

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650058

研究課題名(和文) 微小管とアクチンフィラメントの細胞内相互作用を再現する新規無細胞系の確立

研究課題名(英文) Cell-free extracts from frog eggs that reproduces intracellular interactions between actin filaments and microtubules.

研究代表者

大隅 圭太 (Ohsumi, Keita)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20221822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞の細胞分裂では、微小管とアクチンフィラメントの協調的な動態調節が重要であり、両者がどのように相互作用するかは細胞生物学の重要課題の1つである。本研究では、カエル卵抽出液を用いて2つの細胞骨格繊維の細胞内動態を再現できる無細胞系を確立し、この系を使って、核アクチンがクロマチンと核膜の結合調節に参与することを初めて見だし、分裂期の紡錘体上への染色体整列にアクチンフィラメントが必要なことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, interaction between actin filaments and microtubules and its regulation play important roles particularly in cell division, although they remain to be investigated partly because of the absence of in vitro systems that allow their analysis. In this study, we have prepared cell-free extract from frog eggs that reproduces intracellular dynamics of both actin filaments and microtubule. Using this in vitro system, we have found that nuclear actin filaments are essential for the maintenance of chromatin binding to the nuclear envelope. We have also demonstrated that both of the cytoskeletal filaments are involved for condensed chromosomes to be aligned on the mitotic spindle in M-phase.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞骨格 アクチンフィラメント 微小管 無細胞系

1. 研究開始当初の背景

微小管とアクチンフィラメントは、真核細胞の主要な細胞骨格繊維であり、細胞分裂などの種々の細胞現象において中心的な役割をはたしている。2つの細胞骨格繊維は独立したシステムを構築しているが、紡錘体(微小管)に由来するシグナルによって収縮環(アクチンフィラメント)の形成位置が決められるなどのことから、両者の間には相互作用に基づくなんらかの連携があることが予想される。これを裏付けるように、微小管とアクチンフィラメントの双方に結合性を示す蛋白質があることが報告され、両者を媒介する因子やその作用機序についての研究の端緒が開かれつつあった。しかし、有用な解析系がないこともあり、本研究開始時点では多くが未開拓の領域であった。細胞骨格の研究において、カエル卵抽出液の無細胞系は、紡錘体や星状体の形成などの微小管の細胞内動態を再現できることから、微小管の細胞内ダイナミクスおよび調節機構の解明に大きく貢献して来た。アクチンフィラメントについても同様の可能性が期待された。しかしながら、卵細胞質の遠心抽出に際しては、細胞質の分離促進のため、抽出緩衝液にアクチン重合阻害剤サイトカラシンを添加するのが常法となっており、そのため、アクチンフィラメントの細胞内動態の研究に卵抽出液を適用することができなかった。

2. 研究の目的

微小管とアクチンフィラメントは、真核細胞の細胞分裂では協調的に調節される必要があり、両者がどのように相互作用するか、その調節がどのようになされるかは細胞生物学の重要課題の一つといえる。しかしながら、二つの細胞骨格繊維が各々別個に研究されてきた経緯もあり、両者の協調的相互作用の在り方については、必ずしも十分な解析がなされていない。微小管とアクチンフィラメントの細胞内動態を再現する無細胞系が存在すれば、細胞骨格の分子細胞生物学にきわめて有用な解析系を低調紙、細胞骨格繊維間の相互作用の実態、制御機構の解明に大きく貢献すると期待される。本研究では、微小管とアクチンフィラメント、双方の細胞内動態を再現するアフリカツメガエルの卵から調製する抽出液の無細胞系を新規に確立し、これを用いて両細胞骨格繊維の細胞内現象、特に分裂期移行時の紡錘体形成と染色体凝縮および紡錘体上への染色体配列における相互作用、在り方およびその調節機構を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アクチンの細胞内動態を再現する無細胞系の確立：私たちが調製法を確立した、阻害剤を全く使わずにツメガエルの未受精卵から抽出した細胞質(ネイティブ卵抽出液)抽出液を出発材料にして、微小管およびアク

チンフィラメントの高次構造構築を再現でき、同時に、各細胞骨格繊維の重合、脱重合程度の定量的解析や、結合成分の生化学的解析が可能な細胞質画分の分離抽出を試みる。

(2) 微小管-アクチンフィラメント間相互作用の解析：ネイティブ卵抽出液にアクチンの重合阻害剤(サイトカラシン)を添加した時の星状体や紡錘体の形態を詳細に調べる。また、サイトカラシン存在下で形成された核を単離して分裂期のネイティブ卵抽出液でインキュベーションする。逆に、ネイティブ卵抽出液で形成された核を、サイトカラシンを添加した分裂期の卵抽出液に移す。各々における星状体や紡錘体の形態および染色体の形態を詳細に比較する。アクチンフィラメントはEGFP-UtrCHを用いて、微小管は蛍光標識チューブリンにより、クロマチンはHoechstによるDNA染色により観察する。

(3) ネイティブ卵抽出液における細胞質分裂調節蛋白質の挙動：様々な細胞周期(間期、分裂中期、後期)にあるネイティブ卵抽出液を調製し、免疫蛍光染色法によりアクチン結合蛋白質アニリンおよびセントラルスピンドリン複合体を構成する蛋白質の1つMKLP1蛋白質と各細胞骨格繊維との共同在性の有無を、また、遠心沈降物に対するウエスタン解析により微小管とアクチンフィラメントに対する結合性の変化を調べる。

4. 研究成果

(1) アクチンの細胞内動態を再現する無細胞系の確立：阻害剤を全く使わずにツメガエル未受精卵から遠心により抽出した細胞質に、精子クロマチンを加えてインキュベーションすると、核が形成されることが確認された。しかし、この卵抽出液には多量の脂質と色素顆粒を結合した膜成分が含まれており、これらのものが蛍光顕微鏡観察の際に強い自蛍光を発するなどの欠点があった。そこで、遠心分離の条件(使用する緩衝液および遠心条件)を検討した。その結果、きわめて簡単な組成(100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES-KCl, pH 7.8)の緩衝液を用いて、15000 g、15分、4の遠心によって細胞質を分離し、パスツールピペットを使って、色素顆粒の一部を含む半透明な細胞質画分を静かに吸い取り、その後、同じ条件での遠心分離を繰り返して、上部の脂質層の混入を少なくしていく、という調製法が適していることを見いだした。精子クロマチンを加えて、その形態から細胞周期をモニターしたところ、卵の賦活後25分に調製したものは、間期と分裂期を交互に数回繰り返すこと、また、5 mM EGTAを含む緩衝液で調製すると、分裂期に停止したものが調製でき、これに過濃度0.4 mMのCaCl₂を添加することによって、間期に移行すること、蛋白質合成阻害剤の添加により間期に停止させることができ

ることなど、従来の卵抽出液と同様に細胞周期を簡単に操作できることが確認された。

阻害剤を含まないこの卵抽出液 (NEE: native egg extract) では、既に報告のある分裂期特異的な、アクチン依存性の細胞質ゲルの収縮 (Field et al., 2011) が確認されただけでなく、間期には、核内にアクチンフィラメント (F-アクチン) の非常によく発達することが見いだされた。さらに、アクチン重合阻害剤を用いて調製されるこれまでの卵抽出液 (CEE: conventional egg extract) で形成された核においては、核の成長後にクロマチンが核膜から乖離して凝集したのに対し、NEE ではクロマチンの核膜結合が維持され、核の F-アクチンがクロマチンと核膜の結合調節に参与することが示唆された (図 1) それに関連して、核膜直下の核ラミナ領域に特に多く F-アクチンが発達するのが観察された。核を含む NEE が分裂期に移行する際には、クロマチンの周辺を F-アクチンが一過

的に取り囲むのが観察され、紡錘体が形成されると、その周辺に F-アクチンのかたまりが分布するのが認められた。このように、NEE では、微小管の構造だけでなく、F-アクチンの構造が構築され、細胞周期の進行に伴って、それらが動的に変化するのが観察された。よって、NEE では、微小管だけでなく F-アクチンの細胞内動態が再現されていると結論された。

(2) 微小管-アクチンフィラメント間相互作用の解析: まず、核の形成、分裂期移行時の核膜崩壊、染色体凝縮、紡錘体形成について NEE と CEE を比較した。その結果、上述のように、CEE では核の成長と共にクロマチンが核膜から乖離して凝集したが、NEE では乖離しなかった。しかし、分裂期への移行に伴って形成される凝縮した染色体の形態には大きな違いは認められず、形成される紡錘体も大きさ、形状共に明瞭な違いは見られなかった。分裂期に停止した卵抽出液に精子を加えて形成される微小管の星状体様構造については、興味深い違いが見いだされた。すなわち、CEE では多数の精子が集合して巨大な微小管の集合体を形成したのに対し、NEE では、精子はあまり集合せず、個々に分離して星状体様構造を形成した。また、その周辺には F-アクチンが分布していた。これらの結果から、分裂期には微小管と F-アクチンが相互作用する可能性が示唆されたので、紡錘体形成に対するアクチン関与の可能性を検討するために以下の実験を行った。間期の CEE

もしくは NEE で核を十分に成長させてから遠心により回収し、各々を分裂期に停止した CEE もしくは NEE に加えて紡錘体を形成させた。その結果、紡錘体の大きさ、形状にはいずれの場合も違いがなかったが、その赤道への染色体の整列の程度には違いが見られた。分裂期の CEE で形成された紡錘体上の染色体は、NEE で形成されてものに比べて、整列の程度が有意に低かった。よって、凝縮した染色体を紡錘体の赤道面に整列させるためには F-アクチンの働きが必要であること、また、紡錘体周辺には F-アクチンが集合するのが観察されたことから、両細胞骨格繊維は少なくとも分裂期には相互作用していることが示唆された。

次に、微小管と F-アクチンの相互作用の在り方およびその調節因子を生化学的に解析するため、超遠心によって卵抽出液の G-アクチンと F-アクチンの分離し、アクチンの重合程度を定量的に解析する系を構築した。そのためには、まず、卵抽出液に多量に含まれるリボソームとミトコンドリアを除く必要がある。遠心条件を検討し、200,000 g、45 分、4 の遠心でリボソームと重い膜成分を沈殿させ、その上清を回収すればよいことを突きとめた。その超遠心上清を緩衝液 (100 mM KCl, 10 mM HEPES-KCl, pH 7.5) で希釈後、245,000 g で 10 分間の遠心によって沈殿を得ると、これに含まれるアクチン量は、重合阻害剤添加で減少し、安定化剤添加で増加したこと、F-アクチンが沈殿して G-アクチンと分離されたことが示された。しかし、この系に微小管の阻害剤を添加すると、アクチン分離のための遠心後に形成される沈殿に含まれる蛋白質の内容が大きく変動し、細胞質の遠心分離のされ方自体が影響を受けること、よって、抱き込みによって G-アクチンが沈殿してしまう可能性が示唆された。また、微小管についても、様々な遠心分離の条件を検討したが、安定化剤、阻害剤に依存して量が増減する沈殿画分を調製できる条件を見いだすことができなかった。この、微小管-アクチンフィラメント間相互作用の生化学的な定量解析系を確立するためには、さらなる検討が必要である。

(3) NEE における細胞質分裂調節蛋白質の挙動: 微小管やアクチンの動態および両者の相互作用に参与する調節因子が NEE においても細胞内と同様に挙動するかについて、アクチン結合蛋白質アニリンおよびセントラルスピンドリン複合体を構成する蛋白質の 1 つ MKLP1 に対する特異抗体を用いた免疫蛍光染色によって調べた。アニリンについては、既に、間期には核に、分裂期には主に細胞皮層に局在化することが示されている。それに一致して、NEE で形成された核に存在することが確認された。MKLP1 については、これまでの先行研究において、少なくとも 3 種類のサブタイプがツメガエルには存在し、そのうちの最も

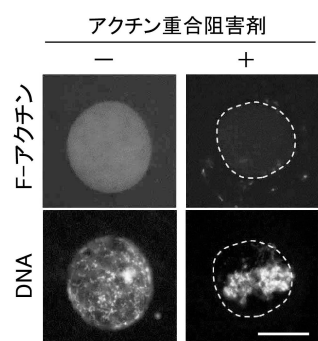


図 1 NEE における核アクチンの集積 F-アクチンを EGFP-UtrCH で、DNA を Hoechst で染色。バーは 20 μ m。

分子量が小さいサブタイプ (MKLP1-S) は、卵および初期胚に特異的に発現していることが見いだされている。興味深いことに、培養細胞では、MKLP1 は核に局在化して細胞質には検出されないが、MKLP1-S は微小管と共局在することが、培養細胞への異所的発現誘導実験によって示されている。また、卵で形成される星状体微小管に対しても、MKLP1-S だけが共局在することが判明している。NEE で精子中心粒から形成される星状体様構造における MKLP1 局在性の有無を検討したところ、卵と同様に、MKLP1 のシグナルが検出された。卵抽出液の遠心分離による、微小管および F-アクチンとの結合性の生化学的解析のためには、上述のように、F-アクチンと G-アクチン、および微小管とチューブリンとの分離法を確立することが不可欠で、その条件検討を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Jullien, J., Miyamoto, K., Pasque, V., Allen, G., Bradshaw, C.R., Garrett, N.J., Halley-Stott, R.P., Kimura, H, Ohsumi, K., Gurdon, J.B. (2014). Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming. *Mol. Cell*, 55, 524-536.
DOI: 10.1016/j.molcel.2014.06.024

〔学会発表〕(計 10 件)

岩淵万里、小野田衣里、小田春佳、大隅圭太、胞胚型核システムの分子基盤、第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会、2016.1.13、松島町(宮城県)

岩淵万里、小野田衣里、小田春佳、大隅圭太、カエル胞胚細胞の核システム、第 86 回日本動物学会、2015.9.18、新潟

岩淵万里、小田春佳、白井菜月、浦菜緒子、小田春佳、大隅圭太、カエル初期胚における未分化細胞の核システム、第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、2014.12.16、廿日市(広島県)

朱睿斌、岩淵万里、大隅圭太、ツメガエル初期胚のヌクレオソーム形成における HIRA の制御機構、第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、2014.12.15、廿日市(広島県)

白井菜月、小田春佳、浦菜緒子、大隅圭太、岩淵万里、アフリカツメガエル初期胚における核アクチンの解析、第 37 回日本分子生物学会、2014.11.25、横浜

大隅圭太、浦菜緒子、小田春佳、白井菜月、岩淵万里、カエル初期胚における核ア

クチンの役割、第 85 回日本動物学会、2014.9.11、仙台

岩淵万里、浦菜緒子、小田春佳、白井菜月、大隅圭太、核アクチンフィラメントの動態を再現する新規ツメガエル卵無細胞系を用いたクロマチン-核膜結合制御機構の解析、第 87 回日本生化学会シンポジウム「核構造タンパク質によるクロマチン時空間制御の理解とマニピュレーション」、2014.10.18、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/laboratory/dcb.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅圭太 (OHSUMI, Keita)
名古屋大学・理学研究科・教授
研究者番号: 20221822

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩淵 万里 (IWABUCHI, Mari)
名古屋大学・理学研究科・講師
研究者番号: 40275350