

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840072

研究課題名(和文)核の細胞内配置を制御するメカニズムは細胞種ごとにどのような違いがあるのか？

研究課題名(英文)What is the difference among mechanisms that regulate the nuclear positioning in various cell types?

研究代表者

木村 健二(kimura, kenji)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号：40644505

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)：本研究は細胞内における多様な核配置戦略を解明することを目的として、線虫*C. elegans*の受精卵と多核化した腸細胞における核の動態を解析した。これまではモータータンパク質・ダイニンが核配置の主要な制御因子として知られていた。今回、(1)卵に侵入した精子核が受精卵内で生じる細胞質流動を利用して適切な配置をとること、(2)多核化した腸細胞における核配置にはモータータンパク質・キネシンが関与する可能性が見出された。本研究により、新規な核の配置機構の存在が明らかになってきた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed the dynamics of the nucleus in the fertilized embryo and in the multinucleated intestinal cell of *C. elegans* to reveal a diverse mechanisms of the nuclear positioning in the cell. Previously, a motor protein dynein has been known as a major regulator of the nuclear positioning. I found that (1) the sperm-derived nucleus utilizes cytoplasmic streaming that emerges after fertilization to position itself in the proper location in the embryo, and (2) a motor protein kinesin-1 is involved in the nuclear positioning in the intestinal cell. This study will reveal new mechanisms of the nuclear positioning in various cell types.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核配置 細胞質流動 キネシン 線虫

1. 研究開始当初の背景

(1) 核の細胞内配置パターンは、発生過程や細胞種ごとに多様性が見られる。例えば、受精卵における核は細胞中央に配置する性質を示し、筋肉のような分化が進んだ多核細胞では、複数の核が規則的な配置パターンを示す傾向にある。このような配置に必要な分子群は同定されつつあり、それらの抑制は、モデル生物の発生障害や、ヒトの発達障害の原因となる。核の配置は、細胞分裂面やシグナル伝達、細胞骨格の配向性などに影響すると予想される。しかし、発生段階や細胞種ごとに核の配置を変えるような、制御機構の多様性や変化に関してはまだ不明な部分が多い。

(2) 本研究の代表者は以前に、線虫 *C. elegans* の受精卵における核の中央配置がダイニンによる小胞輸送に依存するとした「相互綱引きモデル」を提唱した(K. Kimura & A. Kimura, PNAS 2011)。しかし、核の配置には多様性があり、受精直後の精子核や、分化後の多核化した細胞の核配置のように、綱引きモデルでは説明が難しいケースもある。

2. 研究の目的

本研究では線虫 *C. elegans* を用いて、受精直後の卵における精子核配置と、分化が進み多核化した腸細胞における核配置のメカニズムを調べることで、綱引きモデルの一般性を検証するとともに、各細胞種における多様な核の配置戦略を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 受精直後の精子核配置のメカニズムと意義を明らかにするため、以下の方法で線虫 *C. elegans* の受精卵内における精子核の動態を解析した。

卵母細胞に侵入した精子核の動態を追跡するため、精子の染色体を可視化できる mCherry:H2B を発現する雄と、細胞膜を可視化できる GFP:PH を発現する雌雄同体を用意した。(線虫受精卵は楕円形であり、卵に侵入した精子核は最終的にどちらかの長軸極側に配置し、そこが将来の後極側になる。)

卵内における精子核の位置を計測するため、受精卵の共焦点顕微鏡による三次元タイムラプス撮影を行い、精子核配置の時間変化を定量化した。

線虫の受精卵では二つの連続した細胞質流動が生じることが知られており、本研究の代表者は精子核の配置変化がこれらの影響を受けているという可能性を見出していた。この影響を評価するため、それぞれの流れを実験的に止めたときの精子核の動態を追跡した。

精子核配置が二つの細胞質流動から受ける影響を評価するため、画像解析により細胞質流動の流れの方向と速さを定量化した。

細胞質流動が及ぼす精子核配置への影響を評価するため、流動のパターンや速度が変化するような遺伝子抑制実験や変異体の作製を行った。

(2) 多核細胞における核配置のメカニズムを明らかにするため、以下の方法で線虫 *C. elegans* の多核化した腸細胞における核配置の解析を行った。

腸における核と細胞膜をそれぞれ GFP で可視化した線虫株を作製した。細胞内における核の位置を測るため、作製した株を麻酔して共焦点顕微鏡で三次元タイムラプス撮影を行い、多核化した腸細胞における核の配置を観察した。

核配置に必要な分子群を特定するため、これまで核配置に関わることが報告されていた分子群の抑制実験を行い、核配置を乱す効果のあるものを選別した。

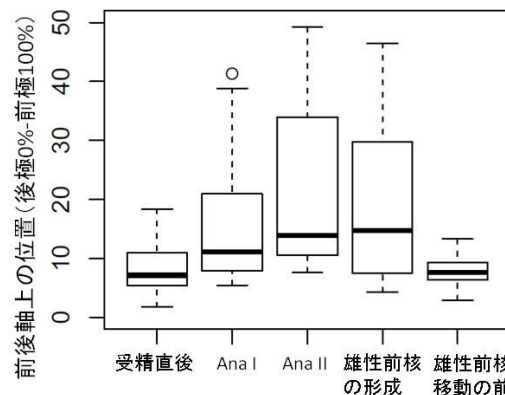
選別した分子群の GFP 融合タンパク質が腸細胞で発現する株を樹立し、細胞内局在を調べた。さらに関連する細胞骨格の配向性を調べ、核配置の足場が形成されているかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) 線虫 *C. elegans* の受精卵内における精子核の動態に関する解析を行い、以下の成果を得た。

受精の際、卵母細胞へ侵入した精子核は、侵入点から徐々に細胞内部へと移動した後、再び元の位置へと戻ってくる傾向を示した(図1)。受精直後に起こる微小管とキネシン(unc-116)に依存した第一の細胞質流動を阻害すると、最初の内部移動は見られなくなった(図2)。さらに、流れの方向と精子核の移動方向は同じであることを確認した。

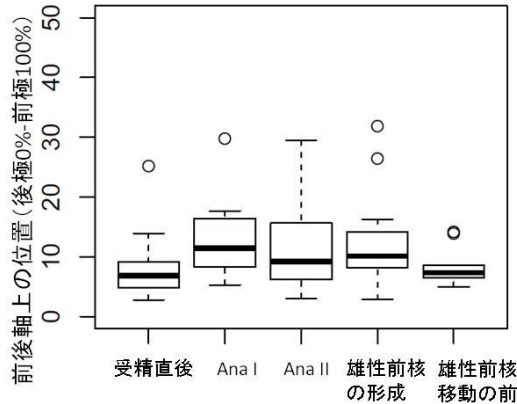
図1 受精卵における精子核の位置変化 (受精から雄性前核移動の前まで)



このことから、卵に侵入した精子核は受精直後の微小管とキネシンに依存した細胞質流動によって細胞内部へと流されることがわ

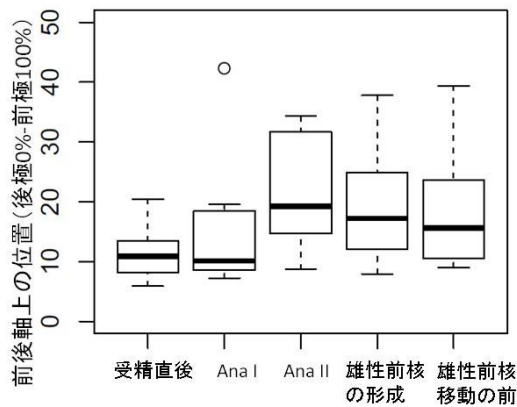
かった。

図2 第一の細胞質流動を抑制したときの受精卵における精子核の位置変化



通常、卵内部へ移動した精子核は元の位置（卵の長軸極の片側：将来の後極）へ戻ってくる。ところが、アクチンとミオシンに依存した第二の細胞質流動を抑制したところ、精子核は卵の極へ戻れなくなった（図3）。さらに、流れの方向と精子核の移動方向が同じであることを確認した。このことから、第一の細胞質流動で卵内部へ移動した精子核は、第二の細胞質流動によって卵細胞の極へと移動することがわかった。

図3 第二の細胞質流動を抑制したときの受精卵における精子核の位置変化



卵内における核移動と細胞質流動との関係性をさらに検証するため、流動パターンを変化させたときの核配置への影響を調べることを試みた。関連分子の抑制や変異体の樹立により、第一の細胞質流動の速度を増加あるいは低下させることに成功した。現在はそれらの変化による流動パターンと核配置の影響を解析している。

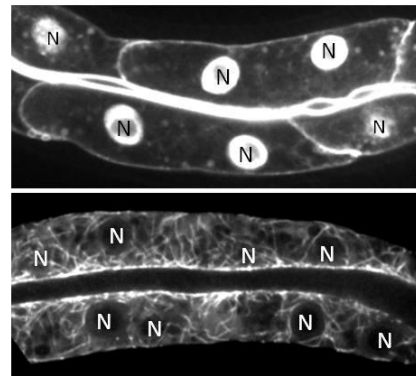
以上の結果から、線虫の受精直後の卵内において、精子核が細胞質流動を利用して配置を変化させるという新事実が明らかになった。これは以前に提案されていた核配置機構(K. Kimura & A. Kimura, PNAS 2011)とは異なる、新たなメカニズムである。これまで精子核の侵入点が将来の極性決定に重要なことはわかっていたが、殆どの精子核が楕円形

の卵の長軸極の片側へ配置する機構は不明であった。今回の成果は、それに答える極めて重要な発見である。

(2) 線虫 *C. elegans* の腸細胞における核配置に関する解析を行い、以下の成果を得た。

腸細胞における核配置を調べるため、腸の核と細胞膜を GFP で可視化した株を用意し、多核化する時期 (L1-L2 幼虫期) の細胞内における核の配置データを得た (図4)。核分裂直後、細胞中央付近で生じた二つの核は次第に離れ、それぞれ細胞を等分したときのほぼ中央付近に配置することを発見した。

図4 多核化した腸細胞における核(画像上)と微小管(画像下)



核配置に関わる分子としてキネシン (unc-116) に注目し、その機能欠変異体を樹立して核配置を調べると、核がやや中央から外れ細胞膜に近く配置する傾向にあるなどの変化が認められた。キネシンは微小管上を移動するモーター分子であるため、腸細胞の微小管を GFP で可視化したところ (図4)、微小管は細胞膜から内部方向へと伸長する傾向にあることがわかった。さらに、キネシン自体を GFP で可視化する株を樹立したところ、キネシンは核膜に僅かに強く局在していた。以上から、多核化した腸細胞における核配置には微小管を利用したキネシン依存的な輸送が寄与することが示唆された。

以上の未発表データは、以前に提案した核配置機構 (Kimura & Kimura, PNAS 2011) とは全く別の新規メカニズムが多核化した腸細胞で作用している可能性を示唆している。これまで多核化した細胞における核の配置機構はほとんど不明であったが、今回の成果はその理解を進める重要なデータである。

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)

木村健二、「The emergence of cytoplasmic streaming through a positive feedback loop between organelle transport and the alignment of microtubules in the C. elegans zygote」, Japan Q-Bio week Mishima symposium、2016年1月12日、国立遺伝学研究所（静岡県・三島市）

木村健二、「The emergence of cytoplasmic streaming through a positive feedback loop between organelle transport and the alignment of microtubules in the C. elegans zygote」, Japan Q-Bio week Tokyo symposium、2016年1月9日-2016年1月10日、東京大学生産技術研究所（東京都・目黒区）

木村健二、「Positive feedback regulation between collective flow generation and the alignment of microtubules that drives meiotic cytoplasmic streaming in C. elegans」, 第67回日本細胞生物学会大会、2015年6月2日、タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

木村健二、「Quantitative analysis of microtubule orientation and organelle movements during meiotic cytoplasmic streaming in C. elegans early embryos」, C. elegans Development, Cell Biology and Gene Expression meeting association with The 6th Asia-Pacific C. elegans meeting、2014年7月15日、奈良県新公会堂（奈良県・奈良市）

木村健二、「細胞質流動メカニズムの共通性と独自性～線虫 C. elegans における細胞質流動の解析～」, 第66回日本細胞生物学会大会、2014年6月13日、奈良県新公会堂（奈良県・奈良市）

〔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：
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

木村 健二 (KIMURA, Kenji)
国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教
研究者番号：40644505

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：