

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19324

研究課題名(和文) 構成的アプローチによる収縮環の統御機構の原理解明

研究課題名(英文) Mechanism regulating a contractile ring-like structure by a constructive approach

研究代表者

山岸 雅彦 (Yamagishi, Masahiko)

東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：30815501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞における収縮環は、主にアクチンフィラメント、ミオシン、アクチン架橋タンパク質(ACP)から構成される収縮性のリング状構造体である。収縮環様構造体を再構成して機能させるモデル系の創出を目指し、*in vitro*及びリボソーム内でその形成条件や分子プロセスを検討した。1分子イメージングにより、ミオシンのアクチンフィラメント切断活性や複数のACPの結合特性を明らかにした。*In vitro*およびリボソーム内で、細胞骨格からなる構造体は、アクチンフィラメントの切断活性に依存することが分かった。これらの結果は、収縮環様構造体の形成はアクチン調節タンパク質によって制御しうることが示唆されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が二分して増殖することは、生命の基本的現象であり、その解明は生命科学の主要な課題のひとつである。本研究は、細胞分裂研究の新たな手法の創出を目指し、収縮環形成機能を研究するに当たりその学術的意義がある。この新たな手法から得られた知見は、細胞分裂(増殖)がかかわる再生医療の分子基盤に繋がることが期待でき社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：The contractile ring in animal cells, which is composed of actin filaments, the motor myosin and actin cross-linking protein, is a ring-like structure. To reconstitute the actomyosin-based ring-like structure with simple components, conditions on forming the structure and molecular processes were examined in an *in vitro* assay and in a liposome-based assay. We found that using single-molecular imaging techniques myosin-minifilaments have actin filament severing activity and actin cross-linking proteins have relatively weak actin-binding affinities. We also found that the actin-based structure depends on severing activity and actin cross-linking proteins. Our results suggest that actin-based ring-like structures may be controlled by actin regulatory molecules.

研究分野：細胞骨格とモータータンパク質の生物物理

キーワード：アクチンフィラメント ミオシン 収縮環 リボソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物細胞の細胞質分裂において、収縮環の機能解明を目指した従来の研究は、遺伝学的な研究や収縮環に局在するタンパク質の生化学的研究、抗体や RNA 干渉による機能阻害研究によって行われてきたが、その全容は不明であった。そのため、構成成分が限定でき、収縮過程の分子プロセスのイメージングが容易な *in vitro* および人工小胞内で収縮環様構造体を再構成する手法の開発を目指した。収縮環様構造体は主に、細胞骨格アクチンフィラメント、モータータンパク質ミオシン、アクチン結合(架橋)タンパク質から構成されることが知られているが、特にアクチン架橋タンパク質の結合特性は分子レベルでは不明な点が多く、詳しい解析が待たれていた。

2. 研究の目的

動物細胞における細胞質分裂では、分裂装置・収縮環が、細胞骨格アクチンフィラメントやモータータンパク質ミオシン、アクチン架橋タンパク質などの相互作用を通して 3 次元空間に構築され、適切なタイミング・場所で、適切な機能を果たす必要がある。本研究では、以下の 2 点を目的とした。

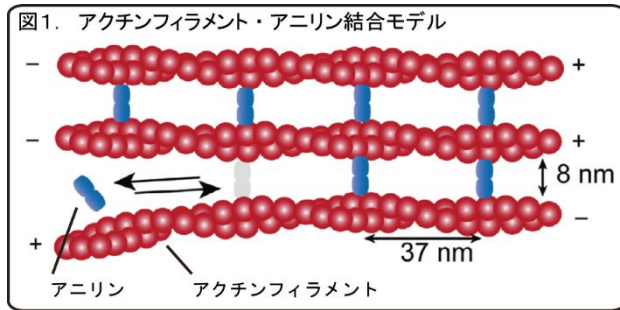
- (1) ミオシンや架橋タンパク質のアクチンフィラメントへの切断能や結合能を定量し、その特質を明らかにする。
- (2) 収縮環形成に必須なタンパク質を人工膜に内包し、生体分子の持つ自律的かつ能動的な性質を利用して、分裂細胞モデルを構成的アプローチにより構築することを目指す。

3. 研究の方法

- (1) ウサギ骨格筋、ヒト培養細胞、大腸菌から単離したアクチン、ミオシン、アクチン架橋タンパク質を用い、*in vitro* アクチンフィラメント滑りアッセイを 3 次元位置検出顕微鏡で行い、ミオシンのモーター特性、アクチン結合タンパク質のアクチン結合特性を定量する。電子顕微鏡法により高空間分解能でアクチンフィラメントとミオシンミニフィラメントの位置関係を定量する。
- (2) アクチン結合タンパク質であるアニリンおよびアクチニンに関して、全反射顕微鏡および高速 AFM による分子動態イメージングによりアクチンフィラメントの架橋の分子プロセスをイメージングする。
- (3) アクチンフィラメント、ミオシンミニフィラメントおよびアクチン結合タンパク質から自発的に形成される不規則構造体を *in vitro* で形成させる。
- (4) 不規則構造体の構成成分であるアクチンフィラメント、ミオシン、アクチン結合タンパク質をリポソーム内に封入し、不規則構造体の膜への結合特性を定量するとともに、リング状構造体の形成条件を検討する。

4. 研究成果

- (1) 3 次元位置顕微鏡を用いて、アクチンフィラメントとミオシンミニフィラメントまたはアクチン結合タンパク質の位置を z 方向を含む 3 次元方向で定量し、ミオシンミニフィラメントやアクチン結合タンパク質の相対位置関係を明らかにし、さらに、ミオシンによる ATP 濃度依存的なアクチンフィラメントの滑り運動活性および切断活性を明らかにした。また、電子顕微鏡での撮影により、アクチンフィラメントとミオシンミニフィラメントとの高分解能での相対位置関係が分かった。アクチンフィラメントとは異なる細胞骨格微小管と微小管依存性モーターでも同様に滑り運動活性を定量し、フィラメントやモーターに特異的な運動活性を明らかにした。
- (2) 光学顕微鏡による 1 分子イメージング実験および高速 AFM を用いた実験により、アクチン結合タンパク質(アニリンおよびアクチニン)のアクチンフィラメント上での結合時間は 1 秒弱であることが分かった。また、全長アニリンは単量体であり、分子内に複数のアクチン結合部位を持ちアクチンフィラメントをその極性に関係なく架橋できることが分かった。その架橋間距離は 8 nm 程度であり、また、アクチンフィラメント上に 37nm 間隔で架橋することが明らかになった(図 1)。これらの成果を投稿論文として報告した。



- (3) アクチンフィラメント、ミオシンおよびアクチン架橋タンパク質により、収縮する構造体の作成ができるようになった。特にこの収縮体の形成には、ミオシンミニフィラメントによるアクチンフィラメントの切断活性が重要な制御因子であることが分かり、また、再構成構造体の収縮速度や収縮面積は、アクチンフィラメントの長さ、ミオシンの濃度、ATPの濃度に依存することが分かった。
- (4) アクチンフィラメント、ミオシンおよびアクチン結合タンパク質をリポソーム内に封入し、リング状構造体形成条件を検討したところ、アクチンの長さおよび結合タンパク質の濃度に大きく依存することが分かった。また、膜結合部分を有するアクチン結合タンパク質を用いたところ、リング状形成能に大きく影響を与えることが分かった。

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuda Kyohei, Sugawa Mitsuhiro, Yamagishi Masahiko, Kodera Noriyuki, Yajima Junichiro	4. 巻 594
2. 論文標題 Visualizing dynamic actin cross linking processes driven by the actin binding protein anillin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1237 ~ 1247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13720	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyohei Matsuda, Mitsuhiro Sugawa, Masahiko Yamagishi, Noriyuki Kodera, Junichiro Yajima
2. 発表標題 Actin Crosslinking Processes Driven by the Actin Binding Protein Anillin
3. 学会等名 Biophysical Society 64th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Kyohei Matsuda, Takuya Kobayashi, Mitsuhiro Sugawa, Masahiko Yamagishi, Yoko Y. Toyoshima, Junichiro Yajima
2. 発表標題 Myosin II decreases the connectivity of an actin network using two different mechanisms depended on concentration of crosslinking protein
3. 学会等名 第57回生物物理学会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Masahiko Yamagishi, Yohei Maruyama, Mitsuhiro Sugawa, Junichiro Yajima
2. 発表標題 Plus-end directionality is present in the conserved catalytic motor core of kinesin-14 minus-end directed motors
3. 学会等名 第57回生物物理学会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 山岸雅彦, 矢島潤一郎
2. 発表標題 マイナスキネシンkinesin-14は保存されたmotor coreに共通のプラス運動性を有する
3. 学会等名 第9回分子モーター討論会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	矢島 潤一郎 (Yajima Junichiro) (00453499)	東京大学・大学院総合文化研究科・准教授 (12601)	