

令和元年5月30日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26712010

研究課題名(和文) in vitroとin vivoを組み合わせた分裂酵母細胞質分裂のメカニズム解明

研究課題名(英文) Combined approach of In vitro and in vivo analysis for mechanisms of cytokinesis in fission yeast

研究代表者

柏崎 隼(Kashiwazaki, Jun)

神戸大学・研究基盤センター・助教

研究者番号：70570654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は細胞全体の変形を伴うダイナミックな現象である細胞質分裂に注目し、分裂酵母をモデルとしてその分子機構の解明を目指している。分裂酵母の細胞質分裂において、アクチンの重合・脱重合が各ステップで重要であることを明らかにした。また、分裂酵母の収縮環収縮の仕組みを明らかにするため、細胞質を除去した細胞ゴーストまたは単離した収縮環を用い、微細構造解析、超解像顕微鏡解析によりミオシンが収縮環中にどのように分布・配置しているかを調べる方法を構築した。また、分裂酵母スフェロプラストが細胞壁分解酵素存在下で分裂する条件を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、細胞質分裂、細胞骨格研究分野に新たな知見を与えることができ、今後もさらなる成果が期待できる。細胞分裂は単細胞生物ではその増殖に、多細胞生物では発生、成長、個体の維持に必須の生命現象である。細胞質分裂がうまくいかないと細胞は多核になり、がん化する原因となり得る。細胞質分裂、収縮環の形成や収縮の仕組みを深く知ることは、医学・薬学分野にも有用な知見となる。また、病原性の真菌が多く知られているが、その治療や感染予防にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We study the mechanisms for cytokinesis, which is the dynamic process accompanied by the whole cell deformation using fission yeast as a model organism. It has been found that actin polymerization and depolymerization is important at each step in cytokinesis. To elucidate the mechanism for contraction of the contractile ring, I constructed the tool to analyze distribution and orientation of myosin II in a contractile ring by ultrastructural analyses and super resolution microscopies using the cell ghosts or the isolated rings. In addition, we found the special condition for cleavage furrow ingression in the fission yeast spheroplasts in the presence of cell wall-degradative enzymes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質分裂 収縮環 分裂酵母

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

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は単細胞生物ではその増殖に、多細胞生物では発生、成長、個体の維持に必須の生命現象である。細胞分裂は大きく分けて核分裂と細胞質分裂の二つのステップからなる。申請者は細胞全体の変形を伴うダイナミックな現象である細胞質分裂に注目し、その分子機構の解明を目指している。動物細胞では、アクチンと II 型ミオシンの束からなるリング (収縮環) が分裂面の細胞表層に形成され、収縮環の収縮に伴って細胞膜がくびれ込む。その後、収縮環は消失し、細胞の分離が別の仕組みにより引き起こされる。それぞれのステップにどのようなタンパク質がどのような機能を発揮しているのか、まだまだ不明な点が多く残されている。このような現象の理解には、複雑な *in vivo* の解析よりも、より単純化した *in vitro* 再構成系を用いた解析が適していると思われる。分裂酵母は動物細胞と同様にアクチンと II 型ミオシンからなる収縮環を形成する。申請者らは細胞壁を除いた球状の分裂酵母 (スフェロプラスト) に収縮環を形成させ、その細胞膜を部分的に破壊して細胞質を取り除くことで収縮環を保持した “細胞ゴースト” の作製に成功している。さらに、ATP を添加するだけで収縮環を *in vitro* で再活性化、つまり収縮させることに成功した (Mishra & Kashiwazaki *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2013, 図 1)。この細胞ゴーストを用いることでさらに有用な知見が得られると考えられた。

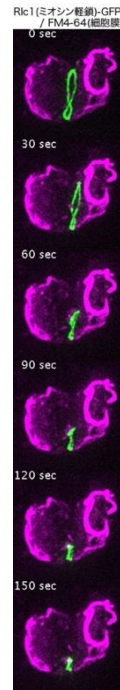


図 1: ゴースト中の収縮環収縮

2. 研究の目的

本研究は、細胞を物理的に二分する細胞質分裂のメカニズムについて、*in vivo* ライブイメージングと *in vitro* 再構成系の両方を駆使して包括的かつ詳細に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

分裂酵母の細胞質分裂に関する遺伝子について、蛍光タンパク質との融合タンパク質の局在や、変異株におけるアクチン細胞骨格や微小管の挙動について *in vivo* ライブイメージングにより細胞質分裂のどのステップに関わっているかを明らかにする。また、分裂酵母の細胞ゴーストによる *in vitro* 再構成系を用い、収縮環構成因子が収縮環の中で空間的にどのように配置しており、収縮中にどのような挙動を示すか、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いて明らかにする。研究を進める中で、分裂酵母のスフェロプラストが動物細胞のように分裂溝を形成する条件を見出したため、この分裂溝形成の仕組みを蛍光顕微鏡による詳細な観察により明らかにする。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母の細胞質分裂機構の解析

分裂酵母の細胞質分裂において、アクチン細胞骨格が様々なステップで異なるはたらきをすることが知られている。ADF/cofilin はアクチンの脱重合や切断を促進し、アクチン繊維のターンオーバーを促進する因子のひとつである。分裂酵母の唯一の ADF/cofilin オルソログである Adf1 の温度感受性変異株では、温度シフトのタイミングによりそのアクチン細胞骨格に及ぼされる影響が変化する。申請者らは、アクチンを生細胞で可視化する蛍光プローブを用い、細胞質分裂の各ステップについて温度シフトを行い、アクチンのダイナミクスがどのように関わっているかを調べた (図 2)。その結果、Adf1 は収縮環の形成、成熟、収縮環の収縮と隔壁の形成のすべてのステップに必要であり、ダイナミックなアクチンの重合 / 脱重合が細胞質分裂の各ステップにおいて重要であることがわかり、論文が国際誌に掲載された (Ueda *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2018)。

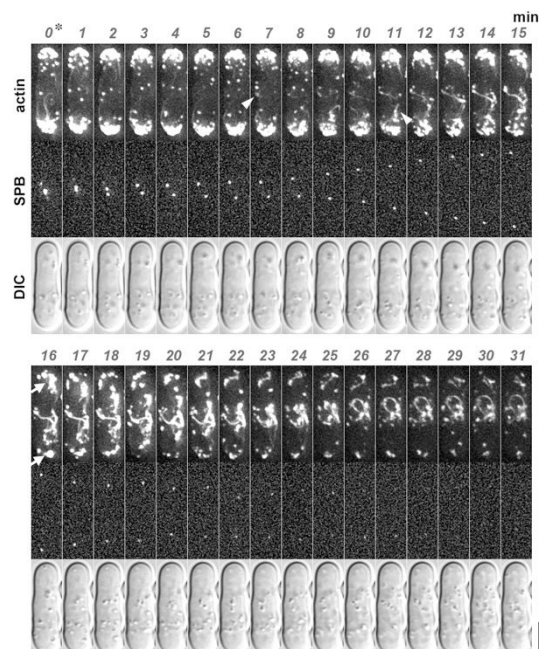


図 2 : adf1 変異株の異常な収縮環形成

分裂酵母の細胞質分裂にはたらく因子は分裂面に局在することが考えられる。これまで、分裂酵母のタンパク質の細胞内局在が網羅的に調べられており、分裂面に局在するが機能未知のものがいくつか報告された。キネシン様タンパク質である Klp8 もそのひとつである。申請者らは、細胞質分裂における Klp8 の役割を明らかにするため、Klp8 の遺伝子破壊株の表現型解析や過剰発現による影響を調べた。klp8 破壊株では、有糸分裂後期における紡錘体微小管伸長がやや遅

れたものの顕著な表現型は見られなかったが、Klp8 の過剰発現が細胞形態の異常を引き起こすことがわかった。さらに、この異常が微小管の安定化によることを見出した。これまで微小管の脱重合を促進するキネシンは知られていたが、Klp8 が微小管の安定化にはたらくキネシンである可能性を示唆した。この成果は国際誌に投稿中である。

(2) 分裂酵母ゴーストを用いた収縮環収縮機構の解析

分裂酵母ゴーストを用いた実験方法についての解説が日本生物物理学会誌、細胞工学および *Methods Cell Biol.* に掲載された。また、分裂酵母のゴーストを用いた収縮環の収縮機構について、詳細に解析を行った。収縮環中のミオシンは収縮するにつれてクラスターを形成する傾向があることがわかった。収縮環を構成する既知の因子について、収縮環収縮時の振る舞いをミオシンとの同時観察により調べた。収縮環中の局在パターンを蛍光強度解析により調べたところ、収縮前はミオシンと一致するものとそうでないものがあることがわかった。しかし、ATP 添加後、収縮に伴ってその局在パターンが徐々にミオシンクラスターと重なっていくことがわかった。また、アクチンの可視化を行ったところ、収縮環の収縮時にはアクチン繊維からなる数本の束が収縮環から放射状に出ていく様子が観察された。アクチンの脱重合を阻害しても収縮速度は変わらないことから、収縮中にアクチン繊維がどのように解離するかを考えるヒントになると思われる。一方で、生細胞ではこのような構造がみられないことから、生理的な意義について検討の余地がある。

(3) 分裂酵母収縮環の単離法の確立

新規の収縮環構成因子の同定および収縮環の微細構造解析のために、収縮環の完全単離法の検討を行った。収縮環の収率を上げるため、収縮環形成の同調系を再検討し、8 割近くのスフェロプラストに収縮環がみられる条件を確立した。これを用いて種々の処理を行い、図 3 に示すような収縮環の単離に成功した。しかし、その後の解析には純度や収量が十分でなかった。新規の収縮環構成因子同定のために、ゴースト試料の二次元電気泳動を行った。収縮環をもつものと収縮環をもたないものを比較したところ、スポットのパターンはよく似ており、顕著な違いを見出すことはできなかった。現在収縮環の単離法の改良を進めている。

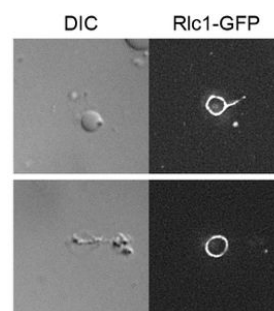


図 3 : 単離された収縮環

(4) 分裂酵母スフェロプラストの分裂溝形成機構

上記(3)の過程で、スフェロプラストが細胞壁溶解酵素存在下でも分裂溝を形成する条件を見出した。分裂酵母の細胞質分裂には、収縮環の収縮に加えて、細胞膜の伸展、細胞壁(隔壁)の合成が協調的に起こることが必要であることが報告されているが、細胞壁の分解は分裂溝の進行を妨げないことがわかった。この条件でグルカンを染色したところ、分裂溝の先端部における染色が常にみられたことと、グルカン合成酵素の変異株では分裂溝形成が著しく阻害されたことから、分裂溝先端部でのグルカン合成が分裂溝の維持に重要であることがわかった。この成果は現在論文投稿準備中である。

(5) 収縮環中のタンパク質配向解析

収縮環を構成するミオシン II が収縮環の中でどのような分布・配向をしているか明らかにするため、ミオシン II 重鎖の N 末端と C 末端に異なる色の蛍光タンパク質を融合したものを分裂酵母に発現する系を構築した。この株で細胞ゴーストまたは単離収縮環を調製し、超解像顕微鏡や免疫電子顕微鏡法によりミオシン II の頭部と尾部の分布を調べることを試みた。ゴーストや単離収縮環ではミオシン II はある程度クラスターを形成している可能性が考えられた。現在ミオシン II の配向について更に詳細に解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

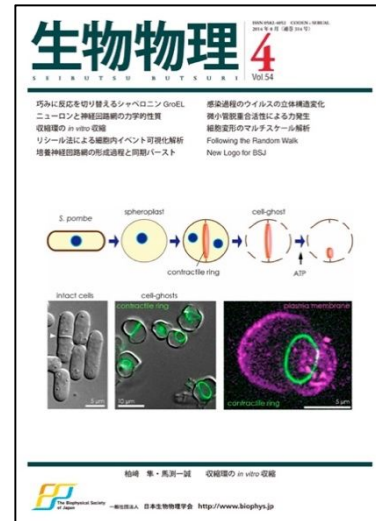
[雑誌論文](計 4 件)

- (1) Ueda, E., Kashiwazaki, J., Inoué, S., Mabuchi, I. Fission yeast Adf1 is necessary for reassembly of actin filaments into the contractile ring during cytokinesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506: 330-338. 査読有 (2018)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.156
- (2) Mabuchi, I., Kashiwazaki, J., Mishra, M. *In vitro* reactivation of the cytokinetic contractile ring of fission yeast cells. *Methods Cell Biol.* 137: 387-394. 査読有 (2017)
DOI: 10.1016/bs.mcb.2016.03.037
- (3) 馬淵一誠、柏崎 隼, 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, 33: 660-665. 査読なし (2014)

- (4) 柏崎 隼、馬淵一誠, 収縮環の *in vitro* 収縮系の開発, 生物物理, 54: 201-205. 査読有 (2014)

DOI: 10.2142/biophys.54.201

関連する図が同号の表紙に採用された(右図)



- [学会発表](計 13 件)
- (1) 柏崎 隼「超解像顕微鏡によるタンパク質配向解析の試み」酵母研究若手の会第 5 回研究会、理研和光、2019 年 3 月
 - (2) Mishra M, Swulius MT, Nguyen LT, Aiech S, Kashiwazaki J, Srinivasan R, Balasubramanian MK, Mabuchi I, Jensen G「Sculpting the ring to make a cut: contractile ring structure and mechanism of cell division」第 69 回日本細胞生物学会大会、仙台、2017 年 6 月(招待講演)
 - (3) 柏崎 隼「分裂酵母の収縮環と細胞質分裂について」酵母研究若手の会第 4 回研究会、基礎生物学研究所、2018 年 3 月
 - (4) Kashiwazaki J, Mishra M, Mabuchi I「Analyses of actin cytoskeleton dynamics in fission yeast cells」the 14th International Congress on Yeasts, Concurrent workshop W04「Imaging Technology」Awaji, September 2016(依頼講演)
 - (5) 柏崎 隼、馬淵一誠「分裂酵母スフェロプラストの分裂溝進行メカニズム」酵母遺伝学フォーラム第 48 回研究報告会、広島、2015 年 8 月
 - (6) 関根彩子、小林 礼、柏崎 隼、植田英一、馬淵一誠「分裂酵母 Cyclase-associated protein(CAP)の低グルコース環境への適応における役割」第 67 回日本細胞生物学会大会、2015 年 6 月
 - (7) Kashiwazaki J, Mishra M, Mabuchi I「Behavior of proteins during the contractile ring contraction in the *S. pombe* cell-ghost」8th International Fission Yeast Meeting, Kobe, Japan, 2015 年 6 月
 - (8) 柏崎 隼「分裂酵母のアクチンがつくる超分子構造」酵母研究若手の会第 2 回研究会、理研、2016 年 3 月
 - (9) 柏崎 隼「分裂酵母のアクチンがつくる超分子構造体 収縮環とアクチンケーブル」第 81 回酵母研究会講演会、京都、2016 年 3 月(依頼講演)
 - (10) 柏崎 隼、Mithilesh Mishra、馬淵一誠、「*in vitro*で探る分裂酵母の収縮環が縮む仕組み」第 88 回日本細菌学会総会 シンポジウム S3「再構築から明らかにする微生物のメカニズム」,長良川国際会議場, 2015 年 3 月(依頼講演)
 - (11) 柏崎 隼「ウニ卵のように分裂する分裂酵母のつくりかた」酵母研究若手の会第 1 回研究会、理研和光、2015 年 3 月
 - (12) 柏崎 隼、馬淵一誠「*in vitro*と *in vivo*で調べる分裂酵母の細胞質分裂の仕組み」日本農芸化学会、岡山大学、2015 年 3 月
 - (13) 柏崎 隼、馬淵一誠「分裂酵母を動物細胞のように分裂させる」2015 年 生体運動合同班会議、学習院大学、2015 年 1 月

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：馬淵 一誠
ローマ字氏名：MABUCHI Issei

研究協力者氏名：高津 正子
ローマ字氏名：TAKATSU Masako

研究協力者氏名：高木 智子
ローマ字氏名：TAKAGI Tomoko

研究協力者氏名：網蔵 令子

ローマ字氏名：AMIKURA Reiko

研究協力者氏名：荒井 律子

ローマ字氏名：ARAI Ritsuko

研究協力者氏名：植田 英一

ローマ字氏名：UEDA Ei-ichi

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。