

氏 名 藤井 謙

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2419 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 A study on the spacing between the centrosomes

論文審査委員 主 査 澤 齊

遺伝学専攻 教授

鐘巻 将人

遺伝学専攻 教授

仁木 宏典

遺伝学専攻 教授

島本 勇太

遺伝学専攻 准教授

谷本 博一

横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科  
准教授

(様式3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full: Fujii, Ken

Title: A study on the spacing between the centrosomes

The centrosome is a major microtubule-organizing center in animal cells. The position of the centrosome inside the cell is important for the cell's functions. Multiple centrosomes sharing a common cytoplasm are observed to position themselves by taking a certain distance among them. As a mechanism of this spacing between the centrosomes, a sliding of anti-parallel microtubules between the centrosomes using kinesin motor proteins has been known. The existence of an additional, kinesin-independent mechanism for the centrosome spacing has been suspected but uncharacterized. The characterization of the spacing mechanism between the centrosomes has been difficult because the cell nucleus and chromosomes are often located between the centrosomes and they hinder the investigation of the direct interaction between the centrosomes.

In this study, I addressed the mechanisms underlying the spacing activity between the centrosomes using the *Caenorhabditis elegans* embryo. Previous studies suggested that kinesins required for the known spacing mechanism in other species are not required for the spacing in the *C. elegans* embryo. To characterize the spacing mechanism in the *C. elegans* embryo, I developed a method to remove the chromosomes from the embryo to focus on the interaction between the centrosomes by excluding the effect from the cell nucleus and chromosomes. In the enucleated embryos, the space between the sister centrosomes increased after the centrosome duplication. The observation demonstrated that the enucleated *C. elegans* embryo is a good model to address the mechanisms underlying the spacing activity.

To investigate the mechanism of the spacing activity between the centrosomes, I searched for the genes required for the spacing activity in the enucleated *C. elegans* embryos. The cortical pulling force is a force generated by force generators at the cell

cortex. I first knocked down *gpr-1/2* genes, which are essential for generating the cortical pulling force. The knockdown impaired the spacing, but not completely. The result suggested that the cortical pulling force contributes to the spacing, but is not the sole driving force. Next, I knocked down *dhc-1* gene, which encodes the catalytic subunit of dynein motor protein. Without dynein, the centrosome spacing was almost completely impaired. In addition to the cortical pulling force, dynein generates “cytoplasmic pulling force”, which means the force to pull the microtubule and the centrosomes at the cytoplasmic locations such as intercellular organelles. Therefore, I inhibited both pulling forces simultaneously. Simultaneous inhibition impaired spacing of centrosomes as severe as *dhc-1* (RNAi). In conclusion, the cortical and cytoplasmic pulling forces provide major driving force for the spacing activity between the centrosomes, independent of the nucleus and chromosomes.

Next, I investigated the physical mechanism for the spacing between the centrosomes. As a mechanism to enable a pair of the centrosomes moving to different directions, I proposed the “pulling force competition model”. In this model, the multiple centrosomes compete for each of the force generators located in the cell cortex or cytoplasm, and the nearer centrosome has the greater chance to be pulled by the force generator. A numerical simulation reproduced the centrosome spacing in enucleated embryos. Importantly, the model reproduced the separation of the centrosome along the surface of the nucleus as well as the centration of the centrosome and associated nucleus in the 1-cell stage *C. elegans* embryos. These results collectively support the pulling force competition accounts for the centrosome spacing.

In addition to the mechanism of the centrosome spacing, I found an interesting behavior of the centrosomes in the enucleated *C. elegans* embryo when dynein is knocked down. My observations detected massive movement of the centrosomes, not for a while after the centrosome duplication but later at the cell cycle. I knocked down

a non-muscle myosin gene (*nmy-2*), which is required for cytoplasmic flow, together with *dhc-1*, the movement of the centrosomes was almost completely blocked. The result indicated that cytoplasmic flow can move the centrosomes even when the dynein function is impaired.

Finally, I also found an unexpected dynamic of the centrosomes in enucleated, dynein knocked down embryos. After the centrosomes are dispersed in the cytoplasm with the cytoplasmic flow, they assemble to come close to each other. The mechanisms underlying the novel assembly behavior are totally mysterious, and will be an interesting topic for future research.

In summary, I found a novel type of the spacing activity of the centrosome that depends on dynein. I propose the pulling force competition model for the spacing between centrosomes. In addition, I found a floating movement of the centrosome driven by the cytoplasmic flow. Finally, I found a mysterious assembly movement of the centrosome. My study characterized novel positioning behaviors and mechanisms of the centrosomes inside the cell in *C. elegans*, which should be applicable to other organisms.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 藤井 謙

Title  
論文題目 A study on the spacing between the centrosomes

中心体は細胞分裂に必須で、その細胞内位置は、分裂の方向、対称・非対称性などに重要である。中心体は微小管を介して様々な力を受けており、その総和によって位置が決まる。中心体は複製後に分離し、間隔を広げて、分裂期に紡錘体の両極を形成する。藤井さんは中心体にどのような力が働いて距離を広げるのか(spacing)に興味を持って研究を行った。これまでに中心体間に形成された逆平行微小管とキネシン 5 による力が関与することが示されている。加えて、中心体を引っ張る細胞表層ダイニン複合体の関与も指摘されているが、それがどのように複製した姉妹中心体の反対方向への移動に関与するかは謎であった。線虫 *C. elegans* の受精卵では、中心体の spacing にキネシン 5 が関与しないことが示されている。また細胞表層ダイニン複合体が、受精卵の極性化に伴う表層流に伴って移動することにより中心体が離れるモデルが提唱されているが、表層流がない細胞での spacing の機構は不明であった。

中心体と相互作用する核や染色体存在下では、それ以外から受ける力を解析することが困難である。そこで、藤井さんは、中心体 spacing の機構を明らかにするため、遺伝学的手法により、核・染色体を持たない受精卵（無核細胞）を作成し、中心体の挙動を観察した。無核細胞では細胞質分裂は完了しないが、細胞周期の進行に伴い中心体は複製を続け、spacing が起こることを発見した。特に、表層流が起こらないと想定される 2 細胞期（中心体が 4 個）において、中心体の挙動を定量的に解析した。通常胚では、複製後の中心体（姉妹中心体）は核膜に沿って移動し、spacing が起こる。無核細胞においても同様の速度で spacing が起こった。また姉妹ではない中心体間は常に姉妹中心体間の距離よりも離れており、spacing 機構が働いていることを示した。次に spacing を起こす分子としてダイニンを阻害すると spacing がほぼ完全に消失した。これに対し、中心体を引っ張る細胞表層ダイニン複合体を阻害したところ、中心体が離れる速度が顕著に低下したが、spacing は起こった。これに加えて、細胞質のオルガネラを足場にしたダイニンの機能に関与する分子 DYBR-1 も阻害すると、ダイニンの阻害と同様、spacing がほぼ消失した。以上の結果、中心体の spacing は、細胞表層のダイニンとオルガネラのダイニンの冗長的働きで制御されていることが明らかになった。

以上の結果を元に、藤井さんは spacing を起こすダイニンの働きを説明する数理モデル (pulling force competition model) を構築した。微小管に力を発揮するダイニンは表層や細胞質に一樣に局在し、二つの中心体から伸びる微小管はこれらに競合的に結合し、引っ張られる。この際、個々のダイニンと結合する確率は中心体との距離に依存する。つまり、ダイニンはより近い中心体を引っ張る確率が高い。このような仮定でシミュレーションを行うと、実際の無核細胞での観察と同様の速度で中心体の spacing が起こった。また、ダ

イニンなどの阻害実験の結果も再現することができた。

本研究は、キネシン5に依存しない中心体の挙動を説明する重要な発見である。特に、複製直後で姉妹中心体が近接している場合でも、ダイニンの発揮する力だけで中心体が離れていくことを説明できたことは驚きに値する。またキネシン5が関与する場合においても、ダイニンによる力も中心体の挙動に関与するため、藤井さんが提唱する **pulling force competition model** は普遍的に使われる可能性がある。以上のことから藤井さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。