

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07031

研究課題名(和文)細胞抽出液を用いた細胞モデルの構築と運動・分裂の再現

研究課題名(英文) Construction of cell model using cell extracts and motility and division of the model

研究代表者

馬淵 一誠 (Mabuchi, Issei)

東京大学・大学院総合文化研究科・名誉教授

研究者番号：40012520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞や酵母の細胞質分裂を担う収縮環の形成機構を研究するためのモデル系を創出し、それを用いたアクチン動態の研究を行った。カエル卵細胞質を脂質膜に封入した「人工細胞」の中ではX-bodyと呼ばれる構造が形成され、これに向かってアクチン流れが起こった。流れは脂質膜でのアクチンの重合/脱重合によって起こり、ミオシン繊維によって制御された。また流れに共役してこの人工細胞が動くことが分かった。分裂酵母の細胞質を同様に封入した場合はアクチンが重合して束を形成した。またこれらの研究と別に、分裂酵母のアクチン脱重合因子Adf1が収縮環形成に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1つの細胞が分裂して2つになる細胞分裂は生命の基本的な活動であり、その解明は細胞生物学の主要課題の一つである。しかし細胞質分裂のメカニズムには不明な点が多い。本研究はその新たな研究手段として人工細胞を用いようというもので、学術的意義は大きい。また細胞質分裂については一般にあまり知られていない。しかしヒトの体では細胞質分裂の失敗によりがん細胞が生ずる例は多い。本研究は、いずれはがん細胞の生成を抑えるための知識を提供できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：A cell model by which we can study mechanism of contractile ring formation in mammalian and yeast cells was created, and the actin dynamics in the cell model was investigated.

In an artificial cell which was created by encapsulation of frog egg cytoplasm into a lipid membrane vesicle, a structure called X-body was formed and actin flowed toward it. This flow occurred by actin polymerization at the lipid membrane and depolymerization near the X-body, and was regulated by myosin filaments. It was found that this artificial cell migrated being coupled with the actin flow. When cytoplasm from fission yeast cells was encapsulated in the lipid membrane, actin polymerized into filaments and the filaments formed bundles in this artificial cell.

Aside from the above study, we revealed that the actin-depolymerizing factor Adf1 was involved in formation of the contractile ring in fission yeast.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞骨格 細胞膜 細胞分裂 人工細胞 アクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞質分裂の研究は主として分裂溝に局在するタンパク質の生化学的研究とそのタンパク質の細胞内での発現を抗体の顕微注入、RNA 干渉で抑制、また、そのタンパク質の遺伝子破壊や変異などで抑えたときに細胞質分裂がどう影響されるか、収縮環が形成されるかどうか、という手法によって行われてきた。このような中で我々は、新しい研究手法を開発するため、生きた細胞質を人工脂質膜に閉じ込めた「人工細胞」を作成する研究を開始した。

(2) 収縮環の形成にはさまざまなアクチン調節タンパク質が働いているが、アクチン脱重合活性をもつ ADF (分裂酵母では Adf1) が収縮環形成に働いているという結果 (Nakano & Mabuchi 2006) は不思議な結果であり解明が待たれていた。また分裂酵母で、微小管に働くはずのキネシンの一つが分裂溝に局在するという報告があり、もしかすると今まで見逃されていた分裂必須因子である可能性が考えられた。そのため、詳しい解析が待たれていた。

2. 研究の目的

(1) 生きた細胞質を封入した脂質膜小胞は「人工細胞」の一種であるが、ここではドロップレットと呼ぶ。ドロップレットに様々な条件を与えて細胞分裂のように自発的に分裂するようになれば、この実験系を利用して細胞分裂に必要な因子を見出すことができる。これが本研究の最終目標だが、我々はドロップレットの中でアクチンの流れが起こることを発見した。まずはその要因と流れの性質を解明する。

(2) 分裂酵母のアクチン脱重合因子 Adf1 は分裂溝に局在し、その発現を抑えると細胞質分裂が妨げられる。Adf1 の細胞質分裂における役割を明らかにするため、どのような時期に働いているか、その時、収縮環形成はどのような状況にあるかを突き止める必要がある。

また分裂酵母のキネシンの一つ Klp 8 は分裂溝に局在するがその役割は不明である。そのためその発現量を変えると何が起こるか、Klp8 と微小管の関係はどうなっているのかを調べ、その役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵や分裂酵母の細胞質を単離し、脂質を溶かしたオイル中で分散させて人工脂質膜に包まれた細胞質ドロップレットを作成する。このとき蛍光標識アクチンや同ミオシンを加えておけばこれらのタンパク質を可視化できる。またアクチン、ミオシンの阻害物質を加えて、その影響を見ることもできる。観察は共焦点蛍光顕微鏡と全反射蛍光顕微鏡を用いる。

(2) 分裂酵母の Adf1 の温度感受性分裂変異株 *adf1-1* を利用し、このタンパク質が収縮環形成のどの段階で働いているかを決定する。また分裂酵母の Klp 8 の遺伝子破壊や過剰発現を行って、その働きを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ツメガエル卵抽出液を含むドロップレットの内部に、数分で DIC 顕微鏡で観察可能な凝集体 (X-body と呼ぶ) が形成され、これに向かってアクチンの流れが観察された。この流れは脂質膜でのアクチンの重合とドロップレット近傍での脱重合によって起こっていた。アクチン

重合を促進するタンパク質フォルミンや Arp 複合体の阻害剤はアクチンの流れを阻害した。ツメガエル卵のミオシンに対する特異抗体やミオシン ATPase 阻害剤プレピスタチンも流れを阻害した。一方、微小管阻害剤は流れに影響しなかった。X-body にはアクチン、ミオシン、ミトコンドリア、ER が局在していた。また脂質膜の断片がエンドサイトーシスのように細胞質に取り込まれて X-body 付近に蓄積することも見られた。その速度はアクチンの流れの速度に近いものだった。X-body の形成初期には X-body は膜近傍に偏在し、そこに向かってアクチンが流れると、同時に流れと反対方向にドロップレットそのものが移動した。この運動はこれまでに報告されている魚類の鱗上に存在するケラトサイトの運動に似ており、この運動時にドロップレット表面に生ずる力はケラトサイトの運動時に発生している力より大きかった。これらの結果から、おそらく世界で初めて、自発的に運動する「人工細胞」の作成に成功したと言える。この人工細胞中で分裂装置を形成できれば、今後細胞質分裂の研究に利用できる。またこの実験系はエンドサイトーシスの研究にも使えると考えられる。

(2) 分裂酵母の抽出液を調製し、(1)と同様に細胞質ドロップレットを作製した。このドロップレット中ではアクチンが繊維へと重合し、繊維が束化してランダムな繊維束を形成した。興味深いことにドロップレットの直径が細胞と同程度の数 μm の場合に、内部にアクチンのリング構造が観察された。アクチンが収縮環のようにリングになるために、人工細胞の大きさという物理的要因を考慮しなければならない可能性を示唆した。

(3) 分裂酵母の Adf1 の温度感受性変異株 *adf1-1* の培養温度を制限温度 36 度にシフトすると、3 分以内に変異 Adf1 が失活することが分かった。この性質を利用してまず、間期に細胞端に多いアクチンパッチが分裂前に壊れる過程に Adf1 が働いていることが分かった。次に収縮環形成に働く時期を調べたところ anaphase B であった。アクチンパッチが壊れて生じた G-アクチン(アクチンモノマー)はミオシン 2 とミオシン 5-1 の働きで分裂位置に運ばれ、そこでおそらくフォルミン Cdc12 の働きで再重合する。Adf1 はこのアクチン繊維を切断し、繊維端を増やすことによって、加速度的に重合を促進し、収縮環への再編成をひき起こすと考えられた。

(4) Klp8 は遺伝子破壊によってはっきりした表現型がでなかったが、マイトーシスを促進する働きは認められた。分裂溝への局在については、初期には確かに収縮環アクチンと共局在するように見えるが、後期以降には収縮環とは局在がずれることがわかった。過剰発現によって微小管の安定化が起こったので、微小管に作用していると思われる。

<引用文献>

Nakano, K. & Mabuchi, I. Actin-depolymerizing protein Adf1 is required for formation and maintenance of the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 17, 2006, 1933-1945.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Ueda, E., Kashiwazaki, J., Inoué, S. & Mabuchi, I.: Fission yeast Adf1 is necessary for reassembly of actin filaments into the contractile ring during cytokinesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、506, (2018), 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.156>

Santella, L., & Mabuchi, I.: Special Issue: Actin cytoskeleton dynamics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読無、506, (2018), iii-iv. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.027>

馬淵一誠、宮崎牧人、石渡信一、村田隆：
「分身を作る細胞分裂 Part1 細胞分裂：細胞をちぎる不思議なリングのしくみ。」 細胞と生命 (Newton 別冊) 査読無、ニュートンプレス、(2017), 66-79、<https://www.newtonpress.co.jp>

馬淵一誠、宮崎牧人、石渡信一、村田隆：「細胞分裂の不思議 第1回 細胞はいかにして二つに分裂するのか」ニュートン、査読無、37、(2017), 82-95、<https://www.newtonpress.co.jp>

〔学会発表〕(計 29 件) (*は招待講演)

・ *Mabuchi, I.: Role of ADF/cofilin in fission yeast cytokinesis.
OIST Seminar (OIST, 2019.3.20)

・ *Mabuchi, I.: Actin dynamics in cytoplasm isolated from frog oocytes.
The 16th International Membrane Research Forum (OIST, 2019.3.18-20)

・ 植田英一、柏崎隼、井上紗貴、馬淵一誠：分裂酵母の細胞質分裂における Adf1 の働き。
生体運動研究合同班会議 (福岡大学、2019.1.5-7)

・ 野田直紀、馬淵一誠：*Xenopus* 卵細胞質を封入した小胞を使った細胞運動の研究。
生体運動研究合同班会議 (福岡大学、2019.1.5-7)

・ 植田英一、柏崎隼、井上紗貴、馬淵一誠：分裂酵母の細胞質分裂における Adf1 の働き。
第13回細胞運動研究会 (早稲田大学、2018.9.20)

・ 野田直紀、馬淵一誠：*Xenopus* 卵細胞質を使った細胞運動の研究。
第13回細胞運動研究会 (早稲田大学、2018.9.20)

・ Naoki Noda and Issei Mabuchi: Relationship between actin dynamics and an aggregate-formation process in *Xenopus* oocyte cytoplasmic droplet.
第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 (東京・船堀、2018.6.5-8)

・ 上条桂樹、加藤薫、高橋正行、馬淵一誠、細谷浩史、藤原敬宏、原田慶恵：超解像顕微鏡で探る哺乳動物細胞の収縮環形成機構。生体運動合同班会議 (2018.1.5-7, 東京)

・ 野田直紀、馬淵一誠：*Xenopus* 未受精卵の細胞質を封入した小胞中でのアクチン・ミオシンのダイナミクス。生体運動合同班会議 (2018.1.5-7, 東京)

・ 加藤薫、上条桂樹、高橋正行、馬淵一誠、藤原敬宏、原田慶恵、細谷浩史：超解像顕微鏡で観察した収縮環の構造と分子機構。第69回日本細胞生物学会大会 (2017.6.15, 仙台)

11. *M. Mishra, M. T. Swulius, L. T. Nguyen, S. Aiech, J. Kashiwazaki, T. Srinivasan, M. K. Balasubramanian, I. Mabuchi, G. Jensen: Sculpting the ring to make a cut: contractile ring structure and mechanism of cell division.
第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム (2017.6.14, 仙台)

12. *N. Noda, I. Mabuchi: Actin dynamics in *Xenopus* egg cytoplasmic droplet and its migration. 第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム (2017.6.14, 仙台)

13. *K. Kamijo, K. Kato, M. Takahashi, I. Mabuchi, H. Hosoya, T. Fujiwara, Y. Harada: Dissecting the molecular mechanism of the contractile ring formation in mammalian cells by super resolution microscopy.
第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム (2017.6.14, 仙台)

14. 加藤薫、上条桂樹、田中みなみ、高橋正行、藤原敬宏、原田慶恵、馬淵一誠、細谷浩史：STED 観察により収縮環の形成メカニズムを考える。生体運動合同班会議 (神戸、2017.1.6-8)

15. 細谷夏実、馬淵一誠：ウニ卵分裂溝におけるミオシンの局在：超解像顕微鏡を用いた検討。生体運動合同班会議 (神戸、2017.1.6-8)

16. Katoh, K., Kamijo, K., Tanaka, M., Takahashi, M., Mabuchi, I., Hosoya, H.: Measurement and analysis of contractile ring observed with STED and SIM.

第 54 回日本生物物理学学会年会 (つくば、2016.11.25-27)

17. *Mabuchi, I.: Mechanism of cytokinesis: from old story to new approaches.
TIFR Seminar (Tata Inst. Fund. Res., Mumbai, 2016.11.11)

18. 細谷夏実、馬淵一誠: ウニ卵分裂溝におけるミオシンの局在: 超解像顕微鏡を用いた検討。
日本動物学会第 87 回大会 (沖縄、2016.11.17-19)

19. 遠藤彩香、関根彩子、小林礼、柏崎隼、馬淵一誠: 分裂酵母 Cyclase-associated protein(CAP) のアクチン動態における役割。生体運動合同班会議 (京都、2016.1.8-10)

20. 吉原壯悟、今村巴恵、野田直紀、柏崎隼、馬淵一誠: 脂質膜小胞に封じ込めた分裂酵母細胞質中のアクチン細胞骨格。生体運動合同班会議 (京都、2016.1.8-10)

21. 細谷夏実、馬淵一誠: ウニ卵 formin/Diaphanous の細胞質分裂における局在。
日本動物学会第 86 回大会 (2015.9.17-19 新潟)

22. *野田直紀、馬淵一誠: Actin flows in *Xenopus* egg extract confined in oil and generates a force for migration of the extract.
日本生物物理学学会第 53 回年会シンポジウム (金沢、2015.9.13-15)

23. 柏崎隼、馬淵一誠: 分裂酵母スフェロプラストの分裂溝進行メカニズム。
酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会 (広島大学、2015.8.31-9.2)

24. 細谷浩史、加藤薫、上条桂樹、高橋正行、馬淵一誠、立花太郎、細羽康介、濱生こずえ: 細胞分裂時におけるミオシン II 調節軽鎖の役割。第 57 回日本平滑筋学会総会シンポジウム「ミオシン軽鎖リン酸化研究の新展開: 循環器研究からシステム生物学へ」(山口大学、2015.8.27)

25. 野田直紀、馬淵一誠: *Xenopus* 卵抽出液を封入した脂質膜小胞はアクチンの動態と共役して運動する。第 67 回日本細胞生物学会大会 (船堀・東京、2015.6.30-7.2)

26. Kashiwazaki, J., Mishra, M., Mabuchi, I.: Behavior of proteins during the contractile ring contraction in the *S. pombe* cell-ghost. The 8th International Fission Yeast Meeting (Kobe, 2015.6.21-26)

27. 関根彩子、小林礼、柏崎隼、植田英一、馬淵一誠: 分裂酵母の Cyclase-associated protein (CAP) の低グルコース環境への適応における役割。
第 67 回日本細胞生物学会大会 (船堀・東京、2015.6.30-7.2)

28. 野田直紀、馬淵一誠: *Xenopus* 卵抽出液を封入した人工脂質膜小胞中でのアクチンの動態と小胞の運動。第 5 回分子モーター討論会 (東大駒場、2015.6.13)

29. *Mabuchi, I.: Novel approaches to study mechanism of cytokinesis in animal cells.
OIST Seminar (2015.4.22, OIST 沖縄)

[図書] (計 3 件)

馬淵一誠: "細胞質分裂" 動物学の百科事典、丸善 (執筆分担、2018.9)
A5 判、806P、ISBN:978-4-621-330309-2

Mabuchi, I., Kashiwazaki, J., & Mishra, M.: *In vitro* reactivation of the cytokinetic contractile ring of fission yeast cells. *In Methods in Cell Biology*, 137 "Cytokinesis" (ed. by Echard, A., Elsevier), 2017, pp. 387-394. ISBN: 978-0-12-809673-4; ISSN 0091-679X,
<http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.03.037>

馬淵一誠:「細胞生物物理学者への道 井上信也自伝」, 青土社 全 373 ページ (監訳、2017.7)
ISBN:978-4-7917-6999-5

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

シンポジウムオーガナイザー：

馬淵一誠：

第 69 回日本細胞生物学会シンポジウム「新たな視点による細胞質分裂のメカニズム研究の新展開」(2017.6.14, 仙台)

馬淵一誠、石渡信一：

第 53 回日本生物物理学会年会シンポジウム「細胞を診て操作する生物物理的アプローチ (New Biophysical Approaches to Explore and Manipulate Cells)」(2015.9.13-15、金沢)

ジャーナル編集：

I. Mabuchi, F. Chang, M-G. Giansanti: Research Topic “Cytokinesis”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Frontiers), 現在編集作業中。

Luigia Santella & Issei Mabuchi：

Special Issue: “Actin cytoskeleton dynamics”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, issue 2, pp. 307-421 (Elsevier, 2018. 11. 25)

新聞記事：

馬淵一誠：「悼む：「真理の探求者」貫ぬく 下村脩さん」毎日新聞朝刊 2018.12.24

博物館展示：

馬淵一誠：「團ジーン博士の位相差顕微鏡」国立科学博物館(パネル、キオスク) (2018.3.13より常設展示)

同、馬淵一誠:ムービー「團ジーン博士による先体反応の発見」(ムービー企画・監修)

同、馬淵一誠:ムービー「位相差顕微鏡で細胞を観る」(ムービー企画・監修)

(いずれも 2018.3.13 より常設展示)

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野田直紀、柏崎隼

ローマ字氏名：Naoki Noda, Jun Kashiwazaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。