

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22247031

研究課題名(和文)収縮環の構造と形成・収縮機構の研究

研究課題名(英文)Structure, formation, and contraction of the contractile ring

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質分裂は収縮環の収縮によって細胞が中央部からくびり切れることによりおこる。私は分裂酵母の収縮環-細胞膜複合体(細胞ゴースト)を単離し、ATPを加えて収縮環を人為的に収縮させることに初めて成功した。この実験系を用い、アクチンの脱重合は収縮そのものには必須ではないことなどいくつかの性質を明らかにできた。また収縮環形成の際のアクチンの分裂位置への集合にはミオシンVが関与していることが示唆された。ウニ卵の分裂溝にアクチン重合を促進するuDiaがアクチンと共存することも示した。さらにカエル卵抽出液を人工脂質膜に封入することにより、脂質膜小胞中でアクチンの流れが起こることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：In cell division, cytokinesis takes place by contraction of the contractile ring at the mid region of the cell. I isolated the cell ghost from dividing fission yeast cells, in which the contractile ring was attached to the cell membrane, and demonstrated for the first time the contraction of the contractile ring by addition of ATP. It was shown using this system that actin depolymerization was not necessary in the contraction. It was also suggested that myosin V is involved in movement of actin to the division site during contractile ring formation. The actin polymerizing protein uDia was shown to co-localize with actin in the contractile ring of dividing sea urchin eggs. Furthermore, it was shown that actin flows in the frog egg extract encapsulated in artificial lipid vesicles.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞分裂 細胞質分裂 収縮環 アクチン ミオシン

1. 研究開始当初の背景

分裂シグナル伝達: 1993年、ウニ卵(Mabuchiら 1993)とカエル卵(Kishiら 1993)で低分子量 G タンパク質 Rho が分裂シグナルの実体として報告された。その後、Rho の上流として活性化因子 RhoGEF、不活性化因子の RhoGAP が関与することも報告された。分裂酵母においても、私達は Rho1 の分裂への関与、Rho1GEF Rgf3 が分裂位置で Rho1 を活性化することを報告した。これらの研究により Rho による分裂シグナル伝達の重要性が確立した。Rho の下流にアクチン重合促進因子 formin、ミオシンリン酸化をおこす ROCK があると考えられている。

収縮環の形成過程とその微細構造解析: 私達は卵細胞の様々なアクチン調節タンパク質を単離精製し、それらの同定と細胞質分裂への関与を研究してきた。最近、分裂酵母のアクチン脱重合タンパク質 Adf1 が収縮環の形成と構造維持に必須であることを見いだした。アメリカでは分裂酵母の formin Cdc12 が収縮環形成に必須であり分裂前に分裂面の一点に局在するところが報告された (Chang 1999)。一方動物細胞でも formin が細胞質分裂に必須であることが報告されている (成宮ら, 1997) が収縮環形成にどのように働くかは分かっていない。

収縮環の収縮: 私達は卵細胞よりミオシンを発見し、次いでミオシンが細胞質分裂に必須であることを証明した。さらにイモリ卵、ウニ卵から分裂溝の単離とその微細構造解析を行ってきた。これらの研究から収縮環の収縮はミオシンを介したアクチン繊維同士のスリによることが確立した。

一方私達はウニ卵で、収縮環の収縮の際にアクチンの脱重合が必要であることを見いだした。その後、カエル卵で収縮環アクチンがターンオーバー(分子交換)していること、下等真核生物の分裂酵母の収縮環ミオシンも分子交換していることを示した。これらのことから私は収縮環の収縮に脱重合が共役するというモデルを考えてきた。

2. 研究の目的

細胞分裂は生物の増殖・成長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。収縮環は主としてアクチンフィラメント (F-アクチン) と II 型ミオシン (以下ミオシン) から成り、これらの相互作用によって収縮する。収縮環がどのような経路で形成されるかという問題は、この分野の中心的課題になっている。私達は本研究の4年間で分裂シグナルを受けて収縮環がどのように形成さ

れ、収縮・消滅するかを分子レベルで解明したい。そのために、主として分裂酵母、ウニ卵、カエル卵を用い、分子細胞生物学の各手法を用いた解析を行う。

3. 研究の方法

1) 収縮環形成: 分裂酵母にアクチン結合ペプチド Lifeact-mRuby 融合タンパク質を発現させてアクチンがどのように収縮環を形成していくかを live 観察する。これを野生型株とアクチン脱重合タンパク質 ADF(Adf1)の変異株において行い、Adf1 が収縮環形成にどのような役割を担っているかを明らかにする。

2) 収縮環の収縮能の研究: 分裂酵母の収縮環-細胞膜複合体を単離し、その収縮の条件を調べる。収縮がアクチンの脱重合を伴うかどうかについて、収縮に対する Adf1 の役割、トロポミオシン Cdc8 の役割、加えたアクチンの影響を調べる。

3) 卵細胞の分裂溝における収縮環関連因子局在の検討: ウニ卵の単離分裂溝における収縮環形成因子 (Rho 関連因子、formin/Diaphanous タンパク質)、ミオシンの局在を蛍光抗体法により調べる。

4) 人工細胞系の開発による収縮環形成の研究: カエル卵の細胞質を人工脂質膜に封入し、この人工脂質小胞が分裂する条件を探索することにより収縮環形成のメカニズムに迫る。

4. 研究成果

1) *adf1* 変異株は正常な収縮環を形成できないが、間期の細胞端にあるアクチンパッチは凝集して細胞中央部へ移動することを見いだした。これは野生型株ではみられない。この移動に V 型ミオシンが関与していることもわかった。野生型株においても収縮環を形成するアクチンの分裂位置への移動に V 型ミオシンが関与していると考えられる。現在論文執筆中である。

2) 分裂酵母の収縮環-細胞膜複合体 (細胞ゴースト) を単離し、ATP を加えて収縮環を人為的に収縮させることに初めて成功した。この実験系を用い、収縮環の収縮中にアクチンは脱重合して収縮完了時には消失しているが、アクチンの脱重合は収縮そのものには必須ではないことがわかった。また *in vitro* での収縮速度は生細胞中での収縮環の収縮速度の 20 倍以上だった。さらに収縮にはミオシン II の ATPase 活性が必須であることが確認された。この成果は論文発表した。

3) ウニのアクチン重合促進タンパク質 *uDia* の抗体をモルモットで新たに作製した。ウニ受精卵の分裂溝を単離し、蛍光抗体法で *uDia* の局在を調べたところ収縮環アクチン繊維と共局在することがわかった。また超解像蛍

光顕微鏡観察により、ミオシン繊維が収縮環中にアクチン繊維と平行に配列していることを見いだした。

4) カエル卵の CSF 抽出液をリン脂質膜に封入すると、小胞中に X-body と名付けた塊ができ、膜からこれに向けてアクチンの流れが起こることを見いだした。この流れがアクチン重合と脱重合によって起こることとミオシンもその維持に働くことを明らかにした。さらに、小胞がアクチンの流れと反対方向に運動することを見いだした。現在、論文執筆中である。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

馬淵一誠、柏崎隼. 2014. 細胞質分裂における収縮環の収縮: in vitro系の開発。細胞工学、査読無、33, 660-665.

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901559.html>

柏崎隼、馬淵一誠. 2014. 収縮環の in vitro収縮系の開発。生物物理、査読無、54, 201-205. Doi: 10.2142/biophys.54.201

馬淵一誠. 2014. 細胞はどのようにして分裂を繰り返すか。2001年ノーベル生理学・医学賞受賞Paul Nurse博士学習院大学講演録。細胞工学、査読無、33, 182.

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901511.html>

馬淵一誠. 2013. 顕微鏡でもものを見ることの新しい動き-特集によせて。生体の科学、査読無、64, 524-525. <https://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=35201>

柏崎隼、高木智子、馬淵一誠. 2013. in vitroにおける収縮環の収縮はミオシン II に依存するがアクチンのダイナミクスには依存しない。ライフサイエンス新着論文レビュー、査読無、7443.

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/7443>

Nakase, Y., Nakase, M., Kashiwazaki, J., Murai, T., Otsubo, Y., Mabuchi, I., Yamamoto, M., Takegawa, K., and Matsumoto, T. 2013. Fission yeast Any1, a β -arrestin-like protein, is involved in TSC-Rheb signaling and regulates amino acid transporters. J. Cell Sci. 査読有 126, 3972-3981. Doi:10.1242/jcs.128355

Mishra, M., Kashiwazaki, J., Takagi,

T. Srinivasan, R., Huang, Y., Balasubramanian, M. K., and Mabuchi, I. 2013. In vitro contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics. Nat. Cell Biol. 査読有 15, 853-859. Doi: 10.1038/ncb2781

Yano, K., Uesono, Y., Yoshida, S., Kikuchi, A., Kashiwazaki, J., Mabuchi, I., and Kikuchi, Y. 2013. Mih1/Cdc25 is negatively regulated by Pkc1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Cells 査読有 18, 425-441. Doi: 10.1111/gtc.12047

馬淵一誠. 2012. 研究の独創性、創造性とは。孤高の研究者ラポート博士の道。現代化学、査読無、501, 58-60. <http://www.tkd-pbl.com/book/b105913.html>

Pollard, T. D., Burgess, D., & Mabuchi, I. 2012. Remembrance of Ray Rappaport, pioneer in the study of cytokinesis. Cytoskeleton、査読無、69, 659-669. Doi: 10.1002/em.21070

[学会発表](計 25 件)

野田直紀、馬淵一誠 *Xenopus* 卵抽出液を封入した脂質膜人工小胞中でのアクチン動態。第 37 回日本分子生物学会年会 (2014.11.25-27 横浜)。

野田直紀、馬淵一誠 *Xenopus* 卵抽出液を封入した脂質膜人工小胞中でのアクチン動態。第 37 回日本分子生物学会年会 (2014.11.25-27 横浜)招待講演。

野田直紀、馬淵一誠 卵抽出液を封入した脂質膜小胞中でのアクチンのダイナミクス。日本生物物理学会第 52 回年会 (2014.9.25-27 札幌)

植田英一、柏崎隼、馬淵一誠 分裂酵母の収縮環形成における ADF/cofilin とフィンプリンの機能。第 66 回日本細胞生物学会大会 (2014.6.11-13, 奈良)

Mabuchi, I. Contraction of the contractile ring as studied by using an in vitro system. International Symposium on the Diversity of Cell Division System in Eukaryotes. (24-25 March 2014, Tokyo) 招待講演。

Mabuchi, I. In vitro reactivation of contractile ring in fission yeast cell ghost. 7th APOCB Congress and ASCB Workshop (24-27 Feb. 2014, Singapore) 招待講演。

Mishra, M., Kashiwazaki, J., Takagi, T., Srinivasan, R., Huang, Y., Balasubramanian, M. K., and Mabuchi, I. In vitro contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics. 58th Annual Meeting of the Biophysical Society (15-19 Feb. 2014, San Francisco) 招待講演

Kashiwazaki, J., Mishra, M., Balasubramanian, M., and Mabuchi, I. *In vitro* contraction system of the fission yeast contractile ring. 2013 ASCB Annual Meeting, New Orleans, USA (New Orleans, 2013.12)

馬淵一誠、柏崎隼、Mishra, M., 高木智子、Srinivasan, R., Huang, Y., and Balasubramanian, M. 2013. 収縮環の *in vitro* 実験系の開発による収縮機構の研究。第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、2013.12.3-6) 招待講演。

柏崎隼、Mishra, M., 高木智子、Balasubramanian, M., and 馬淵一誠. 2013. 分裂酵母収縮環の *in vitro* 再活性化。第 36 回日本分子生物学会年会(神戸、2013.12.3-6)

馬淵一誠 *In vitro* 実験系の開発による細胞質分裂の研究 シンポジウム「細胞を創る操る」(奈良、2013.11.28) 招待講演。

Balasubramanian, M., Mishra, M., Kashiwazaki, J., Tao, E. Y., Huang, Y., Huang, J. J., Takagi, T., Subramanian, D., Xie, T., Padmanabhan, A., Haochen, J., Wedlich-Soldner, R. and Mabuchi, I. Cytokinesis *in vitro* and *in vivo*, Cell Biology of Yeasts, Cold Spring Harbor, NY, 2013.11.5-9) 招待講演。

Kashiwazaki, J., and Mabuchi, I. Actin cable motility during interphase in fission yeast, Cell Biology of Yeasts, Cold Spring Harbor, NY, 2013.11.5-9)

Balasubramanian, M., Tao, E. Y., Mishra, M., Kashiwazaki, J., Huang, Y., Huang, J. J., Takagi, T., Subramanian, D., Xie, T., and Mabuchi, I. Cytokinesis *in vitro* and *in vivo*, 7th International Fission Yeast Meeting (London, June 2013) 招待講演

Mishra, M., Kashiwazaki, J., Takagi, T., Srinivasan, R., Huang, Y., Balasubramanian, M., and Mabuchi, I. *In vitro* contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics, 7th International Fission Yeast Meeting, (London, June 2013) 招待講演

Kashiwazaki, J. and Mabuchi, I. Actin stabiliser induces formation of motile thick actin bundles in *S. pombe* 7th International Fission Yeast Meeting. (London, UK, June 2013)

野田直紀、馬淵一誠 *Xenopus* 卵抽出液を封入した脂質膜小胞中でのアクチン動態。第 65 回日本細胞生物学会大会 (名古屋、2013.6.19-21)

柏崎隼、Mithilesh Mishra, Mohan Balasubramanian、馬淵一誠 分裂酵母ゴーストを用いた収縮環の *in vitro* 再活性化 第 65 回日本細胞生物学会大会シンポジウム(名古屋、2013.6.19-21) 招待講演

植田英一、柏崎隼、馬淵一誠 *adf1* 変異株でみられるアクチン塊の分裂位置への移動には Myo5 が関与する。第 65 回日本細胞生物学会大会 (名古屋、2013.6.19-21)

柏崎隼、馬淵一誠 間期の分裂酵母における V 型ミオシン依存的なアクチンケーブルの伸長方向制御。第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ & ポスター (福岡、2012.12.11-14)

21. Kashiwazaki, J., and Mabuchi, I. Actin stabilizer induces formation of motile thick actin bundles in fission yeast cells. 2012 Annual Meeting of the American Cell Biology Society (2012.12.15-19, San Francisco)

22. Uyeda, E-I., Kashiwazaki, J., and Mabuchi, I. Roles of actin-depolymerizing factor Adf1 in fission yeast cytokinesis. 2012 Annual Meeting of the American Cell Biology Society (2012.12.15-19, San Francisco)

23. Inaba, H., Mabuchi, I., Yoda, K., and Adachi, H. Analyses on the roles of two actin-binding domains of D411-2p protein involved in cytokinesis of *Dictyostelium*. Joint Meeting of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology (2012.5.28-31, Kobe)

24. Uyeda, E., Kashiwazaki, J., and Mabuchi, I. Role of Adf1 in the process of formation and contraction of the contractile ring in fission yeast cells. Joint Meeting of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th Annual Meeting of the

Japan Society for Cell Biology
(2012.5.28-31, Kobe)

25. Kashiwazaki, J., and Mabuchi, I.
Movement of cortical actin cables is driven
by type V myosins in interphase fission
yeast cells. Joint Meeting of the 45th
Annual Meeting of the Japanese Society of
Developmental Biologists & the 64th
Annual Meeting of the Japan Society for
Cell Biology (2012.5.28-31, Kobe)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：
[http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~e060105/
mabuchilab/index.html](http://www-cc.gakushuin.ac.jp/~e060105/mabuchilab/index.html)

新聞掲載：読売新聞夕刊 2013.8.1「細胞分裂
のリング」

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

なし

(3) 連携研究者

臼倉治郎 (USUKURA, Jiro)
名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授
研究者番号：30143415

孤嶋慎一郎 (KOJIMA, Shin-ichiro)

学習院大学・理学部・助教
研究者番号：30519210
平成 22-24 年度

柏崎隼 (KASHIWAZAKI, Jun)
学習院大学・理学部・助教
研究者番号：70570654
平成 25 年度より

(3) 研究協力者

柏崎隼 (KASHIWAZAKI, Jun)
平成 22-24 年度
高木智子 (Takagi, Tomoko)
Mohan K. Balasubramanian
Shinya Inoue