

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07462

研究課題名(和文) 褐藻類の細胞質分裂におけるプレート状アクチン構造の分子制御機構

研究課題名(英文) Molecular regulation of actin plate on brown algal cytokinesis

研究代表者

長里 千香子 (NAGASATO, Chikako)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号：00374710

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)：本研究では、褐藻類の細胞質分裂に特徴的なプレート状アクチン構造の働きを明らかにする目的で、頂端分裂細胞を有する*Halopteris congesta* (クロカシラ目)を主な研究材料として、微小管とアクチンのライブイメージング、細胞質分裂阻害実験、細胞質分裂関連タンパク質候補の単離と局在解析に取り組んだ。その結果、そのプレート状アクチン構造の形成と形態維持には微小管との相互関係が必要であること、そして、隔膜形成への関与が確かめられる結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、細胞質分裂における知見は、動物・酵母(オピストコンタ)、陸上植物(アーケプラスチダ)から得られたものであり、真核生物全体における細胞質分裂の共通性と多様性を理解するためには、褐藻類といった他の真核生物のグループからのアプローチも必要であるという点で学術的意義がある。また、細胞質分裂が正しく行われるかどうかは、その後の多細胞体制の構築、発生に重要な意味をもたらす。沿岸生態系を支える褐藻類の体の作り方を理解することは社会的意義のあるものだと考える。

研究成果の概要(英文)：In this project, the brown alga, *Halopteris congesta* (Sphacelariales) with an apical meristem cell was used to study function of actin plate unique cytokinetic apparatus in brown algae. To achieve this object, live imaging of microtubules (MTs) and actins, pharmacological experiments using cytokinesis inhibitors, and isolation of proteins relating progress of cytokinesis were conducted. The results gave me insight for actin plate as follows: involvement of MTs in the formation and maintain of actin plate, and function of actin plate for the formation of a new cytokinetic plane.

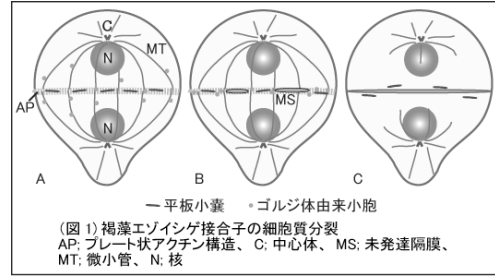
研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質分裂 褐藻類 アクチン 微小管

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

褐藻類はコンブやワカメを含む生物群で、ほとんどが海産の多細胞生物である。動物や陸上植物とは異なるストラメノパイル系統群に属し、この系統群の中でもっとも大型・複雑化した生物群といえる。褐藻類の細胞質分裂装置は、娘核近傍に存在する中心体から伸びる微小管とその交差部位に形成されるプレート状アクチン構造からなる。しかしながら、褐藻類では、細胞質分裂装置、特にプレート状アクチン構造の出現に対して、どのように娘細胞の仕切りが形成されていくのかは不明であった。褐藻類の細胞質分裂には以下のステップが存在していることが微細構造解析により示されている：



(1)核分裂完了後、娘核近傍に存在する中心体から伸びる微小管の交差部位が細胞質分裂面となる (図 1A)、(2)隔膜形成にはゴルジ体由来小胞と平板小囊 (flat cisterna; 短軸方向が 20~60 nm、長軸方向が 600 nm の電子密度の高い円盤状の構造で急速凍結置換法を導入することにより初めて可視化された構造) が関係する (図 1B)、(3)隔膜は細胞内部に数カ所にわたって形成され、融合しながら拡大することで親細胞膜に到達する (図 1C)、(4)ゴルジ体由来小胞は細胞質分裂面に最初に蓄積する褐藻類特有の細胞壁成分であるフコイタンを含んでおり、微小管によって輸送される、(5)アクチン重合阻害剤により平板小囊形成が著しく抑制されるとともに細胞質分裂が阻害される。さらに三次元透過型電子顕微鏡/電子線トモグラフィ法により、(6)平板小囊は小胞体から派生していることも知見として加えられた。これらの結果は、陸上植物の細胞質分裂とは、細胞質分裂に関わる細胞骨格系の形態的特徴と膜の供給源は大きく異なるが、膜融合の初期にネットワーク構造 (陸上植物では tubular network; TN、褐藻類では membranous network; MN) を形成し、シート状の膜構造 (陸上植物では fenestrated sheet; FS、褐藻類では membranous sac; MS) を発達させるなど、隔膜形成途中に見られる膜構造の形態的变化にいくつかの類似点が存在していることが明らかになった。しかしながら、プレート状アクチン構造の電子顕微鏡下での可視化はできず、隔膜形成との関係については、不明のままであった。

### 2. 研究の目的

真核生物の細胞質分裂では、微小管やアクチンを基本とする細胞質分裂装置のダイナミクスによって分裂サイトの決定、および娘細胞の物理的分断が行われている。そのため、正常な細胞質分裂完了には、進行過程に合わせた細胞骨格の厳密な制御機構が必要とされる。褐藻類では、核分裂完了後に中心体から伸びる微小管の交差部位にアクチンがプレート状に配向し、この領域に集積してきた小胞が融合することで細胞質分裂が進行する。プレート状アクチン構造の出現は、褐藻類の細胞質分裂の特徴の一つであるが、形成されるタイミングや膜融合過程との関係については不明である。本研究では、細胞骨格のライブイメージングとその配向に関連するタンパク質の単離・機能解析により、プレート状アクチン構造の働きを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では糸状体制で頂端分裂細胞を有する *Halopteris congesta* (クロガシラ目) を用いて研究をすすめた。*Halopteris* は頂端から数細胞は単列であるが、それ以降は多列となる。頂端細胞は 10 時間程度のサイクルで細胞質分裂を繰り返すこと、細胞分裂が光学顕微鏡レベルでも観察しやすいという理由から、本研究の遂行に最適な材料であると考え選定した。まずは細胞質分裂時の微小管、アクチンの働き、それらの相互作用を調べるために、(1)蛍光標識プローブによるライブイメージングの取得、(2)細胞質分裂阻害剤による細胞質分裂への影響を調べた。さらに、微小管およびアクチン関連タンパク質について(3)EB1; end-binding 1、formin の cDNA の単離を行い、(4)抗体を作製し、免疫染色法により局在解析を行うことで、細胞質分裂装置の形成と制御への関連性を確かめることを行った。

### 4. 研究成果

(1)蛍光標識プローブによるライブイメージングの取得  
細胞質分裂装置の主要な構成要素である微小管とアクチンの挙動について捉えるために、蛍光標識プローブによるライブイメージングの取得を行った。蛍光標識プローブとしては、HiLyte488 標識チューブリン、ローダミン標識アクチン、Lifeact GFP (組み換えタンパク質を作製。lifeact とは出芽酵母由来する 17 個のアミノ酸からなるペプチドで、アクチンフィラメントに結合することが可能。アクチンの重合を妨げないことが知られている。この組み換えタンパク質がアクチンフィラメントと結合することは使用前に *in vitro* で確かめている) をマイクロインジェクションにより細胞内に導入した。

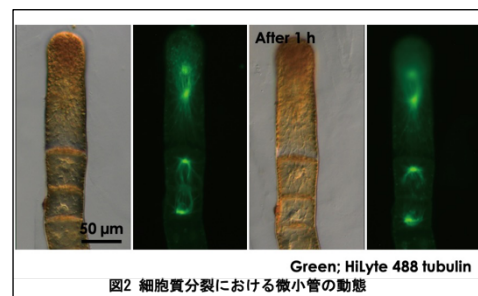


図2 細胞質分裂における微小管の動態

微小管の動態については、細胞内部から外側に向けて発達する隔膜の周辺に中心体から発達している微小管のプラス端が付随していること、その様子から隔膜の拡大と関連性のあることが示唆された(図2)。アクチンに関しては、隔膜発達と同様に細胞内部でプレート状構造が出現し、細胞周辺へ広がっていく様子が観察された(図3)。一方、小胞の蓄積や隔膜形成の様子とプレート状アクチン構造の挙動を同時に観察するため、エンドサイトーシスによって取り込まれた内膜を標識する FM4-64 を使用した。その結果、小胞は細胞質分裂面全体で蓄積していることが観察され、それよりも狭い範囲で Lifeact-GFP の蛍光が確認された(図4)。このことから、プレート状アクチン構造が出現した領域から隔膜形成が起こり、その構造の拡大に伴い、隔膜も成長をし、親細胞壁へ融合するのではないかと考えた。この観察は蛍光ファロイジンと FM4-64 を用いた観察でも同様の結果を得ることができた。

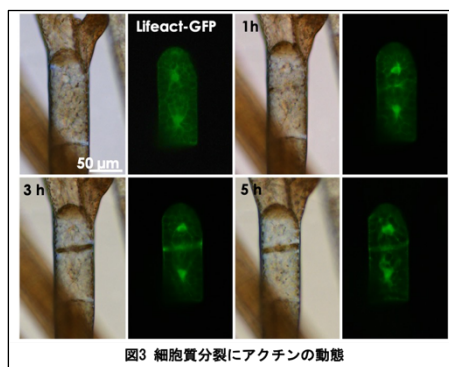


図3 細胞質分裂にアクチンの動態

## (2) 細胞質分裂阻害剤による細胞質分裂への影響

ミオシン II の阻害剤である BDM (2,3-butanedione monoxime)、ゴルジ体からの小胞の形成を阻害する BFA (brefeldinA) による細胞質分裂への影響について連続撮影による観察を行った。BDM では細胞質分裂は阻害され、細胞質分裂予定域に見られる透明な領域が娘核の間を往来する様子が観察された。アクチンが形成されているかどうかについては、突き詰めることはできなかったが、微小管交差部位によって決定される細胞質分裂面が安定せずにいる様子が観察された。このことから、ミオシンが細胞質分裂面の固定に何らかの影響を及ぼしているのではないかとこの考察に至った。

BFA では細胞質分裂が完全に阻害され、細胞質分裂が進行しないまま次の核分裂周期へ進んでいる場合や、細胞質分裂が部分的に進んでおり、通常見られる細胞の長軸方向に対して垂直方向に生じる細胞質分裂とは異なる角度に分裂面が生じている例などが観察された。この様子は、電子顕微鏡による詳細な観察からも明らかになった。BFA 処理に関しては、アクチンと微小管の関係について調べた。その結果、BFA で細胞質分裂が阻害された場合でもアクチンは次の核分裂周期が始まるまで細胞質分裂予定域に残存しており、その位置が形成途中の隔膜と一致すること、微小管がアクチンと連結している様子が観察された。また、核分裂期に入ると、アクチンは消失することが明らかになった。このことから、微小管はプレート状アクチン構造の維持に関係していることが示された。

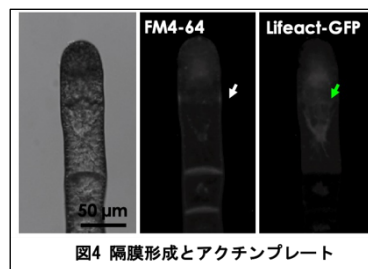


図4 隔膜形成とアクチンプレート

## (3) EB1; end-binding 1, formin の cDNA の単離

植物細胞で細胞質分裂への関与が示されている微小管結合タンパク質でプラス端に存在する EB1; end-binding 1、アクチンフィラメントの形成を促進するとともに微小管の配向にも影響する formin の cDNA の単離を試みた。EB1 に関しては cDNA を全長単離することができた。一方、シオミドロのゲノムデータベースを使い formin のオーソログを検索したところ、FH2 ドメインを持つと予測されているものは 8 遺伝子あった。formin は FH1、FH2、FH3 ドメインを持つタンパク質であるが、必ずしも全てのドメインが存在するというわけではない。しかしながら、シオミドロのゲノム中において FH1 ドメイン (proline-rich で profilin などの他のアクチン結合タンパク質との相互作用を有する) を見出すことはできなかった。他の生物の formin では FH1 ドメインが FH2 ドメインの N 末側であることが多い。このことが褐藻類の formin の局在や機能とどのような関係があるのかについては今後の課題となった。

## (4) 抗体を作製し、免疫染色法により局在解析

EB1 に対するポリクローナル抗体を作製した。その結果、細胞周期を通じた局在を褐藻類のクロガシラ、アミジグサを用いて観察したが、微小管とほぼ共局在していることが確認され、細胞質分裂において特徴的な局在は示さなかった。

本研究期間を通して、褐藻類の細胞質分裂に特徴的なプレート状アクチン構造の形成とその機能について取り組んだ。その結果、その形態の維持と形成には微小管との相互関係があること、そして、隔膜形成への関与が確かめられる結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagasato Chikako, Motomura Taizo	4. 巻 54
2. 論文標題 Effect of brefeldin A and the dynamics of the actin plate on cytokinesis of zygotes in the brown alga, <i>Silvetia babingtonii</i> (Fucales, Phaeophyceae)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Phycology	6. 最初と最後の頁 26 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1080/09670262.2018.1501516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Godfroy Olivier, Uji Toshiki, Nagasato Chikako, Lipinska Agnieszka P., Scornet Delphine, Peters Akira F., Avia Komlan, Colin Sebastien, Mignerot Laure, Motomura Taizo, Cock J. Mark, Coelho Susana M.	4. 巻 29
2. 論文標題 DISTAG/TBCCd1 Is Required for Basal Cell Fate Determination in <i>Ectocarpus</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 3102 ~ 3122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1105/tpc.17.00440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nagasato, C., Motomura, T.
2. 発表標題 Dynamics of actin plate on brown algal cytokinesis
3. 学会等名 The 8th Asian Pacific Phycological Forum (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長里千香子
2. 発表標題 褐藻類の細胞質分裂についての微細構造学的解析
3. 学会等名 第73回日本顕微鏡学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木日奈子、本村泰三、長里千香子
2. 発表標題 褐藻類の細胞質分裂におけるアクチンの挙動
3. 学会等名 日本植物形態学会第31回
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木日奈子、本村泰三、長里千香子
2. 発表標題 褐藻類の細胞質分裂時に出現するアクチンと隔膜形成、微小管との関係について
3. 学会等名 日本藻類学会第44回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 C. Nagasato, C. Katsaros, T. Motomura	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Taylor & Francis Group	5. 総ページ数 492 (381-389)
3. 書名 Cryofixation of brown algae for Transmission Electron Microscopy. In Protocols for Macroalgae Research	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----