

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; 高橋, 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

研究論文

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。18,800 G 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トンパク質を 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ため、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

表1. 本研究で使用した分裂酵母株

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

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变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, 3 G 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、1,000 G 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で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。

$$\text{遠心加速度} = 1,118 \times \text{回転半径(cm)} \times \text{回転速度}^2 \text{ (rpm)} \times 10^{-8}$$

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	⇔	18,800 G
12,500 rpm	⇔	13,100 G
10,000 rpm	⇔	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ティングし、1.5 μ l 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°C で 90 min 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 50 ml のコンカルチューブに戻し、26°C で 30~120 min 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 1.5 ml とり、遠心機にかけ集菌 (15,000 rpm, 1 min, 26°C) 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、5 μ m 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 2 μ m 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 5 μ m 以下の「短め」のスピンドル微小管を S.S. 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°C 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

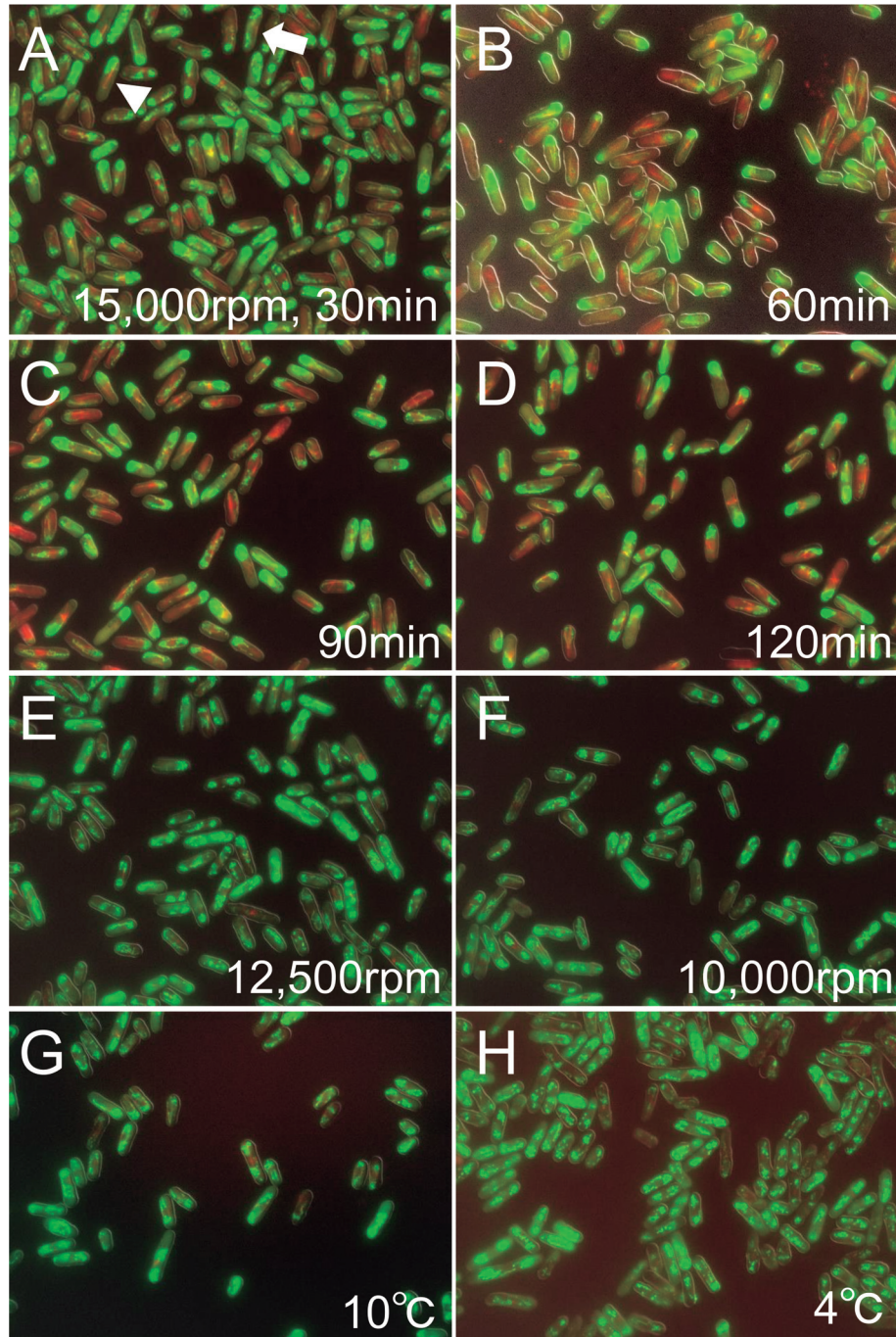


図1 遠心時間，遠心力，温度を変えた遠心培養におけるミトコンドリア偏在化
 遠心力 15,000 rpm，温度 26°C で，遠心時間は 30 min (A)，60 min (B)，90 min (C)，
 120 min (D)．遠心時間 30 min，温度 26°C で，遠心力は 12,500 rpm (E)，10,000 rpm
 (F)．遠心力 15,000 rpm，遠心時間 30 min で，温度は 10°C (G)，4°C (H)．緑：
 Cox4-GFP，赤：mCherry-Atb2．使用株は CY132．

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 割の細胞で明確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る.

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

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

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 合成経路に参与する酵素
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	Lifectact	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

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⁸⁾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⁹⁾。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

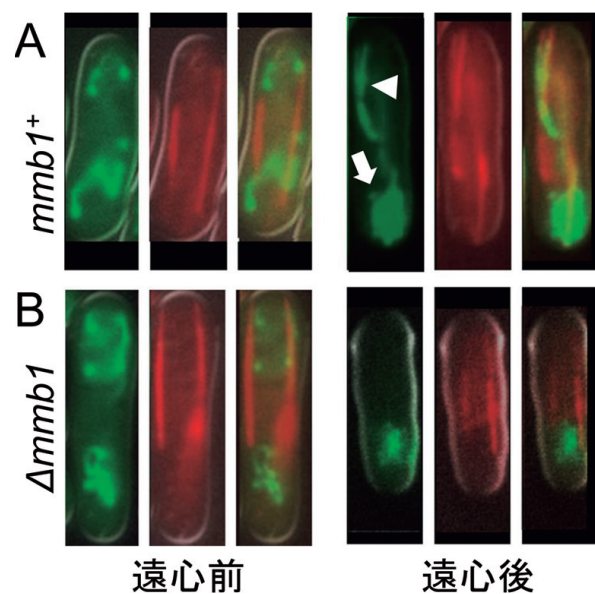


図2 過重力環境のミトコンドリアと間期微小管構造への影響

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, $\Delta mmb1$, 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

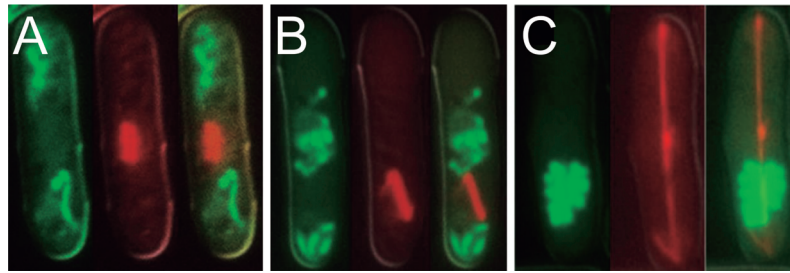


図3 過重力負荷のミトコンドリアとスピンドル微小管への影響
遠心前(A)と遠心直後(B, C)の野生株細胞 (CY132). 緑: ミトコンドリア (Cox4-GFP), 赤: 微小管 (mCherry-Atb2), 遠心条件は 15,000 rpm, 26°C. B は 90 min 遠心後の短いスピンドル微小管をもつ細胞, C は 60 min 遠心後の長いスピンドル微小管を持つ細胞.

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 Mmb1 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 $\Delta mmb1$ 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 $\Delta mmb1$ 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 $\Delta mmb1$ 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

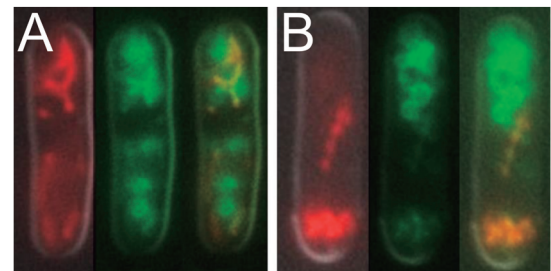


図4 過重力負荷の液胞への影響
遠心前(A)と遠心直後(B)の野生株細胞 (SP319). 遠心条件は 15,000 rpm, 90 min, 26°C. 赤: ミトコンドリア (Cox4-RFP), 緑: 液胞 (Abc4-GFP).

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

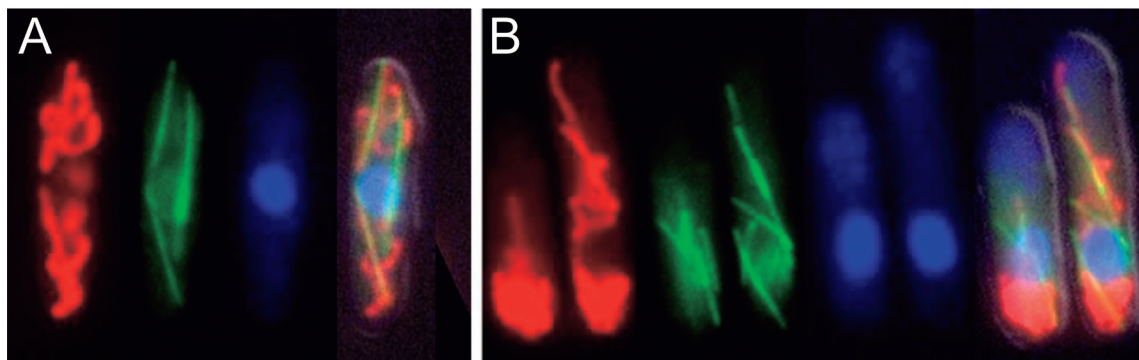


図5 過重力負荷の間期核の細胞内配置への影響

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°C. 緑: 微小管 (GFP-Atb2), 赤: ミトコンドリア (Cox4-RFP), 青: 核 (NLS-BFP).

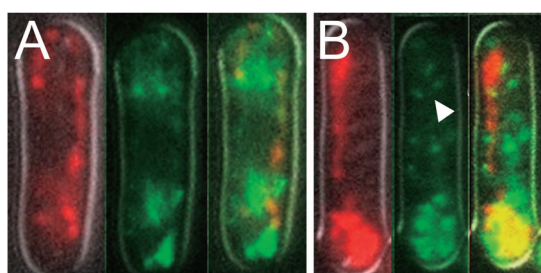


図6 過重力負荷のゴルジ体への影響

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°C. 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つ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

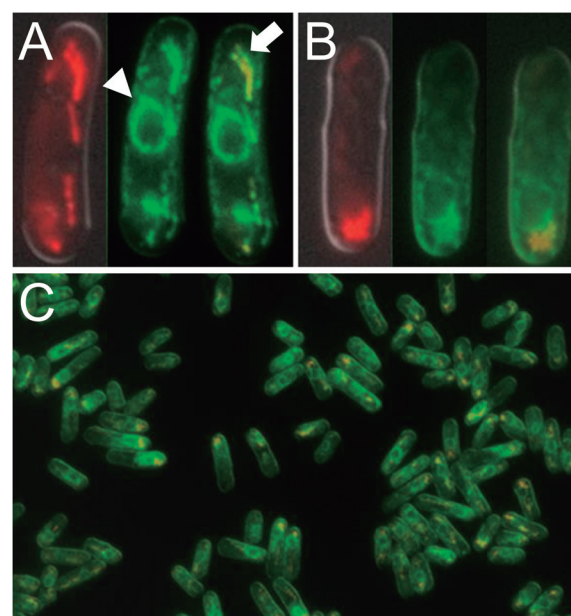
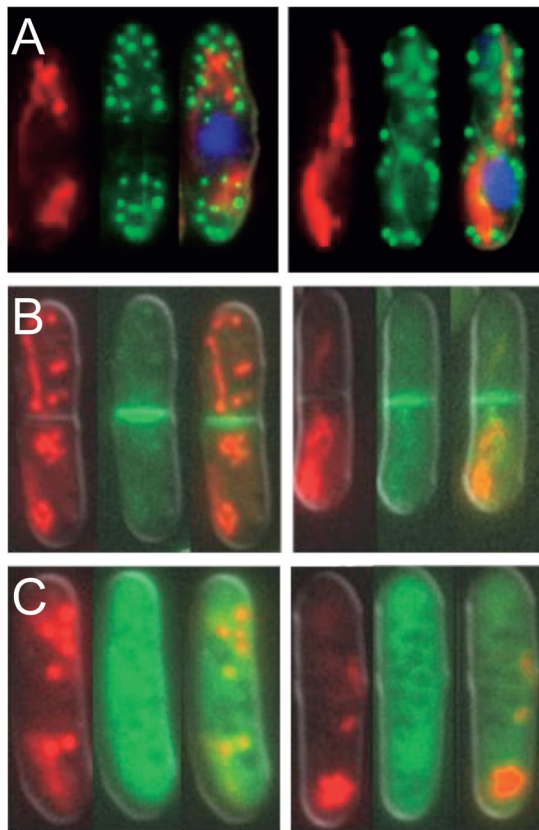


図7 過重力負荷の小胞体 (ER) への影響

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°C. 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°C. 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(〜2,900 G)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⁾。分極パ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 $\Delta mmb1$ 株で測定した。いずれの細胞株においても、26°C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°Cの EMM2 振とう培養の平均的な倍加時間(〜4 hr)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°Cのイン

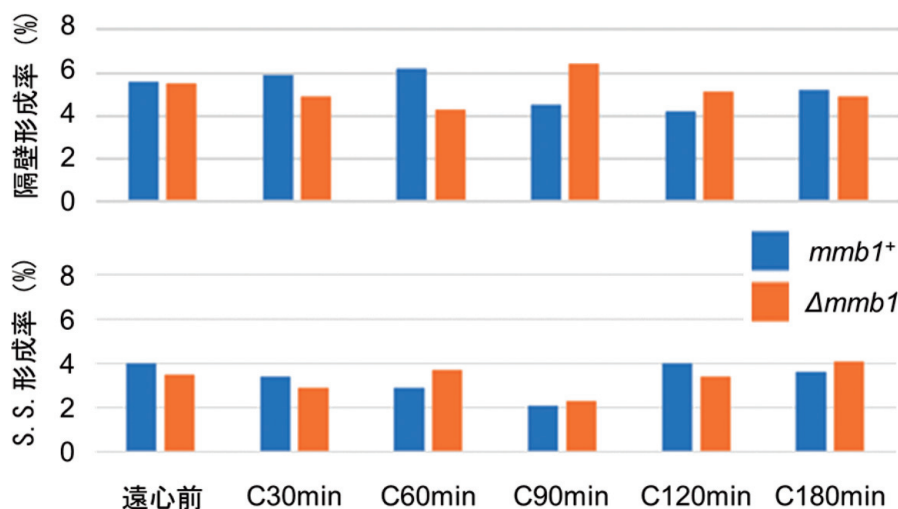


図9 過重力環境下におけるスピンドル微小管および隔壁形成率
EMM2 培地中, 15,000 rpm, 26°Cで 30 min~180 min 遠心培養した野生株細胞（青：*mmb1*⁺, CY132）と *mmb1* 遺伝子破壊株細胞（オレンジ： $\Delta mmb1$, NS135）の隔壁形成率(上)と短めのスピンドル (S.S.) 微小管形成率(下). C は遠心時間 (min).

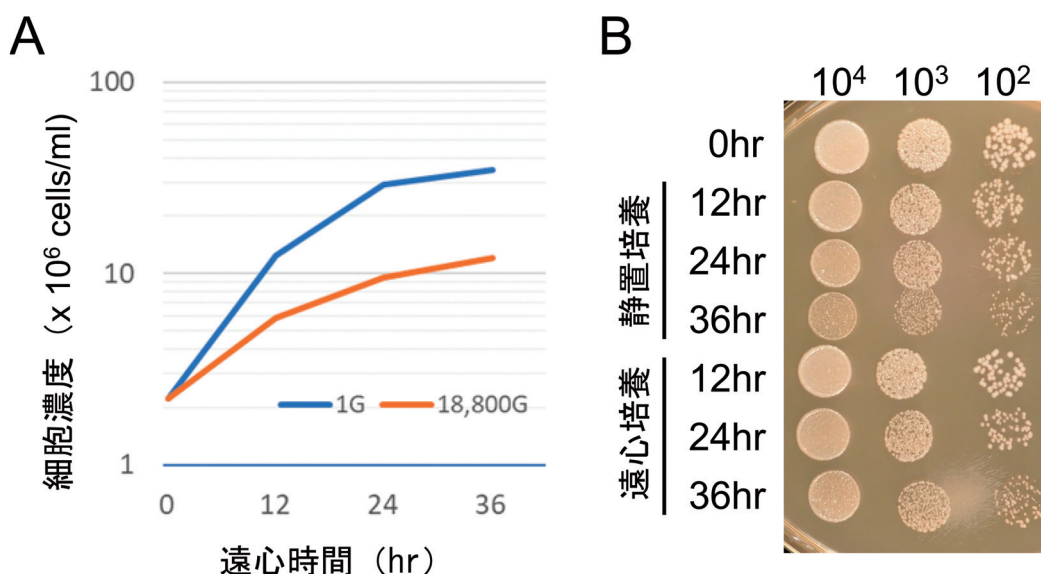


図10 長時間の過重力環境下における細胞増殖率と生存率
対数増殖期初期の野生株細胞 (SP590) を EMM2 液体培地中 26°Cで静置培養（青, 1 G）および遠心培養（オレンジ, 18,800 G）し, 12 hr ごとに細胞濃度(A)と細胞生存率(B)を測定した. 生存率は, YPD 培地に 10⁴ 細胞, 10³ 細胞, 10² 細胞ずつ希釈してスポット, 遠心実験前 (0 hr) から 26°Cで 4 日間培養してコロニー形成能を比較した.

キュベータで静置培養した細胞を用いた. 2×10^6 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, 12 hr 後にすでに対数増殖期末期に相当する 1×10^7 cells/ml の細胞濃度に到達しており, 以降の 24 hr および 36 hr 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, 18,800 G の超重力下では, 明らかに細胞の平均分裂速度が低下し, 12 hr 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).

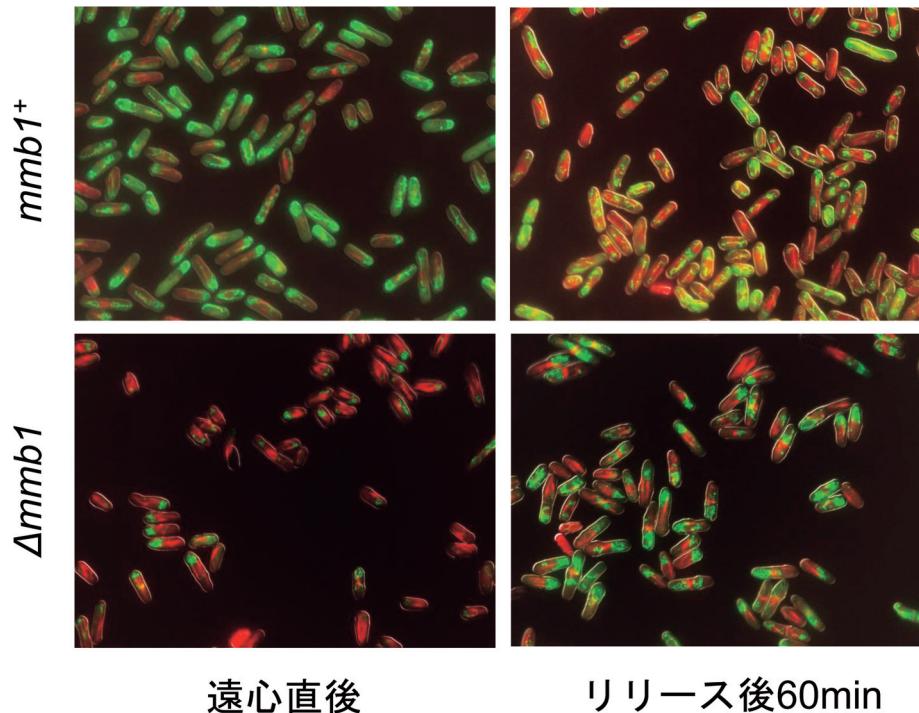


図 11 過重力負荷からリリースした細胞のミトコンドリア
遠心直後（左パネル）と遠心からリリースして 60 min（右パネル）の野生株細胞（上パネル, *mmb1*⁺, CY132）と *mmb1* 遺伝子破壊株細胞（下パネル, $\Delta mmb1$, NS135）。緑：ミトコンドリア（Cox4-GFP）、赤：微小管（mCherry-Atb2）。

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 $\Delta mmb1$ 株 (NS135) の細胞を 15,000 rpm, 90 min, 26°C 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、 $\Delta mmb1$ 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 $\Delta mmb1$ 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 $\Delta mmb1$ 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る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。遠心中也細胞増殖・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

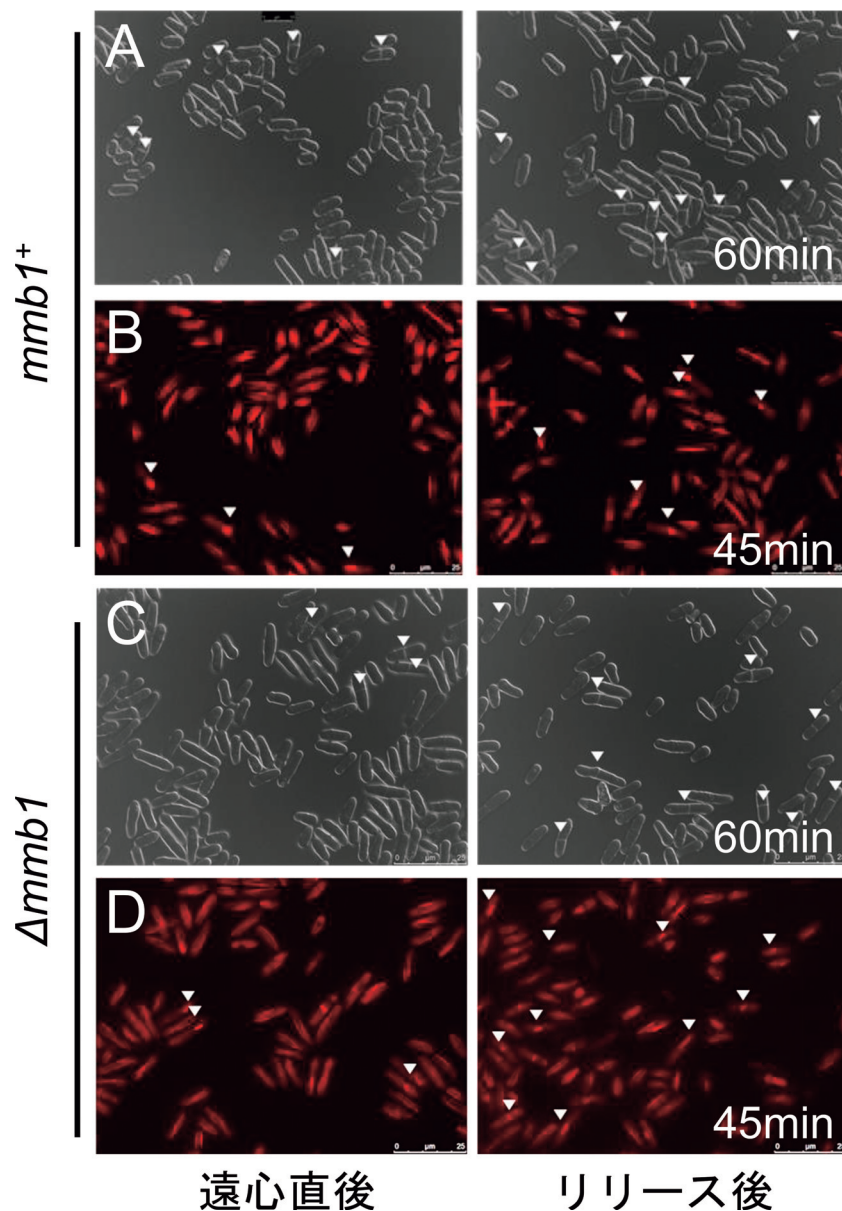


図 12 過重力負荷からリリース後の細胞の M 期遅延

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°C.

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°C の遠心では、15,000 G の

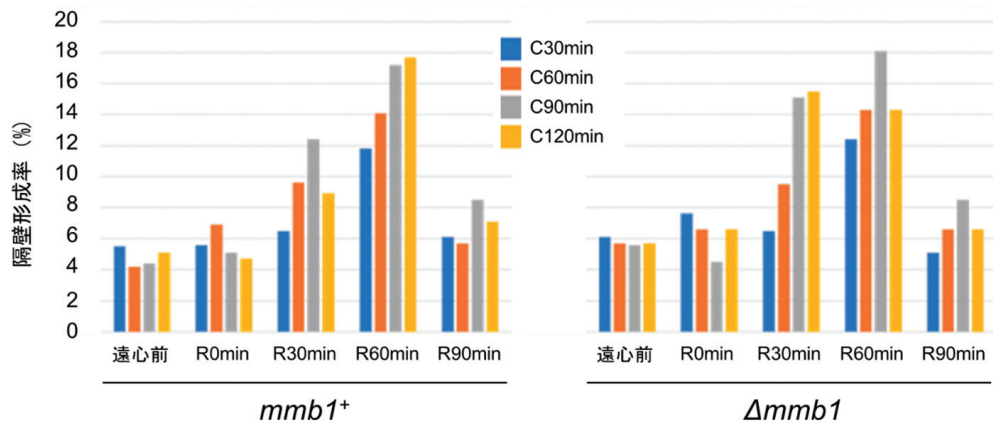


図 13 過重力負荷からリリース後の分裂酵母細胞の隔壁形成率
使用株は野生株（左, CY132）と $\Delta mmb1$ 株（右, NS135），C は遠心時間（min），R は遠心後に正常培養へ移してから経過時間（min）．遠心条件は 15,000 rpm, 26°C.

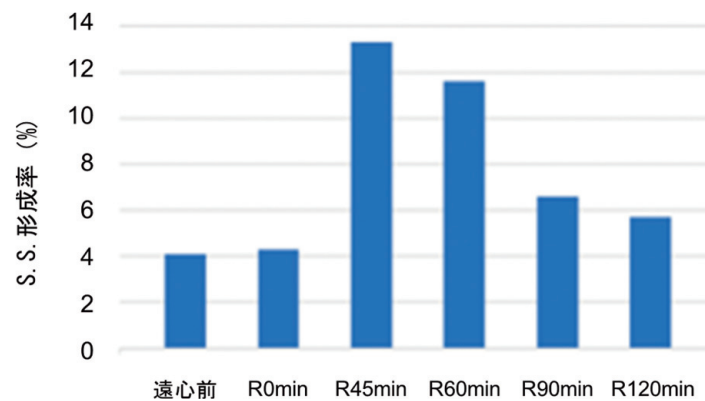


図 14 過重力負荷からリリース後の野生株細胞の短めのスピンドル（S.S.）微小管形成率
使用株は CY132, R は遠心後に正常培養へ移してから経過時間（min）．遠心条件は 15,000 rpm, 90 min, 26°C.

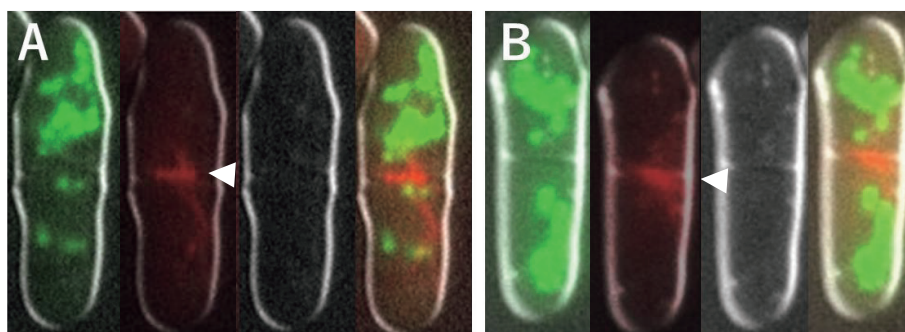


図 15 過重力負荷からリリース後に現れる奇妙な微小管構造
野生株（CY132），90 min 遠心後 60 min リリースした細胞．緑：ミトコンドリア（Cox4-GFP），赤：微小管（mCherry-Atb2）．隔壁の入りかけている細胞（A），隔壁のある細胞（B）．

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い。

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に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の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 ($\Delta mmb1$) を利用した。*Mmb1* の発見者であるFuらは論文の中で、*Mmb1* 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 3~5 G 程度ま

での加速を実現できるが、日常生活で 10 G 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 28 G 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 $10^4 \sim 10^5$ 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、 $F = mg = 10^{-13} \text{ kg} \times 9.8 \text{ m/s}^2 \div 1 \text{ pN}$ 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、 $1 \text{ Da} = 1.66054 \times 10^{-24} \text{ g}$ なので、例えば 100 kDa の少し大きめのタンパク質 1 個の重さは、 $m = 100 \times 1000 \text{ Da} = 10^5 \text{ Da} = 1.66 \times 10^{-19} \text{ g} = 1.66 \times 10^{-7} \text{ pg}$ となる。それにかかる力 F は $F = mg = 1.66 \times 10^{-7} \text{ pg} \times 9.8 \text{ m/s}^2 \div 1.6 \times 10^{-6} \text{ pN}$ なので、ミトコンドリア 1 個に働く力 1 pN よりもおおよそ $10^5 \sim 10^6$ 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 $10^4 \sim 10^5$ 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 10^6 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 1 pN と 0.1 μN 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°C 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 Sty1 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 6 μm 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 10⁴ G 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の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 60 min 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、 $\Delta mmb1$ 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、Mmb1 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 $\Delta mmb1$ 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ない細胞はほとんど生じないようであるが、 $\Delta mmb1$ 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、この遅延が起き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 $\Delta mmb1$ 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、宿主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は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】

- 1) 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.
- 10) 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.
- 13) 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.
- 15) 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.