

収縮環の収縮メカニズムの可視化

武井 優芽 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞の分裂は、生体の維持に必須の生命現象である。この過程は、染色体の分離と、それに続く細胞質分裂からなる。細胞質分裂では、収縮環が細胞の赤道面に形成され、収縮環の径が小さくなるのに伴い分裂溝が入り、最終的に二つの娘細胞に分かれる。収縮環は、主に繊維状アクチンと、ミオシンから構成されるが、その超微細構造を詳細に捉えた観察例はない。さらに、細胞質分裂はアクトミオシンの収縮活性により進むと考えられているが、それらの動的構造変化は不明である。その理由は、電子顕微鏡レベルでの収縮環の微細構造や構造変化の過程は、培養細胞を含めてほとんどの生物で観察が難しかったからである。最近、上条と加藤らは超解像顕微鏡を用いて、培養細胞の収縮環におけるアクチンと、ミオシンの微細構造をナノメートル精度で観察し、新たな収縮環の形成機構モデルを構築した。(上条と加藤ら、投稿中)

収縮環には、主に非筋タイプミオシン II が存在する。このミオシンの調節軽鎖 (MRLC) の Ser19 が、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) によりリン酸化される (1pMRLC) と、ミオシン重鎖 (MHC) が集合して、Bipolar filament となる。この Bipolar filament が、アクチンと共に収縮環を形成する。

この 1pMRLC の、Thr18 がさらに AuroraB キナーゼによりリン酸化されると、二重リン酸化状態になる (2pMRLC)。この 2pMRLC は、1pMRLC と細胞内分布が異なる (細谷ら、2013)。即ち、2pMRLC は収縮環表層だけでなく、収縮環のミッドゾーンにも局在する。2pMRLC と紡錘体の微小管との関係が想起されるが、報告がなく、高分解能での観察もされていない。

本研究は、超解像顕微鏡を用いて、数十 nm の分解能での収縮環の可視化解析を目指した。まず、その準備段階として、試料の作製と観察技法を習得しつつ、未だ役割が不明瞭な 2pMRLC と紡錘体微小管の関係について、共焦点顕微鏡あるいは、疑似超解像顕微鏡で可視化解析を行った。

また、収縮環の形成メカニズムを調べるため、*in vitro* の実験系の構築を目標として、タンパク質精製を進めた。

【方法】

1) 固定標本の作成と顕微鏡観察

カバーガラス上に培養したブタの腎上皮由来の LLC-PK1 細胞を、4% パラホルムアルデヒドで固定し、ブロッキング処理後、間接蛍光抗体法に供した。1pMRLC の抗体は上条教授 (東北医科薬科大) より、2pMRLC の抗体は細谷教授 (広島大) より提供を受けた。微小管は市販のチューブリン抗体、アクチン繊維は蛍光ファロイジン、核は DAPI を用いて染色した。処理した細胞を、スライドガラスにマウントして、観察用標本とした。観察には、共焦点顕微鏡 (Nikon A1) を用いた。3 次元立体的な配置を明確にするために、100-300 nm のステップで、xy 平面の z-stack 画像を連続的に取得した。さらにデコンボリューション処理により分解能を 150 nm 程度に高め (疑似超解像)、3 次元構築を行った。

できあがった立体像を、任意の断面で切り出し、各タンパク質の 3 次元配置を検討した。

2) タンパク質の精製

収縮環形成の *in vitro* モデルを構築するため、アクチン、アクチン核化・重合促進因子 mDia1、アクチン調節タンパク質 profilin1 を精製した。アクチンは、ニワトリ骨格筋のアセトンパウダーから抽出・精製した。mDia1 は大腸菌に GST 融合型タンパク質を発現し、その抽出液をグルタチオンセファロースとインキュベートし、目的のタンパク質を精製した。同様に、大腸菌に 6×His 融合型 profilin1 を発現し、その抽出液を Ni-NTA レジンとインキュベートし、目的のタンパク質を精製した。以上の精製物は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で確認した。

【結果・考察】

1) 2pMRLC の観察について

2pMRLC の局在を共焦点顕微鏡で確認した結果、収縮環のアクチンが存在する領域、収縮環よりも内側のアクチンの存在しない領域 (ミッドゾーン)、及び星状体近傍の蛍光強度の大きいスポットに検出され、さらにごくわずかに細胞質に分布していた。これらの局在は、細谷らの共焦点顕微鏡観察と一致した。

さらに、収縮環領域の 2pMRLC の分布を、疑似超解像 (分解能: 150 nm) で記録し、2pMRLC とアクチン、及び微小管の関係を 3 次元の画像で検討した。その結果、2pMRLC は、アクチンとは全体の 30.01% ± 3.02% (n=13) が共局在し、微小管とは全体の 23.68% ± 3.22% (n=11) が共局在することがわかった。一方、1pMRLC は、アクチンと共局在し、微小管との共局在は見られなかった。以上の結果は、1pMRLC は二重リン酸化の制御を受け、アクチン系と微小管系を行き来すると考えれば説明がつく。

MRLC 自体は、アクチンや微小管との結合部位を持たない。即ち、アクチンと共局在する時は MHC と複合体を作り、微小管と共局在する時は、別のタンパク質を介在すると思われる。これまでに報告がある AuroraB キナーゼやセントラルスピンドリンの分布 (三嶋、2006) が、今回観察した 2pMRLC の分布とよく似ており、これらが 2pMRLC と複合体を作る可能性がある。今後、さらに超解像顕微鏡 (SIM、及び STED) の観察を重ね、細胞質分裂におけるミオシンの役割を詳細に解明したい。

2) タンパク質の精製について

上条と加藤らが提唱した新たな収縮環の形成メカニズムを検討するため、本研究で精製したタンパク質を用いて、今後、次のように *in vitro* の実験系構築を目指す。第一段階として、mDia1 からアクチン繊維を放射状に伸長する。次に、そのアクチン繊維上をミオシンが滑ることを確認する。第二段階では、マイクロパターンニングにより、ガラス上のアクチン繊維が環状に並ぶように、mDia1 の配置や量の条件、そして収縮環モデルが収縮するミオシンの活性条件や濃度を検討する。