

令和元年5月28日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07090

研究課題名(和文) 定量計測と数理モデル化による極性タンパク質の局在領域を決める分子・物理機構の解明

研究課題名(英文) Single-molecule analyses of PAR polarity proteins in *C. elegans* embryos

研究代表者

荒田 幸信 (Arata, Yukinobu)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：40360482

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)：進化的に保存された極性タンパク質PARタンパク質群の局在領域サイズを決定する機構を解明するために、1分子イメージングにより、膜上の拡散距離を計測した。拡散動態は卵の大きさを実験的に操作してもPAR-2の動態には顕著な変化は見られなかった。一方、二光子顕微鏡を用いて片側の中心体を破壊し星状紡錘体の卵内での位置を変化させると、極性タンパク質の領域サイズが変化した。本研究から、極性タンパク質の局在領域サイズは、極性分子の細胞内動態とマイクロチューブル構造体の相互作用によることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞極性タンパク質の非対称局在は、ナノメートルスケールの分子の衝突を基礎にして、マイクロメートル(細胞)スケールで形成される。物理パラメーターとして定義できるタンパク質動態を基礎に細胞現象である細胞極性を理解することは、「物質と生命」をつなぐ知見を提供する点で学術的な意義がある。また、物質により構成される生命現象を理解するための新しい視点を提供する点で社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：In order to understand mechanism for determining the area size of the localized region of the evolutionarily conserved polarity PAR proteins in polarized cells, we investigated the intracellular dynamics of PAR-2 and the role of the cytoskeleton. For analysis, wild-type embryos and RNAi embryos (*imb-5*, and *C27D9.1*) with increased or decreased size of *C. elegans* one-cell embryos were used. According to single molecule imaging, diffusion distance of PAR-2 on the membrane did show no significant change in large or small sized of embryos. On the other hand, using a two-photon microscope to destroy the centrosome on one side, we manipulated the position of the spindle in cells. In these manipulated embryos, the domain size of PAR-2 was significantly changed. These results revealed that the size of the localized region of polar protein is due to the interaction of the intracellular dynamics of the polarity proteins and the microtubule structure.

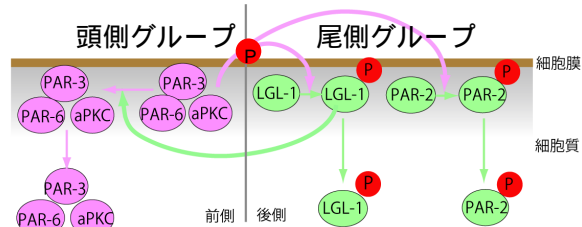
研究分野：発生生物学、生物物理学

キーワード：細胞極性 タンパク質動態 1分子イメージング 細胞骨格

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

1. 研究開始当初の背景

細胞極性タンパク質は、非対称分裂、細胞移動、上皮シート形成の際、特徴的な非対称局在を示す。非対称局在領域の大きさは、それぞれの細胞動態を実現する上で重要である。一例として、マウス卵母細胞において、極性タンパク質 PAR-3 が細胞膜上の非常に限られた領域に局在し、卵母細胞と極体の極端に大きさの異なる非対称分裂に関与している (Duncan et al. Dev. Biol. 2005)。線虫の受精卵の極性形成においては、PAR タンパク質群は、卵の将来の頭側または尾側にそれぞれ相補的に非対称に局在する。“頭側 PAR”および“尾側 PAR”グループ(上図)の局在は、リン酸化反応を介した「相互抑制反応」により維持される(上図)。これまでに、PAR タンパク質の局在領域が大きくまたは小さくなる、または断片化する変異体が同定されており、線虫胚は極性タンパク質の局在領域の決定機構を解析するための有用なモデル系となりうる。これまでの分子生物学的な解析によって、非対称局在を形成する定性的な機構は明らかになったが、局在領域サイズの比のような定量的な特性を決定する機構は不明である。システムの定量的な特性を決定する機構を明らかにするためには、生細胞内での極性タンパク質の動態計測、および計測値を評価するための数理モデルが必須である。



2. 研究の目的

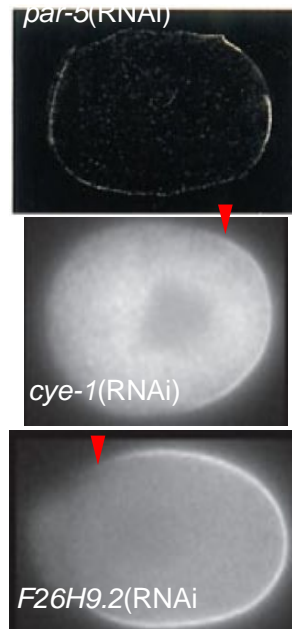
極性化した細胞において、極性タンパク質の局在領域サイズは厳密に制御されている。線虫卵の非対称分裂では、PAR タンパク質群は、将来の頭側と尾側の細胞膜上に相補的に局在し、卵長軸の赤道に境界を形成する。局在領域の大きさを決定する機構はわかっていない。本研究では、1分子イメージングおよび蛍光相関分光法を用いて極性タンパク質の動態を計測し、計測値に基づいて数理モデルを構築する。局在領域の大きさが異常になる既存の変異体も同様に計測し数理モデル化する。野生型と変異体における極性タンパク質動態および二つの数理モデルを比較することにより、局在領域サイズを決定する分子および物理メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

これまでに構築した1分子検出技術を用いて PAR-3 の動態を計測し、計測結果に基づいて数理モデルの構造およびパラメーターを決定する。PAR-3 の計測結果をこれまでに構築した数理モデルと統合し、2因子2成分の数理モデルを構築する。同様に、局在領域の大きさの比が異常になる変異体において、PAR-2 と PAR-3 の動態を計測し、数理モデルを構築する。野生型と変異体のタンパク質動態を比較し、変異体胚で欠損したタンパクが頭側または尾側 PAR のどちらの、どの動態を制御しているかといった極性タンパク質の動態制御の分子メカニズムを解明する。また、野生型と変異体の数理モデルを比較・解析し、非対称局在領域の大きさを決定する物理メカニズムを明らかにする。以上により、「分子の動態制御」と「細胞スケールのパターンの決定機構」の階層をつなぎ、極性タンパク質の局在領域の大きさを決定する分子的・物理的メカニズムを解明する。

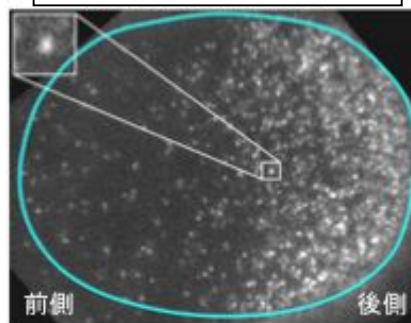
4. 研究成果

当初の計画では、ドメインサイズ決定機構を明らかにするために、局在領域サイズを決定するために重要なタンパク質動態である膜上の拡散距離である可能性を検討した。極性タンパク質の極性ドメインの大きさは細胞サイズに依存して変化することから、拡散速度を、正常胚と卵の大きさが変化する RNAi 胚において比較した。1分子イメージングによるタンパク質輝点の動きから、膜上の拡散距離を計測した。予想とは異なり、卵の大き



par-5(RNAi)では PAR-2 の局在領域が断片化する。cye-1(RNAi)では、PAR-2 の領域が縮小し、F26H9.2(RNAi)では

図2 PAR-2 の1分子輝点



受精卵の将来の後側に輝点が多い

さが変化しても PAR-2 の動態は、*cye-1*、*H26H9.2* では顕著な変化が見られなかった。この結果から、ドメインサイズの決定機構は予想していたより長い時間スケールで起こる細胞骨格系の形成メカニズムと関係がある可能性を考えた。アクチン骨格の分布も非対称局在することが知られている。受精卵サイズが大きくなるまたは小さくなる RNAi 胚（それぞれ *imb-5*、*C27D9.1*）で、アクチン繊維の挙動を観察した。これらの RNAi 胚では、極性形成期の終わりにアクチン分布領域の境界が野生型と異なり、卵の極性軸上の中央位置から顕著にずれていた。タイムラプス観察から、このずれの原因は卵サイズの違いによって、卵サイズに対するアクチン繊維の収縮移動距離が相対的に変化した為と考えられた。しかし、このズレは維持期になると速やかに解消され、野生型胚と同じ極性軸中央位置に変化した。特に、サイズの大きい胚では、極性軸上の中央位置から余分に張り出した領域だけが、維持期に入るとともに細胞膜上から一斉に解離した。このことは、アクチンの分布領域サイズは、アクチンの自律的制御というよりその他の因子の位置情報の下流で制御されていることを示唆する。この可能性を検討するために、この位置情報がチューブリン骨格系によって与えられる可能性を検討した。中心体から伸びる星状紡錘体は、卵の極性軸を二分するように極性軸両側に伸びていることから、局在領域サイズを決定するための位置情報になり得る。極性維持期の始めに、二光子顕微鏡を用いて片側の中心体を破壊し星状紡錘体の卵内での位置を変化させると、極性タンパク質の領域サイズが変化した。これらの結果は、極性タンパク質の局在領域サイズの決定には、アクチン骨格というよりもマイクロチューブル骨格が重要な働きをしていることを示している。この結果から、細胞サイズ依存性は、タンパク質の動態ではなく、より長い時間・空間スケールを持つ細胞骨格制御システムによって制御される可能性が高い。これまでの報告で、マイクロチューブルを短くすると極性ドメインの境界が不規則に極性軸中央から逸脱すること現象が報告されている（Ai et al. 2011）。極性タンパク質の非対称局在が細胞スケールで正確なサイズのパターンを展開するためには、非対称性そのものを構築する極性分子の細胞内動態と、マイクロチューブルによって構成される細胞スケールの構造体の相互作用していることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/coverartcandidate1/>

<https://sites.google.com/site/coverartcandidate1/slider-image>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。