

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19370080

研究課題名（和文） 細胞質分裂を誘起する分子機構の研究

研究課題名（英文） Molecular mechanism that induces cytokinesis

研究代表者

馬淵 一誠（MABUCHI ISSEI）

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：40012520

研究成果の概要（和文）：分裂酵母から初めてアクチンを精製して性質を調べ、骨格筋アクチンと同様のフィラメントに重合することを示した。分裂酵母収縮環のアクチンフィラメントを可視化し方向性を決定できた。収縮環が収縮するにつれフィラメントが短くなることを初めて実証した。収縮環アクチンははじめ分裂面の1点から両方向へ重合すること、その後、方向性が入り交じり収縮が起ることを提唱した。ハエ細胞を用いて、細胞質に拡散しているミオシン分子が細胞分裂期に赤道面表層に集積することを示した。

研究成果の概要（英文）：Actin was purified from fission yeast cells for the first time, and it was shown to polymerize into filaments that are indistinguishable from muscle actin filaments. The contractile ring actin filaments were visualized and their directionality was determined. Filaments were shown to shorten during contraction of the ring. We proposed that actin first polymerizes at one point in the division plane to both directions, and then the directionality was mixed in the ring prior to contraction. Using cultured fly cells we showed that myosin molecules in the cytoplasm accumulate at the division cortex during cytokinesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：遺伝子、細胞・組織、シグナル伝達、生体分子、蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

私達は卵細胞よりミオシンを発見しミオシンが細胞質分裂に必須であることを証明した。この研究により、細胞質分裂がアクチン、ミオシンからなる収縮環の収縮によって起こることが確立した。さらに分裂溝を単離し、収縮環が方向性の異なるアクチンフィラメン

トから構成されているなどの微細構造解析を行ってきた。1993年にウニ卵で低分子量Gタンパク質 Rho を初めての分裂シグナル因子として報告した。その後の研究で分裂シグナル伝達は Rho シグナル伝達機構を使っていることが確立した。しかしこのシグナル伝達機構がどのようにしてア

クチン、ミオシンの収縮環への構築を起すのかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

細胞分裂は生物の増殖・再生にとって必須であり、分裂面の決定は多細胞生物の発生・分化にとって重要である。動物細胞や酵母は分裂面の細胞膜直下に形成される収縮環の収縮により分裂する。この構造は主としてアクチンフィラメントと II 型ミオシンから成り、これらの相互作用によって収縮する。本研究では収縮環の形成位置がどのように決定され（分裂シグナル伝達の機構）、それを受けて収縮環がどのように形成され、収縮するのかを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 分裂酵母の収縮環の形成過程を明らかにするために分裂酵母のアクチンの精製を試みる。

(2) 分裂酵母収縮環のアクチンフィラメントを可視化しその方向性を決定するために、酵母細胞の透過処理とミオシン S1 修飾を行い、電顕観察を行う。

(3) 分裂期のミオシンリン酸化と分裂シグナル：ハエ培養細胞のミオシンの軽鎖調節のリン酸化とミオシンのダイナミクスならびに局在との関連を明らかにする。

(4) ウニ卵疑似分裂溝の分裂面を決定するため、ジェリーカナルのマーキングを試みる。

## 4. 研究成果

(1) 分裂酵母アクチンの精製と性質：分裂酵母から初めてアクチンを精製し、その性質を調べた。分裂酵母アクチンは骨格筋アクチンと太さ、らせんの周期など構造的に区別つかないアクチンフィラメントに重合することを電子顕微鏡観察、光回折法により示した。マグネシウムイオンを結合した分裂酵母アクチンは骨格筋アクチンより若干速く重合したが、カルシウムイオンを結合した場合、KC1を加えるとフィラメントでなく顆粒状に重合する点が異なっていた。分裂酵母アクチンは骨格筋アクチンに比べ、分裂酵母プロフィリンと強く相互作用したが、骨格筋ミオシンとは弱く相互作用した。分裂酵母細胞中の濃度は 8.7 $\mu$ M だった。

(2) 分裂酵母収縮環の構造と形成過程：分裂酵母細胞を透過処理し、ミオシン S1 を浸透させて収縮環のアクチンフィラメントをやじり構造に変換させてから樹脂に包埋し、連続切片を作製し、電子顕微鏡観察によりフィラメントの方向性を決定した。

その結果、収縮環を構成するアクチンフィラメントの数は 1,000-2,000 本、平均長は約 0.6 $\mu$ m、反対方向のフィラメントがほぼ 1:1 存在していた。収縮環が収縮するにつれフィラメントが短くなるのが初めて実証された。また、収縮環のアクチンフィラメントの配列を 3 次元再構成することにより、分裂酵母においては収縮環アクチンははじめ分裂面の 1 点から両方向へ重合すること、その後、方向性が入り交じり収縮が起ることを提唱した。収縮環を作るとき、細胞内のほぼ半量のアクチン分子を使っていることが分かった。

(3) 分裂期のミオシン集積とリン酸化：GFP-ミオシンを発現したショウジョウバエ S2 細胞でミオシン分子のダイナミクスを解析した結果、ミオシンは収縮環形成期に細胞質に拡散している分子が赤道面表層で捕捉されることで分裂位置に集積することが分かった。さらに捕捉には調節軽鎖の活性化リン酸化および重鎖のフィラメント形成が必要であることを明らかにした。

(4) ウニ卵の疑似分裂溝の形成：ウニ未受精卵をタンパク質脱リン酸化酵素の阻害剤で処理すると疑似分裂溝を生ずるが、この分裂溝の形成面が卵の極性軸と無関係であることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1) Goda, M., Inoue, S., and Mabuchi, I. 2009. Calyculin-A induces cleavage in a random plane in unfertilized sea urchin eggs. *Biol. Bull.* 216, 40-44. 査読有

2) Uehara, R., Hosoya, H., and Mabuchi, I. 2008. *In vivo* phosphorylation of regulatory light chain of myosin II in sea urchin eggs and its role in controlling myosin localization and function during cytokinesis. *Cell Motil. Cytoskelet.*, 65, 100-115. 査読有

3) Sakata, S., Watanabe, Y., Usukura, J., and Mabuchi, I. 2007. Characterization of native myosin VI isolated from sea urchin eggs. *J. Biochem.* 142, 481-490. 査読有

4) Kamasaki, T., Osumi, M., and Mabuchi, I. 2007. Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J. Cell Biol.* 178, 765-771. 査読有

5) Yamashiro S., Abe, H., and Mabuchi, I. 2007. IQGAP2 is required for the cadherin-mediated cell-to-cell adhesion

in *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Biol.* 308, 485-493. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

1) Mabuchi, I., Takagi, T., Inoue, S., and Goda, M. Mitochondria are anchored by actin filaments to the cortex and are motile in sea urchin eggs. The 49<sup>th</sup> annual meeting of the American Society for Cell Biology (2009.12.5-9, San Diego, USA).

2) Kashiwazaki, J., Yoneda, Y., Arai, R., Yoshida, M., and Mabuchi, I. Analysis for Klp8, a unique kinesin-like protein in fission yeast. The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting (2009. 10. 26-31, Tokyo)

3) Mabuchi, I., Kamasaki, T., Oiwa, Y., Takagi, T., Inoue, S., Shirato, Y., and Kashiwazaki, J. Structure and formation of the contractile ring in fission yeast. The 5<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting (2009. 10. 26-31, Tokyo).

4) 馬淵一誠 細胞質分裂のメカニズム～酵母や動物細胞はどのようにして分裂するか。グローバル COE 物質科学イノベーション講演会 (2009.10.1, 北海道大学) .

5) Mabuchi, I. Proteins involved in cytokinesis in sea urchin eggs. JSPS Bilateral Joint Project Japan-Singapore Seminar “Cytokinesis: Dynamics of the Contractile Ring” (2009.6.6, 東京) .

6) Kamasaki, T., Oiwa, Y., Takagi, T., and Mabuchi, I. Structure and formation of the contractile ring in fission yeast and animal cells. Symposium: “Structure and evolution of cytokinetic machinery in eukaryotic cells” JSCB 60<sup>th</sup> Annual Meeting (2009.6.2, 名古屋) .

7) 米田裕美、武藤悌、荒井律子、吉田稔、馬淵一誠 Localization analysis of Klp8, a unique kinesin-like protein of fission yeast. 第 61 回日本細胞生物学会大会 (名古屋、2009.6.2-4) .

8) Mabuchi, I. Structures of the F-actin contractile ring and other actin cytoskeletons in fission yeast. JSPS Bilateral Joint Project Japan-Singapore Seminar “Cytokinesis” (2008.11.3, Singapore) .

9) Mabuchi, I. Structure and assembly of actin cytoskeletons in fission yeast cell. The 2nd International Symposium on Bio-nanosystems (2008.10.31, 東京大学) .

10) 米田裕美、武藤悌、荒井律子、吉田稔、馬淵一誠 分裂酵母のキネシン様タンパク質

Klp8 の解析. 酵母遺伝学フォーラム (札幌、2008.9.10-12) .

11) 馬淵一誠 分裂酵母の細胞質分裂のしくみ. 第175回酵母細胞研究会例会 (2008.7.11, 横浜) .

12) 大岩由香、高木智子、馬淵一誠 Ultrastructural analysis of contractile ring formation in *Xenopus* eggs. 第60回日本細胞生物学会大会 (横浜、2008.6.29-7.1) .

13) 白戸悠香子、武藤悌、馬淵一誠 Roles of Mid1/Dmf1 and Plo1 in formation of the contractile ring in fission yeast. 第60回日本細胞生物学会大会 (横浜、2008.6.29-7.1) .

14) 高木智子、青山一弘、馬淵一誠、大隅正子 酵母細胞のアクチン細胞骨格. 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会 2007 年度研究討論会 (2007 年 12 月 19 日、東京) .

15) Takaine, M., Mabuchi, I. Properties of acin from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and interaction with fission yeast profilin. The 47<sup>th</sup> ASCB annual meeting (Washington, D. C., 2007.12).

16) 馬淵一誠、釜崎とも子、大隅正子 分裂酵母の収縮環アクチンフィラメントの方向性と収縮環形成のプロセス. 第40回酵母遺伝学フォーラム (2007.9.11-13 大阪コンベンションセンター) .

17) 高木智子、青山一弘、馬淵一誠、大隅正子: 分裂酵母のアクチン細胞骨格の微細構造. 日本顕微鏡学会第 63 回学術講演会 (新潟) 2007.5.21

〔図書〕(計 6 件)

1) 孤嶋慎一郎、馬淵一誠 細胞骨格. **分子生物学イラストレイテッド**第3版、羊土社、pp. 175-180. (執筆分担、2009) .

2) 釜崎とも子、高木智子、馬淵一誠、大隅正子 分裂酵母のアクチン細胞骨格に関する微細構造学的解析. **顕微鏡**44, 179-184 (2009) .

3) 馬淵一誠 ウニ卵の収縮環の蛍光像. **細胞工学** 27, 209 (2008).

4) 馬淵一誠 **分子細胞生物学辞典** 第2版 東京化学同人 (執筆分担) (2008).

5) 馬淵一誠 「分裂酵母の細胞質分裂」. **酵母のすべて**. シュプリンガー・ジャパン、pp. 256-267 (執筆分担、2007).

6) 馬淵一誠 「細胞質分裂: 細胞分裂における収縮環の形成」. **シリーズ 21 世紀の動物科学 5 「発生」**、培風館、pp. 9-38. (執筆分担、2007).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/life\\_science.htm](http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/bio/life_science.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬淵一誠 (MABUCHI ISSEI)  
学習院大学・理学部・教授  
研究者番号：40012520

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

