

個体発生における細胞骨格の動態を制御する
遺伝子ネットワークの解明

Analysis of genetic networks that regulate cytoskeletal
dynamics in animal development

杉本 亜砂子 (Sugimoto Asako)

東北大学 大学院生命科学研究所 発生ダイナミクス分野 教授



研究の概要

本研究では線虫 *C. elegans* の胚発生をモデル系として、RNAi による遺伝子機能破壊と
個体レベルのライブイメージングを統合的に用いることにより、個体発生における細胞骨格の
動態を制御する遺伝子ネットワークを明らかにすることをめざす。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：(1)線虫 (2)細胞骨格 (3)ライブイメージング (4)遺伝子 (5)発生・分化
(6)細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格の動態は、分子レベル（蛋白質分子の重合・脱重合）、細胞レベル（細胞骨格繊維の集合体の構築）、個体レベル（細胞集団における協調的なふるまい）という多段階の制御を受けている。これまでの細胞骨格動態の研究は試験管内や培養細胞を用いた分子レベル・細胞レベルの研究が主流であり、個体発生における細胞骨格制御機構についてはいまだ解析が進んでいない。本研究では、個体レベルの解析に極めて適した実験系である線虫 *C. elegans* を用いて、個体発生における細胞骨格の動態を制御する遺伝子ネットワークを明らかにすることをめざす。

2. 研究の目的

本研究では線虫 *C. elegans* の胚発生をモデル系として、RNAi による遺伝子機能破壊と個体レベルのライブイメージングを統合的に用いることにより、個体発生における細胞骨格の動態を制御する遺伝子ネットワークを明らかにすることをめざす。具体的には、a) 細胞分裂軸の制御、b) 細胞極性の確立、c) 細胞形態変化、というすべての多細胞生物の発生の基盤となる3つの現象に着目する。それぞれについて (1)細胞骨格の個体レベルの経時的变化を3次元的に可視化するためのイメージング技術開発、(2)RNAi と定量的イメージング解析による、発生過程における細胞骨格動態に影響を与える遺伝子群のス

クリーニング、(3)個体発生において細胞骨格の動態を制御する遺伝子ネットワークモデルの構築と検証、を実施する。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルの細胞骨格の動態解析に必要な技術開発

- ① *C. elegans* 胚発生期における細胞骨格動態を可視化するための蛍光融合蛋白質マーカー発現株の作出
- ② 胚発生過程における細胞骨格の動態を解析するための多色4次元イメージング技術の確立
- ③ 得られた4次元画像データの定量的解析法の確立

(2) 胚発生期の細胞骨格の動態に影響を及ぼす遺伝子群の同定と機能解析

- ① 定量的4次元イメージング解析を用いた、細胞骨格の動態に影響を及ぼす遺伝子群のRNAiスクリーニング
- ② 同定した遺伝子産物の生体内における局在および分子機能解析

(3) 胚発生期における細胞骨格の動態を制御する遺伝子ネットワークモデルの構築と検証

- ① スクリーニングで同定した遺伝子群と既知の細胞骨格関連遺伝子群の相互作用解析による遺伝子ネットワークモデルの構築
- ② 分裂酵母や培養細胞を用いた、構築した

遺伝子ネットワークの普遍性の検証

4. これまでの成果

(1) 紡錘体微小管・中心体を可視化するための 蛍光融合蛋白質マーカー発現株の作出

線虫初期胚で蛍光融合蛋白質を発現させるためのベクターを開発するとともに、線虫の形質転換法を最適化し、形質転換株の作成効率を向上させた。確立した系を用いて、初期胚における紡錘体微小管・中心体の動態を可視化するための蛍光融合蛋白質マーカーを発現する線虫株を多数作製した。

(2) 初期胚における紡錘体微小管・中心体の 動態の4次元イメージング解析法の確立

*C. elegans*初期胚における紡錘体微小管および中心体の3次元空間における動態を追跡するため、中心体・微小管・核膜・細胞膜・染色体等の細胞内構造を同時に2種類あるいは3種類可視化して3次元ライブイメージング(=多色4次元イメージング)を行うシステムを構築した。

(3) 中心体動態の4次元定量的解析法の確立

上記の4次元イメージングシステムを用いて、野生型および細胞極性関連因子RNAi胚において、受精直後から第二分裂までの中心体と細胞膜の4次元イメージデータを取得し、その動態を定量的に解析した。その結果、PAR蛋白質経路に依存して、星状体微小管と細胞膜との相互作用が前極側と後極側で異なることが見いだされた。

(4) γ -チューブリンとAurora Aキナーゼがそれぞれ独立に寄与する微小管合成経路の解析

われわれは以前の研究から、線虫初期胚に γ -チューブリンとAurora Aキナーゼがそれぞれ独立に寄与する微小管合成経路が存在することを見いだしている。本研究により、Aurora Aが関与する経路は、細胞分裂期に凝縮した染色体周辺で形成される微小管合成に必須であることを見いだした。この染色体依存的微小管形成には γ -チューブリンは関与していない。この結果より、これらの二つの微小管合成経路が時空間的に協調することが紡錘体形成に重要であると推測される。

さらに、変異型Aurora Aを用いたin vivo解析により、Aurora Aのキナーゼ活性は微小管合成に必要な可能性が示唆された。また、免疫沈降と質量分析によるAurora Aおよび γ -チューブリン結合蛋白質の網羅的同定をすすめている。その結果、線虫における γ -チューブリン複合体をはじめと同定し、その構成成分を明らかにした。その他の結合蛋白質についても解析をすすめている。

5. 今後の計画

(1) 細胞膜と微小管の力学的相互作用を解析するために、細胞膜動態の可視化・イメージング技術開発を行う。

(2) 細胞極性に依存した中心体動態の制御メカニズムの解析を継続し、特に細胞膜-微小管の相互作用と細胞極性の関連について検討する。

(3) Aurora A キナーゼが関与する微小管形成経路については、関連候補因子をすでに同定しているため、これらが関わる遺伝子ネットワークの解明をすすめる。

(4) 上記テーマの進行状況を勘案しながら、細胞形態変化に関わる遺伝子ネットワークの解析にも着手する。

6. これまでの発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Sugimoto, A. (6名中5番目), The Role of Protein Phosphatase 4 (PP4) in Regulating Microtubule Severing in the *Caenorhabditis elegans* Embryo., *Genetics*, 181, 933-943 (2009),

[学会発表] (計13件)

- ① 杉本亜砂子, 細胞から個体へ: 線虫初期胚のライブイメージング解析, 奈良先端科学技術大学院シンポジウム「視る生物学4」, 2009/11/25, 奈良先端科学技術大学院大学
- ② 戸谷美夏, 杉本亜砂子, 紡錘体形成に関わる2つの微小管制御経路, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009/06/04, 名古屋国際会議場
- ③ Sugimoto, A., Assembly and positioning of mitotic spindles in early *C. elegans* embryos., 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008/12/09, 神戸ポートアイランド
- ④ M. Toya, Sugimoto, A., Coordination of two distinct pathways to form spindle microtubules in *C. elegans* embryos. 1st EMBO Conference of Centrosomes and Spindle Pole Bodies. 2008/09/14, Heidelberg, Germany.

ホームページ等

発生ゲノミクス研究チーム HP : http://www.cdb.riken.jp/dge/index/frame_j.html