

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14501

研究課題名(和文)細胞のくびれ運動を駆動する収縮環と細胞膜の相互作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of plasma membrane deformation during cell division.

研究代表者

上原 亮太(Uehara, Ryota)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：20580020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜と細胞骨格の相互作用の正確な制御は動物細胞の細胞質分裂にとって必須であるが、その分子機構は明らかでない。本研究では種々の細胞骨格細胞膜結合性因子の分裂期細胞内動態、機能解析を通して、細胞質分裂を司る膜、細胞骨格相互作用機構の理解を目指した。我々はERMタンパク質が細胞質分裂時に他の膜結合タンパク質とは異なる特徴的な細胞内動態および局在依存性を持つことを発見した。ERMタンパク質の欠損は細胞質分裂の完了を阻害しなかったが、膜収縮運動の特性を変化させた。興味深いことに、他の膜因子の発現を抑制するとERMの分裂位置への集積が顕著に増加し、収縮運動により積極的に寄与するようになることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Precisely controlled actin-membrane interactions are required for animal cytokinesis. We investigated the dynamics and functions of ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) proteins in control of cytokinesis in human cells. We found that stable association of ezrin to the furrow depended on cholesterol, but not on RhoA. Depletion of ERMs significantly changed the kinetics of furrow ingression but did not drastically affect the accuracy of cytokinesis. Notably, however, in the background of anillin and supervillin co-depletion, ezrin became drastically accumulated at the furrow and substantially contributed to the furrow ingression activity. The ERM-driven cleavage furrow in the anillin- and supervillin-depleted cells was narrower than that in unperturbed cells, suggesting characteristic mechanical property of ERM in inducing cell deformation. These results provide insight into cooperative regulatory system of actin-membrane interaction featuring multiple linkers with distinct molecular properties.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質分裂 細胞膜 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

細胞周期の最後、細胞膜のくびれ運動により細胞が二分される「細胞質分裂」は、生命継承に必須の現象である。くびれ運動は、分裂位置に現れる「収縮環」によって駆動されるが、構成要素の激しい分子交換と解体を伴って収縮する収縮環が、細胞膜と継続的な相互作用を維持しながら、細胞膜に変形力を伝搬する仕組みは不明である。その要因は、収縮環と細胞膜を係留する分子装置の実体が明らかでないことにある。これまでに細胞膜と細胞骨格を係留するリンカータンパク質が数多く同定されてきたが、それらが協調して細胞質分裂の制御に関わる仕組みは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞局在解析および細胞内機能解析を用いて収縮環の細胞膜への係留に関与する細胞骨格・細胞膜結合性因子を網羅的に同定し、それらの細胞質分裂期における細胞内動態や膜変形運動における機能、因子間の協働関係を明らかにすることを目指した。これらを通して細胞質分裂期に収縮環と細胞膜の間で起こる細胞装置間相互作用の実態を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞材料

本研究の実験にはすべてヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、およびヒト大腸ガン由来 DLD-1 細胞を用いた。いずれも DMEM 培地に 10%牛胎児血清および抗生物質（ペニシリン・ストレプトマイシン）を添加した培地で摂氏 37 度、5%CO₂ の環境を維持するインキュベーター内で培養した。

(2) 遺伝子阻害実験

遺伝子阻害実験には RNAi 法を用いた。具体

的には、各標的遺伝子をコードする siRNA を、Lipofectamin RNAiMAX (invitrogen)により細胞内に導入し、1-4 日間培養することで、遺伝子発現阻害を行って下記の実験に供した。各種外性遺伝子の導入には JetPEI (Polyplus science)を使用した。

(3) 間接蛍光抗体法

細胞内における細胞骨格・細胞膜結合性因子の局在を解析するために間接蛍光抗体法を行った。具体的には細胞を 3.2%パラフォルムアルデヒド含有緩衝液で固定後、0.5%トライトン X100 含有緩衝液で透過処理し、蛍光抗体法によって標的遺伝子産物を染色することで観察した。パラフォルムアルデヒドにより抗原性が失われてしまう標的を染色する際には 100%メタノールもしくは 10%トリクロロ酢酸を用いて細胞固定を行った。各種因子の抗体は、メーカーから購入して用いた。

(3) 細胞観察

細胞観察は、60x および 100x 対物レンズを装着したスピニングディスク型コンフォーカル顕微鏡によって行った。生細胞観察の場合、観察の数時間前に細胞培養液をフェノールレッド不含の培地に交換し、ステージインキュベーター内で、摂氏 37 度、5%CO₂ 環境の下で、細胞をカバーガラスボトムチャンバー内に培養した状態で蛍光タンパク質によってタグした標的因子の細胞内動態を観察した。

(4) 生化学実験

タンパク質発現量解析は、ウェスタンブロット法を用いて行った。まず、細胞をサンプルバッファーにより溶解、ボイルしたのち、SDS-PAGE ゲルにアプライして、電気泳動した。タンパク質の展開後、ゲルを PVDF 膜にトランスファーし、各因子特異的抗体により標的タンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) アニリン阻害細胞における各細胞骨格・細胞膜結合性因子の細胞内局在

先行研究により、細胞骨格・細胞膜結合性因子アニリンが細胞質分裂期に細胞分裂位置に集積し、収縮環の収縮運動制御に必須の役割を果たすことが知られている(Oegemaら、2000 *Journal of Cell Biology* など)。アニリンの発現抑制細胞では、収縮環が細胞の分裂位置から途中で脱離することで細胞質分裂の進行および完了が重度に抑制され細胞が分裂に失敗するが、その際にも収縮環の収縮運動の開始は正常に起こり、また、その他の細胞膜の変形運動も観察される。このため、アニリン以外にも細胞質分裂期の細胞膜変形に関わる重要な因子が存在することが推測された。

そこで、アニリン発現抑制細胞において、GFP タグging法により、種々の細胞骨格・細胞膜結合性因子の細胞内動態を生細胞観察し、細胞膜変形活動に関わる特徴的な挙動を示す因子を探索した。その結果、正常細胞においてすでに分裂位置への集積が報告されていた ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) タンパク質(Satoら、1991 *Journal of Cell Biology*) が、アニリン発現抑制細胞において興味深い挙動を示すことを見出した。Ezrin-GFP は、分裂開始時から細胞赤道上の分裂位置に集積し、アニリン発現抑制による収縮環の脱離後も分裂位置の細胞がくびれた部位に集積し続けた。これは、収縮環の脱離後に収縮環とともに分裂位置から脱離する *Supervillin* など他の細胞骨格・細胞膜結合性因子とは極めて異なる特徴的な動態であった。さらに、Ezrin-GFP は細胞の極表層が収縮する際のみ極にも一過的に集積することが見出された。これらの観察から、ERM タンパク質がアニリン発現抑制時に細胞膜が変形する部位に特徴的に局在する因子であることがわか

ったため、その局在メカニズムおよび細胞変形における機能をさらに解析することにした。

(2) ERM タンパク質の細胞分裂位置への局在依存性

先行研究により、ERM タンパク質の細胞膜との相互作用には低分子量Gタンパク質 RhoA によって制御されるシグナリング経路が関与することが示されていた(Hiraoら、1996 *Journal of Cell Biology*)。RhoA は細胞質分裂制御において収縮環の形成・機能に必須の役割を果たすことから(Mabuchiら、1993 *Zygote*)、まず ERM タンパク質の細胞分裂位置への局在における RhoA の重要性を検証した。RNAi により RhoA の発現を抑制すると、内性 RhoA タンパク質の発現が効率的に抑制され、RhoA 依存的に分裂位置に集積することが知られている *Citron kinase*(Madauleら、1998 *Nature*) の分裂位置への集積が抑制された。このとき、ERM タンパク質はコントロールと同様に分裂位置に集積し続けることがわかった。

一方、細胞質分裂期に細胞分裂位置に集積することが知られるコレステロールをメチルシクロデキストリン処理によりキレートすると、著しく ERM タンパク質の分裂位置への集積が抑制され、細胞の極部位へ散逸することがわかった。このとき、アニリンや RhoA は分裂位置に局在したままであったことから、ERM の細胞内局在が、これらの細胞質分裂関連細胞膜結合性タンパク質とは異なる分子メカニズムにより制御されていることが明らかになった。

(3) ERM タンパク質の細胞質分裂制御への関与

次に ERM タンパク質の細胞質分裂制御における機能を解明するために、RNAi によりすべての ERM タンパク質を同時抑制し、分裂進行

への影響を調べた。ERM の発現抑制は細胞質分裂の失敗によって引き起こされる細胞の二核化の発生率を顕著には上昇させなかったが、細胞質分裂における膜変形の動態を生細胞観察により詳細に解析すると、ERM の抑制により収縮運動の開始フェーズが加速し、逆に本来収縮が加速される収縮進行フェーズにおける最大収縮速度が有意に減少していることを見出した。このことから、ERM は分裂位置における細胞膜変形に必須ではないが、膜変形の動態制御に関与している可能性が示唆された。また、アニリンと ERM を同時発現抑制すると、通常アニリン抑制細胞で見られる細胞極表層の収縮現象が劇的に抑制されることがわかった。このことから、ERM は分裂位置だけでなく分裂細胞全体における細胞膜と細胞骨格の相互作用に関与していることが示唆された。

一方で、アニリンと同時に別の細胞骨格・細胞膜結合性因子である Supervillin を発現抑制すると、アニリンを単独で発現抑制した際に見られる分裂位置での細胞膜収縮速度の減少が部分的に抑制される（加速される）ことを見出した。興味深いことに、アニリンと Supervillin を同時に発現抑制した細胞では、Ezrin の分裂位置への集積が数倍程度増加することがわかった。さらに、アニリン、Supervillin に加えて ERM を同時発現抑制すると、アニリン、Supervillin 発現抑制時に見られた収縮速度の加速が完全に抑制されたことから、ERM は、他の重要な収縮制御性の膜タンパク質が欠損した際に、それらの欠失を相補する新奇の役割を有していることが明らかになった。

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 1 件)

(1) Uehara, R., Kamasaki, T., Hiruma, S., Poser, I., Yoda, K., Yajima, J., Gerlich, D.W., Goshima, G. (*corresponding author)

Augmin shapes the anaphase spindle for efficient cytokinetic furrow ingression and abscission.

Molecular Biology of the Cell
(2016) 27:812-827 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)
Shota Hiruma and Ryota Uehara

Molecular mechanism of the contractile ring-the plasma membrane interaction during cytokinesis in human cells
日本細胞生物学会 69 回年会 シンポジウム 仙台国際センター2017年6月13-15日 招待講演

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://tenure-track.cris.hokudai.ac.jp/lab/uehara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 亮太 (UEHARA, Ryota)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：20580020

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
比留間 翔太 (HIRUMA, Shota)
北海道大学・生命科学院・博士課程