

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18770127

研究課題名（和文） 収縮環におけるアクチン細胞骨格のダイナミクス

研究課題名（英文） actin cytoskeletal dynamics in the contractile ring

研究代表者

箕浦 高子（MINOURA TAKAKO）

中央大学・理工学部・准教授

研究者番号：80300721

研究成果の概要：

細胞質分裂における「収縮環」は、アクチン、ミオシンを主体とする極めてダイナミックな構造体である。本研究では、収縮環におけるアクチン分子のふるまいを理解するために、スペックル顕微鏡法及び色変換性プローブを用いてアクチンを局所的に可視化し、収縮環の形成・消失過程を追跡することにより、収縮環中のアクチンの挙動を観察した。この際、複数のプローブを検討し、細胞内毒性や蛍光退色などの問題点が比較的少ないプローブを選択した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	150,000	3,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

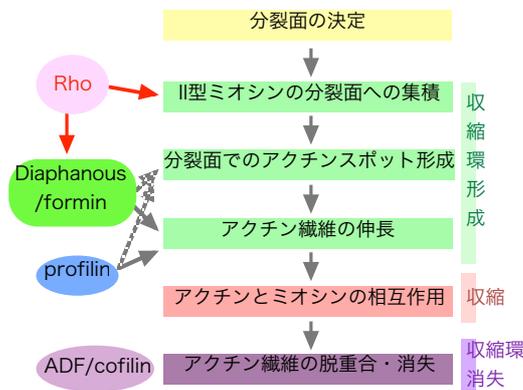
キーワード：運動、ライブイメージング、アクチン、細胞質分裂、収縮環、
スペックル顕微鏡法、photo conversion

1. 研究開始当初の背景

細胞質分裂を担う「収縮環」は、アクチン、ミオシン、アクチン調節タンパク質と、低分子量Gタンパク質等のシグナル因子によって形成される。これらの因子が一定の秩序をもって集合し、収縮環という高次構造を形成したのち、収縮の力を発生するという現象は、筋収縮などの高度に組織化した構造下での力発生とも多くの共通点を持つ。

しかし一方で細胞質分裂は核分裂終了後に一過的に起こる現象であり、収縮環の迅速な形成・力発生・消失が非常にタイトな制御の下で行われているという特徴を持つ。申請者の所属研究室（当時）ではこの収縮環の形成メカニズムを、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の卵を用いて研究してきた。その結果、収縮環形成が1) ミオシンのスポット状集積、2) アクチンのミオシンスポットへの蓄積、3) スポット同士

の融合によるアクチンケーブルの形成という段階的・形成過程を経ることを明らかにした (Noguchi and Mabuchi, 2001, *J. Cell Sci.* 114, 401-412)。同様の段階的収縮環形成は分裂酵母の細胞質分裂においても申請者の所属研究室 (当時) で見いだされており (Motegi et al., 2000, *J. Cell Sci.* 113, 1813-1825)、これらは真核生物に共通の現象であると考えられる。また、アクチンケーブルの伸長にはアクチン重合促進因子である Diaphanous/formin と profilin が協調的または個別に機能することもいくつかの細胞で報告されている。収縮環が形成されると今度はアクチン・ミオシンの相互作用によりそれが収縮し、同時に ADF 等のアクチン脱重合因子が作用して収縮後の F-アクチンを速やかに分解する (下図)。最近、formin リコンビナントタンパク質が *in vitro* でアクチン繊維を伸長させる様子が観察されたが (Higashida et al., 2004, *Science* 303, 2007-2010)、収縮環の中で formin がどのようにアクチン繊維を伸長させているのか、とくに我々の示したミオシンとアクチン繊維の段階的・形成過程のどこで作用しているのかは不明である。また、いくつかの細胞種で蛍光アクチン・蛍光ミオシン等による収縮環形成と収縮のライブ観察が行われているが、一本一本のアクチン繊維やミオシンがどのような方向性・速度で収縮環に取り込まれ、収縮と共に解離していくのか、その過程を解析した例はなかった。



2. 研究の目的

本研究では、分裂の同調が可能で各種遺伝子やタンパク質の導入が容易な *Xenopus* 培養細胞を用いて、収縮環上のアクチンやミオシンの繊維構造を1本ないしは数本の束のレベルで標識し、収縮環ダイナミクスにおけるライブイメージングを行う。既に有力な観察材料として EGFP-アクチン遺伝子を染色体上に組み込んだ株を作

成し、この株の細胞質分裂に伴うアクチンの挙動をライブイメージングしたほか、一部のアクチン繊維のみ標識することを念頭に EGFP 配列部に対する siRNA によって蛍光アクチンのみの発現量を抑えることにも成功した。また、アクチンとチューブリンについて、波長領域の異なるいくつかの蛍光タンパクとの融合プラスミドを用意し、また収縮環で作用する他のアクチン結合タンパク質についても標識タンパク質の発現系及び siRNA による発現抑制系を順次整えている。これらの材料を各種顕微鏡法を用いて観察し、収縮環の各構成因子の分子レベルでの挙動を解析することにより、「収縮の素過程を実際に見る」ことを目指す。

一方、収縮環の構成タンパク質はおおよそ明らかになってきたものの、それらの収縮の前後での増減や、アクチン・ミオシンの結合様式・結合順序の詳細は不明である。そこで、上述の *Xenopus* 卵から収縮環形成の段階毎にこれを単離し、生化学的解析及び質量分析を用いてその構成パターンを解析する。*Xenopus* 卵は培養細胞よりもはるかに大きく、ガラス針を用いた顕微操作により収縮環のみを単離することが可能である。また、端黄卵であるため収縮環の形成が動物極側から植物極側へと長期にわたって進行する。従って収縮環形成の段階を追ったサンプリングが可能である。こうして収縮環の機能に携わる (新規タンパク質を含む) 因子が明らかになれば、その上であらためて、RNAi 法を用いてこれらの因子を機能阻害し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

以下に挙げる方法で、収縮環アクチン繊維のダイナミクスを直接観察する。

(1) 「緑色蛍光色素 mKikuGR (理化学研究所、宮脇敦史チームリーダーより分与) および Dendra-2 は、紫外線照射により不可逆的に赤色に変化する。mKikuGR-actin または Dendra2-actin 発現コンストラクトを作成し、培養細胞に発現させた後、収縮環の特定領域をレーザーでスポット照射することにより収縮環アクチン繊維を局所的に変色させ、その分散過程を3次的に追跡する。

(2) CFP-actin と YFP-actin とを一定の比率で共発現するとアクチンの重合に呼応した FRET が起こることが、神経スパインにおいて示されている。これの細胞質分裂への適用を試み、ダイナミクス観察および、アクセプターブリーチングによる FRET 効率の測定を行う。

(3) 微量発現プロモータを用いてアクチンや他の収縮環構成タンパク質を微量蛍光標識し、スペックル観察法によりそのダイナミクスを観察する。シグナルが弱い場合は複数のeGFPをアクチンのN末端にタンデムに連結し、極微量発現プロモーター下で発現させる系をもちいて、収縮環収縮時のアクチン分子のスペックル顕微鏡法による観察をおこなう。

(4) 上皮由来の培養細胞と繊維芽細胞では基質への接着様式が異なるため、細胞質分裂時の細胞形態が幾分異なる。とくに上皮細胞では収縮の終了時に娘細胞間の距離が繊維芽細胞に比べて大きくなる傾向にあり、分裂時の扁平度も高い。そこで、*Xenopus* やヒトの、由来の異なるいくつかの細胞を用いて上記蛍光標識アクチンを導入し、観察を行う。

(5) mKikuGR-actin や Dendra-2-actin の挙動が、蛍光標識されたアクチン分子の挙動のみを反映している可能性が捨てきれないことから、Dendra-2 で蛍光標識したアクチン結合タンパク質のアクチン結合ドメインを新たにプローブとして作成し、その挙動を比較解析する。

(6) Dendra-2-actin のツメガエル培養細胞への導入は、導入効率が低いことに加え、細胞により発現量の差が認められるため、細胞質分裂の観察に適した細胞を多く得ることが極めて困難である。そこで Dendra-2-actin の恒常発現株を得る。

4. 研究成果

(1) a) 微量の Alexa488-actin を顕微注入した、または、b) 極微量発現プロモーター (pdelCMV、京都大学渡辺直樹准教授より分与) 下流に連結した eGFP アクチン融合タンパク質を発現させた、ほ乳類培養細胞を共焦点顕微鏡でリアルタイム観察し、間期アクチン構造の単分子スペックルの運動を観察した。これを、細胞周期のうちのわずかな期間に形成される収縮環のスペックル観察に適用するため、条件の改良を行った。まず eGFP をアクチンの N 末端にタンデムに連結し pdelCMV 下で発現させることによりシグナル強度を増した。さらに、複数の細胞種を観察し、比較的扁平性を保ちながら細胞質分裂を完了する細胞として LLC-PK1 細胞を選択した。これらにより、収縮環収縮時のアクチン分子のスペックル観察に初めて成功した (図 1)。

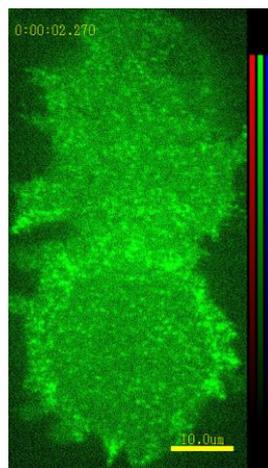


図 1

(2)

UV 照射により不可逆的に赤変する緑色蛍光色素、mKiku-GR を連結したアクチンをほ乳類培養細胞で発現させ、収縮環の特定領域をレーザーでスポット照射した。これを光学セクション顕微鏡 (デルタビジョン RT、セキテクノトロン株式会社) により 3 次元タイムラプス観察し、緑色蛍光アクチンの中に局所的に存在する赤色蛍光アクチンの挙動とその分散過程を追跡した。この結果、「purse strings model」では説明できない複雑なアクチン繊維の挙動が認められた。また、収縮環を形成するアクチンの分子交換速度が、収縮環の収縮過程で変動する可能性が示唆された。しかし、mKiku-GR-actin は観察時の退色性と細胞内で発現させた時の毒性が大きく、観察は困難であった。そこで、新たな色変換性蛍光色素、Dendra-2 を連結したアクチンをアフリカツメガエル培養細胞にて発現させた。退色性と細胞内毒性については、Dendra-2-actin は mKiku-GR-actin よりも良好であった。上記と同様に収縮環の特定領域をレーザーでスポット照射し、その分散過程を 3 次的に追跡した。その結果、収縮環上の変色スポットは収縮の進行とともに素早く分散・消失するのが観察された (図 2)。このような挙動は比較的安定とされるストレスファイバー上の変色スポットでは認められなかったことから、収縮環上でのアクチン分子のダイナミックなターンオーバーを反映しているものと考えられた。

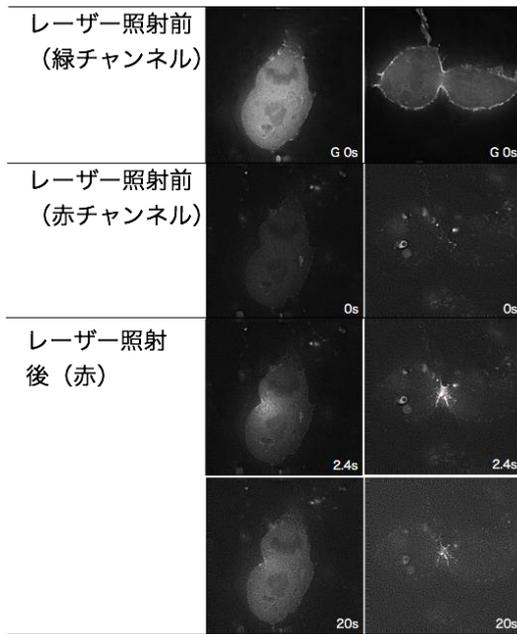


図 2

(3) Dendra-2-actin の挙動が、蛍光標識されたアクチン分子の挙動のみを反映している可能性が捨てきれないことから、アクチン結合タンパク質モエシン、IQGAP の各アクチン結合ドメインを Dendra-2 に連結した新たなプローブ (DmMoesinABD-Dendra-2, Dendra2-CHD) を作成し、比較解析を試みた。しかし、いずれのプローブもツメガエル培養細胞内に導入すると細胞質内に非特異的に集積し、また一部のストレスファイバーと結合しなかったため、アクチンのプローブとしては適していないことが判った (図 3)。

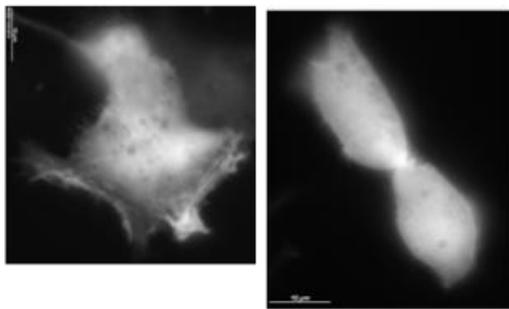


図 3 Dendra2-moesin の細胞内局在

(4) Dendra-2-actin のツメガエル培養細胞への導入は、導入効率が低いことに加え、細胞により発現量の差が認められるため、細胞質分裂の観察に適した細胞を多く得ることが極めて困難である。そこで Dendra-2-actin の恒常発現株の取得を試

みた。現在は該当株の単離作業を進めている。

(5) 本研究では、主として色変換性 GFP バリエーションを連結したアクチンを標識として用い、細胞質分裂時の収縮途中の収縮環のアクチン繊維のダイナミクスを観察した。収縮環中のアクチン繊維の一部を他と区別し、その動向を生きたまま観察する手法として、他に FRET やスペックル顕微鏡法での試みも行ったが、色変換性 GFP バリエーションによる標識がもっとも直接的で収縮環構造内の任意の位置・時間に標識できる点が優れている。現在のところ本研究以外に同様の報告はない。本研究のアプローチによって期待されることは次の通りである。培養細胞の収縮環はその収縮の過程で円周がおよそ $60 \mu\text{m}$ から数 μm にまで大きく減少する。このときに収縮環中のアクチン繊維の一方所を赤く変色させると、収縮環中のアクチン繊維の配向はランダムであるため、もし収縮においてアクチンとミオシンの滑りが支配的であれば、双方向に滑る成分により、時間の経過とともに赤のシグナルが薄く分散することが予想される (図 4 A)。一方、もし収縮環内のアクチン分子の重合・脱重合による再編成が支配的であれば、赤のシグナルが分散せずに減少していくことが考えられる (図 4 B)。観察結果は後者に近く、収縮環中でアクチン繊維中のアクチン分子がダイナミックにターンオーバーしていることが示唆された。このようなアクチン分子の振る舞いには formin や ADF/cofilin が寄与していると考えられる。

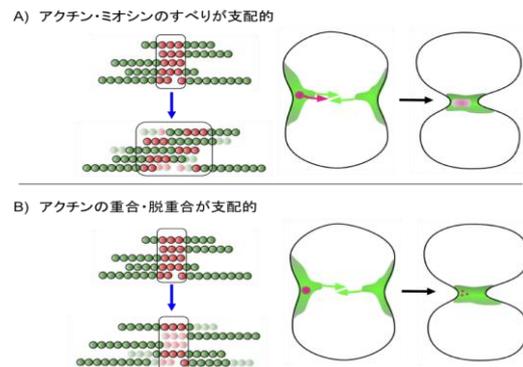


図 4

本研究において、標識を導入した多くの細胞では増殖不良などの細胞毒性やアクチン構造の異常が多く認められ、また標識の色変換性や観察時の耐退色性にも改良の余地があった。本研究で試した複数の標識コンストラクトの内では、Dendra2-actin で

最も良好な結果を得ることができた。しかしさらに安定した観察を行うには、Dendra2-actin の恒常発現株の樹立が必須である。今後は Dendra2-actin の恒常発現株を用いた観察系を確立し、その上でアクチンのダイナミクスを支配する formin や ADF/cofilin の制御系を加えることにより、収縮環中のアクチン繊維のふるまいをより明確に示すことができるものと期待される。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①箕浦高子、馬淵一誠、色変換性 GFP バリエーションを用いた細胞質分裂収縮環の観察、日本動物学会第 78 会大会、2007 年 9 月 20 日、弘前大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箕浦 高子 (MINOURA TAKAKO)

中央大学・理工学部・准教授

研究者番号：80300721