

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32641

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650136

研究課題名(和文)細胞にアクチンは必要かークラミドモナスを用いた検証ー

研究課題名(英文)Is actin indispensable for cell survival? A study with Chlamydomonas

研究代表者

箕浦 高子(Kato-Minoura, Takako)

中央大学・理工学部・准教授

研究者番号：80300721

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)：真核生物共通の細胞骨格アクチンは、生命活動に必要不可欠なのか。本研究では緑藻クラミドモナスを用いて、この問題に対峙した。この生物にはアクチン遺伝子が2つしかなく、またそれらがコードするアクチン(CrAとNAP)は大きく性質が異なる。研究代表者は以前にCrAの欠損株を得ている。そこでこの株に対してamiRNAによるNAPの段階的発現抑制を行った。その結果、NAPの発現を検出限度以下にまで抑制すると生育に重大な支障が生じるが、CrAを欠損した状態でも通常の10%程度のNAPが存在すれば生存可能であることが判明した。以上から、アクチンは必要だがごくわずかで良いという結論が得られた。

研究成果の概要(英文)：Is the cytoskeletal protein actin indispensable for eukaryotic life? In this study, we asked this fundamental question using mutants of a unicellular green alga, Chlamydomonas, which has only two actin genes coding for two discrete types of actins, CrA and NAP. We previously isolated a null mutant of CrA. Here, we examined the effect of expression reduction of NAP using amiRNA in the CrA-less mutant. A transformed strain that expressed no CrA and ~10% of NAP was viable, although another strain that expressed no CrA and no detectable NAP displayed abnormal growth. These results suggest that actin is indispensable, but only a small amount of it is enough for cells to survive.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アクチン 重合 amiRNA 細胞分裂 繊毛形成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アクチンは、運動や細胞分裂など、真核生物の生存に関わる現象の鍵としてはたらく細胞骨格である。このためアクチンは、生命活動に不可欠なタンパク質と考えられてきた。しかし、はたして本当に、アクチンは細胞にとって必要不可欠なのだろうか。本研究では、単細胞性緑藻のクラミドモナスを用いて、この問題に対峙した。クラミドモナスには CrA と NAP という異なるタイプのアクチンが各 1 種類ずつしか存在しない。しかもその一方の CrA を欠損した変異株を研究代表者自身が以前に単離同定している (文献①)。このことから、CrA 欠損株で NAP の発現抑制を行うことにより、細胞内のアクチンを段階的に削減することが可能である。

(2) 細胞内のアクチンを欠損させる研究は、アクチン遺伝子を多数もつ高等動植物では困難である。他方、アクチン遺伝子を 1 つしかもたない酵母では、その欠損株が致死性を示すことから、アクチンが必須であることは明らかである (文献②)。しかしこのことは酵母の特殊性に起因する可能性もある。また、細胞構造があまりにも単純な酵母では、アクチン機能の詳細な解析には限界がある。

(3) クラミドモナスの 2 つのアクチンのうち、CrA は動植物のアクチンとアミノ酸配列の一致度が約 90% の一般的な配列をもつ。一方 NAP は一致度が約 65% と、アクチンとしては例外的に一次構造の保存性が低い (文献③)。研究代表者らのこれまでの研究から、NAP の重合性が極めて低いことも示唆されている (文献①、④)。クラミドモナスでは、細胞質に繊維状のアクチンが観察されないこと、CrA 欠損株が非保守的な NAP しか発現しないにもかかわらず生育に支障がないこと、アクチン重合阻害剤処理を施しても生育に影響がないことなど、以前からアクチンの機能や必要性について、疑問が呈されていた。

## 2. 研究の目的

(1) amiRNA によるアクチンの段階的発現抑制：「細胞にとってアクチンは必要か。」という問いに答えるために、CrA 欠損株に対して amiRNA による NAP の発現抑制を施し、アクチンの関与する形質の変化や細胞の致死性を解析する。クラミドモナスでは、amiRNA による遺伝子発現の抑制系が最近開発された (文献⑤)。また、硝酸で誘導の on/off が可能な抑制系も報告されている (文献⑥)。細胞内のアクチンが完全にゼロになると致死となる可能性も考えられるので、通常の抑制系に加えて硝酸誘導性の amiRNA も用いる。これにより、細胞内のアクチンが 2 種 (野生株)、1 種 (CrA のみ=NAP を抑制した野生株)、1 種 (NAP のみ=CrA 欠損株)、0 種 (NAP を抑制した CrA 欠損株)、

の 4 とおりの状態をすべて作り出す。そして、このように細胞内のアクチンを段階的に減らした効果として、以下の 2 点をおもに検証する。①細胞の増殖速度と形態 (= CrA と NAP の細胞質分裂への寄与)、②接合管の伸長性 (=CrA と NAP の重合性の有無)。

(2) NAP 欠損株の作出の試み：研究代表者らの長年の努力にもかかわらず、これまでに NAP 遺伝子の欠損株は得られていない (本研究開始時点)。しかし、本研究の目的のためには本来、NAP 欠損株の利用が望ましい。そこで HR (相同組換え) による NAP 遺伝子の破壊を試みる。クラミドモナスや植物細胞では HR が極めて起こりにくいことが知られているので、手始めに CrA 遺伝子の破壊を指標に、HR を生じやすい突然変異株の作出を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) amiRNA によるアクチンの段階的発現抑制：amiRNA のターゲット配列を予測するアプリケーション (WMD3) を用い、NAP 遺伝子に対して抑制効果を示す可能性の高い配列を選別する。この配列を恒常発現性 amiRNA ベクター (pChlamiRNA3int)、および硝酸誘導性 amiRNA ベクター (pMS539) に導入する。これらを野生株および CrA 欠損株に導入し、NAP の発現抑制株を得る。

(2) クラミドモナスにおける HR の実現性の検討：CrA 欠損株は CrA を軽鎖とする鞭毛内腕ダイニンを欠損するため、鞭毛外腕ダイニン欠損株 (oda 株) との二重変異により運動性を完全に失うことがわかっている。この特性を利用して、HR を生じやすい突然変異株をスクリーニングする。すなわち、CrA 遺伝子の領域中央部を薬剤耐性遺伝子に置換した破壊型 CrA 遺伝子を作成し、あらかじめ UV で変異誘導した oda 株に導入する。その後、運動性と薬剤耐性を指標にスクリーニングし、HR の有無を調べる。

## 4. 研究成果

(1) amiRNA によるアクチンの段階的発現抑制：まず、細胞内のアクチンを可能な限りゼロに近づけた場合の効果調べた。NAP の恒常的発現抑制が期待される NAP-pChlamiRNA3int を作成し、CrA 欠損株に導入したところ、NAP の発現が通常の 10% 程度にまで抑制された株が得られた (図 1)。しかし、この株の表現型は親株とまったく変わらなかった。次に、NAP-pChlamiRNA3int を野生株に導入し、その株と CrA 欠損株との二重変異株を得た。NAP の発現が検出限界以下にまで抑制された株 (抑制株 e) が得られ、この株では細胞質分裂や鞭毛形成に異常が認められた (図 2)。したがって、CrA が欠損した状態でも

通常の 10%程度の NAP が存在すればクラミドモナスは生存可能だが、検出限界以下にまでアクチン量が減少すると、分裂異常や短鞭毛の表現型が生じ、生育に支障をきたすことがわかった。なお、硝酸誘導性 NAP amiRNA 発現ベクター (NAP-pMS539) による NAP の発現抑制も行った。NAP-pMS539 を CrA 欠損株に導入し、硝酸源の切り替えによって NAP の amiRNA 発現を誘導したところ、前述の抑制株 e と同様の分裂阻害や鞭毛形成阻害が認められた。

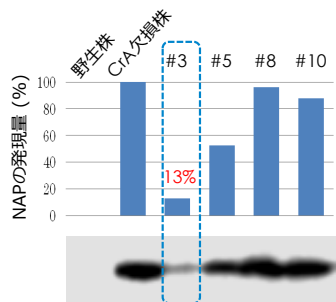


図 1  
NAP の発現抑制 (1)

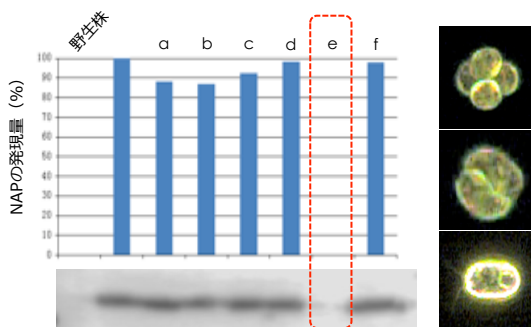


図 2 NAP の発現抑制 (2) と抑制株 (e) の表現型

一方、本研究の実施期間中に、スタンフォード大学の 大西雅之氏らのグループにより NAP の欠損株が単離され、CrA 欠損株との二重変異株の致死性が報告された (文献⑦)。上記の結果と併せると、クラミドモナスの生育には CrA か NAP のいずれか一方のアクチンが必須であるが、その量はごくわずかで良いと結論された。

(2) 大西氏らは、アクチン重合阻害剤ラトランキュリンに耐性を示す株として、NAP 欠損株を単離・同定した。つまり、一般的なアクチンと同様にラトランキュリン感受性を示す CrA とは異なり、NAP はラトランキュリン耐性という特質をもつと考えられる。また、前述のように、NAP の重合性は極めて低いと考えられている。そこで以下の方法により、NAP と CrA のそれぞれ単独での重合性を検証した。

① CrA 欠損株の接合管様構造の Lifeact 標識：クラミドモナスの+型配偶子は、-株との接合時に接合管というアクチン繊維束を含む突起を細胞頂端部に形成する。野生株の接合管には CrA と NAP が共存する。cAMP ア

ナログの dbcAMP 処理により、+株単独でも接合管形成は誘導可能である。しかし、NAP のみを発現する CrA 欠損株の+型配偶子では、dbcAMP 処理で細胞頂端部に NAP が蓄積するが、接合管は伸長しない。そのためこれまでは、NAP 単独では重合能がないか、極めて低いと考えられてきた。今回、F-アクチン結合性蛍光プローブ Lifeact-Venus 発現プラスミドを+型の CrA 欠損株に導入したところ、細胞頭頂部の接合管様構造に蛍光が認められた (図 3)。したがって、CrA が存在しない場合、何らかの理由により接合管の伸長は妨げられるものの、接合管様構造中の NAP は重合状態であり、NAP は重合するポテンシャルをもつことが判明した。

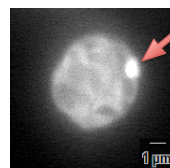


図 3  
CrA 欠損株の接合管様構造 (Lifeact シグナル)



図 4 野生株 (左) および NAP 欠損株 (右) の接合管 (暗視野観察)

② NAP 欠損株の接合管伸長:大西氏から分与された NAP 欠損株を用いて、同株の接合管形成を観察した。その結果、CrA 単独でも接合管が伸長し、またその接合管は CrA と NAP が共存する野生株の接合管よりも長い傾向にあった (図 4)。このことから、CrA 単独で重合が可能だけでなく、野生株の接合管では共存する NAP が抑制的にはたっている可能性が示唆された。

③ 分裂酵母のアクチン温度感受性 (TS) 変異株を用いた NAP の重合性と機能性の評価：間期の分裂酵母では、アクチンはパッチ状またはケーブル状の構造をとる。そこで、分裂酵母の唯一のアクチン遺伝子の TS 変異株に NAP 遺伝子を導入し、制限温度下で NAP がとる構造を調べた。その結果、パッチ状またはケーブル状の NAP の構造が認められ、酵母細胞内で NAP が重合体を形成している可能性が示唆された。さらにこの NAP 導入株では、TS 性が相補されたことから、一次構造の違いにもかかわらず、NAP が酵母アクチンの代替として機能することが判明した。

(3) NAP 欠損株の作出の試み：

① CrA 遺伝子をパロマイシン耐性遺伝子で分断した破壊型 CrA 遺伝子を作成し、あら

かじめ UV で変異を誘発した *oda* 株に導入した。得られた多数のパロモマイシン耐性コロニー（そのほとんどはゲノム内のランダムな位置に耐性遺伝子が導入されたと考えられる）を集め、運動性がなく試験管の底に沈む細胞集団を濃縮した。この細胞集団から、CrA 遺伝子の近傍に破壊型アクチン遺伝子が挿入された株を複数単離することに成功した。しかし、これらの株では導入配列の片端でのみ HR を起こした結果、野生型 CrA 遺伝子の下流に破壊型 CrA 遺伝子が挿入されていることが判明した。本研究は以上で中止したが、クラミドモナスでの HR による遺伝子破壊実験系の開発において、一つの可能性が見出された。すなわち、本研究で見出された片端での HR が他の遺伝子においても一定の頻度で生じるのであれば、破壊型遺伝子の両末端を対象遺伝子の ORF 内配列と相同になるように設計することによって、対象遺伝子がノックアウトできるという可能性である。

② ①の研究と並行して、京都大学福澤秀哉氏、山野隆志氏らのグループが作成した時限的挿入変異株ライブラリーのスクリーニングによる NAP 遺伝子破壊株の獲得を試みた。このライブラリーは、パロモマイシン耐性遺伝子発現カセットをクラミドモナス野生株に導入し、パロモマイシン耐性を示すクローンを多数収集したものである。各クローンには番号がつけられ、96 株ごとに寒天培地プレート上で一定期間保存されている。本研究では 12,480 株の変異株ライブラリーをスクリーニングしたが、NAP 遺伝子破壊株の検出には至らなかった。本研究と同時期に、同様のライブラリーの作成とカセット挿入部位の網羅的決定が、世界中の複数の機関で行われた。しかし、NAP 遺伝子座への挿入変異は全く報告されていない。NAP 遺伝子座は DNA 断片の挿入の起こりにくい特異な部位である可能性が考えられる。

以上のように、CrA と NAP は互いに異なる特性をもつが、それぞれクラミドモナスや分裂酵母の生育に必要なアクチンとしての基本機能を備えていることが判明した。また、クラミドモナスでは、CrA と NAP のどちらか一方は生存に必須であるが、その量はごくわずかでよいこともわかった。このことは、アクチンが真核生物全般で細胞骨格として極めて重要とする従来の考えからすると意外である。CrA が一般的なアクチンと同様のタイプであるのに対し、NAP はラトランキュリン耐性や低重合性というユニークな特徴をもつ。これら 2 つの異なるタイプのアクチンを、クラミドモナスが何のために維持し、どのように使い分けているのかは、依然として大きな謎である。

#### <引用文献>

① Kato-Minoura, T., Hirono, M., Kamiya, R. *Chlamydomonas* inner-arm dynein mutant, *ida5*, has a mutation in an

actin-encoding gene. *J. Cell Biol.* Vol. 137 (3), 1997, pp. 649-656.

② McCollum, D., Balasubramanian, M., Gould, K. Identification of cold-sensitive mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* actin locus. *FEBS Letters* Vol. 451, 1999, pp. 321-326.

③ Kato-Minoura, T., Okumura, M., Hirono, M., Kamiya, R. A novel family of unconventional actins in volvoclean algae. *J. Mol. Evol.* Vol. 57, 2003, pp. 555-561.

④ Kato-Minoura, T. Extremely low polymerizability of a highly-divergent *Chlamydomonas* actin (NAP). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol. 412, 2011, pp.723-727.

⑤ Molnar, A., Bassett, A., Thuenemann, E., Schwach, F., Karkare, S., Ossowski, S., Weigel, D., Baulcombe, D., Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* Vol.58(1), 2009, pp. 165-174.

⑥ Schmollinger, S., Strenkert, D., Schroda, M., An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Current Genetics* Vol.56, 2010, pp. 383-389.

⑦ Onishi M., Pringle, J. R., Cross, F. R., Evidence that an unconventional actin can provide essential F-actin function and that a surveillance system monitors F-actin integrity in *Chlamydomonas*. *Genetics.* Vol. 24, 2016, pp. 977-996.

#### 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 1 件)

① KATO-MINOURA, Takako, KARINO, Kumiko, AKIMOTO, Nobuyui, YOSHIGA, Norito, EHARA, Mika, AOKI, Seishiro Phylogenetic analysis of NAP, an unconventional actin of the Volvocales. *Plant Systematics and Evolution* 査読有  
Vol.301, 2015, pp.1725-1733  
DOI 10.1007/s00606-014-1187-5

[学会発表] (計 7 件)

① 箕浦 高子・青木 誠志郎、Phylogenetic analysis of NAP, an unconventional actin of the Volvocales、17th International Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas*, 2016 年 6 月 30 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

② 箕浦 高子・堀越 由子・今枝 香、鞭毛内

腕ダイニンの形成にはアクチンのN末端側が重要である、日本動物学会第86回大会、2015年9月19日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

③ 箕浦 高子・堀越 由子・今枝 香、鞭毛内腕ダイニンの形成にはアクチンのN末端側が重要である、第53回日本生物物理学会年会、2015年9月15日、金沢大学(石川県金沢市)

④ 今枝 香・堀越 由子・箕浦 高子、鞭毛ダイニン内腕の形成に必要なアクチンサブドメインの推定、日本動物学会第85回大会、2014年9月11日、東北大学(宮城県仙台市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.chuo-u.ac.jp/minoura/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

箕浦 高子 (KATO-MINOURA, Takako)

中央大学・理工学部・准教授

研究者番号：80300721

### (2) 研究分担者：なし

### (3) 連携研究者

神谷 律 (KAMIYA, Ritsu)

学習院大学・理学部・客員教授

研究者番号：10124314

### (4) 研究協力者

植木 紀子 (UEKI, Noriko)

中央大学・理工学部・共同研究員