

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370029

研究課題名(和文)ピンポイント機能阻害による細胞内微細構造ダイナミクスの研究

研究課題名(英文)Dynamic analyses of subcellular structures using pinpoint functional depletion

研究代表者

松永 幸大(Matsunaga, Sachihoro)

東京理科大学・理工学部・准教授

研究者番号：40323448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内微細構造を不活性化する「ピンポイント機能阻害法」を用いて、動植物の細胞分裂ダイナミクス制御機構を明らかにすることを目的とした。光変換タンパク質を染色体タンパク質に連結し、高出力レーザーによるピンポイント機能阻害法を開発した。光変換タンパク質によるRBMXタンパク質の時空間特異的機能阻害実験をライブセルイメージングと組み合わせて実施した。その結果、RBMXはクロマチンと相互作用していることを明らかにした。技術的には、蛍光基質で標識した細胞内の微細構造にレーザー光を照射してROSを発生させて、タンパク質複合体の構造を破壊することで、細胞分裂の遅延を起こすことができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Dynamic analyses of subcellular structures using pinpoint functional depletion
The purpose of this project is to reveal the dynamics of cell division in animals and plants using pinpoint functional depletion. The pinpoint functional depletion using a chromosomal protein RBMX fused with a photosensitizer protein was successfully performed by high-power laser. Spatiotemporal inactivation of RBMX with the photosensitizer was performed in combination with live cell imaging. At the result, RBMX interaction with chromatin is turned out through the spatiotemporal inactivation. This method to induce the delay of cell division can be performed through generation of reactive oxygen species and structural destruction of the protein complex by laser irradiation to fluorescent protein-labelled subcellular structures.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：細胞分裂 染色体 顕微鏡 イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内構造そのものを、細胞内で改変することは困難であった。

(2) 従来の生物学の研究は、遺伝学や分子生物学で作成した変異体や形質転換体の表現型を解析するために、固定処理や切片作成などの作業工程を経て顕微鏡で見た像をデータに活用してきた。

(3) ライブイメージング技術の発達により、固定法を脱却し、生きた細胞や器官の振る舞いを解析できるようになった。

(4) しかし、更に踏み込んで、イメージング中にタンパク質の機能を阻害したり、細胞内小器官の機能を改変し、タイムラグなく機能解析する技術は未だ開発途上にあった。

2. 研究の目的

(1) 顕微鏡で見ている細胞内微細構造を、その場で不活性化する「ピンポイント機能阻害法」を用いて、細胞分裂における動植物の染色体や紡錘体のダイナミクス制御機構を明らかにする。

(2) 3D画像を活用しながら、細胞内微細構造の時空間特異的阻害を実施する。

(3) レーザー顕微法により、細胞分裂における微細構造のダイナミクス制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) KillerRed、SNAP-tag、miniSOG を連結させた染色体・微小管構造タンパク質を動植物培養細胞に発現させて、高出力レーザーによるピンポイント機能阻害法の条件検討を実施する。

(2) 照射ポイントや機能阻害前後の変化を高精度に把握するために、細胞内時空間情報として活用する。

(3) 動態制御因子を RNAi 法によりロックダウンすることで、染色体-紡錘体動態の制御メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 光変換タンパク質 KillerRed を染色体タンパク質 RBMX に連結し、ヒト培養細胞に発現させて、高出力レーザーによるピンポイント機能阻害法の条件検討を実施した。照射ポイントや機能阻害前後の変化を高精度に把握するために、ライブイメージング・データを細胞内時空間情報として活用した。KillerRed の凝集は見られず細胞内で正常に発現した。この利点を利用して、KillerRed による RBMX タンパク質の時空間特異的機能阻害実験をライブセルイメージングと組み

合わせて実施した。その結果、RBMX はクロマチンと相互作用していることを明らかにした。本研究結果を、Cell Press 社の Cell Reports 誌に発表した。技術的には、蛍光基質で標識した細胞内の微細構造にレーザー光を照射して ROS を発生させて、タンパク質複合体の構造を破壊することで、細胞分裂の遅延を起こすことに成功した初めての事例となった(図1)。

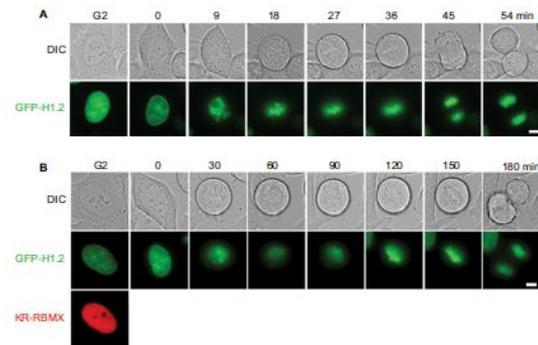


図1 KillerRed-RBMX (KR-RBMX) を用いたピンポイント機能阻害 (以下、図1の説明) AはGFP-H1.2のみを発現させたコントロールを示す。核膜崩壊から細胞分裂完了まで1時間以内に終了する。Bは同時にKillerRed-RBMXを発現させた場合を示す。G2期にピンポイント機能阻害すると、細胞分裂完了まで3時間かかり、細胞分裂の遅延が生じたことがわかる。スケールバーは10 μ mを示す。(以上、図1の説明)

高出力レーザーを装着したライブセルイメージングシステムにより、パルス回数、パルス強度などのピンポイント機能阻害の条件設定を、細胞活性のモニタリングと共に実施することで、ピンポイント制御技術を用いた細胞分裂解析手法を開発することができた。

また、RBMXを細胞からなくすと、コヒーシオンは細胞の中にあるにも関わらず、染色体の間に集まらずに細胞内に分散した状態になることがわかった。その結果、2本の染色体はくっつくことができず、細胞分裂の進行も著しく遅くなり、細胞死を起こすこともライブセルイメージングにて明らかにすることができた。RBMXは菌類から植物・動物まですべての生物に保存されているタンパク質であり、種を超えて生命活動の維持に必須なタンパク質として働いていることがわかった。

(2) SNAP-tag法を用いた機能阻害法も、KillerRed同様に照射ポイントや機能阻害前後の変化を検討した。しかし、機能阻害のためには高出力レーザーを必要としており、長時間照射によって細胞死が頻繁に起こり、本システムによるピンポイント機能阻害には向かないことがわかった。

(3)miniSOG を微小管構成タンパク質であるチューブリンに連結させてタバコ BY-2 細胞に導入し、照射ポイントや機能阻害前後の変化を検討した。miniSOG-チューブリンの発現効率が低く、ピンポイント機能阻害の確立までには至らなかった。

(4)ピンポイント機能阻害法の確立
以上の研究成果により、当初の目標であったピンポイント機能阻害法を確立し、RBMX が細胞分裂に参与することを明らかにすることで、染色体構造のダイナミクス制御機構を解明することができた。

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12件)

Sano, Y., Watanabe, W. and Matsunaga, S., Chromophore-assisted laser inactivation - towards a spatiotemporal-functional analysis of proteins, and the ablation of chromatin, organelle and cell function, JOURNAL OF CELL SCIENCE, 査読有, 127, 2014, 1621-1629

DOI : 10.1242/jcs.144527

Yoshida, Y., Fujiwara, T., Imoto, Y., Yoshida, M., Ohnuma, M., Hirooka, S., Misumi, O., Kuroiwa, H. Kato, S., Matsunaga, S. and Kuroiwa, T., The kinesin-like protein TOP promotes Aurora localization and induces mitochondrial, chloroplast and nuclear division., JOURNAL OF CELL SCIENCE, 査読有, 126, 2013, 2392-2400

DOI : 10.1242/jcs.116798.

③Matsunaga, S., Katagiri, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, T., Hasegawa, J., Hayashi, K. and Sakamoto, T., New insights into the dynamics of plant cell nuclei and chromosomes., INTERNATIONAL REVIEW OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 査読有, 305, 2013, 253-301

DOI : 10.1016/B978-0-12-407695-2.00006-8.

Takahashi, N., Kajihara, T., Okamura, C., Kim, Y., Katagiri, Y., Okushima, Y., Matsunaga, S., Hwang, I., and Umeda, M., Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in Arabidopsis roots., CURRENT BIOLOGY, 査読有, 23, 2013, 1812-1817

DOI : 10.1016/j.cub.2013.07.051

Kohma Hayashi, Junko Hasegawa, Sachihiro Matsunaga, The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: endoreduplication precedes rapid cell expansion, Scientific Reports, 査読有, 3, 2013, 2723

DOI : 10.1038/srep02723

Matsunaga, S., Takata, H., Morimoto, A., Hayashihara, K., Higashi, T., Akatsuchi, K., Mizusawa, E., Yamakawa, M., Ashida, M., Matsunaga, T. M., Azuma, T., Uchiyama, S. and Fukui, K., RBMX: a regulator for maintenance and centromeric protection of sister chromatid cohesion., CELL REPORTS, 査読有, 1, 2012, 299-308

DOI : 10.1016/j.celrep.2012.02.005

Eriko Iwata, Saki Ikeda, Natsumi Abe, Asuka Kobayashi, Mariko Kurata, Sachihiro Matsunaga, Yasushi Yoshioka, Marie-Claire Criqui, Pascal Genschik and Masaki Ito, Roles of GIG1 and UVI4 in genome duplication in Arabidopsis thaliana, Plant Signaling & Behavior, 査読有, 7, 2012, 1079-1081

DOI : 10.1105/tpc.111.092049.

Kutsuna, N., Higaki, T., Matsunaga, S., Otsuki, T., Yamaguchi, M., Fujii, H. and Hasezawa, S., Active learning framework with iterative clustering for bioimage classification., Nature Communications, 査読有, 3, 2012, 1032

DOI : 10.1038/ncomms2030.

Equilibrina, I., Matsunaga, S., Morimoto, A., Hashimoto, T., Uchiyama, S. and Fukui, K., ASURA (Phb2) interacts with Scc1 through chromatin., CYTOGENETIC AND GENOME RESEARCH, 査読有, 139, 2013, 225-233

DOI : 10.1159/000350004

Higashi, T., Watanabe, W., Matsunaga, S., Application of visualization techniques for cell and tissue engineering., JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 査読有, 115, 2013, 122-126

DOI : 10.1016/j.jbiosc.2012.09.008.

Noda, M. et al. (14人中11番目), Assembly states of the nucleosome assembly protein 1 (NAP-1) revealed by sedimentation velocity and non-denaturing mass spectrometry., Biochem. J., 査読有, 436, 2011, 101-112

DOI: 10.1042/BJ20102063

Lee, M. H. et al. (6人中5番目), PHB2 (ASURA) is required for kinetochore assembly and subsequent chromosome congression., Acta Histochem. Cytochem., 査読有, 44, 2011, 247-258

DOI: 10.1267/ahc.11033

[学会発表](計9件)

Sachihiro Matsunaga, Imaging analyses of DNA replication and cell division in root development, 第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山大学 五福キャンパス

松永幸大、北原英里奈、栗原大輔、小牧伸一郎、高木麻衣、佐野行己、長島慶宜、中神

弘史、伊藤正樹、杉本慶子、橋本隆、松永朋子、坂本卓也、植物の動原体局在型オーロラキナーゼは微小管プラス末端制御タンパク質EB1をリン酸化する、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3 - 6日、神戸ポートアイランド

③Sachihiro Matsunaga, Subnuclear dynamics and cell dynamics in root morphogenesis., Workshop on Modeling Biomolecular Systems in Cellular Environment (招待講演) 2013年10月31日、京都大学理学研究科セミナーハウス

松永幸大、ライブセルイメージングによる細胞動態解析、日本女子大学バイオイメージングセンター第4回公開シンポジウム(招待講演) 2012年10月27日、日本女子大学八十年館

Sachihiro Matsunaga, Dynamics analysis of RBMX responsible for chromosome cohesion and bioimage classification by CARTA, 4-th France-Japan Joint Seminar (招待講演), 2013年1月9日, RIKEN Harima Institute / Spring-8 / SACLA

Junko Hasegawa, Takuya Sakamoto, Sachihiro Matsunaga, Correlation between DNA A content and cell volume under DNA damage and auxin starvation, 第54回日本植物生理学会年会, 2013年3月21日, 岡山大学津島キャンパス

松永幸大、DNA複製とゲノム倍加、日本植物学会第76回大会、2012年9月17日、兵庫県立大学 姫路書写キャンパス

松永幸大、朽名夏磨、桧垣匠、馳澤盛一郎、生物画像の自動分類ソフトウェア「カルタ」の開発、日本植物形態学会第24回大会、2012年9月14日、兵庫県立大学 姫路書写キャンパス

松永幸大、染色体接着に關与するタンパク質RBMXの解析、第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月27 - 28日、北海道大学クラーク会館、学術交流会館

〔図書〕(計3件)

Tetsuko Noguchi, Shigeyuki Kawano, Atsushi Sakai, Yasuko Hayashi, Ichiro Karahara, Sachihiro Matsunaga and Hirokazu Tsukaya, Springer, Atlas of Plant Cell Structure, 2014, 未定

Kazama, Y. and Matsunaga, S., Nova Scientific Publisher (New York, USA), The role of repetitive sequences in plant sex chromosome evolution. "New Insights on Plant Sex Chromosomes" edited by Navajas R., 2012, 21-34

③Takata, H., Matsunaga, S. and Maeshima, K., Springer Verlag (Heidelberg, Germany), The organisation of genomic DNA in mitotic chromosomes: a novel view. "Molecular Biology and Evolution of the Plant

Genome" edited by Greilhuber, J., Leitch, I., Wendel, J. and Dolezel, J., 2012, 33-44

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ
<http://www.rs.tus.ac.jp/sachi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
松永 幸大(Matsunaga Sachihiro)
東京理科大学・理工学部・准教授
研究者番号：40323448

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
朽名 夏磨(Kutsuna Natsumaro)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教
研究者番号：70578559