

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14765

研究課題名(和文) RNA/タンパク質の一分子同時イメージング法を用いた細胞分裂機構の解明

研究課題名(英文) Imaging analysis of cytokinesis by the simultaneous detection method of RNA/protein at single-molecule level

研究代表者

竹内 雅宜 (Takeuchi, Masaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：00332271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の形態形成では、細胞分裂の制御は根源的かつ必須な現象である。本研究では、内在性 mRNA とタンパク質を同時に、ライブで一分子可視化できる新規蛍光検出法の開発に成功した。これにより、細胞分裂に機能する分子の mRNA およびタンパク質の時空間的な解析が可能となった。今後、細胞分裂の分子機構の全貌解明に向けて、本手法が十分貢献するものと期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物における、細胞分裂は根源的かつ必須な現象である。本研究では、細胞分裂に機能する分子の mRNA およびタンパク質の時空間的な制御を解析可能な新規蛍光検出法の開発に成功した。細胞分裂の時期や場所を規定するメカニズムを明らかにする学術的意義や社会的意義は非常に大きく、本手法もこの分野の研究進展に貢献するものと期待している。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic morphogenesis, the control of cell division is a fundamental and essential phenomenon. In this study, I succeeded in developing a new fluorescence detection method that allows live visualization of endogenous mRNA and protein simultaneously at single-molecule level. This enables the spatiotemporal analysis of mRNA and protein that function in cell division. In the future, I hope that this method will fully contribute to elucidation of the molecular mechanism of cell division.

研究分野：分子細胞生物化学

キーワード：mRNA タンパク質 細胞分裂

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

1. 研究開始当初の背景

真核生物の形態形成では、細胞分裂の制御は根源的かつ必須な現象である。しかし、動植物間では分裂様式は大きく異なり、植物では Cell plate 形成を介した分裂様式を、動物では収縮環形成を介した分裂様式をとる。植物細胞の分裂装置である Cell plate では、チューブリンタンパク質からなる微小管構造体の構築と細胞内タンパク質輸送系を介した、新しい隔壁への物質輸送がなされ、細胞の内部から新しい隔壁、つまり新しい細胞膜、細胞壁が形成される。一方、動物細胞の分裂装置である収縮環は、繊維状のアクチンタンパク質およびその他のアクチン関連タンパク質の集合と沈着によって構築され、細胞の外側から細胞をくびれ切らせる、きんちゃく袋のように機能する。いずれの分裂様式においても、細胞骨格系と細胞内タンパク質輸送系に関わる分子群が重要な機能を果たすことが知られているが、その知見は、もっぱらタンパク質レベルのものに限られており、mRNA レベルでの知見はほぼ皆無である。

2. 研究の目的

このような状況の中、研究代表者は、世界に先駆けて、内在性 mRNA とタンパク質を同時に、ライブで一分子可視化できる蛍光検出法の開発を第一の目的とした。そして、次に、その検出法を利用することにより、植物細胞および動物細胞の細胞分裂において機能する分子群の mRNA / タンパク質レベルでの細胞内局在および時空間的制御機構を明らかにして行くことを第二の目的とした。このように、本研究課題には、二つの目的が存在するが、その最終目的は、それらを合わせたものである。つまり、細胞分裂に関わる分子群の mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの時空間的制御機構の解析を通じて、細胞分裂の始原過程の分子機構を解明することである。

3. 研究の方法

真核生物が形態形成を行う上で、細胞が分裂する場所やタイミングを制御・調節することは非常に重要である。それは、生物の生命維持の観点からも、必須で根源的な事象といえる。これほどまでに根源的な事象ではあるが、動物と植物の間において、細胞分裂の様式とシステムが全く異なることは驚きである。植物では Cell plate 形成を介した分裂様式を、動物では収縮環形成を介した分裂様式をとる。これまでの細胞生物学的領域における研究知見から、いずれの分裂様式においても、細胞骨格系と細胞内タンパク質輸送系に関わる分子群が重要な機能を果たすことが知られている。しかしながら、それらの知見は、もっぱらタンパク質レベルのものに限られており、mRNA レベルでの知見はほとんど存在しない。本研究課題では、内在性 mRNA とタンパク質を同時に、ライブで一分子可視化できる新規蛍光検出法を開発し、細胞分裂において機能する分子群の mRNA / タンパク質の両レベルでの制御機構を時空間的に解析した。まず、この新規蛍光検出法を構築するために、内在性 mRNA とタンパク質を波長の異なる蛍光タンパク質で可視化標識することを決定した。具体的には、タンパク質は、赤色蛍光タンパク質 mCherry や tagRFP との融合タンパク質の形で発現し、細胞内局在等を解析することとした。これに対して、内在性 mRNA は、各々の mRNA 内の 2 箇所の部位 (塩基配列) を認識する RNA 結合タンパク質 Pum の変異体をあらかじめ作製し、それぞれの Pum 変異体をスプリットタイプの緑色蛍光タンパク質 GFP の N 末端断片や C 末端断片との融合タンパク質の形で発現し、細胞内局在等を解析することにした。最終的には、これらの赤色蛍光タンパク質ならびにスプリットタイプの緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質を共発現している生物試料を TIRF 顕微鏡 (全反射照明蛍光顕微鏡) を用いて観察し、ライブでかつ一分子レベルでの可視化解析を行うというものである。

4. 研究成果

植物細胞の Cell plate 形成に関わる分子群の解析では、タバコ培養細胞 BY-2 およびシロイヌナズナ個体を実験材料として用いた。Cell plate 構造体を構成する細胞骨格系分子群として、チューブリン、Cell plate において局在する細胞内タンパク質輸送系の分子群として、SNARE タンパク質 KNOLLE および ARF GTPase 結合タンパク質に注目した。これらのタンパク質分子を可視化するために、赤色蛍光タンパク質 mCherry や tagRFP との融合遺伝子を作製し、バイナリーベクターに組み込んだ。BY-2 細胞およびシロイヌナズナ個体において発現させたところ、分裂時および根端分裂組織において、確かに Cell plate に局在することが分かった。ARF GTPase 結合タンパク質に関しては、Cell plate 以外の細胞膜および細胞内部にもかなりの蛍光シグナルが検出されるため、以後の解析からは除外した。次に、チューブリンと KNOLLE の mRNA を可視化するために、各々の mRNA 内の 2 箇所の部位(塩基配列)を認識する RNA 結合タンパク質 Pum の変異体を 4 種類作製した。そして、それぞれを GFP の N 末端断片、C 末端断片との融合遺伝子を作製し、バイナリーベクターに組み込んだ。これらのバイナリーベクターを BY-2 細胞およびシロイヌナズナ個体において発現させたところ、いずれの場合にも再構成された GFP の蛍光はほとんど検出されなかった。その原因を探るべく、認識部位の変更および認識部位間の距離の変更を通して、詳細に検討を行って来た。これにより得られた、原因に対する私的な見解は後述する。

動物細胞の収縮環形成に関わる分子群の解析では、ヒトの線維芽細胞 HEK293T および上皮性細胞 MCF7 などを実験材料として用い、収縮環構造体を構成するアクチンと密接な相互作用を持つ Alpha-actinin 1 (ACTN1) およびアクチンのリモデリングに関わる mDia2 などの細胞骨格系分子群に注目した。これらのタンパク質分子を可視化するために、赤色蛍光タンパク質 mCherry や tagRFP との融合遺伝子を作製し、発現ベクターに組み込んだ。HEK293T および MCF7 細胞において一過的に発現させたところ、分裂時に確かに収縮環近傍および他のアクチン繊維に局在することが分かった。次に ACTN1 と mDia2 の mRNA を可視化するために、各々の mRNA 内の 2 箇所の部位を認識する RNA 結合タンパク質 Pum の変異体を 4 種類作製した。それぞれを GFP の N 末端断片、C 末端断片との融合遺伝子を作製し、発現ベクターに組み込んだ。これらの発現ベクターを動物細胞において一過的に発現させたところ、いずれの場合も再構成された GFP の蛍光はほとんど検出されなかった。植物系、動物系の mRNA 可視化プローブのこの問題点を探るべく、認識部位の変更および認識部位間の距離の変更を通して、詳細に検討を行った。結果として、最後に作製したアクチン mRNA を可視化するプローブのみ蛍光シグナルが検出された。現在までのところの見解では、RNA 結合タンパク質 Pum の改変は万能というわけではなく、何らかの構造上の制約が存在するというものである。つまり、新規な mRNA 可視化プローブの作製においては、実績のある mRNA 可視化プローブの構造をできる限り維持し、小規模な構造改変に留めた方が良いと考えられる。

本研究課題では、HEK293T を実験材料として用いた動物細胞の系において、収縮環構造体の主構成因子であるアクチンタンパク質とアクチン mRNA の同時、一分子ライブ観察に成功した。具体的には、アクチンタンパク質分子を可視化するために酵母の Abp140 に由来する 17 アミノ酸からなるアクチン結合ドメインと mRFP との融合遺伝子 Lifeact-mRFP を作製し細胞において一過的に発現させた。また、アクチン mRNA を可視化するために、その mRNA 内の 2 箇所の部位を認識する RNA 結合タンパク質 Pum の変異体と GFP の N 末端断片、C 末端断片との融合遺伝子を作製し、発現ベクターに組み込み、このプローブを細胞において一過的に発現させた。これらの 2 種類のプローブを共発現させた細胞においては、アクチンタンパク質による細

胞内の繊維状構造体とアクチン mRNA による細胞質全体に拡散したシグナルが同時に検出されるものの、特徴的な共局在などは検出されなかった。この結果は、アクチンタンパク質とアクチン mRNA の局在が互いに独立している可能性を示唆している。今後、これらの2種類のプローブを共発現させた細胞を各種の細胞骨格系阻害剤や細胞内タンパク質輸送系阻害剤で処理することにより、アクチンタンパク質とアクチン mRNA の局在に顕著な影響を及ぼすかどうかを詳細に解析する。また、細胞周期を同調させた条件下においても詳細な検討を行いたい。

真核生物の形態形成では、細胞分裂の制御は根源的かつ必須な現象である。本研究課題では、内在性 mRNA とタンパク質を同時に、ライブで一分子可視化できる新規蛍光検出法の開発に成功した。これにより、細胞分裂に機能する分子の mRNA およびタンパク質の時空間的な解析が可能となった。今後、細胞分裂の分子機構の全貌解明に向けて、本手法が十分貢献するものと期待している。また、生命の根源的事象である細胞分裂の時期や場所を規定するメカニズムを明らかにする学術的意義や社会的意義は非常に大きく、本手法は、他研究分野の研究進展にも多大な波及効果を及ぼすものと確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

竹内雅宜、シロイヌナズナARFGAPタンパク質の分子細胞生物学的解析、日本植物学会第80回大会、2016年

竹内雅宜、シロイヌナズナARFGAPタンパク質の分子細胞生物学的解析、第5回エンドメンブレミーティング、2016年

竹内雅宜、シロイヌナズナARFGAPタンパク質の機能解析、日本植物学会第81回大会、2017年

竹内雅宜、シロイヌナズナARFGAPタンパク質の分子細胞生物学的解析、第6回エンドメンブレミーティング、2017年

Masaki Takeuchi、Functional analysis of a novel Arabidopsis ARF GAP protein、Taiwan-Japan Plant Biology 2017、2017年

竹内雅宜、シロイヌナズナARFGAPタンパク質の司る小胞輸送の解析、第59回日本植物生理学会年会、2018年

〔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

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。