミトコンドリアと挙動を ともにしていることが明らかになった.小胞体 (Psh3)シグナルはミトコンドリアに引っ張られ る形で偏在化する部分と細胞質に残って偏りを示 さないシグナル部分とに分離できることもわかっ た.このようにこの遠心法を、オルガネラ間の構 造的関係を判別しやすくする新しい手法として活 用することができるかもしれない.

またこの遠心法は、単一のオルガネラの細胞内 の挙動が変化した場合の検証方法としても活用で きる. 例えば同じ微小管でも, 間期の微小管は遠 心に対して抵抗性を示したのに対し、M期前半の 短いスピンドル微小管は容易に偏在化してしまっ た(図2,図3). これは間期の微小管は動的不安 定性により常に自らの骨格を細胞の形に合わせて 作り変えることができるため、遠心による変形に 耐性を持っているのに対し, M期前半のスピンド ル微小管は、核分裂のために染色体との相互作用 に特化した構造に変化して他の細胞構造との繋が りをほとんど失っているからかもしれない、本研 究では、ミトコンドリアと微小管の結合を解くた めに, *mmb1* 遺伝子破壊株 (*Δ mmb1*) を利用し た. Mmbl の発見者である Fu らは論文の中で. Mmbl を介して微小管とミトコンドリアが結合 していることをさまざまな手法を駆使して示そう としているが⁶⁾,野生株とmmb1遺伝子破壊株の 遠心後の撮影像を見ればそれはきわめて明瞭な事 実であることがわかる. このような解析対象の細 胞内構造に関わる遺伝子変異株(例えばオルガネ ラとオルガネラの結合タンパク質の変異など)と 本遠心法を組み合わせれば、これまで証明が困難 だったこと(オルガネラ間で結合があるのかない のかなど)も容易に解析できるようになるかもし れない.

4.3 マイクロスケールの細胞世界における 重力の影響

我々にとっては、本研究の遠心で用いた10,000 Gを超える遠心力は想像を絶する加速度である. ジェット戦闘機などでは瞬間的に3~5G程度ま での加速を実現できるが、日常生活で10Gを超 えるような遠心加速度を体験することはない.も う少し非日常的な宇宙規模の重力加速度に目を移 すと、太陽の表面重力加速度でも約28Gである. 非常に重い恒星の代表として知られる典型的な白 色矮星の表面重力加速度は約10万G程度と計算 されているので、このクラスの星に出かけて行か ないと、本研究で分裂酵母が晒された超重力環境 を体験することはできない.

本研究で明らかとなったように、このような過 酷な過重力環境下においても、分裂酵母細胞は細 胞増殖を続け、少なくとも短期間(~180 min)は 見かけ上、正常なタイミングで核分裂と細胞質分 裂を行うことができる. 言い換えると、細胞の世 界は、我々の感覚とは異なった物理世界を形成し ているということだろう. 我々が生活するメート ルオーダーの世界からは 10-6 ほど小さなマイク ロメートルオーダーの細胞内の世界では、重力の 影響は極めて小さい.水素結合や分子間力などの 静電気的な力が圧倒的に強く、それらに比べると 物質に働く重力加速度の104~105倍程度の増加 は、実は無視できる程度の増加に過ぎないようで ある. 例えばミトコンドリアの重さは. およそ10 pg だと言われている. この場合, ミトコンドリ ア1個に働く重力 Fは、F=mg=10⁻¹³kg x 9.8 m/s² ≒1 pN である. これに対してタンパク質の 平均的な重さは数十kDa で、1Da=1.66054× 10⁻²⁴gなので、例えば100kDaの少し大きめのタ ンパク質1個の重さは、m=100x1000Da=10⁵ $Da=1.66 \times 10^{-19} g=1.66 \times 10^{-7} pg となる. それ$ にかかる力 F は F=mg=1.66 x 10⁻⁷ pg x 9.8 m/s² ≒ 1.6 x 10⁻⁶ pN なので, ミトコンドリア 1 個 に働く力1pNよりもおおよそ10⁵~10⁶倍程度小 さい.いずれも分子間力などに比べると極めて小 さな力で、細胞内の分子システムはより大きな分 子間力にあらがうように進化してきたため、今回 の104~105倍程度の遠心力の増加では大きな影 響は受けなかったのだろう。ただ遠心によって重 力が10°倍になると、タンパク質1個にかかる重 力が通常の細胞内のミトコンドリア1個にかかる 重力と同じくらいになり、ミトコンドリア1個に は 0.1 µN 程度の比較的大きな重力がかかる. 今 回の我々の遠心条件は、この1pNと0.1µNの差 をうまく捉えて、ミトコンドリアのような大きめ の構造体を偏在化させることができたのだと考え られる. この観点からは、数万Gの超重力のかか る世界では真核生物のようなオルガネラを持つ複 雑な細胞より、原核生物のような単純で小さな細 胞の方が適応しやすいかもしれない.

今回, 超重力環境下において, 明らかなミトコ ンドリアやスピンドル微小管の偏在化がみられた にもかかわらず. EMM2 培地 26℃で 180 min ま での培養では、細胞周期の進行に大きな乱れが生 じていないのは大きな驚きであった. Soto らは, cdc25-22 変異細胞を用いた同調実験で、200 Gの 中程度の遠心分離(200 G~2,900 G)によって一 過性の(15 min 程度の)細胞周期の遅延を誘起で きることを報告している11). この中程度の遠心分 離 で は, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) である Styl の活性化により細胞先端 からのアクチンの脱分極が促進されるが、この効 果は一過的で, 30~40 min 後にはアクチンパッチ が細胞端にほぼ完全に戻り先端成長が再開す る¹¹⁾. Soto らの実験は、遠心中の細胞周期の遅延 を検出しているわけではなく、リリース後の観察 結果であるため、本研究結果とは矛盾しない、ミ トコンドリアに関しては、後述するように正確な 分配を保障するチェックポイント機構が発動され ないかどうかを検討したが、ミトコンドリアの不 均等な分配を容認したまま細胞周期が進むことが わかった.スピンドル微小管と核が偏在化する と、常識的には M 期チェックポイントが発動し て、M期の遅延が発生することが予想されたが、 そのような乱れも起こらなかった。本研究に先 立って分裂酵母を遠心分離にかけその影響をみた Daga らの先駆的研究の中に、遠心からリリース 後の細胞分裂の観察例が記載されている¹³⁾. Daga らによると、遠心によって偏った短いスピ ンドル微小管は、リリース後に伸長を続け、核を 細胞の両端まで分離して正常な細胞分裂を終え る、遠心中の細胞分裂のライブ観察は今のところ 不可能であるが、遠心中の分裂の様子を我々の撮 影画像から推測すると(図 3B, C), 遠心中も Daga らがライブ観察したリリース後の細胞と同 じことが起こっている可能性が高いと考えられ る. すなわち過重力がかかっているにもかかわら ず、それに打ち勝ってスピンドル微小管は長軸方 向に伸長することができ、結局遅延を引き起こす こともなくうまく核を分配することに成功してい るようである.

さらに長い培養時間における過重力の細胞への 影響の詳細な分析は、今後の課題である.遠心培 養時間を 12 hr, 24 hr, 36 hr に設定して細胞の増 殖率と生存率を同条件のマイクロチューブ内の静 置培養と比較すると、明らかな増殖阻害が起こっ ていることがわかった (図 10). 12 hr で細胞長に ばらつきが出始め、24 hr では 20 µm 以上の明ら かに伸長した細胞と6µm以下の短い細胞が頻 出, 混在するようになる(未発表データ). 24 hr 後でも細胞増殖は進行しており、予備的な結果に よると、微小管の形態から M 期にあると推測さ れる細胞が観察された. 今回調べた時間範囲で は、超重力環境下で有意な生存率の低下は見られ なかったことから、分裂酵母は10⁴Gを越える重 力のもとでも(少なくとも1~2日は)生存可能 であることが示唆された.より長期間の培養で、 分裂酵母細胞が超重力環境に適応して分裂を続け ることができるのか、生存可能な場合、どのよう な適応形態を見せるのかは、たいへん興味深い今 後の研究課題である.

4.4 ミトコンドリア偏在とスピンドル微小管の 配向異常

本研究では、過重力負荷をかけた後の細胞をリ リースして、その回復過程で何が起こるかについ ても観察した.遠心の影響で明らかにミトコンド リアの分配異常が発生しているので、これがどの ように修正されるのかを解析することが当初の目 的であった、遠心後、細胞をリリースし60min 経過すると、偏在化したミトコンドリアは、野生 株細胞ではほとんど観察できなくなっていたが、 △mmb1 細胞では依然として偏在化したままのミ トコンドリアが多く見られた.野生株細胞のミト コンドリアは遠心により偏在化しても、リリース 後に過重力が無くなれば、Mmbl を介して微小管 に結合し、細胞内に拡散されてうまく再分配され るようになるのだろう. これに対し *Δ mmb1* 細 胞では、ミトコンドリアと微小管が結合すること ができないために上手く再分配されずに取り残さ れたミトコンドリアが多く観察されるのだと考え られる. 遠心中はミトコンドリアの分配異常が多 くみられ、娘細胞でミトコンドリアを過剰に受け 継ぐ細胞とわずかしか受け継がない細胞が出てく る.野生株細胞では微小管に結合したミトコンド リアが遠心方向とは逆の娘細胞にも残るので、ミ トコンドリアをまったく受け継がいない細胞はほ とんど生じないようであるが, Δmmb1 細胞では

ミトコンドリアを失った細胞も頻出する.野生株 細胞では、リリース後に少量ながら分配されるこ とに成功したミトコンドリア粒が「タネ」となっ て、細胞体積に合わせた量のミトコンドリアを作 り出すことができるのかもしれない¹⁴⁾.本実験系 は、このようなミトコンドリアの回復過程を解析 するにも好適な実験系と言えるだろう.

本研究では、ミトコンドリアを強制的に細胞の 片側に寄せることのできる遠心法を用いて、ミト コンドリアの娘細胞への分配に関して、その精度 を監視するミトコンドリア分配チェックポイン ト¹⁵⁾が存在するかもしれないという仮説の検証 を行った.もしミトコンドリアが M 期に娘細胞 に分配されない、あるいはほんの少ししか分配さ れないような事態が発生したとき、それを監視す るチェックポイント機構が存在するのであれば、 最終的にミトコンドリアがある程度均等に分配さ れるまで細胞分裂の終了を遅延させるはずであ る. 実際, 遠心からリリース後の回復期にある細 胞集団で通常よりも4倍近くもの隔壁形成率の上 昇がみられたことは、この遅延が起こっているこ とを示唆していると当初は考えていた. しかしな がら解析を進めるうちに以下の矛盾点が浮き彫り になった. 1)回復期にある細胞集団では分裂遅 延が起こるが、同様にミトコンドリアの分配異常 が発生していると思われる遠心中の細胞集団では 分裂遅延が起こらない(図9).また遠心中に実 際にミトコンドリアの分配異常が発生している。 2)回復期の細胞集団で分裂遅延が発生するのが ミトコンドリアの分配異常に起因するのであれ ば、野生株細胞に比べてミトコンドリアが再分配 されにくい *Δ mmb1* 細胞の細胞集団の方により 高い隔壁形成率の上昇や上昇のタイミングの遅れ がみられるはずだが、両者はほぼ同じような遅延 を示した(図9).したがって,分裂酵母細胞には, ミトコンドリア分配チェックポイントのような監 視機構は存在せず、隔壁形成率の上昇は別の要因 によるものであろうと推定された.

そこで次に隔壁形成期より前の M 期のイベン トが、リリース後の細胞で同調しているかどうか を調べたところ、M 期前半の短いスピンドル微小 管構造を持つ細胞がリリースして 45~60 min 経 過すると通常より多く出現することがわかった (図 14).分裂酵母では、M 期前半の短いスピン ドル微小管の両端が、ミトコンドリアの一部を捕 まえて伸長反応を起こすときの足場にしており、 その捕獲がうまくいかなかった場合、微小管の配 向を長軸方向に合わせるのに少し時間がかかると いう報告がある16). この現象は、細胞内共生によ り外部から進入してきた原核細胞由来のミトコン ドリアが、ホスト細胞の核分裂の精度を上げるた めに機能している「オルガネラ共生」の一例では ないかと考察されている.野生株細胞の M 期で は、短いスピンドル微小管の両端にほぼ必ずミト コンドリア粒が付着しているが、このミトコンド リアの捕獲に成功しなかった細胞では、長軸方向 へのスピンドル微小管の配向が定まらずに時間が かかるため、このような細胞では M 期の遅延が 起こる¹⁵⁾、遠心後リリースした細胞では、ミトコ ンドリアが細胞の片側に偏在しているので、スピ ンドル微小管が形成される細胞の中央付近では通 常よりミトコンドリア密度が低く、スピンドル微 小管によるミトコンドリア捕獲がうまくいかない 可能性が高いと考えられる. 実際にリリース後に 増加する短いスピンドル微小管を観察してみたと ころ、ミトコンドリアが近くに存在せず、斜めや 横(短軸方向)を向いてしまっているスピンドル 微小管が多くみられた(図12).したがってリ リース後の細胞では、ミトコンドリアの捕獲に失 敗したスピンドル微小管が、その伸長方向を長軸 に合わせるのに手間取ってスピンドル形成期の遅 延が起き、それがその後の隔壁形成期の上昇に繋 がったのではないかと考えられる。またこの遅延 が典型的な M 期チェックポイント機構で監視さ れているかどうかは、たいへん興味深い点である. M 期チェックポイント遺伝子破壊株細胞で今回 と同じ条件で観察を行い、同様の表現型を示す遅 延が観察されるかどうかを確認する必要があるだ ろう.

本研究で見つかったリリース 60~90 min 後に 出現する奇妙な横向きの微小管構造は, どのよう なものなのか不明である.太い形状から短い M 期初期のスピンドル微小管のようにも見えるが, 時期的には隔壁形成前期のようである.DIC 像 にうっすらと隔壁ができかかっている様子が見て 取れるものがあり,長軸方向に細い間期様微小管 構造が形成されていることが多い.今後の研究で その実態が明らかになることを期待したい.

謝辞

本研究は主に中山椋太の2019年度卒業研究の

結果をベースに、追加実験を行ってまとめたもの である.本研究で作製した分裂酵母株のオリジナ ルソースを供与していただいたナショナルバイオ リソースプロジェクト (NBRP)酵母遺伝資源セ ンターおよびペンシルベニア大学 Phong T Tran 博士に感謝したい.

【参考文献】

- S.K. Hariom, A. Ravi, G.R. Mohan, H.D. Pochiraju, S. Chattopadhyay, E.J.R. Nelson: Animal physiology across the gravity continuum, Acta Astronaut., 178, pp.522– 535, 2021.
- 2)井尻憲一:宇宙の生物学,朝倉出版シリーズ (応用動 物科学/バイオサイエンス) 5,朝倉書店,2001.
- 3) T.J. Corydon, H. Schulz, P. Richter, S.M. Strauch, M. Böhmer, D.A. Ricciardi, M. Wehland, M. Krüger, G.S. Erzinger, M. Lebert, M. Infanger, P.M. Wise, D. Grimm: Current knowledge about the impact of microgravity on gene regulation, Cells, 12, 7, 1043, 2023.
- 4) M. Salazar, S. Joly, G. Anglada-Escudé, L. Ribas: Epigenetic and physiological alterations in zebrafish subjected to hypergravity, PLoS One, 19, 5, e0300310, 2024.
- 5) I.V. Ogneva: Single cell in a gravity field, Life (Basel), 12, 10, pp.1601-1619. 2022.
- 6) C. Fu, D. Jain, J. Costa, G. Velve-Casquillas, P.T. Tran: mmb1p binds mitochondria to dynamic microtubules, Curr Biol., 21, 17, pp.1431–1439, 2011.
- 7) I. Hagan, A.M. Carr, A. Grallert, P. Nurse: Fission Yeast: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2016.
- 8) A. Hayashi, D.Q. Ding, C. Tsutsumi, Y. Chikashige, H. Masuda, T. Haraguchi, Y. Hiraoka: Localization of gene

products using a chromosomally tagged GFP-fusion library in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Genes Cells, 14, 2, pp.217–225, 2009.

- 9) A. Vještica, M. Marek, P.J. Nkosi, L. Merlini, G. Liu, M. Bérard, I. Billault-Chaumartin, S.G. Martin. A toolbox of stable integration vectors in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J Cell Sci., 133, 1, jcs240754, 2020.
- P. Martínez, P.O. Ljungdahl: The SHR3 homologue from *S. pombe* demonstrates a conserved function of ER packaging chaperones, J. Cell. Sci., 113, 23, pp.4351–4362, 2000.
- 11) T. Soto, A. Núñez, M. Madrid, J. Vicente, M. Gacto, J. Cansado: Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Microbiology, 153, 5, pp.1519–1529, 2007.
- 12) L.B. Persson, V.S. Ambati, O. Brandman: Cellular control of viscosity counters changes in temperature and energy availability, Cell, 183, 6, pp.1572–1585, e16, 2020.
- R.R. Daga, F. Chang F: Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane, Proc Natl Acad Sci U S A., 102,23, pp.8228–8232, 2005.
- 14) R. Jajoo, Y. Jung, D. Huh, M.P. Viana, S.M. Rafelski, M. Springer, J. Paulsson: Accurate concentration control of mitochondria and nucleoids, Science, 351, 6269, pp.169–172, 2016.
- A.C. Leite, V. Costa, C. Pereirax: Mitochondria and the cell cycle in budding yeast, Int J Biochem Cell Biol., 161, 106444, 2023.
- 16) N. Krüger, I. M. Tolić-Nørrelykke: Association of mitochondria with spindle poles facilitates spindle alignment, Curr Biol., 18, 15, pp.R646–R647, 2008.