

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06819

研究課題名(和文) 一分子蛍光偏光イメージングによる収縮環形成メカニズムの解析

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of contractile ring formation by single molecule fluorescence polarization imaging

研究代表者

佐藤 啓介 (Sato, Keisuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60644044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂過程で形成される収縮環の形成機構を明らかにすることを目的として研究を行った。方法としては、蛍光偏光顕微鏡による生細胞分子配向解析と、近位依存標識法による関連タンパク質の同定を用いた。蛍光偏光顕微鏡観察のためのアクチンとミオシンの蛍光偏光プローブの作製に成功し、これらを安定発現する哺乳類培養細胞株を樹立した。近位依存標識法は、新たな手法の発表があったため、当初の計画から変更を行った。COVID-19の影響により、研究期間内に予定の研究計画を完了することはできなかったが、準備はほぼ整っているため、研究期間終了後も研究を継続して計画の完了を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂は地球上に生きる全ての細胞に共通する必須の現象である。アクチンとミオシンからなる収縮環は、植物以外のはばすべての真核生物の細胞分裂過程で形成される構造であるが、収縮環形成の分子メカニズムはこれまで分かっていなかった。細胞分裂過程がどのように行われているか、どのようにコントロールされているかを明らかにすることは、基礎生物学的、基礎医学的な意義があるだけでなく、例えば癌細胞がなぜ異常に分裂するのか(コントロールされない分裂を行ってしまうのか)、またそれを制御するにはどうしたらよいか、といった人類にとって重要な課題を解決するために役に立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We carried out characterization of molecular mechanisms for contractile ring formation during cell division. We used live-cell molecular orientation analysis using fluorescence polarization microscopy (FPM) and identification of related proteins using proximity-dependent labeling. We established mammalian cell lines stably expressing actin orientation probe or myosin orientation probe for FPM. We changed the method for proximity-dependent labeling because a new method was reported. Research project has not been completed due to COVID-19, but we will continue the project.

研究分野：細胞生物学

キーワード：収縮環 蛍光偏光 アクチン ミオシン

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞分裂において、有糸分裂で染色体を分配した後、各染色体を含む二つの娘細胞を作るために行われるのが細胞質分裂である。植物以外の多くの真核生物では、細胞質分裂の際、アクチンとミオシンを主要構成要素とする収縮環と呼ばれる構造が形成される。収縮環形成過程でアクチンとミオシンの配向がどのように関連しながら変化していくか、その詳細には不明な点が多い。ミオシンの向きを調べる方法は、これまで免疫染色の超解像顕微鏡観察または電子顕微鏡観察以外に無く、生細胞では不可能であった。また、収縮環形成過程では、アクチン繊維が狭い領域に密集して存在するため、通常の顕微鏡法では、繊維がどの方向に走っているのか調べるのが難しかった。さらに、収縮環の構成因子も、特に哺乳類細胞においては十分に把握されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母の収縮環形成過程でのアクチン繊維とミオシンの配向を生細胞で観察すること、哺乳類細胞の収縮環構成因子およびそれらと膜を繋ぐ因子を網羅的に同定すること、以上の実験結果から分裂酵母と哺乳類細胞のそれぞれで収縮環形成機構のモデルを構築すること、を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) POLArIS 法によるアクチンとミオシンの配向観察

申請者らは、任意の蛋白質に空間的位置関係が固定された形で蛍光標識可能な新規蛍光偏光プローブ POLArIS (Probe for Orientation and Localization Assessment, recognizing specific Intracellular Structures of interest) を開発した。POLArIS で標識された蛋白質の向きと、蛍光の偏光面の向きの関係は一定になり、これを蛍光偏光顕微鏡で解析すると、蛋白質の配向を一分子レベルで決定できる。本研究では、アクチンに対する POLArIS とミオシンに対する POLArIS を作製し、収縮環形成過程でのアクチン繊維とミオシンの配向を生細胞でリアルタイム解析することを目指した。

### (2) 哺乳類細胞の収縮環構成因子およびそれらの膜係留因子の網羅的同定

収縮環は一過性に形成される構造であり、古典的な免疫沈降法やプルダウン法では網羅的同定は困難であると予想されるため、本研究では、近位依存性ビオチン標識 (BioID, Roux et al., *J. Cell Biol.*, 2012) を利用することとした。BioID は、ビオチンリガーゼを既知の収縮環構成蛋白質に融合して発現させ、標的蛋白質の近傍に存在する蛋白質をビオチン化し、streptavidin を介してビオチン化蛋白質を単離・精製し、質量分析で同定することを目指した。

蛋白質の同定後は、RNAi によるノックダウン実験や、生細胞イメージングにより、それぞれの時空間的・機能的関連を解析し、ミオシンやアクチン重合促進因子が膜にリクルートされるメカニズムを明らかにすることを目指した。

## 4. 研究成果

### (1) POLArIS 法によるアクチンとミオシンの配向観察

アクチンに特異的に結合することが報告されている抗体様分子を緑色蛍光蛋白質の循環置換体と連結することで、アクチン繊維に平行な向きの蛍光偏光を持つ POLArIS プローブを作製することに成功した (POLArIS<sup>act</sup>, Sugizaki et al., *PNAS*, 2021)。生化学的実

験から、POLArIS<sup>act</sup> は単量体アクチン (G-actin) にはほとんど結合せず、繊維状アクチン (F-actin) に特異的に結合することがわかった。また、F-actin に結合する際、POLArIS 分子とアクチン分子の量比はほぼ 1:1 となることが分かった。クライオ電子顕微鏡で結合様式を解析しようとしたが、GFP 部分は想定以上に揺らぎが大きく、可視化されなかった一方で、抗体様分子部分は高分解能で可視化され、他の汎用される F-actin プロープである LifeAct や UtrCH と結合部位が重複することが明らかとなった。細胞に発現させ、生きたまま蛍光顕微鏡観察する実験では、LifeAct や F-tractin と比べて細胞質のバックグラウンド画分が少なく、より高コントラストで F-actin が可視化されることが分かった。また UtrCH とは同程度のコントラストであったが、ラメリポディアのアクチンへの preference は異なることが分かった。

POLArIS<sup>act</sup> を発現させた哺乳類培養細胞を蛍光偏光顕微鏡観察したところ、細胞分裂過程で、収縮環を構成するアクチン繊維の配向を観察できることが確認された。POLArIS<sup>act</sup> を安定発現する哺乳類培養細胞株を作製し、これを用いて米国ウッズホール海洋学研究所の共同研究先で 1 分子蛍光偏光解析により、収縮環形成過程でのアクチン配向解析を行おうとしたが、COVID-19 の影響により、研究期間内の実施を断念せざるを得ない状況となった。共同研究の実施が可能になり次第、実験を再開する。

ミオシンについても、非筋ミオシン IIA に結合することが報告されている抗体様分子を緑色蛍光タンパク質の循環置換体と連結することで、培養細胞のストレスファイバーなどアクトミオシン繊維に平行な向きの蛍光偏光を持つ POLArIS プロープを作製することに成功した (未発表データ)。このミオシン POLArIS を安定発現する哺乳類培養細胞株を作製し、米国ウッズホール海洋学研究所の共同研究先で 1 分子蛍光偏光解析により、収縮環形成過程でのミオシン配向解析を行おうとしたが、アクチンと同様、COVID-19 の影響により、研究期間内の実施を断念せざるを得ない状況となった。共同研究の実施が可能になり次第、実験を再開する。

分裂酵母については、強いプロモーターから POLArIS<sup>act</sup> を恒常発現させると細胞の生育を阻害することが分かったため、発現誘導可能なプロモーターを使うことにした。申請者の研究室では適切な発現量で発現誘導することに成功したが、共同研究先では、うまく発現誘導させることができなかった。培養機器などの違いにより、完全に同一の培養条件を再現することが難しかったためと考えられる。この問題を克服するため、恒常発現でも生育阻害効果が出ないような適切な強さのプロモーターを探す必要があると考えられた。研究期間終了後も研究を継続し、適切なプロモーターが見つかり次第、分裂酵母についても蛍光偏光顕微鏡観察を行う。また、ミオシンの POLArIS プロープについても同様にプロモーターの検討を行ったのち、蛍光偏光顕微鏡観察を行う。

## (2) 哺乳類細胞の収縮環構成因子およびそれらの膜係留因子の網羅的同定

当初 BioID を利用する予定であったが、研究期間内に、BioID の改良版 (TurboID, Branon et al., *Nat. Biotechnol.*, 2018) が開発されたため、TurboID を利用することとした。しかし、COVID-19 の影響により、研究を縮小する必要が生じたため、研究期間内にすべての実験を完了することができなかった。準備はおおむね整っているため、研究期間終了後も研究を継続し、計画の完了を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugizaki Ayana, Sato Keisuke, Chiba Kazuyoshi, Saito Kenta, Kawagishi Masahiko, Tomabechi Yuri, Mehta Shalin B., Ishii Hirokazu, Sakai Naoki, Shirouzu Mikako, Tani Tomomi, Terada Sumio	4. 巻 118
2. 論文標題 POLARIS, a versatile probe for molecular orientation, revealed actin filaments associated with microtubule asters in early embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2019071118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2019071118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakai Nori, Sato Keisuke, Tani Tomomi, Saito Kenta, Sato Fumiya, Terada Sumio	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetically encoded orientation probes for F-actin for fluorescence polarization microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 359 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfz022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤啓介, 杉崎 綾奈, 齊藤 健太, Shalin B. Mehta, 白水 美香子, 谷 知己, 寺田 純雄
2. 発表標題 F-actin特異的分子配向プローブPOLARISactの開発と評価
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉崎 綾奈, 佐藤啓介, 千葉和義, 川岸将彦, 寺田 純雄
2. 発表標題 ヒトデ初期発生の有糸分裂においてアクチン繊維は微小管星状体と関連して放射状に伸長する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N.Nakai, K.Sato, T.Tani, K.Saito, F.Sato, S.Terada.
2. 発表標題 GFP-based F-actin Orientation Probes for Fluorescence Polarization Microscopy and Speckle F-actin Orientation Imaging in Living Cells.
3. 学会等名 2019 Annual meeting of The American Society for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤啓介, 杉崎綾奈, 齊藤健太, MEHTA Shalin, 白水美香子, 谷知己, 寺田純雄
2. 発表標題 新規ユニバーサル蛍光偏光プローブPOLARISの開発
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉崎綾奈, 佐藤啓介, 千葉和義, 川岸将彦, 寺田純雄
2. 発表標題 蛍光偏光ライブイメージングによるヒトデ卵の初期発生におけるアクチン動態の解析
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中井紀, 佐藤啓介, 杉崎綾奈, 永嶋一貴, 齊藤健太, 川岸将彦, 谷知己, 寺田純雄
2. 発表標題 蛍光偏光ライブイメージングのためのプローブPOLARISの汎用性拡張の試み
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉崎 綾奈、佐藤 啓介、千葉和義、Shalin B. Mehta、谷 知己、寺田 純雄
2. 発表標題 新規アクチン蛍光偏光プローブの開発
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nori Nakai, Fumiya Sato, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Sumio Terada
2. 発表標題 Development of genetically-encoded actin probes for fluorescence polarization microscopy.
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nori Nakai, Fumiya Sato, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Sumio Terada
2. 発表標題 Development of genetically-encoded actin probes for fluorescence polarization microscopy
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗原結合タンパク質と蛍光タンパク質または蛍光標識 されるタグタンパク質との融合タンパク質	発明者 寺田純雄、佐藤啓介、 中井紀、齋藤健太、 川岸将彦	権利者 東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 7568	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 蛍光標識のための融合タンパク質設計における“固い”標識に関する特許	発明者 寺田純雄、佐藤啓 介、中井紀、齋藤健 太、川岸将彦	権利者 東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-34315	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺田 純雄 (Terada Sumio) (00262022)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  (12602)	
研究分担者	川岸 将彦 (Kawagishi Masahiko) (60323606)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  (12602)	
研究分担者	齊藤 健太 (Saito Kenta) (60374659)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  (12602)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	谷 知己 (Tani Tomomi)	米国ウッズホール海洋学研究所	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Marine Biological Laboratory		