

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770193

研究課題名(和文)多細胞生物に特異的な細胞質分裂システムの探索

研究課題名(英文)Exploration of cytokinesis systems specific in multi-cellular organisms

研究代表者

小山 宏史 (Koyama, Hiroshi)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教

研究者番号：10530462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多細胞生物に特異的な細胞質分裂システムを探索した。マウスの初期胚をモデルとして、非筋細胞ミオシンIIに依存しない細胞質分裂の有無を、ミオシンIIの特異的阻害剤を用いて検証した。また、ミオシンIIに蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いて、ミオシンIIが一般的な細胞質分裂とは異なる時空間的動態を示す細胞が存在するかを調べた。加えて、多細胞系での細胞質分裂の研究を促進するための手法として、種々の画像処理・解析方法、ならびに、数理的プラットフォームといった、基盤的技術の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：I explored cytokinesis systems specific in multi-cellular organisms. In mouse early embryos as a model system, to examine whether there were cells whose cytokinesis did not depend on non-muscle myosin II (NMYII) proteins, I tested sensitivity of each cell to an inhibitor specific to NMYII. I analyzed spatio-temporal patterns of the localization of NMYII in mice expressing NMYII fused to a green fluorescent protein, and examined whether there were cells exhibiting atypical localization patterns of NMYII compared to that in the "general" cytokinesis. Moreover, I constructed basic techniques for analyzing cytokinesis in multi-cellular organisms: image processing algorithms to count cell numbers and to extract protein localization patterns, and a mathematical platform to perform mechanical simulations of cytokinesis.

研究分野：発生・細胞生物学

キーワード：細胞質分裂 多細胞生物 非筋細胞ミオシンII 力学

1. 研究開始当初の背景

細胞質分裂は、細胞分裂時に細胞を力学的に二つに分割するプロセスであり、単細胞ならびに多細胞生物を問わず、生命の基本的なプロセスの一つである。動物細胞の細胞質分裂の遂行においては、モータータンパク質である非筋細胞ミオシン II による収縮環の収縮が必須の役割を果たすと信じられてきた。しかし、近年、ミオシン II に依存しない細胞質分裂システムが存在するいくつかの証拠が提示された。例えば、細胞性粘菌および哺乳動物培養細胞において、細胞が基質に接着した条件においてはミオシン II に依存せずに細胞質分裂を遂行することが可能である。これらの知見は、細胞質分裂には、外部環境に対応した多様な力学的機構が存在することを示唆している。

これまでの細胞質分裂の研究は、細胞性粘菌、培養細胞、ウニ卵細胞など、主に単細胞系で行われてきた。一方、多細胞系においては、細胞同士が密集した環境下にあるため、互いに強い力学的相互作用を及ぼしあっていると想像される。実際に、細胞分裂の方向という観点においては、周囲の細胞の幾何学的状態によって分裂の方向が影響を受けることが、実験的・理論的に裏付けられている。さらに、多細胞系で細胞は、細胞塊あるいは細胞シートなど様々な配置をとるため、周囲からの力学的制約も多様だと考えられる。しかしながら、そのような多様な環境下でどのような力学的機構によって細胞質分裂を遂行しているか、多細胞系に特異的な細胞質分裂システムが存在するか等は、十分に理解されていない。

2. 研究の目的

本研究では、多細胞生物に特異的な細胞質分裂システムを探索し、その力学的機構を明らかにすることを目指した。また、多細胞系での細胞質分裂の研究を促進するための方法として、種々の画像処理・解析方法、ならびに、力学的機構の解析のための数理的プラットフォームといった、基盤的技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

マウスの初期胚発生期では、細胞塊や細胞シートなどの様々なタイプの組織が形成され、かつ、組織の劇的な構造変化と細胞分裂が同時に起きる。すなわち、細胞質分裂中の細胞に対する力学的制約のタイプも多様であると予想される。そこで、マウス胚をモデル系として、多細胞生物に特異的な細胞質分裂システムの有無を検証するために、細胞質分裂のミオシン II への依存性を指標として探索を行った。さらに、ミオシン II、ならびに、アクチンに注目してその時空間的動態を追跡することで、細胞質分裂時に特徴的な局在様式を示す細胞が存在するかを検討した。また、ミオシン II、ならびに、アクチンの3次

元的な動態を視覚的に容易に解析するための画像処理・解析方法の開発、および、周辺細胞からの力学的制約を受けた環境下での細胞質分裂の力学的機構を数理的に解析するための数理的プラットフォームの開発を行った。

4. 研究成果

(1) 研究代表者はすでに、線虫 (*C. elegans*) のミオシン II の温度感受性変異株を用いた解析から、ミオシン II を失活させた場合でもある頻度で細胞質分裂に成功する発生の時期があることを発見していた。そこで、マウス胚に対しても類似の実験を行った。すなわち、ミオシン II の特異的阻害剤であるプレビスタチンを添加した培養条件において、細胞質分裂に成功する細胞が存在するか否かを検証した。マウスの1細胞期から着床直前の胚盤胞期 (約32細胞期)、ならびに、着床後の受精後5.5から6.5日目胚 (数百から数千細胞期) の各発生ステージに対して、プレビスタチン添加下で培養した。その結果、ある時期においてある頻度で細胞質分裂の成功が観察された。一方、同じ時期に対して、アクチン重合の阻害剤であるサイトカラシン D を用いて同様の実験を行った場合には、細胞質分裂の成功は観察されなかった。以上の結果は、マウス胚においてもミオシン II に依存しない、あるいは、依存性の低い細胞質分裂システムが存在する可能性を示唆する。

プレビスタチン添加下での細胞質分裂の成功の頻度を定量的に解析するために、細胞数を自動でカウントできる画像処理・解析プログラムの開発を試みた。核内タンパク質であるヒストン2Bに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合したタンパク質を発現させることで核を蛍光ラベルしたマウス (H2B-EGFPマウス) を用いて、共焦点顕微鏡によって3次元的な画像を取得した。ローカル閾値法に基づいた独自の画像処理フィルタを開発して核の領域を抽出した。さらに、3次元空間中での個別の核として認識するための一連のコンピュータ・アルゴリズムを開発した (図1)。これによって、胚盤胞期までの胚においては、自動で正確な細胞数をカウントすることが可能となった。一方、着床後の時期については十分な精度を達成することは困難で課題が残った。

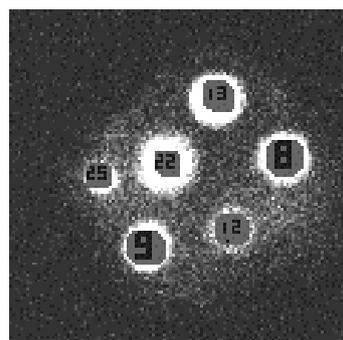


図 1

着床前胚での個別の核を独自に開発した画像処理方法によって認識した例。核の正確な領域を抽出することより、核の数を算出することを優先したため、必ずしも核の全領域を正確に認識しているわけではない。

(2) 収縮環の収縮に依存する一般的な細胞質分裂においては、ミオシン II、および、アクチンが収縮環に強く集積することが知られている。マウス胚においてこれらのタンパク質の時空間的動態が、一般的な動態と異なる様式を示す細胞が存在するかを検討した。アクチンに関しては、繊維状アクチンに結合する蛍光標識したタンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いた。ミオシン II に関しては、ミオシン II の調節軽鎖 (MRLC2) に GFP を融合した遺伝子 (MRLC2-EGFP) (広島大学細谷浩史博士より分与) を導入した遺伝子改変マウスを、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センターの協力で作成した。これらの遺伝子改変マウスの胚を用いて、共焦点顕微鏡によるライブイメージングを行ったところ (図 2)、MRLC2-EGFP が必ずしも収縮環には検出されず、むしろ、ミッドゾーンと呼ばれる領域に選択的に局在する細胞があることがわかった。MRLC2-EGFP を培養細胞に発現させた場合には、収縮環に強く局在することが知られている (Asano et al. Genes Cells 2009 14 555-568)。一方、ミッドゾーンには 2 重リン酸化型のミオシン II 調節軽鎖が局在しうることが培養細胞においてすでに報告がある (Kondo et al. BBRC 2012 417 686-691)。以上から、MRLC2-EGFP がミッドゾーンに強く局在するという今回発見された局在パターンは、これまで発見されていた局在パターンとの相違が認められる。一般的な細胞質分裂とは異なる、あるいは、改変されたシステムが働いている可能性がある。

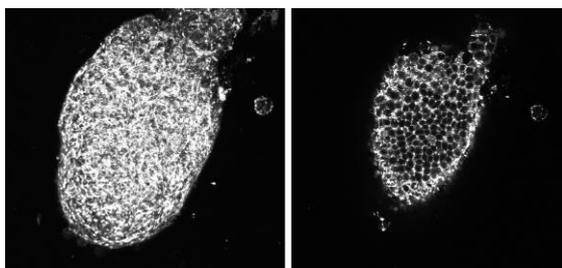


図 2

マウス着床後胚での MRLC2-EGFP の分布を共焦点顕微鏡で撮影した例。3次元表示 (Max intensity projection) (左図) と 1 断面像 (右図)。

次に、ミオシン II、アクチン、あるいは、細胞形態の動態を、詳細、かつ、システムチックに解析するための画像処理・解析方法を、木森義隆博士 (自然科学研究機構 イメージングサイエンス研究分野) の協力で作成した (図 3、4)。この方法は 2 つのパートに分

かれている。一つは、ミオシン II やアクチンといった細胞内の構造物を選択的に抽出するパートである (図 3)。もう一つは、個別の細胞領域を抽出 (セグメンテーション) するパートである (図 4)。両方のパートを組み合わせることで、個別の細胞でのミオシン II やアクチンの局在のパターンを評価することができる。いずれのパートにおいても、Mathematical morphology と呼ばれる理論体系に基づいた画像処理手法を応用した。得られた結果は、各構造物の分布・動態を 3 次的に視覚的に認識することが容易な様式となっている。胚においては細胞が重層的に配置された 3 次的な構造をとっているため、胚の表面に現れていない細胞における構造物の動態を視覚的に捉えることは通常容易でないことが多い。今回開発した画像処理・解析方法は、上記のような組織の表層に位置しない細胞の解析においても非常に有用だと考えられる。

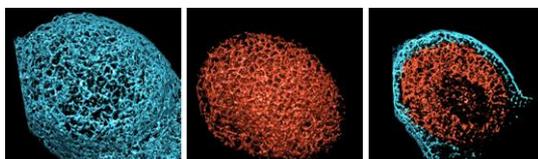


図 3

マウス着床後胚での、細胞内の繊維状アクチンを画像処理法で抽出した例。表層の細胞 (左図、右図の青) と深部の細胞 (中央図、右図の赤) でのアクチンの分布を 3 次的にとらえることができる。

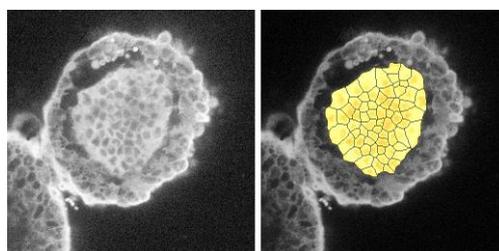


図 4

マウス着床後胚での個別の細胞領域を画像処理法によって抽出した例。共焦点顕微鏡の画像 (左図) と細胞領域を抽出した画像 (右図)。

(3) 細胞質分裂の力学的機構を解析するために、細胞骨格にかかる力学を測定する分子プローブの開発を試みた。すでに、青色蛍光タンパク質 (CFP) と黄色蛍光タンパク質 (YFP) の間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した力学プローブが報告されていた (Grashoff et al. Nature 2010 466 263-266, Meng and Sachs JCS 2011 124 261-269)。すなわち、これらのプローブでは、力を受けると CFP と YFP とが物理的に引き離され、FRET の効率が低下することが期待される。これらのプローブには検出感度、および、細胞毒性等の問題があったので、改変を試みた。得られたプローブを基本構造として、繊維状アク

チンにかかる力をモニターできるようにさらなる改変を加えた。作成したプローブを培養細胞で発現させ、細胞に人為的に伸展ストレスを与えたところ、FRET 効率の低下が観察された。したがって、外的な力による繊維状アクチンの伸展状態をモニターできていることが示唆される。細胞質分裂時の力の時空間的变化を測定する有用な方法となりうる。

(4)多細胞系における細胞質分裂の力学的機構を理解するうえで、周辺細胞からの力学的制約を考慮することは重要である。数理的な解析は、力学的制約や形態的な変化といった直観的に捉え難い要因の評価に有用である。そこで、多細胞系を表現できる数理モデルの開発を行った。多細胞系の数理モデルとして vertex モデルがよく知られているが、細胞質分裂のように個別の細胞が大きく形態を変化させるような事象の解析においては、空間的な精密性が十分ではない。そこで、空間的な精密性を高くした数理モデルを新たに構築した。これによって、周辺細胞からの力学的制約によってどのような力学的ストレスを受け、さらに、それが細胞質分裂時の形態変化に影響するかを評価する数理的プラットフォームを提供できる。

(5)以上から、マウス初期胚において、ミオシン II に依存しない細胞質分裂システムの存在が示唆された。さらに、ミオシン II 調節経路の動態においてこれまで知られている一般的な細胞質分裂と相違がある可能性がある。また、本研究で作成された MRLC2-EGFP マウス、力学プローブ、細胞数のカウントの画像処理法、ミオシン II やアクチンの分布を抽出するための画像処理法、数理的プラットフォームは、マウス胚のみならず、多細胞系での細胞質分裂システムの研究において非常に有用である。今回得られた知見と上記の各種の新規の材料・手法を用いて、マウス胚での細胞質分裂の多様性に関するシステムチックな解析、および、その力学的機構の理解を推進していくことが今後重要である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 小山 宏史、マウスの卵管のヒダの形態形成の力学的機構、定量生物学の会 第 5 回年回、2012/11/23-25、東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 宏史 (KOYAMA, Hiroshi)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教