

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07338

研究課題名(和文) アルベオラータ生物のアクトミオシンによらない細胞質分裂の分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism of cytokinesis that does not depend on actomyosin in Alveolata

研究代表者

中野 賢太郎 (NAKANO, Kentaro)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50302815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質分裂の分子機構は、動物細胞や酵母等のモデル生物を用いて研究が進められてきた。その結果、アクトミオシンからなる収縮環による巾着モデルが提唱された。だが、このモデルで原動力を発生するミオシンは、オピストコンタに特有である。本研究では、他の生物グループの細胞質分裂の分子細胞生物学的理解を深めるため、繊毛虫テトラヒメナについて研究した。その結果、フォルミンファミリー蛋白質が基底小体BBに局在し、細胞内のジオメトリーを制御して分裂溝の形成位置の決定に関係する可能性を発見した。また、分裂初期にBBに分布し、その後縦行微小管に移行する蛋白質キナーゼが細胞質分裂の進行に必要なことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞質分裂の分子機構が不明であった、アルベオラータ生物群の代表的なモデル生物である繊毛虫類のテトラヒメナについて本研究を行うことで、従来考えられてきたアクチンとミオシンに依存的な細胞質分裂のマシナリーがあてはまらない生物がいることを確実に示すことに成功した。一方で、テトラヒメナのフォルミンファミリータンパク質が微小管細胞骨格や基底小体と係り、細胞質分裂の制御に寄与する結果を示すことに成功した。さらに細胞質分裂の進行に必要なタンパク質キナーゼを同定することに成功した。この成果は、真核生物の細胞質分裂の分子機構には多様性があることを示した点で学術的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of cytokinesis has been well studied using model organisms such as animal cells and yeast. For these cells, a "purse string model" has been proposed with a contractile ring composed of actomyosin. However, the myosin II that generates the driving force in this model exists only in the Opisthokont. In this study, we investigated cytokinesis of the ciliate Tetrahymena in order to gain a further understanding of the molecular and cellular biology of cytokinesis in other groups. As a result, we found that the formin family proteins are localized in the basal body BB and may be involved in determining the position of the cleavage furrow by controlling the intracellular geometry. We also found that a protein kinase that distributes in the early BB and then translocates to the longitudinal microtubule is required for progression of cytokinesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：テトラヒメナ アクチン ミオシン フォルミン 微小管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は生命活動の基盤である。全ての生物は、約 40 億年以前に誕生した祖先型細胞が、連綿と増殖・分裂を繰り返し、現在に至る。細胞の分裂様式は保守的でありながら、生物のドメインや界などで大きく異なり、また同じ生物種でも環境条件や生理条件に適した様式をとることが知られている。ところが、細胞の分裂様式の多様性について、分子細胞生物学的研究はほとんど行われていない。

細胞分裂の分子機構は、動物細胞や酵母などのモデル生物を利用して研究がよく進められてきた。これらの細胞でアクチン・ミオシンからなる収縮環を構成し、分裂する「巾着モデル」が提唱されている。ところが、この細胞質分裂の原動力を発生する型ミオシンは、真核生物の限られた系統にだけにしか存在しない。つまり、オピストコンタ生物群以外の生物グループでは、細胞体をくびり切る原動力は、何が生み出すのか不明である。またオピストコンタ生物群の分裂においては、母細胞が分裂する位置を決める仕組みとして、細胞核または紡錘体の位置、あるいは紡錘体両極から展開される星状体微小管が交差した位置が大切なことがわかっているが、他の生物群ではその仕組みは異なると考えられる。しかし、オピストコンタ生物群以外で分裂シグナルの実体が解明されている生物種は僅かしかない。

2. 研究の目的

上記のように、地球生命は原始細胞の誕生後、分裂・増殖し、その命を 40 億年近くも紡いできたため、細胞分裂は生命の根源的現象であり、その分子機構は生物間で普遍的だと盲目的に信じられてきた。しかし、個々の生物群の細胞の分裂を観察した知見等を並べると、生命活動に根源的な細胞分裂の分子基盤には進化的多様性があるはずである。そこで、その分子細胞生物学的な理解を本研究では深めることを目的とした。我々は、先行研究において、原生生物の代表的なモデル生物である繊毛虫テトラヒメナが、アクチン・ミオシン非依存的に細胞質分裂する可能性を見出している。そこで、繊毛虫テトラヒメナにおける動物細胞と異なる細胞分裂機構を解析し、多くの原生生物などの生物群の細胞質分裂の分子基盤が、酵母や動物細胞とは別のものであることに先鞭をつける。さらに、繊毛虫類は渦鞭毛藻やアピコンプレクサと共に、アルベオラータ生物群を構成する。繊毛虫テトラヒメナに特有の細胞分裂の分子機構が解明されれば、赤潮の原因となる渦鞭毛藻や、マラリアやトリパノソーマなどの病原性寄生原虫を含むアピコンプレクサの増殖制御の基礎的な知見が蓄えられると期待できる。

原生生物にみられるアクチン非依存的な細胞質分裂

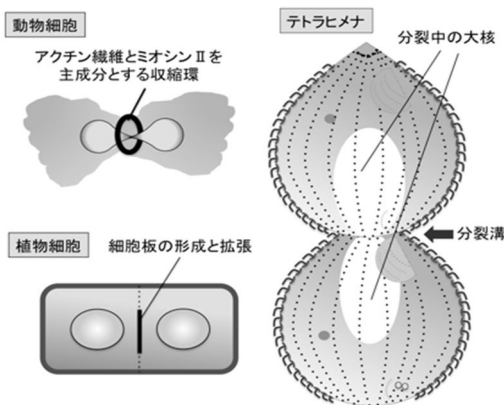


図1 真核生物の 8 つの生物群において、酵母や動物はオピストコンタという 1 つの生物群に過ぎない。オピストコンタや高等植物を除く真核生物の大部分は、単細胞生物であり、原生生物と総称される。その内、動物細胞のように分裂溝を形成して、二分裂するものは多い。アルベオラータに属する繊毛虫類もその 1 つである。最近まで、アクチン・ミオシンの収縮環依存的に細胞質分裂すると信じられてきたが、*Tetrahymena thermophila* のゲノム解読の結果、この生物は収縮環の原動力を発生する型ミオシンをもたないことが判明した。型ミオシンはオピストコンタに限って存在する。つまり、酵母や動物細胞はその系統発生後に、収縮環依存的な分裂様式を採用したと推測できる。

3. 研究の方法

本研究では、繊毛虫テトラヒメナの中で、全ゲノム配列が決定してアノテーションなどが進み、遺伝子操作方法が確立している *Tetrahymena thermophila* を対象生物に選び、主に以下の 3 つの研究計画を推進した。

- (1) アクチン・ミオシン非依存的な分裂溝形成のしくみ
- (2) 基底小体の機能分化と分裂面決定のメカニズムについて
- (3) 細胞膜を裏打ちするアルベオラーサック (AS) の分配機構とその制御

(1)では、分裂溝形成に必要な遺伝子産物の同定を目指した。(2)では、細胞表層全体にある多数の基底小体から、分裂面が選別され、機能発現する機序を解くことを目指した。(3)では、細胞分裂時に分裂溝直下のアルベオラーサック (AS) が適切に分配され、娘細胞に伝搬されるしくみを調べることを試みた。なお、これらの解析は密接に関連があるため、実験結果や細胞株等の解析ツールを柔軟に相互活用する工夫を施した。また本研究では、*T. thermophila* の遺伝子導入用コンストラクトの構築に用いる PCR プライマーの設計の工夫や、GFP を高発現する細胞株をクローニングするための改善方法を検討した。その結果、In-fusion を用いたクローニングシステムが効率的に動くため、従来の PCR ベースでの遺伝子導入用コンストラクトの構築から、In-fusion クローニングシステムに切り替えるなど行った。またベンチャー企業の協力を得て、テトラヒメナを 1 細胞ずつ単離・培養する系を確立するのにも成功した。さらに、ABiS の研究支援課題である細胞の繊毛運動波形を高時間分解能且つ高空間分解能での計測については、従

来よりも明瞭な繊毛運動波形の記録取得に成功した。その際に、精密光学機器メーカーの技術協力により、テトラヒメナを吸引し固定する観察チャンバーの導入も試みた（しかし、この系では微分干渉法や位相差法などが利用できないという光学的問題が浮上し、ロトキネシス時の繊毛運動の波形パターンを計測するまでには至っていない。チャンバーの構造を見直すなどの改善を検討したが、本課題終了までには間に合わなかった）。

4. 研究成果

繊毛虫テトラヒメナのユニークな細胞分裂の分子機構の解明を目指し、1.アクトミオシン非依存的な分裂溝形成に必要な遺伝子の同定、2.テトラヒメナの細胞表層全体にある多数の基底小体 (BB) から、分裂面の BB が選別されて分裂溝の形成を誘導する機序、3.細胞分裂時に分裂溝直下のアルベオラーサック (AS) が適切に分配され、娘細胞に伝搬されるしくみの研究に着手した。以下順を追って説明する。

(1) アクトミオシン非依存的な分裂溝形成のしくみ

まず細胞分裂中のテトラヒメナの分裂溝に、アクチンが局在するか確認実験を実施した。先行研究では、アクチン抗体を用いた間接蛍光抗体染色法により、分裂溝にシグナルが報告されていた。しかし、我々が同様の実験を行っても再現性はほとんど得られなかった。そこで、GFP を利用し、先行研究で分裂溝に局在が報告されていたフィンプリン FIM1、アクチン繊維結合ペプチドとして動植物の細胞で幅広く利用されている Lifeact、及び *T. thermophila* の主要なアクチンである ACT1 の細胞内分布を調べた。その結果、Lifeact-GFP 発現細胞では、蛍光シグナルが細胞質全体にほぼ均一に広がったため、テトラヒメナのアクチン繊維とは結合しないこと結論した（結果示さず）。FIM1、及び ACT1 については、細胞の口部装置近傍と食胞膜周辺にドット上のシグナルが検出された。これらのシグナルは、アクチン重合阻害剤処理で消失するため、細胞内のアクチン繊維を検出していると判断した。一方で、分裂細胞においては分裂溝に濃縮したシグナルは認められなかった（結果示さず）。GFP の結合部分をアミノ (N) 末端からカルボキシ (C) 末端に変えても、同様の結果が得られた。これより、テトラヒメナの細胞質分裂における分裂溝の陥入には、ACT1 を主成分とするアクチンは必要ないことが示唆された。この研究成果は、先行研究で報告されている ACT1 遺伝子破壊細胞でも分裂溝の陥入が進行できる結果と矛盾しない。

次に、ACT1 以外のアクチン遺伝子産物の関与についても確認した。*T. thermophila* は、ACT2、ACT3、ACT4 (ARP1)、及び tARP の4種類のアイソフォームを有する。それぞれの遺伝子破壊実験の結果と、遺伝子産物の局在について、表1に示す。

表1 アクチンアイソフォームの機能解析の結果

	ACT2	ACT3	ACT4 (ARP1)	tARP
遺伝子破壊株の表現型	細胞増殖に影響なし。分裂像にも異常なし。	細胞増殖に影響はほとんどない。遊泳運動能が低下した。異常な分裂像がみられる。	細胞増殖が著しく遅くなる。細胞形態や分裂像が異常な細胞が高頻度で出現。	細胞増殖に影響はない。遊泳運動能が低下した。分裂像に異常なし。
遺伝子産物の細胞内分布 (GFP 発現細胞の観察より)	細胞の口部装置近傍と食胞膜周辺にドット上に分布。	繊毛内に分布。	細胞表層に並ぶ基底小体に分布。	繊毛内に分布。

ACT4 についてはその後の研究から、ダイナクチン複合体を形成する ARP1 であることが判明した。そのため、ACT4 遺伝子破壊株では、細胞質ダイニンの機能に支障を生じ、細胞内の微小管の分布などが著しく影響を受けることがわかった。テトラヒメナの細胞表層には緻密な微小管細胞骨格のネットワーク構造が存在する。これらの構造が壊れることで、細胞形態の維持ができなくなった可能性が高い。細胞質分裂の異常（分裂位置の異常、多核細胞や無核細胞の出現）については、細胞形態の異常による副次的な可能性と、細胞質ダイニン自体が直接に細胞質分裂に関与している可能性が考えられた。しかし、本研究ではこれらの可能性を切り分けるには至らなかった。

一方、ACT3 遺伝子破壊株では、細胞質分裂の完了がうまくできない細胞が全体の2%程度観察された。この遺伝子破壊株は、野生型細胞と比べて遊泳運動速度が下がっており、繊毛運動の繊毛打頻度も低下しているのがわかった。細胞質分裂の異常は、遊泳運動能が低下した結果、細胞の分裂溝の陥入の最終段階であるくぶりきり運動（ロトキネシス）の効率が悪くなっているためだと推測した。そこで、研究方法に上述したように、ABiS の支援を受けて解析を進めた。しかし、技術的な問題を克服できずに、この推測を確認するには至らなかった。

細胞内で機能する真っ直ぐに伸長したアクチン繊維の形成には、フォルミンファミリーのアクチン重合タンパク質が重要な役割を担う。そこで、テトラヒメナのフォルミン様遺伝子 BNI1、BNI2、及び BNI3 の機能解析を進めた。この結果については、(2) と関連するため後述する。

(2) 基底小体の機能分化と分裂面決定のメカニズムについて

GFP を用いて BNI1、BNI2、及び BNI3 の細胞内局在解析を進めた結果、これらのうち、前2者が基底小体 (BB) に局在することを見出した。一方、BNI3 はアクチンの分布と類似し、食胞周辺に明瞭なシグナルが見られた。さらに、BNI1 の局在を精査した結果、分裂中のテトラヒメナの分裂溝に濃縮する様子が観察された (図2)。この局在はアクチン繊維には依存しないこともわかった (図2A)。一方で、微小管を冷却処理などで壊すと、局在は消失した (図2B)。BNI2 についても BNI1 と同様の局在を取ることがわかった (結果は示さず)。

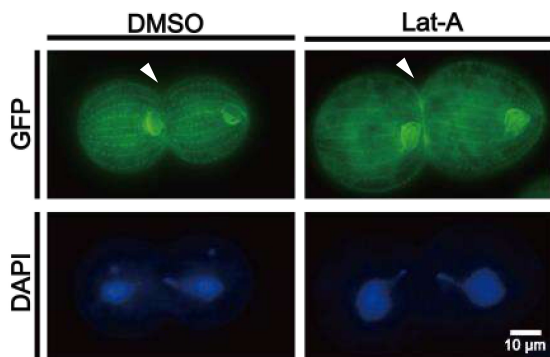
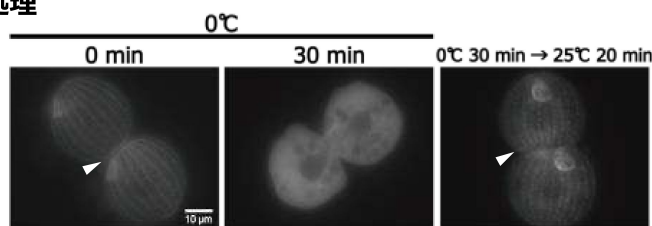


図2 GFP-BNI1 発現細胞の観察

A) 細胞をホルマリン固定し、DAPI で DNA を染色し、大核と小核も観察した。細胞表面全体に点状に並んでいるのが基底小体 (BB) に分布する GFP-BNI1 である。特に口部装置には BB が密に分布するため、シグナルが強く見られる。白い矢頭が指す部分が分裂溝に分布する GFP-BNI1 である。アクチン重合阻害剤で処理しても、分裂溝の GFP-BNI1 のシグナルは残っていた。

冷却処理



B) 冷却処理を行なった結果、BB 及び分裂溝の GFP-BNI1 のシグナルが消失した。温度を室温に戻すと、シグナルも回復するのが認められた。

次に遺伝子破壊実験を行なった。その結果、BNI1 や BNI3 の機能が失われても、細胞はほぼ正常に増殖できた。一方、*BNI2* 遺伝子破壊株では、細胞増殖速度が低下し、分裂像が異常な細胞が高頻度で観察された (図3)。その結果、無核あるいは多核の細胞が出現した。

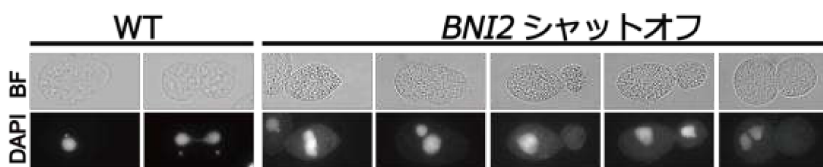


図3 *BNI2* 遺伝子破壊株の分裂像を観察した結果、分裂位置が細胞の中央からずれるのが高頻度でみられた。

以上より、BNI1 や BNI2 が BB に局在し、細胞内のジオメトリーを制御して分裂溝の形成位置を決めるのに関与している可能性を推測した。このシグナルに Rho ファミリー低分子量 GTPase が寄与するか調べる目的で、*T. thermophila* に2種類存在する Rho 様遺伝子の機能解析を行なったが、現在までに細胞質分裂に関するポジティブな結果は得られていない (結果は示さず)。フォルミンファミリーのタンパク質には微小管の制御に働くものが知られているため、テトラヒメナの BNI1 や BNI2 が微小管と共に細胞質分裂に寄与する可能性が期待できる。

また本研究では、細胞の予定分裂面の BB に限局する CMB1 に着目し、*cmb1* 遺伝子破壊株を作成した。しかし、この遺伝子破壊株は正常に分裂し、増殖できた。*T. thermophila* のゲノムを確認したところ、CMB1 に類似の遺伝子は見当たらなかった。そのためテトラヒメナは、CMB1 の経路とは別に細胞分裂面を決定するしくみを有すると推察した。

一方、我々が薬剤スクリーニングで目星をつけていた細胞分裂に働く蛋白質キナーゼ群について、研究を進めた (論文投稿準備中のため遺伝子の名前は伏せる)。分子系統解析と発現量の検討を行い、まず2つのキナーゼの細胞内局在性を調べた。GFP 発現細胞を作成した結果、いずれも BB に局在した。興味深いことに、そのうちの一方のキナーゼは分裂期初期の BB に分布し、分裂期の進行とともに縦行微小管に移行した (図4)。このような局在様式の変化を示す蛋白質はこれまでに知られておらず、その生理的意義は不明である。そこで、これらのキナーゼについて、ドミナントネガティブ変異体を作成し、それぞれをテトラヒメナ野生株に発現した。その結果、薬剤処理した細胞と同様に分裂溝の陥入が抑制された表現型を呈するのが観察された (図5)。これより、テトラヒメナの細胞質分裂の進行に必要な蛋白質キナーゼをコードする遺伝子を単離できたと思われる。さらに、同キナーゼ遺伝子群の別の4つの遺伝子の産物についても、GFP による局在解析を行った。これらのうち3つは細胞周期を通じて BB に局在したため、先の2つの遺伝子産物と重複する機能を担っている可能性が考えられた。他の1つについては、特定の時期にだけ大核内に集積するのが認められた。以上の4つの蛋白質キナーゼ遺伝子についてはドミナントネガティブ変異を導入し、細胞に発現する準備を進めたが、表現型の特定には至っていない。

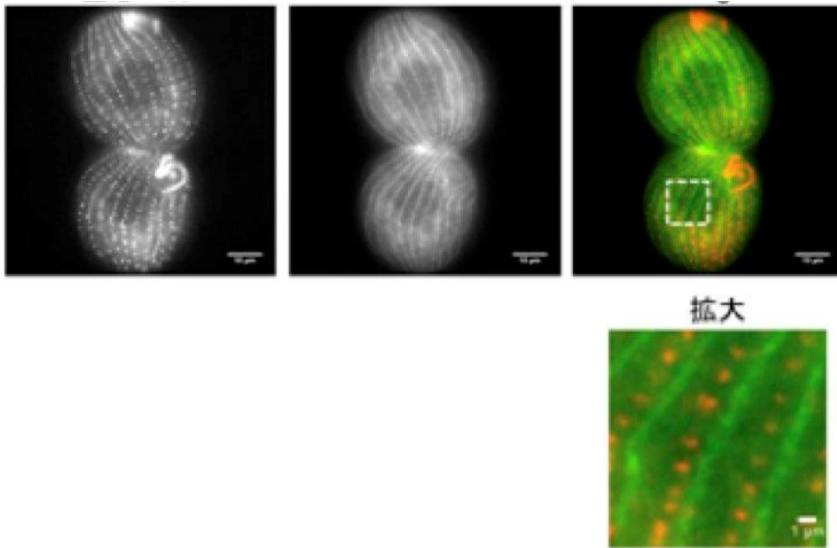


図4 テトラヒメナの細胞分裂に働く蛋白質キナーゼは、分裂期終期に、縦行微小管に移行した(中央の写真)。左はセントリン抗体で染色した BB。右は重ね合わせした画像。点線の部分を拡大したものを下に示す。

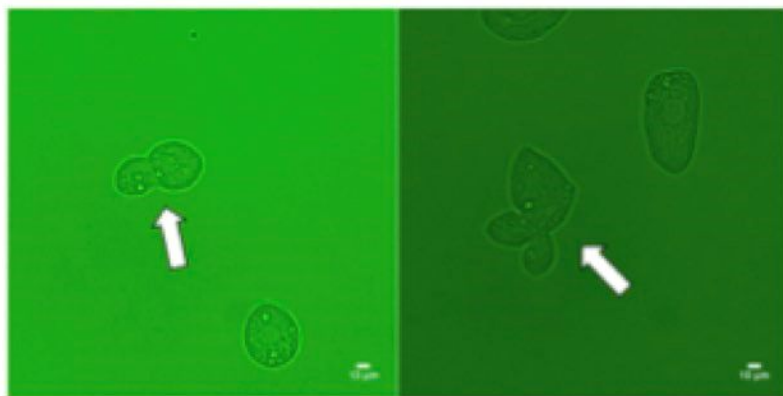


図5 テトラヒメナの細胞分裂に働く蛋白質キナーゼのドミナントネガティブ型遺伝子を細胞に発現した。その結果、矢印で示すような分裂異常が高頻度で観察された。

(3) 細胞膜を裏打ちするアルベオラーサック (AS) の分配機構とその制御

本研究では、先行研究で AS に付随するエピプラズム層構成蛋白質 TCBP25 を GFP で標識した細胞株の作成を試みたが、残念ながら成功には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuharu Kushida, Masak Takaine, Kentaro Nakano, Toshiro Sugai, Krishna Kumar Vasudevand, Mayukh Guha, Yu-Yang Jiang, Jacek Gaertig & Osamu Numata	4. 巻 0
2. 論文標題 Kinesin-14 is Important for Chromosome Segregation During Mitosis and Meiosis in the Ciliate <i>Tetrahymena thermophila</i>	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Eukaryotic Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1111/jeu.12366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hagita Minoru, Fujito Kota, Numata Osamu, Nakano Kentaro
2. 発表標題 Functional analysis of a ciliate specific actin-related protein, tAtp, localized in cilia of <i>Tetrahymena thermophila</i>
3. 学会等名 Cell and Developmental Biology Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石坂 望生, 藤戸 洸太, 高見澤 広子, 沼田 治, 中野 賢太郎
2. 発表標題 繊毛虫 <i>Tetrahymena thermophila</i> の細胞質ダイニン DYH1 の機能解析
3. 学会等名 第 39 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 徳永 苑子, 中野 賢太郎
2. 発表標題 繊毛虫テトラヒメナにおけるフォルミン様タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/nakano.html>
オルガネラ細胞生物学研究室
<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/nakano.html>
オルガネラ細胞生物学研究室
<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/nakano.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----