

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770177

研究課題名(和文) 分裂酵母の収縮環におけるアクチン相互作用の解析

研究課題名(英文) Actin and myosin-II interaction of the contractile ring in fission yeast

研究代表者

高稲 正勝 (TAKAINE, Masakatsu)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：20573215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質分裂はあらゆる細胞の増殖に必須である。特に動物細胞や菌類においては、筋肉と同様にアクチン繊維とII型ミオシンから構成される、収縮環という構造体が時空間的に制御された細胞質分裂に重要な役割を果たす。収縮環におけるアクチン-ミオシン相互作用の分子機構を解明するべく、分裂酵母を使用して本研究を行った結果、収縮環特異的に局在し、収縮環形成に必須なアクチン結合因子Rng2によるミオシンの活性制御、およびミオシンによる収縮環維持機構を新たに発見した。これらの知見は細胞質分裂全般の分子機構の理解およびガン細胞等の特定の細胞の増殖を制御する医学的手法の開発等に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cytokinesis is essential for proliferation of any type of cell. Especially in animal cells and fungi, the contractile ring --a circular structure that is composed of actin filaments and myosin-II like muscle sarcomere-- plays an important role in the spatiotemporally regulated cytofission. In this study, we aimed to elucidate the molecular basis of actin-myosin-II interaction in the contractile ring. We found that an actin-binding protein that localized to the ring and is vital for its assembly, Rng2, regulated ATPase and motor activities of myosin-II and that myosin-II was involved in maintenance of the ring at later anaphase, not only in its assembly and constriction. These findings may greatly contribute to a comprehensive understanding of the whole mechanism of cytokinesis at molecular level and to medical applications, for example development of a technique for regulating growth of some type of cell such as cancer cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞質分裂 アクチン細胞骨格 II型ミオシン 収縮環 分裂酵母 IQGAP アクチン調節タンパク質
分子モーター

1. 研究開始当初の背景

非筋細胞内のII型ミオシンとアクチン繊維は細胞の変形、運動および分裂に重要な役割を果たす、動的な細胞骨格である。従来、非筋II型ミオシンは筋肉のミオシンと同様にアクチン繊維と相互作用して、収縮力を発生させると考えられてきた。この細胞内アクチンミオシン相互作用の著名な例が動物細胞や菌類の細胞質分裂時における収縮環である。収縮環は主にアクチン繊維とII型ミオシンから構成されている。収縮環は、最も根源的な細胞の営みである細胞分裂に必須の構造体であり、その性状を理解することは重要である。さらに収縮環は原初的なアクチン系であるため、非筋細胞においてミオシンがアクチン細胞骨格におよぼす作用を解明する上で、また筋肉細胞の出現に至るまでのアクチン系の進化を理解する上でも、収縮環の形成および収縮機構を解明することは重大な意義を持つ。

筋肉研究からの類推により、収縮環も筋肉と同様に、逆向きのアクチン繊維を双極性のミオシンフィラメントが引き込み合うことで収縮するという仮説 (purse-string model, Satterwhite and Pollard, 1992) が広く支持されている。しかしpurse-string modelを裏付けるような構造的証拠は未だ確認されていない。また収縮環中のアクチンとII型ミオシンが常にターンオーバーしているという実験結果もこのモデルとは適合しない。加えて収縮環アクチンミオシンは収縮しつつ消失することを考え合わせると、収縮環においては構成成分のターンオーバーを許容しつつ、それらの収縮と分解を共役させた、purse-string model以外の、収縮機構が働いていることが予想された。

ではそのような収縮機構は如何にして可能であろうか？近年の研究によりII型ミオシンはアクチン細胞骨格の脱重合 (Medeiros et al., 2006; Haviv et al., 2008; Wilson et al., 2010) やアクチンのターンオーバー (Murthy & Wardsworth, 2005) にも関与していることが明らかになりつつある。これらの報告は、ミオシンはアクチン繊維上を動いたり、アクチン繊維を変位させたりする単なるモーターではなく、ATP加水分解のエネルギーによりアクチン繊維の重合状態を変化させ得ることを示唆している。上記の収縮環の収縮機構を解明するには、ミオシンが 1) アクチン繊維に及ぼす力と、2) アクチン繊維の重合状態に及ぼす作用、とりわけ脱重合作用、とを分けて吟味することが重要である。またアクチン脱重合因子 (ADF) が細胞質分裂に必須 (Nakano & Mabuchi, 2006) あるいは関与していることを鑑みると、ミオシンのアクチン繊維脱重合作用は、ADFの作用と共同的 (synergetic) である可能性も考慮すべきである。

代表者はこれまでに分裂酵母のIQGAP様タンパク質 Rng2 が、収縮環 アクチ

ン繊維を束ねて配向させることで収縮環の構築と維持に必須な役割を果たしていることを示した (Takaine et al., 2009)。さらに Rng2 のアクチン繊維束化に必要な部位を特定し、invitro でその活性を測定および観察する実験系を確立した。

2. 研究の目的

上述のように収縮環の収縮における分子機構の詳細は不明のままである。本研究では以下の3つのサブプロジェクトを遂行し、II型ミオシンのアクチン繊維に対するどのような作用が収縮環の維持/収縮に関与しているのかを多角的に解明することを目的とした：

- (1) 収縮環形成必須因子 Rng2 によるアクチン-ミオシン相互作用調節機構の解析
- (2) 分裂酵母 II 型ミオシン変異株の系統的な作製と機能および同在解析
- (3) Rng2 類似遺伝子の機能解析

3. 研究の方法

既存の遺伝学的、生化学的、生物物理学的手法、および生細胞観察を組み合わせる解析を行った。

- (1) 収縮環形成必須因子 Rng2 によるアクチン-ミオシン相互作用調節機構の解析
Rng2 アクチン結合部位のアクチンミオシン相互作用に対する作用の生化学的および生物物理学的解析

Rng2 のアクチン結合部位 (Rng2CHD) を大腸菌で発現させた後、精製した。精製 Rng2CHD がアクチン-ミオシン相互作用におよぼす効果について、共同沈降実験、ミオシン ATPase 活性測定、ミオシン運動アッセイ等で観察した。

Rng2 のアクチン結合活性がリン酸化により制御されている可能性の検証
まず Rng2 分子内のサイクリン依存型リン酸化酵素 (CDK) による予想リン酸化サイト (計 12 カ所) をバイオインフォマティクスの手法で同定した。それらのサイト上のセリンまたはスレオニン残基全てをアスパラギン酸に置換した疑似リン酸化型 Rng2 コンストラクト、および全てをアラニンに置換した疑似脱リン酸化型 Rng2 コンストラクトを作製し、それらを使用して、それぞれ黄色蛍光タンパク質 (YFP) 融合型疑似リン酸化型 Rng2 変異株 (YFP-Rng2-12D)、および YFP 融合型疑似脱リン酸化型 Rng2 変異株 (YFP-Rng2-12A) を作製した。作製した変異株の収縮環形成に要する時間や収縮に要する時間を生細胞観察から計測し、野生株と比較した。

- (2) 分裂酵母 II 型ミオシン変異株の系統的な作製と機能および同在解析

II 型ミオシンのモーター活性を変化させることがわかっている既知の点変異を、YFP 融合型分裂酵母 II 型ミオシン遺伝子に導入し

た変異株シリーズを作製した。それらのミオシン変異株における収縮環形成および収縮環の収縮を観察し、また収縮環における変異ミオシン濃度を計測した。さらに蛍光回復実験 (FRAP) から収縮環における変異ミオシン分子の入れ替わり速度を測定した。

(3) Rng2 類似遺伝子の機能解析

Rng2CHD と類似のアミノ酸配列を持つ新規遺伝子をデータベース上で検索し、機能未知遺伝子 *npg1* を同定した。*npg1* 遺伝子破壊株の増殖や細胞質分裂の様子を観察した。また減数分裂時における *Npg1* の局在を観察し、*npg1* 遺伝子の孢子形成における機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 収縮環形成必須因子 Rng2 によるアクチン-ミオシン相互作用調節機構の解析

Rng2 アクチン結合部位のアクチン-ミオシン相互作用に対する作用の生化学的および生物物理学的解析

共同沈降実験より、Rng2CHD はアクチン繊維とミオシンの結合を妨げないこと、および Rng2CHD とミオシンは直接結合しないことがわかった。一方で Rng2CHD はミオシンのアクチン活性化 ATPase 活性を濃度依存的に阻害した。またミオシン運動アッセイから、Rng2CHD はミオシンによるアクチン繊維の運動速度を濃度依存的に低下させることが明らかになった。これらの Rng2CHD の活性は、アクチン繊維束化を誘導しない程度の濃度でも観察されるため、アクチン繊維の束化自体は Rng2 によるミオシン活性の調節には必要ないと推察された。従って Rng2CHD はアクチン繊維に結合してその性質あるいは構造を変化させることで、ミオシンとアクチン繊維の相互作用を間接的に調節していることが示唆された。

昨年より Rng2CHD とアクチン繊維の相互作用の生物物理学的解析を共同研究として開始し、Rng2CHD はアクチン繊維のらせんピッチを変化させる等の新たな知見が得られつつある。今後、これまでの成果をとりまとめ、論文として国際誌上で発表する予定である。

Rng2 のアクチン結合活性がリン酸化により制御されている可能性の検証

CDK による予想リン酸化サイトは Rng2 分子の全長に渡って、計 12 カ所同定された。従って Rng2CHD を含む、Rng2 のドメインの活性が細胞周期依存的にリン酸化により制御されている可能性が示唆された。疑似リン酸化型および疑似脱リン酸化型 Rng2 は収縮環に局在し始める時期が野生型 Rng2 と若干異なっていた。また収縮環における局所的濃度も野生型、リン酸化型 Rng2、および脱リン酸化型 Rng2 でわずかながら差が観察された。これらの結果は Rng2 の局在や機能が細胞周期の時

期ごとに、リン酸化によって制御されていることを示唆する。現在はより詳細な解析を進めている。またリン酸化型および脱リン酸化型の Rng2CHD タンパク質を調製して、アクチン繊維との結合を生化学的に観察し、Rng2CHD の活性がリン酸化による制御を受けているかどうか検証を試みている。

(2) 分裂酵母 II 型ミオシン変異株の系統的な作製と機能および局在解析

まず収縮環の形成と収縮に必須な II 型ミオシン Myo2 に点変異導入を試みたところ、複数の変異株が致死性を示した。これは Myo2 のモーター活性が厳密に調節されており、変異によりわずかでも活性が変化することで、収縮環形成に異常をきたし、細胞質分裂が不全になったためと考えられた。そこで収縮環に局在し、その収縮には関与するが、細胞質分裂に必須ではない II 型ミオシン、Myo3 に点変異を導入した。

変異型 Myo3 は野生型とは異なる様々な局在様式を示したが、概して (1) 収縮環への均一な局在には健全な ATP 加水分解サイクルが必要であること、(2) Myo3 の局所的濃度は ATP 存在下における頭部ドメインのアクチン繊維との親和性 (アクチン活性化 ATPase 活性測定におけるアクチン濃度の K_m 値で表される) と相関すること、(3) モーター分子としての運動性自体は収縮環への局在には直接的には必要でないこと等が示唆された。

これらの Myo3 変異株は単独では収縮環の動態にほとんど異常をきたさないが、Myo2 のモーター活性が極端に低下している温度感受性変異株 *myo2-E1* と収縮環への局在量が半減する *myo3-S469V* 変異の二重変異株では、一端形成された収縮環が頻繁に変形したりあるいは徐々に消失する様子が観察された。また同様の表現型がトロポミオシン Cdc8 の温度感受性変異と *myo3* 遺伝子破壊の二重変異株でも観察された。Cdc8 は Myo2 のモーター活性を亢進させる (Stark et al., 2010) ため、この二重変異株では *myo2-E1 myo3-S469V* と同様に、収縮環に局在する II 型ミオシンの活性量が低下していると考えられる。これらの結果から Myo2 と Myo3 のモーター活性は協調して分裂期後期の収縮環の維持に関与していることが明らかになった。

さらに収縮環上の Myo3 の動態を経時的に観察し、取得画像を演算処理により鮮明化して詳細に解析したところ、Myo3 は収縮環上で数十のクラスターを形成し、円周に沿って運動していることが明らかになった。またドメイン解析から、尾部の中央付近の領域がクラスター形成や局在に必要であることが判明した。Myo3 は尾部のコイルドコイル領域に大きなギャップを持つため、二量体やフィラメントを形成しない単量体 II 型ミオシンであることが先行研究で示唆されていた

が (Bezaniilla et al., 2000)、本研究によって、少なくとも収縮環上では超分子集合体を形成すること、クラスター化が Myo3 の局在や機能に重要であることが示唆された。以上の成果を論文にまとめて国際誌に投稿し、編集者の指示に従って改訂稿を作成中である。

(3) Rng2 類似遺伝子の機能解析

Rng2CHD と類似の配列を有する機能未知の遺伝子 *npg1* を同定し、細胞質分裂において Rng2 と重複した機能を担っているであろうという予想のもと、局在や機能の解析を行った。

当初の予想に反して、*npg1* は栄養増殖期ではほとんど発現しておらず、*npg1* 遺伝子破壊株の増殖は野生株と差が無く、収縮環形成や細胞質分裂にも異常が認められなかった。改めて *npg1* の発現を解析したところ、*Npg1* タンパク質は減数第一分裂と第二分裂の間に時期特異的に発現していることが判明した。また *npg1* 破壊株では胞子形成の効率が著しく低下していた。これらのことから *npg1* は Rng2 とは異なり、細胞質分裂ではなく、胞子形成特異的に機能していることが示唆された。

胞子形成の様子を経時観察でより詳細に観察した結果、*npg1* 破壊株では、胞子膜の前駆体である前胞子膜形成が初期の段階から異常になっていた。また遺伝学的解析から *npg1* は既知の胞子形成関連因子である *spo3* や *meu14* と共同して作用することが示唆された。

さらに蛍光タンパク質融合型の *npg1* を発現する株を作製して、*Npg1* の局在を詳しく観察した。*Npg1* はまず減数第一分裂後に核内にドット状に現れ、減数第二分裂の開始までに核外へ移行して、分離した二つの中心体に局在するという、全く新規の局在様式を示した。この結果は減数第一分裂以降に核内から中心体付近へと伝わる、新規のシグナル伝達機構の存在を示唆するものである。これらの成果は細胞生物学の国際誌上で論文として公表した。

(4) まとめと今後の展望

細胞質分裂はあらゆる細胞の増殖に必須である。特に真核細胞においてはアクチン繊維と II 型ミオシンからなる収縮環は、細胞質分裂を時間的・空間的に制御するために重要な役割を果たす。本研究により、収縮環に局在するアクチン調節タンパク質によるアクチン-ミオシン相互作用の制御機構およびミオシンモーター特性と局在の関係性等が明らかになりつつある。また本来、II 型ミオシンは収縮環の形成や収縮に関与すると考えられていたが、II 型ミオシンのモーター活性が収縮環の維持にも積極的に関わっていることが初めて明らかになった。これらの知見は収縮環におけるアクチン-ミオシン相互作用を分子レベルで理解する上で重要であり、医

学的にも特定の細胞の増殖（例えばガン細胞）を制御する手法の開発等にも貢献する可能性があると言える。また偶然ながら新規胞子形成関連因子を同定・解析し、減数分裂時における新たなシグナル伝達経路を見出した。これらの発見は酵母の胞子形成機構の解明に大きく貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

高稲 正勝、今田 一姫、沼田 治、中村 太郎、中野 賢太郎

The meiosis-specific nuclear passenger protein is required for proper assembly of forespore membrane in fission yeast. *Journal of Cell Science* (査読有り) 127, 2014, 4429-4442.

DOI: 10.1242/jcs.151738

高稲 正勝、沼田 治、中野 賢太郎

Fission yeast IQGAP maintains F-actin-independent localization of myosin-II in the contractile ring. *Genes to Cells* (査読有り) 19, 2014, 161-176.

DOI: 10.1111/gtc.12120

[学会発表](計 3 件)

高稲 正勝、沼田 治、中野 賢太郎

Motor activity of myosin-II is required for maintenance of the contractile ring in fission yeast

第 52 回日本生物物理学会年会

2014 年 9 月 25 日

札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

高稲 正勝、沼田 治、中野 賢太郎

分裂酵母の細胞質分裂における単量体型 II 型ミオシンの局在と機能

第 51 回日本生物物理学会年会

2013 年 10 月 28 日

国立京都国際会館 (京都府京都市)

高稲 正勝、沼田 治、中野 賢太郎

IQGAP confines myosin-II to the cytokinetic contractile ring

第 50 回日本生物物理学会年会

2012 年 9 月 23 日

名古屋大学・東山キャンパス (愛知県名古屋市)

[その他]

筑波大学 生命環境系 オルガネラ細胞学教室ホームページ:

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/organelle/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高稲 正勝 (TAKAINE, Masakatsu)
筑波大学・生命環境系・研究員
研究者番号：20573215

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し