

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830147

研究課題名(和文)理論・実験の併用でさぐるアクチンの細胞内自己組織化

研究課題名(英文) Intracellular self-organization of actin cytoskeleton

## 研究代表者

藤田 征志 (Fujita, Masashi)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：80564749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン繊維とミオシン分子モーターは、細胞表層でネットワークを形成し、収縮力を発生する。このアクトミオシンネットワークは、線虫*C. elegans*の一細胞胚の表層において、明滅する斑点構造を形成する。本研究では、この斑点構造を制御するメカニズムを解析した。その結果、RhoGAPタンパク質RGA-3/4が斑点に共局在していることがわかった。RGA-3の細胞内局在を人工改変する実験などを行った結果、RGA-3/4が斑点のサイズと分解を制御していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Actin filaments and myosin motor form network at the cell cortex and generate contractile forces. This actomyosin network form pulsatile foci in the cell cortex of the one-cell embryos of the nematode *C. elegans*. In this study, I investigated how the foci structure is regulated. I found that RhoGAP proteins RGA-3/4 colocalize to the actomyosin foci. Experiments showed that RGA-3/4 regulate the size and disassembly of actomyosin foci.

研究分野：システム生物学

キーワード：細胞骨格 アクチン ミオシン 細胞動態 RhoGAP

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 生命情報学と細胞骨格

生命現象はしばしば時間的・空間的な規則性をもつ。例えば概日リズムや、動物の皮膚模様などが有名である。こうした現象の理解には、従来の実験生物学だけでは限界があり、計算機シミュレーションをはじめとする生命情報学が大きく貢献してきた。細胞骨格は細胞生物学・発生生物学で中心的役割を果たすとともに、時間的・空間的な規則性の豊かな題材を提供する。例えば、中期紡錘体の染色体振動や、筋原繊維の形成などがそうである。こうした細胞骨格の規則性に数理のメスを入れることは、生命情報学と細胞生物学・発生生物学の双方の発展に有益である。

### (2) Myosin foci

細胞骨格の規則性のうち、近年発見されたものが myosin foci である。これはアクチン繊維とモータータンパク質 myosin が斑点状に集まったもので、出現と消滅を周期的に繰り返す。この時間変化を生み出すメカニズムは、未だ不明である。Myosin foci は昆虫と両生類の原腸形成時に観察されており、細胞集団を移送するうえで進化的に保存された役割を持つと考えられている。

Myosin foci は、線虫 *C. elegans* の 1 細胞胚にも存在し、頭尾軸の決定因子を移送する重要な役割を持つ。線虫胚の myosin foci は、周期的時間変化に加えて規則的な空間分布を持っている。サイズがほぼ均一な myosin foci が多数出現し、それらは概ね等間隔に位置する。この空間分布を生み出すメカニズムも、これまで不明だった。

## 2. 研究の目的

*C. elegans* 1 細胞胚における myosin foci の時間的・空間的規則性は、どのようなメカニズムで生まれるのか？この研究では、myosin の制御因子である RGA-3/4 が、myosin foci の自己組織化に与える影響を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) RGA-3/4 の RNAi ノックダウン

RGA-3/4 の機能を調べるうえで、RNAi によるノックダウンは有用な研究手段になる。しかし高い配列相同性を持つ *rga-3* 遺伝子と *rga-4* 遺伝子は機能的に冗長であるため、その両者を確実にノックダウンする必要がある。ところが *C. elegans* においては複数の遺伝子を標的とする RNAi は効果が出にくいことが知られている。そこで、RNAi 法の検討を行い、鳥取大の河野らによって提唱されたダブルノックダウン法を試みた。*rga-3* と *rga-4* のコーディング配列を単一の発現ベクターにクローニングして、feeding RNAi 法を行った。その結果、98%という高い胚性致死率が得られた。この数値は、このベクターを用いた RNAi によって、内因性 RGA-3/4 の発現量を大幅に減少していることを示唆して

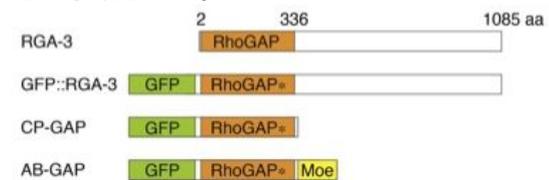
いる。

### (2) RGA-3 細胞内局在の人工改変

後述する実験結果から、RGA-3/4 の細胞内局在が、myosin の細胞内分布に影響を与える可能性が考えられた。この可能性を検証するために、RGA-3 細胞内局在の遺伝子組換えによる人工改変を行った。RGA-3 の N 末領域は保存された RhoGAP ドメインであるが、C 末側には配列モチーフは見当たらない。N 末、C 末それぞれの mCherry 融合タンパク質を線虫胚で発現させた結果、C 末が細胞表層への局在に必要なことが判った。

この結果に基づいて、次の 3 つの RhoGAP 組換えタンパク質を設計した。1 つ目は、GFP::RGA-3 であり、コントロールとしての役割を担う。2 つ目は、GFP と RGA-3 の N 末側 RhoGAP ドメインの融合タンパク質である。このタンパク質は細胞質に局在することが期待されることから、CP-GAP (cytoplasmic GAP) と命名した。3 つめは、GFP、RhoGAP ドメインと、*Drosophila moesin* の F アクチン結合ドメインの融合タンパク質である。このタンパク質は、F アクチンと結合することが期待されることから、AB-GAP (actin-binding GAP) と命名した。

これらの 3 つの組換えタンパク質を発現する線虫株を構築した。蛍光顕微鏡で観察したところ、いずれのタンパク質も当初の期待通りの細胞内局在を示した。さらに *rga-3/4* RNAi 時の細胞質分裂をレスキューすることができたので、RhoGAP として機能していることが示唆された。



### (3) 蛍光強度の定量化

後述する実験結果から、内因性 RGA-3/4 が myosin foci の寿命を短縮する役割があることが示唆された。その分子メカニズムについての知見を得るために、GFP::RGA-3 と mCherry::myosin の 2 色観察を行った。その結果、foci へのタンパク質の蓄積の順序は、myosin が先に集まり、やや遅れて RGA-3 が集まり始めることが観察された。

この観察結果を定量的に確認するために、60 個の foci について蛍光強度の時間変化を測定した。測定された蛍光強度について、myosin と RGA-3 の相互相関を計算し、RGA-3 が myosin より 5~10 秒遅れて蓄積する foci が過半数であることを確認した。

## 4. 研究成果

### (1) RGA-3/4 の必要性

野生型胚では、myosin は細胞表層に foci 構造を形成する。ところが RGA-3/4 を RNAi ノ

ックダウンしたところ、細胞表層の myosin は foci を形成せず、一様に分布した。この結果から、RGA-3/4 が myosin foci の形成に必須であることが判った。

#### (2) RGA-3 の細胞内局在

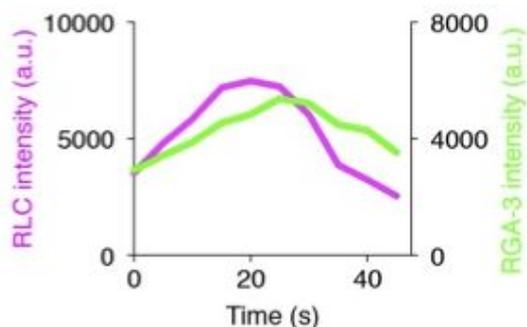
YFP::RGA-3 を調べた先行研究によると、RGA-3 は細胞表層に foci 状の構造を形成する。この構造が myosin foci と一致するか確認するために、GFP::RGA-3 と mCherry::myosin の両方を発現する遺伝子組換え線虫株を構築した。その結果、RGA-3 は細胞表層の myosin foci に共局在することが確認された。

#### (3) RGA-3 共局在の役割

RGA-3 は myosin の負の制御因子であることから、RGA-3 が共局在することが myosin の分布に影響を与えている可能性が考えられた。この可能性を検証するために、RGA-3 の C 末領域を削除した組換え遺伝子 CP-GAP を発現させたところ、細胞表層の myosin は巨大なリング状構造を形成した。この分布は野生型胚で見られるものとは大きく異なっている。一方、F アクチンと共局在する組換え遺伝子 AB-GAP を発現させると、myosin は野生型に似た foci 状の構造を形成した。このことから、細胞表層における myosin 構造のサイズを制限する上で、actin-myosin のネットワークに RhoGAP が共局在することが必要十分であることが示唆された。

#### (4) RGA-3/4 と foci の寿命の関連性

興味深いことに、AB-GAP を発現する線虫株では、myosin foci の寿命が著しく長くなっていた。そこで、組換えタンパク質である AB-GAP と、内因性の RGA-3/4 を同時に発現させると、foci の寿命が短くなった。これは、内因性の RGA-3/4 には foci の寿命を短くする機能があることを示唆している。この機能の詳細を探るために、GFP::RGA-3 と mCherry::myosin の 2 色観察を行った。その結果、RGA-3 は myosin に比べて、foci への蓄積がやや遅れることが判明した。さらに、RGA-3 の蓄積が遅れるほど、myosin foci の寿命が伸びることも判明した。これらの結果は、RGA-3 が foci の分解を促進することを示唆している。



#### (5) 結論

本研究の結果は、myosin foci のサイズと寿命の制御が、そこに共局在する RhoGAP を介して行われていることを示唆している。線虫に限らず、ショウジョウバエや両生類の myosin foci も small GTPase Rho に制御されているため、同様のメカニズムに従っているのか、今後の研究が待たれる。

今後の研究としては、RhoGAP の遅れを取り入れた計算機シミュレーションによって、myosin foci のダイナミクスが再現できるかが重要な課題である。

#### 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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計5件)

発表者：藤田征志、発表タイトル：Colocalization of RhoGAP Restricts the Size of Pulsatile Actomyosin Foci in *C. elegans* Embryos、学会名：The 2014 ASCB/IFCB Meeting、発表年月日：2014年12月6～10日、発表場所：Philadelphia(USA)

発表者：藤田征志、発表タイトル：Colocalization of RhoGAP Restricts the Size of Pulsatile Actomyosin Foci in *C. elegans* Embryos、学会名：The 62nd NIBB Conference "Force in Development"、発表年月日：2014年11月17～19日、発表場所：岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)

発表者：藤田征志、発表タイトル：Morphology of actomyosin network is regulated by colocalization of RhoGAP RGA-3/4、学会名：*C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting、発表年月日：2014年7月15～19日、発表場所：奈良県新公会堂(奈良市)

発表者：藤田征志、発表タイトル：Analysis of colocalization between RhoGAP protein RGA-3/4 and actomyosin in *C. elegans* embryos、学会名：第36回日本分子生物学会年会、発表年月日：2013年12月3～6日、発表場所：神戸ポートアイランド(神戸市)

発表者：藤田征志、発表タイトル：RhoGAP proteins RGA-3/4 mediate spatial negative feedback of the actomyosin in *C. elegans* embryos、学会名：第51回日本生物物理学会年会、発表年月日：2013年10月28～30日、発表場所：国立京都国際会館(京都市)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤田 征志 (FUJITA, Masashi)

独立行政法人理化学研究所・生命システム

研究センター・研究員

研究者番号：80564749

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：