

分裂酵母のアクチン細胞骨格に関する微細構造学的解析 Ultrastructural Analysis of the Actin Cytoskeleton in Fission Yeast

釜崎とも子^a, 高木 智子^{b, c}, 馬淵 一誠^c, 大隅 正子^{d, e}

Tomoko Kamasaki, Tomoko Takagi, Issei Mabuchi and Masako Osumi

^a名古屋大学高等研究院・日本学術振興会特別研究員PD

^b日本女子大学理学部物質生物科学科・日本女子大学バイオイメージングセンター

^c学習院大学理学部化学科生命分子科学研究所

^d認定特定非営利活動法人総合画像研究支援

^e日本女子大学名誉教授

要 旨 アクチン細胞骨格は、細胞の極性成長や細胞質分裂などの生命活動の基盤として重要である。分裂酵母は、アクチン細胞骨格の形成機構や役割を研究するための優れたモデル系である。分裂酵母のアクチン細胞骨格は、主に蛍光顕微鏡によって解析されており、パッチ、ケーブル、リングの3種の構造として観察されるが、その微細構造はほとんど可視化されていなかった。最近、我々は加圧凍結固定法および免疫電子顕微鏡法によって、3種のF-アクチン構造の微細形態を明らかにした。さらに、分裂酵母細胞のアクチン細胞骨格を構成するF-アクチンの方向性を初めて明らかにした。これらの解析から、アクチン細胞骨格に関する基本的な情報や、アクチン細胞骨格の機能を解明するための一助となる知見が得られた。

キーワード：アクチン細胞骨格, 加圧凍結固定法, ミオシン S1 修飾, 分裂酵母, 電子顕微鏡

1. アクチン繊維の性質

アクチン細胞骨格は、細胞の生命活動における様々な運動の基盤として重要である。筋収縮、細胞運動、細胞質分裂などの運動は、アクチンフィラメント (F-アクチン) によって構築された構造の上をモータータンパク質のミオシンが滑走することによって起こる。アクチンの細胞内動態は、多数のアクチン結合タンパク質によって調節され^{1,2)}、さらにアクチン結合タンパク質は、上流のシグナルによって制御されている。F-アクチンはG-アクチンが重合した、太さ6~7nmの二重らせん状の繊維である³⁾。F-アクチンとミオシンS1を混合すると、S1がF-アクチン中のG-アクチンと規則的に結合し、F-アクチンの極性を反映した、一方向性の“やじり構造”を形成する⁴⁾ (図1A)。この時、やじりの先端方向を“やじり端”あるいはマイナス端といい、その反対の端を“反やじり端”、あるいはプラス端という。F-アクチンのプラス端では、マイナス端よりも速く重合が行われる。

非筋細胞のアクチン細胞骨格は、細胞周期や外界からの刺激に応じて、形成もしくは消失する、非常に動的な構造であり、その機能はF-アクチンの方向性と深く関係がある。動物細胞を用いた研究では、細胞内のF-アクチンをミオシン

S1やヘビーメロミオシンで修飾することにより、アクチン細胞骨格を構成するF-アクチンの方向性が可視化されてきた⁵⁾。例えば、微絨毛や精子の先体に見られる束状のF-アクチンは、全て同じ方向性を示し^{6,7)}、繊維束自体は収縮能を持たない。一方、収縮環を構成するF-アクチンは、繊維のプラス端側で分裂溝の細胞膜と結合し、収縮環には互いに逆の方向性を示す、2種類のF-アクチンが存在する^{8,9)}。これによって、収縮環のF-アクチンは、ミオシンと共に収縮すると考えられている。

2. 分裂酵母の細胞周期におけるアクチン細胞骨格の挙動

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、長さが8~14 μm、太さが3~4 μmの円筒形の単細胞真核生物であり、細胞の極性や細胞分裂を研究するためのモデル生物である。分裂酵母のアクチン細胞骨格は、主に蛍光顕微鏡によって解析されており^{10~13)}、細胞周期を通じて、パッチ、ケーブル、リングの3種類のF-アクチン構造として観察される (図2)。間期において、F-アクチンパッチはold endに位置し、単極で伸長成長する¹⁰⁾。New end take-off¹⁴⁾と呼ばれる時期を境にして、パッチは細胞の両端に分布するようになり、両極で伸長成長する。また、細胞の長軸方向には、F-アクチンケーブルが走行する^{10,15)}。パッチとケーブルは、小胞の分泌や細胞壁形成に関与すると考えられている^{11,16,17)}。分裂期においては、細胞中央の分裂位置に、動物細胞の収縮環に相当するF-アクチンリングが形成される¹³⁾。そして、リングの収縮に

^a 〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町
TEL & FAX: 052-788-6174
2009年5月11日受付

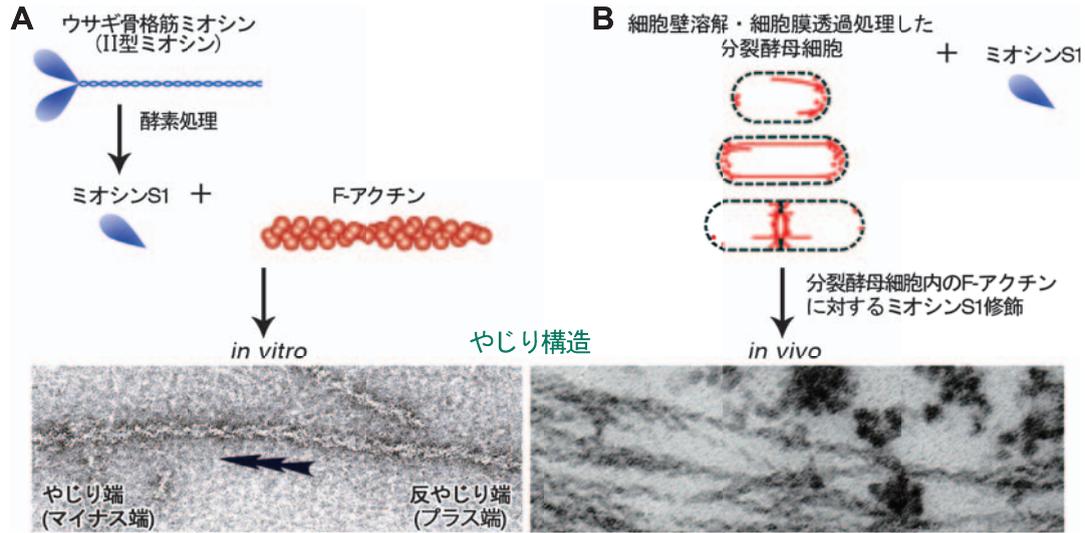


図1 *in vitro*, *in vivo* における F-アクトンのミオシン S1 修飾.

(A) *in vitro* における F-アクトンのミオシン S1 修飾. ウサギ骨格筋ミオシン (II型ミオシン) を酵素処理することによって, ミオシン S1 が得られる. ミオシン S1 と F-アクトンを混合すると, F-アクトンに沿って “やじり構造” が観察される. (B) 分裂酵母細胞内のアクトン細胞骨格に対するミオシン S1 修飾法. 透過性にした細胞とミオシン S1 を混合すると, アクトン細胞骨格を構成する F-アクトンに “やじり構造” が形成される.

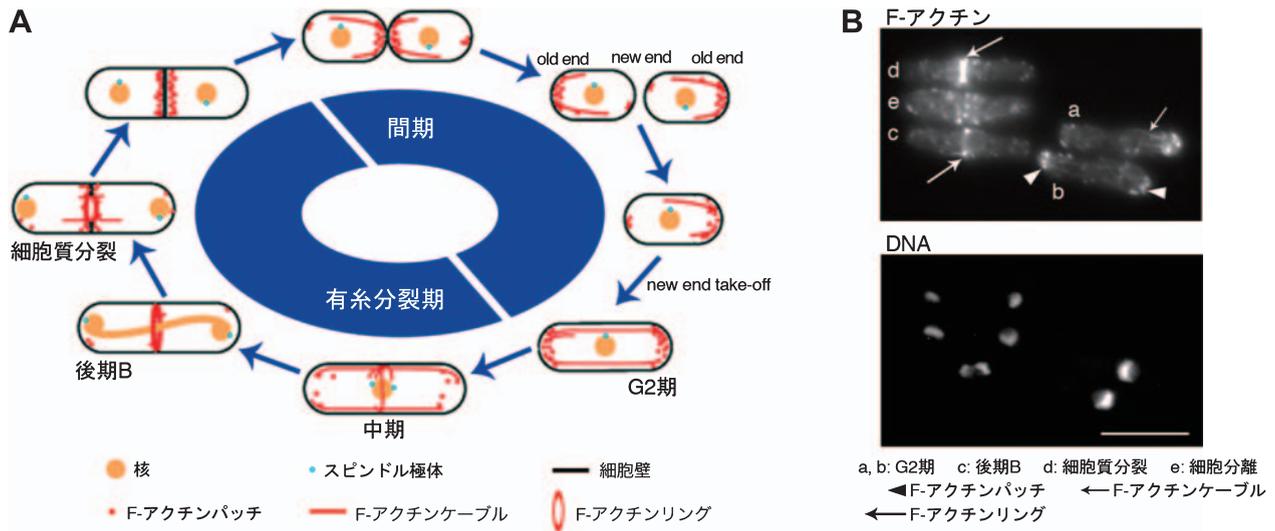


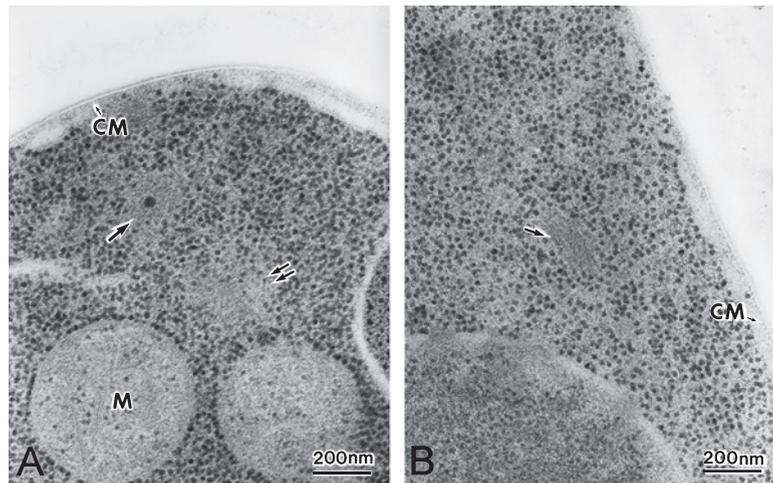
図2 分裂酵母の細胞周期に伴うアクトン細胞骨格の挙動^{10,13)} (A) と蛍光顕微鏡像 (B). ローダミン-ファロイジンによって F-アクトンを, DAPI によって DNA を染色した. Bar, 10 μm .

に伴い, 一次隔壁が形成されることによって, 細胞質分裂する^{18,19)}.

最近まで, 動物細胞において分裂酵母のアクトン細胞骨格と類似した構造は, ケーブルとリング (収縮環) 以外に観察されていなかった. しかし, アフリカツメガエル卵の収縮環形成端において, 複数のパッチが伸長および融合することによって, ケーブルが形成される様子が観察された²⁰⁾. このような構造変化は, アクトン細胞骨格の形成過程を議論する上で興味深いことから, 注目を集めている. 動物細胞のケーブル構造としては, ストレスファイバー, 糸状仮足の F-アクトン, 微絨毛の芯, 先体糸などがある. これらの構造は, 分

裂酵母のケーブルと類似しているが, F-アクトンの方向性, 構成成分さらに機能も異なるため, 一括して議論することはできない.

これまで, 3 種類の F-アクトン構造に関する分子遺伝学的解析や, 光学顕微鏡観察が進められてきた. しかし, 動物細胞に比べて, 小さく, 細胞壁を持つ分裂酵母は, アクトン細胞骨格の電子顕微鏡観察が特に難しいため, その微細構造はほとんど明らかにされていなかった. 最近, われわれは加圧凍結置換固定法を用いた透過電子顕微鏡 (TEM) による解析から, 分裂酵母細胞のアクトン細胞骨格である, パッチ, ケーブル, リングの微細構造を同定した (高木, 投稿準備中).



← フィラソーム ⇐ 不定形な繊維状構造体 ← 短い繊維束

図3 加圧凍結固定法による分裂酵母のアクチンパッチのTEM像。(A) フィラソーム (←) と、リボソームが排除された領域に見られる、不定形な繊維状構造体 (⇐)。(B) 長さ0.2～0.3 μmの短い繊維束 (←)。CM, 細胞膜。M, ミトコンドリア。

また世界に先駆けて、分裂酵母細胞内におけるF-アクチンのミオシンS1修飾法を確立し、アクチン細胞骨格を構成するF-アクチンの方向性を決定した^{21,22}。本稿では、分裂酵母のF-アクチン構造に関する基本的な情報や、アクチン細胞骨格の機能を解明するための一助となる知見を紹介する。

3. アクチンパッチの微細構造の同定

分裂酵母のF-アクチンパッチは、蛍光顕微鏡法ではドット構造として観察されるが^{10～13,15}、最近、加圧凍結置換固定した試料に免疫電子顕微鏡法(IEM)を適用することによって、パッチの微細構造は三種類に分類されることが明らかになった(図3;高木,投稿準備中)。

第一の構造は、酵母などの真菌に見られる、フィラソームである。分裂酵母のフィラソームは、microvesicleの周囲を繊維性の要素が取り囲んだ、直径0.1～0.3 μmの構造である^{15,16,23,24}。第二の構造は、リボソームが排除された領域に見られる、直径約0.3 μmの不定形な繊維状構造体である。IEMによる解析から、フィラソームの繊維性の要素および不定形な繊維状構造体は、F-アクチンパッチのマーカーである、Arp3からなることが明らかにされている。第三の構造は、細胞内部に見られる長さ0.2～0.3 μmの繊維束であり、それを構成する繊維の直径は、F-アクチンと同じく、10 nmだった。

4. F-アクチンケーブルにおけるF-アクチンの方向性の解析

分裂酵母のF-アクチンケーブルは、細胞の長軸方向に伸長する線状の構造として、蛍光顕微鏡によって観察される。その微細構造は、加圧凍結置換固定した細胞のTEMによる解析により、直径約8～10 nmの微細繊維からなる、長さ約1.2 μmの繊維束であると考えられている。

動物細胞の研究では、1960年の石川らによる報告以降、細胞内のF-アクチンをミオシンS1やヘビーメロミオシン修飾することにより、F-アクチンを同定し、かつ繊維の極性が可視化されてきた⁵。われわれは、この方法を分裂酵母細胞に応用することを試みた。まず、分裂酵母の生細胞をZymolyase100Tによって細胞壁を溶解した後、ファロイジンを添加したTritonX-100で細胞膜を透過処理した。さらに、透過性にした細胞とミオシンS1を混合し、細胞内のF-アクチンをS1修飾した(図1B)。これら一連の処理条件を検討することによって、分裂酵母のアクチン細胞骨格を構成するF-アクチンの“やじり構造”が、初めてTEMによって観察できるようになった^{21,22}。

ミオシンS1で修飾した分裂酵母細胞内のF-アクチンの観察には、野生株と細胞周期を同調した、*cdc25*温度感受性変異株²⁵を用いた。*Cdc25*はM期への進行に必要なCdc2キナーゼを活性化するフォスファターゼであり、この変異によるアクチン細胞骨格の異常は報告されていない。野生型細胞および*cdc25*細胞の長軸方向に“やじり構造”を呈したF-アクチンからなるケーブルが見られた(図4A, B)²¹。G2期もしくはM期に同調した*cdc25*細胞の、ケーブルを構成するF-アクチンの方向性を調べると、それぞれのケーブル中のF-アクチンの方向性は大体揃っているように見られた(図4C, D)²¹。そこで、G2期およびM期のケーブルを撮影した50枚の電顕像をそれぞれ用意し、それらを構成するF-アクチンの方向性を決定した。すると、G2期ではケーブルを構成する81±19%、M期では26±21%のF-アクチンが、細胞端に対してプラス端を向けていた²¹。すなわち、G2期からM期へ移行する間に、ケーブルの方向性は逆転することが判明した。この結果から、ケーブルは細胞周期に伴う極性成長部位に、必要な物質を輸送するためのレールとして機能すると考えられた(図5)。

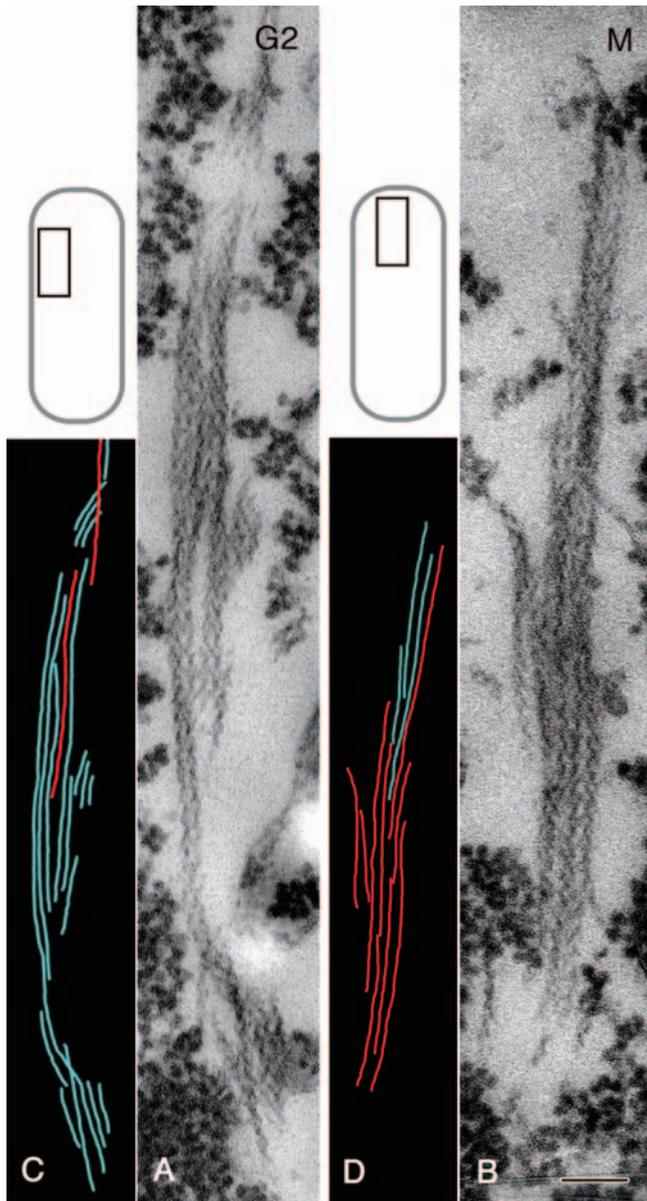


図 4

5. F-アクチンリングにおけるF-アクチンの方向性の三次元的解析

分裂酵母のF-アクチンリングの微細構造は、分裂溝に存在するF-アクチンの束であり^{15,16}、IEMによる解析から、リングの構成成分であるトロポミオシンの局在も観察されている¹⁵。S1修飾した*cdc25*細胞の赤道面を観察すると、緩い束状のF-アクチンが細胞膜に沿って走行し、細胞質を囲んでいた(図6)²²。厚さ55nmの超薄切片を作製した場合、このような繊維束は、赤道面周囲の14~33枚の連続切片にわたって認められたことから、F-アクチンリングであると判断した。次に、F-アクチンリングの連続切片を6組作製し、収縮環の全構造を解析した。リングを構成する全てのF-アクチンの本数は、1,100~2,100本だった²²。6例の収縮環を構成する全てのF-アクチンの方向性を決定したところ、互いに逆方向の繊維の本数比は、おおよそ1対1だった²²。リングから無作為に選んだ100本のF-アクチンの平均長は、後期Bでは $0.59 \pm 0.16 \mu\text{m}$ 、細胞質分裂期では $0.45 \pm 0.12 \mu\text{m}$ であった²²。この解析から、リングを構成するF-アクチンの長さは、収縮環の収縮に伴って短くなると推察された。こ

図4(左) F-アクチンケーブルの微細構造とF-アクチンの方向性。(A, B)G2期およびM期に同調した*cdc25*変異株における、S1修飾したF-アクチンケーブルのTEM像。観察部位は各図の左上に示した。CM, 細胞膜。Bar, 0.1 μm 。(C, D)ケーブルを構成するF-アクチンの方向性をトレースした像。F-アクチンケーブルに最も近い細胞端に対してプラス端に向けたF-アクチンを青色で、一方、細胞端に対してマイナス端に向けたF-アクチンを赤色で示した。

図5(下) F-アクチンケーブルにおけるアクチン重合とケーブルの機能。間期においては細胞成長端側で、分裂期においては細胞中央部で、ケーブルを構成するF-アクチンが重合することによって、ケーブルは伸長する。その結果として、細胞の極性成長や細胞質分裂に必要な物質を輸送できるようになると考えられる。

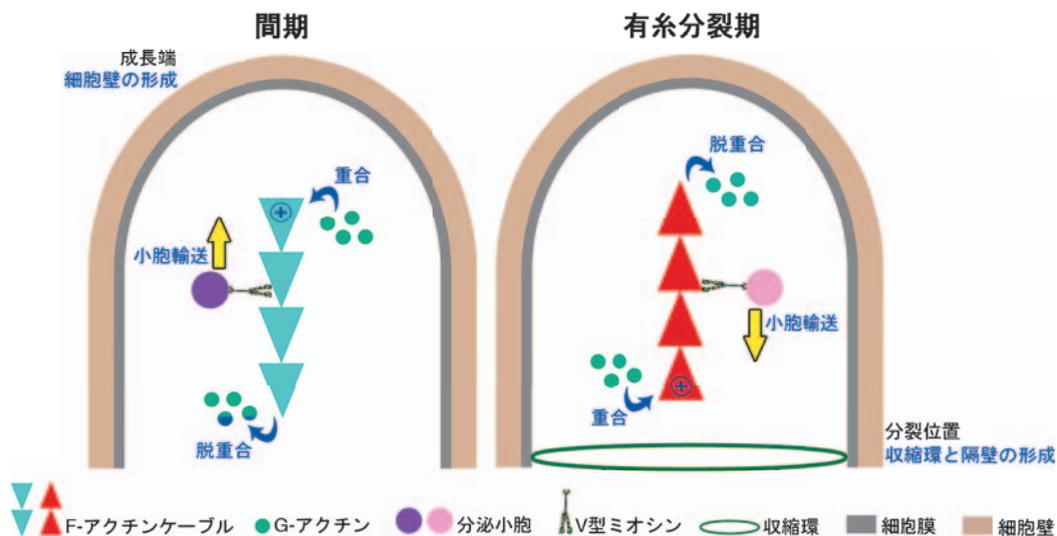


図 5

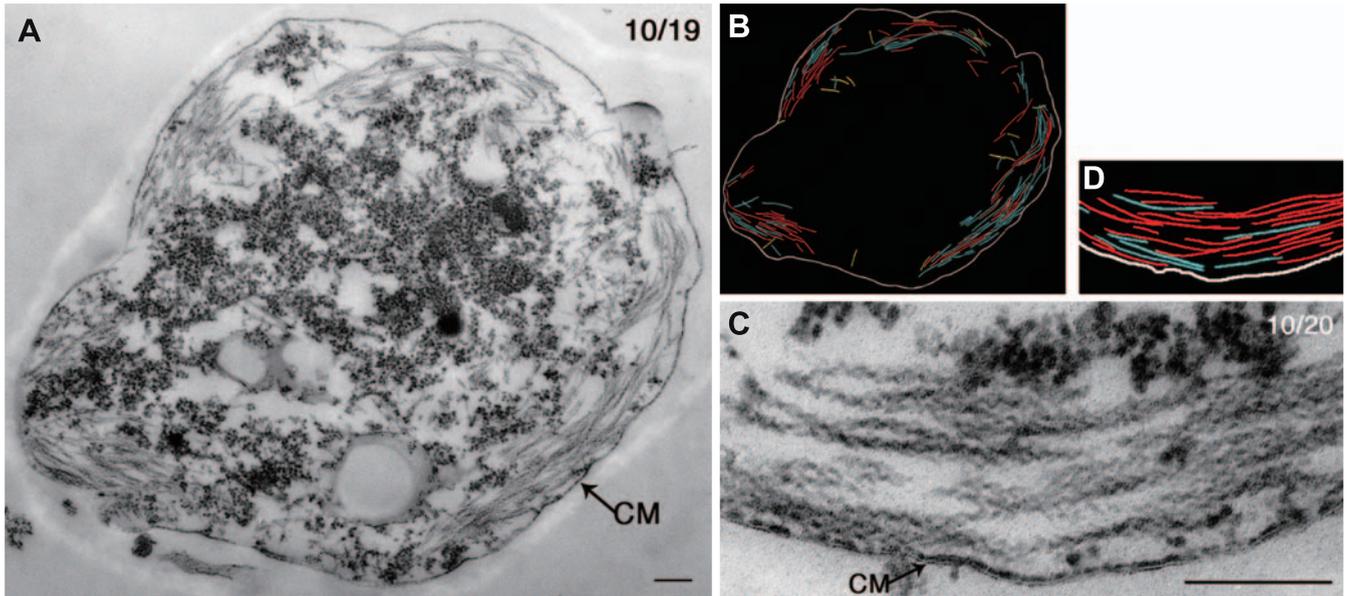


図6 分裂期に同調した *cdc25* 変異株の赤道面におけるS1修飾した収縮環の微細構造。(A) 後期B後半の収縮環における切片 #10 の電顕像 (全切片数 = 19)。矢印, 収縮環のF-アクチン。CM, 細胞膜。Bar, 0.2 μm 。(B) Aで見られたF-アクチンのトレース像。マイナス端を時計回りに向けたF-アクチンを赤色で, その逆方向性のF-アクチンは青色で示した。それ以外, もしくは未知の方向性の繊維は黄色で示した。白い線, 細胞膜。(C) 後期B前半の収縮環における切片 #10 の拡大像 (全切片数 = 20)。Bar, 0.2 μm 。(D) Cで見られたF-アクチンのトレース像。

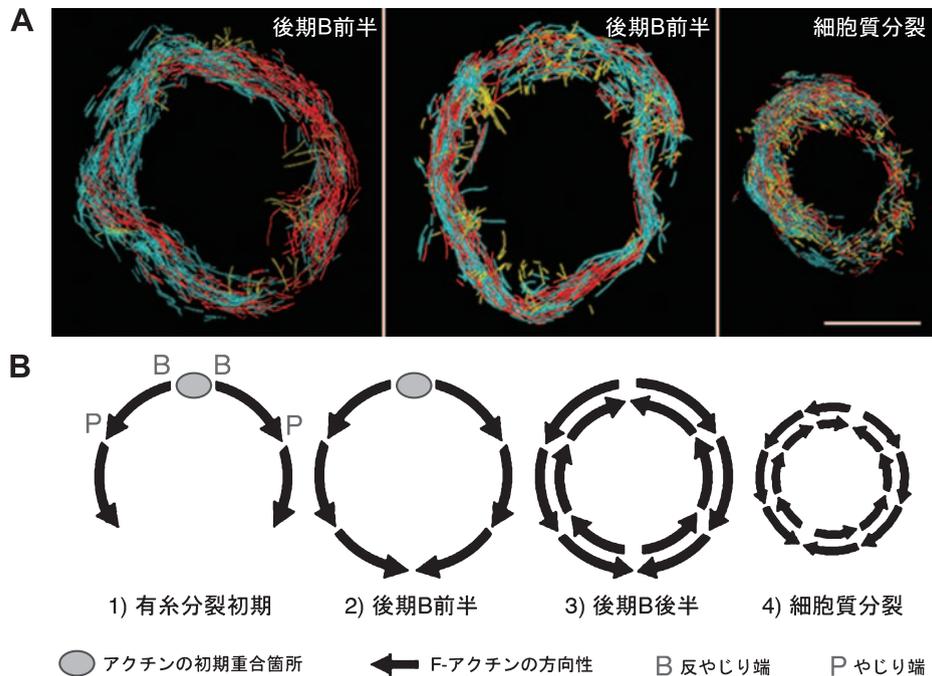


図7 収縮環を構成するF-アクチン方向性。(A) 後期B前半, 後期B後半, 細胞質分裂期の収縮環におけるF-アクチンの三次元再構築像。Bar, 1 μm 。(B) 収縮環の形成と収縮過程の想定図。(Kamasaki et al., 2007²²⁾より, 一部改変して転載)

のような収縮環のF-アクチンに関する基本的な情報は, 動物細胞も含めて, われわれの研究によって初めて明らかになった。さらに, われわれは収縮環を構成するほぼ全てのF-アクチンの方向性を決定し, リングの三次元再構築を行った(図7A)²²⁾。後期B前半では, 同じ方向性のF-アクチンが,

リングの半分ずつを占めており, 互いに逆の方向性である2本の半円形の繊維束によって, リングが構成されているようであった。一方, 後期B後半以降のリングでは, 互いに逆方向性のF-アクチンが全体的に均一に混在していた。これらの結果から, リング形成の初期には細胞中央部の表層の

1 箇所からアクチン重合が起こり、繊維束が両方向に向けて伸長する可能性が示唆された (図 7B)。さらに、収縮が開始する前に、収縮環の F-アクチンが、再配列して入り混じることが推察された。

6. 微細構造学的解析における今後の課題

今後は、ミオシン S1 修飾法と免疫電子顕微鏡法を併用した手法の確立を目指し、その手法を用いて、分子レベルでのアクチン細胞骨格の形成・再編成機構の解明に迫りたいと考えている。さらに、細胞内におけるミオシンフィラメントの微細構造を可視化することにより、細胞の極性成長および細胞質分裂におけるアクチン細胞骨格の機能をさらに追究することを計画している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室 荒井律子博士に有益なご助言を賜った。RATOC システムエンジニアリング株式会社 南郷脩史社長、日本女子大学 松影昭夫元教授、昭和大学 故佐々木崇寿教授には、多くの便宜を図って頂いた。それらの方々に対して、心からの感謝の意を表する。

文 献

- 1) Pollard, T.D. and Cooper, J.A.: *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 987–1035 (1986)
- 2) 馬淵一誠 : Annual Review 細胞生物学 1991 (1991)
- 3) Hanson, J. and Lowy, J.: *J. Mol. Biol.*, **6**, 46–60 (1963)
- 4) Nachmias, V.T. and Huxley, H.E.: *J. Mol. Biol.*, **50**, 83–90 (1970)
- 5) Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H.: *J. Cell Biol.*, **43**, 312–328 (1969)
- 6) Tilney, L.G., Hatano, S., Ishikawa, K. and Mooseker, M.: *J. Cell Biol.*, **59**, 109–126 (1973)
- 7) Tilney, L.G.: in Inoue, S. and Stephens, R.E. (Ed.), *Molecules and Cell Movement*, Raven Press, New York, 339–388 (1975)
- 8) Sanger, J.M. and Sanger, J.W.: *J. Cell Biol.*, **86**, 568–575 (1980)
- 9) Mabuchi, I., Tsukita, S., Tsukita, S. and Sawai, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 5966–5970 (1988)
- 10) Marks, J. and Hyams, J.S.: *Eur. J. Cell Biol.*, **39**, 27–32 (1985)
- 11) Kobori, H., Yamada, N., Taki, A. and Osumi, M.: *J. Cell Sci.*, **94**, 635–646 (1989)
- 12) Kobori, H., Toda, T., Yaguchi, H., Toya, M., Yanagida, M. and Osumi, M.: *J. Cell Sci.*, **107**, 1131–1136 (1994)
- 13) Arai, R. and Mabuchi, I.: *J. Cell Sci.*, **115**, 887–898 (2002)
- 14) Mitchison, J.M. and Nurse, P.: *J. Cell. Sci.*, **75**, 357–376 (1985)
- 15) Arai, R., Nakano, K. and Mabuchi, I.: *Eur. J. Cell Biol.*, **76**, 288–295 (1998)
- 16) Kanbe, T., Kobayashi, I. and Tanaka, K.: *J. Cell Sci.*, **94**, 647–665 (1989)
- 17) Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Perez, P. and Toda, T.: *J. Cell Biol.*, **144**, 1173–1186 (1999)
- 18) Gould, K.L. and Simanis, V.: *Genes and Dev.*, **11**, 2939–2951 (1997)
- 19) Rajagopalan, S., Wachtler, V. and Balasubramanian, M.: *Trends Genet.*, **19**, 403–408 (2003)
- 20) Noguchi, T. and Mabuchi, I.: *J. Cell. Sci.*, **114**, 401–412 (2001)
- 21) Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. and Mabuchi, I.: *Nat. Cell Biol.*, **7**, 916–917 (2005)
- 22) Kamasaki, T., Osumi, M. and Mabuchi, I.: *J. Cell Biol.*, **178**, 765–771 (2007)
- 23) Takagi, T., Ishijima, S.A., Ochi, H. and Osumi, M.: *J. Electron Microsc.*, **52**, 161–174 (2003)
- 24) Baba, M., Baba, N., Ohsumi, Y., Kanaya, K. and Osumi, M.: *J. Cell Sci.*, **94**, 207–216 (1989)
- 25) Russell, P. and Nurse, P.: *Cell*, **45**, 145–153 (1986)