

# 細胞核内アクチンフィラメントの機能と制御機構の研究

著者	山崎 祥他
号	51
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1115号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00122746">http://hdl.handle.net/10097/00122746</a>

やまざき しょうた

氏名（本籍地） 山 崎 祥 他

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1115 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）応用生命科学専攻

論 文 題 目 細胞核内アクチンフィラメントの機能と制御機構の研究

博士論文審査委員 （主査）准教授 原田 昌彦

教 授 阿部 敬悦

教 授 高橋 英樹

博士論文内容要旨

細胞核内アクチンフィラメントの  
機能と制御機構の研究

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

山崎祥他

指導教員

原田 昌彦 准教授

## 第1章 序論

細胞骨格の主要な構成タンパク質であるアクチンは、細胞内において単量体の G-アクチン(Globular-actin), あるいは G-アクチンが重合・繊維化した F-アクチン(Filamentous-actin)の形態で存在する。細胞質において、F-アクチンのバンドル化(束化)は強固な細胞骨格を形成し、細胞の形態維持や遊走などの様々な細胞機能を担っている。このような細胞内におけるアクチンの機能やダイナミクスは、アクチンに進化的・構造的に関連性を有するアクチン関連タンパク質(actin-related protein; Arp)や、アクチン結合タンパク質(actin-binding protein; ABP)によって制御されている。さらに近年では、細胞核内におけるアクチンの機能やダイナミクスも注目され始めている。

核内のアクチンの機能としては、核内 G-アクチンが Arp サブファミリーと共にクロマチンリモデリング複合体の構成タンパク質となることで、クロマチンの構造変換や修飾など幅広いゲノム制御機構に関与することが明らかになっている(Oma and Harata, 2011)。その一方で、核内における F-アクチンの意義や機能については長い間不明であった。

近年、遺伝子の初期化の際に一過的に核内アクチンフィラメントの形成が起きること、このフィラメント形成は初期化因子である Oct4 の発現誘導に重要な役割を持つことが示され(Gurdon, 1962; Miyamoto et al., 2011)、核内における F-アクチンの転写制御への関与が注目され始めている。そこで本研究では、人為的に核内アクチン重合を誘導可能なヒト培養細胞の実験系を確立することで、核内 F-アクチンの機能と制御機構について解明することを目的とした。

## 第2章 核内アクチン重合を任意に誘導可能なヒト培養細胞実験系の確立

アクチンの細胞質-核間シャトルは輸送因子である Importin9 (Ipo9) と Exportin6 (Exp6) によって制御される。アクチンのアミノ酸配列中には二か所の核外移行シグナル (Nuclear export signal; NES) が存在し (Wada et al., 1998)、そのため大部分のアクチンは細胞質に局在し、核内のアクチンも迅速に細胞質へ排出される(Dopie et al., 2012)。そこで、核移行シグナル (Nuclear localization signal; NLS) をアクチンに付加することで、核内アクチン量を増加させることを目指した。まず、NLS 付加アクチン(NLS-actin)をヒト培養細胞である HeLa に一過的に発現させ、共焦点顕微鏡による観察を行った(Fig. 1)。その結果、核内の存在するアクチン量の増加が認められ、核内でバンドルを形成した F-アクチンの GFP 蛍光も観察された。そこで次に、これらのバンドルが確かに F-アクチンのバンドルであるかを二つの実験により検証した。

まず、F-アクチンのプローブである Phalloidin に蛍光タグである Alexa594 を付加した Phalloidin プローブを用い、免疫染色を行った(Fig. 2)。1時間の抗体染色では核内バンドルへの Phalloidin の結合は認められなかったが、プローブの反応時間を 24 時間まで延長したところ、核内バンドルへの結合が観察され、NLS-actin の発現により形成されたバンドルが F-アクチン由来であることが示された。

次に、F-アクチンの切断によって脱重合を誘導する Mycalolide B 処理を行い、タイムラプス(経時)観察を行った(Fig. 3)。その結果、薬剤処理の 30 分後にはほぼ全てのバンドルの消失が観察された。これらの二つの検証から、NLS-actin の発現により核内 F-アクチンのバンドルが形成されること、また核内においてもアクチンは重合機能を保持していることが明らかになった。そこで次に、バンドルを形成せずに核内に蓄積したアクチンが全て G-アクチンとして存在しているかを解析した。

まず、Lifeact プローブによって核内アクチンの状態解析を行った。Lifeact は F-アクチンに結合するペプチドで、その結合はアクチンの重合・脱重合に影響しないことが知られている(Riedl et al., 2008)。この特性を利用し、Lifeact-mCherry 発現ベクターを NLS-actin と共発現させることで、核内アクチンへの結合が認められるか顕微鏡による観察を行った(Fig. 4)。その結果、Lifeact と核内アクチンの共局在が認められ、バンドルを形成していない細胞でも、核内アクチンの少なくとも一部は F-アクチンの状態で存在することが示された。これらの検証結果から、NLS-actin の発現によって、ヒト培養細胞で核内 F-アクチンを人為的に誘導可能な実験系を確立できたことが示された。

### 第 3 章 転写制御における核内 F-アクチンの機能解析

アフリカツメガエル卵を用いた遺伝子リプログラミング過程において、核内 F-アクチンの形成が Oct4 の発現に重要な役割を持つことが報告されている。そこで、ヒト培養細胞における核内 F-アクチン形成によって、同様に OCT4 の発現誘導が起きるかを解析した。定量 PCR による発現解析では、NLS-actin を発現した細胞において、コントロールと比較して有意な OCT4 の発現上昇が確認された (Fig.5)。そこで次に、内在性アクチンの核内局在量を増加させることによって、同様に OCT4 の発現誘導が認められるか検証を行った。アクチンの脱重合剤である Latrunculin B (LatB) は、細胞質のアクチンを脱重合させ、核内のアクチン局在量を増加させる作用が報告されている。そこで、まず Lat B の処理によって増加した核内アクチンが F-アクチンを形成するか解析を行った。その結果、Lat B の処理により核内における Lifeact プローブの蛍光が観察され、Lat B は核内アクチンの重合を促進することが示された(Fig. 6A)。また、核内 F-アクチンの形成による OCT4 の発現上昇も認められた(Fig. 6B)。これらの結果から、ヒト培養細胞でも核内 F-アクチンが OCT4 の発現を誘導することが示された。

そこで次に、核内 F-アクチンによる OCT4 の詳細な発現誘導機構の解析を行った。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルにおける主要な転写因子である  $\beta$ -catenin は、Wnt シグナルの非存在下で細胞質のアクチンフィラメントに結合し安定化される。また、Wnt シグナルの活性化により核内へ移行し、OCT4 を含むターゲット遺伝子の転写誘導を行う(Li et al., 2012)。これらの背景から、核内においても  $\beta$ -catenin は F-アクチンに結合することで安定化され、核内局在量が増加し、OCT4 を含むターゲット遺伝子を活性化する可能性を考え、その検証を行った(Fig. 7)。

まず、核内 F-actin の形成による転写への影響を網羅的に解析するため、マイクロアレイ解析を行った。変化した遺伝子のうち細胞内シグナルに関与した遺伝子に注目すると、増加した 85 遺伝子の中の 16 個が Wnt 関連遺伝子である一方で、減少した 55 の遺伝子中には 1 個しか含まれていなかった(Fig. 8)。この結果は、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化に核内 F-アクチンが寄与する可能性を示唆している。そこで次に、核内 F-アクチンが  $\beta$ -catenin の細胞内局在に与える影響を解析したところ、NLS-actin を発現した細胞では核内の  $\beta$ -catenin の増加が観察された(Fig. 9A)。次に、核内に蓄積した  $\beta$ -catenin が転写活性化に寄与しているかを解析するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、NLS-actin 発現細胞でレポーター遺伝子の有意な発現上昇が確認され(Fig. 9B)、核内に蓄積した  $\beta$ -catenin が転写活性に寄与していることが示された。これらの結果から、核内 F-アクチンが  $\beta$ -catenin を介して転写制御に関与することが示唆された。

#### 第 4 章 核内アクチンの重合制御における Arp4 の機能解析

上記の実験により、核内 F-アクチンによる転写制御への関与が示唆された。しかし、核内におけるアクチンの重合は遺伝子プログラミングの際やストレス誘導時などの際のみ観察され、通常の培養条件下では観察されない。これは、細胞質と異なるアクチンの制御機構が核内に存在し、通常は核内 F-アクチンの形成が抑制されていることを示唆している。そこで、核内アクチンの重合抑制因子を同定する目的で、本研究ではアクチンファミリータンパク質の一つである Arp4 に焦点を当て解析を行った。Arp4 はアクチンと高い相同性を持つ一方で、核内に局在しており、アクチンのように繊維化しない性質を持つ。加えて、*in vitro* の解析からは濃度依存的にアクチンの重合を阻害することが報告されている(Fenn et al., 2011)。これらの先行研究から、Arp4 が核内でアクチンの重合を阻害することで、核内 F-アクチンの機能制御に関与する可能性を考えた。その検証のため、ヒト培養細胞内の Arp4 を減少させた際に、核内でアクチン重合の誘導が起きるか解析を行った。RNA 干渉法による Arp4 のノックダウン (Arp4KD) 実験では、核内の Lifeact 蛍光の増加が観察され、Arp4KD により核内アクチンの重合化が認められた(Fig. 10)。Arp4 はクロマチンリモデリング複合体の構成タンパク質であることから、転写制御への影響、特にアクチンの細胞質-核間の輸送因子である Ipo9/Exp6 への影響の可能性も考えられたが、これら輸送因子の発現に変化は認められなかった(Fig. 11)。これらの結果から、Arp4 が核内アクチンの重合制御因子であることが示唆された。

#### 第 5 章 総合考察

近年、遺伝子の初期化の際に核内アクチンフィラメントが形成され、この繊維形成が初期化因子である Oct4 の発現誘導に重要な役割を持つことが報告されるなど、核内 F-アクチンの機能が注目され始めている。本研究では、ヒト培養細胞の核内でアクチン重合を任意に誘導可能な実験系を確立し、核内 F-アクチンの機能と制御機構を解析した。その結果、

ヒト培養細胞の核内で形成されたアクチンフィラメントが、ツメガエル卵を用いた遺伝子の初期化の際と同様に初期化因子 **OCT4** の発現を誘導することを明らかにした。この結果は脊椎動物の核内においてもアクチンは重合能を有しており、さらに核内 **F**-アクチンによる **OCT4** 発現の誘導機構が進化的に保存されていることを示唆している。

次に、ヒト培養細胞による核内 **F**-アクチンの誘導系を用いて、 **$\beta$ -catenin** に注目し核内 **F**-actin による **OCT4** 発現の誘導メカニズムの解析を行った。細胞質と同様に核内アクチンフィラメントへの  **$\beta$ -catenin** 結合が観察され、さらに核内 **F**-アクチンの形成に依存して増加した  **$\beta$ -catenin** が転写活性を誘導することを見出し、核内 **F**-アクチンが遺伝子の初期化を含む様々なエピジェネティック制御へ関与する可能性が示された(**Fig. 12A**)。

核内 **F**-アクチンやアクチンバンドルの形成は、ゲノムの核内空間配置にも影響を与える可能性がある (**Fig. 1**)。ゲノムのエピジェネティック制御においては、クロマチンの構造だけでなく、核内におけるクロマチンの空間配置が重要な役割をもつ。核内クロマチンの空間配置は核内に存在する構造タンパク質の複合体で形成された「核骨格」によって制御されると考えられている。しかし、核骨格の構成タンパク質や機能、作用機序などの詳細は不明である。本研究で示唆された核内アクチンフィラメントの形成によるクロマチンの空間配置への影響は、アクチンフィラメントが核骨格の一つとして、ゲノム空間配置に寄与している可能性を示している(**Fig. 12B**)。

本研究では、核内アクチンダイナミクスに与える低分子化合物の影響として、**Lat B** が核内アクチン量を増加し、さらに **OCT4** 発現を誘導することを示した。現在、遺伝子の初期化実験において初期化効率の向上が課題となっている。今後、**Lat B** などのアクチン結合化合物が核内 **F**-アクチン形成に与える影響をさらに解析することで、核内アクチンをターゲットにした遺伝子の初期化効率の向上や、再生医療分野への貢献も期待できると考えている。

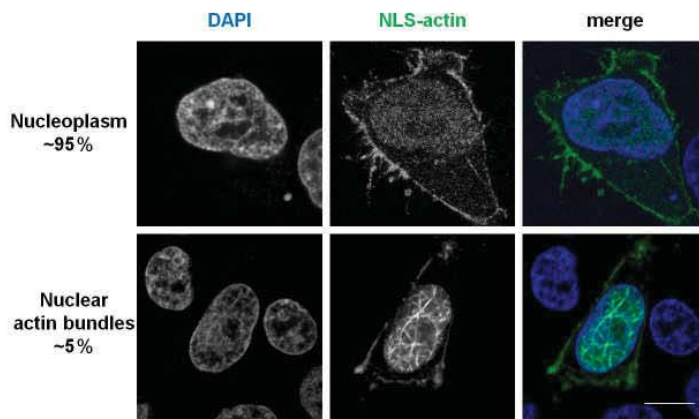


Fig. 1. Expression of EYFP-NLS-actin induces the nuclear localization of actin and the formation of nuclear F-actin. To analyze dynamics of actin in the nucleus, actin fused with a nuclear localization signal (NLS) and EYFP was ectopically expressed in HeLa cells. Cellular DNA was stained with DAPI.

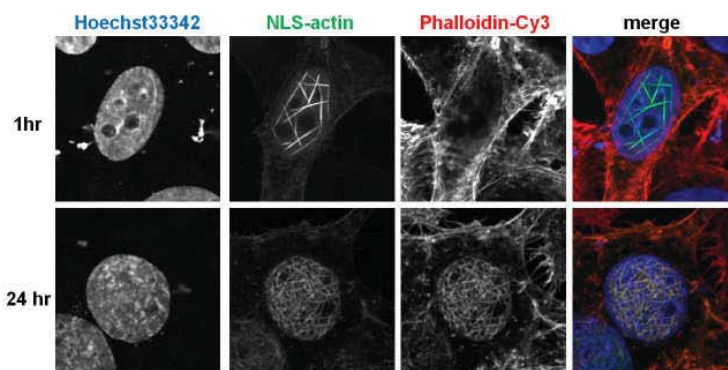


Fig. 2. Properties of nuclear EYFP-NLS-actin bundles formed in HeLa cells. Nuclear EYFP-NLS-actin bundles have low affinity to phalloidine and requires longer time (>24hr) for staining.

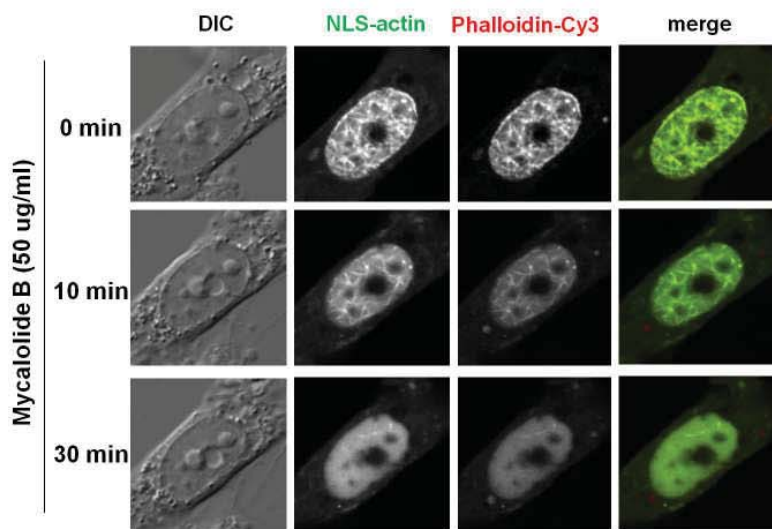


Fig. 3. Nuclear actin bundles were severed by Mycalolide B. HeLa cells expressing EYFP-NLS-actin were treated with Mycalolide B. Mycalolide B severed nuclear F-actin.



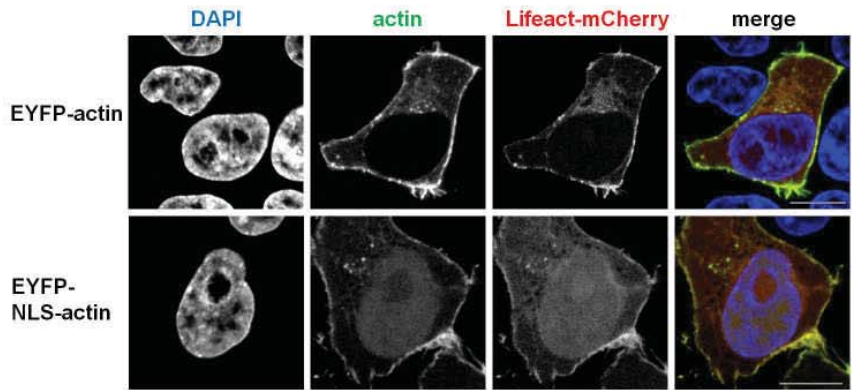


Fig. 4. Expression of EYFP-NLS-actin induces the formation of nuclear F-actin. Lifeact-mCherry was transiently expressed together with EYFP-actin (top panels) or EYFP-NLS-actin (bottom panels) in HeLa cells. Lifeact is a 17-amino-acid peptide, which binds to F-actin. Cellular DNA was stained with DAPI. Bar = 10  $\mu$ m.

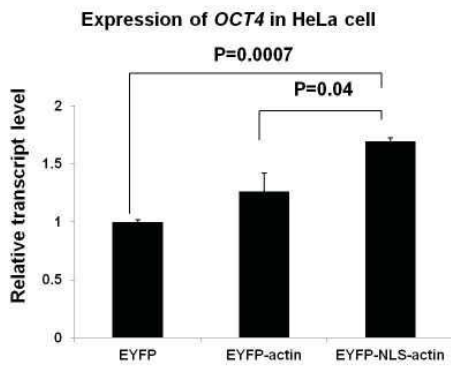


Fig. 5. Nuclear F-actin activates OCT4. OCT4 gene expression was increased in cells with nuclear actin. HeLa cells transfected with a vector coding for an indicated proteins were analyzed by qRT-PCR. Normalized values with the expression of GAPDH were shown.

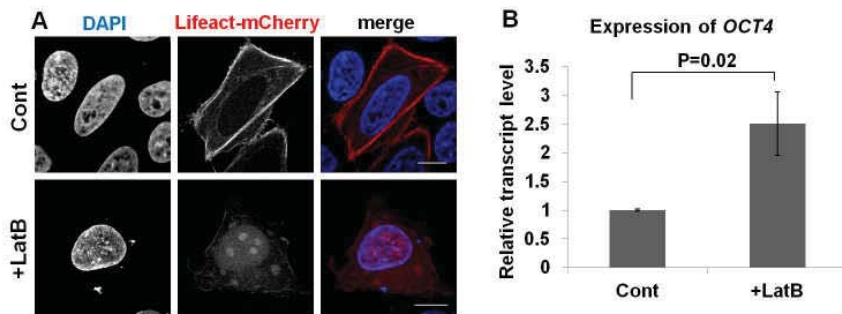


Fig. 6. LatB induces polymerization of endogenous actin in the nucleus. (A) HeLa cells expressing Lifeact-mCherry were treated with 1  $\mu$ M Lutrunculin B (LatB) and the presence of nuclear F-actin in these cells was observed under a microscope (lower panels). Control cells were not treated with LatB (Cont, upper panels). (B) The expression of OCT4 in control and LatB-treated cells were analyzed.

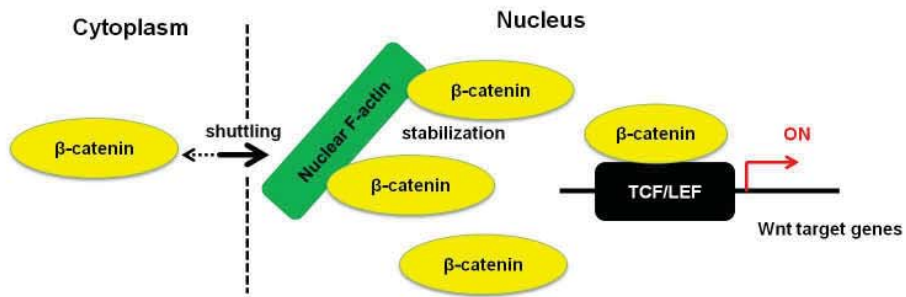


Fig. 7. A schematic model of  $\beta$ -catenin tethered by nuclear F-actin.

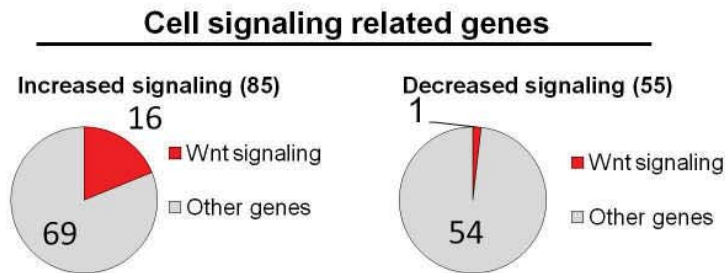


Fig. 8. Microarray analysis of HeLa cells expressing NLS-actin.

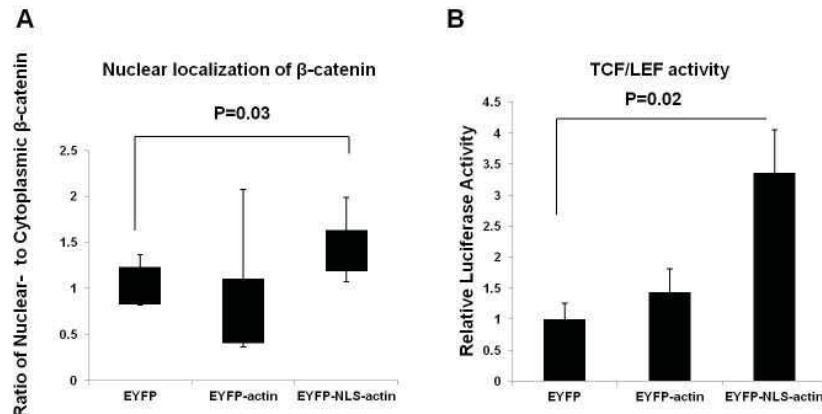


Fig. 9. Nuclear actin induced nuclear localization of  $\beta$ -catenin and activation of a Wnt/ $\beta$ -catenin target. (A) Nuclear actin induced the accumulation of nuclear  $\beta$ -catenin. (B) Nuclear accumulated  $\beta$ -catenin enhanced the activity of the TCF/LEF promoter. The p value was determined by student's *t*-test.

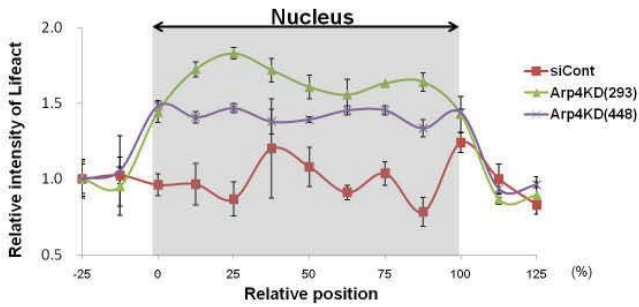


Fig. 10. Detection of F-actin in the nucleus of Arp4 KD cells. The relative distributions of Lifeact-mCherry in the nucleus and the cytoplasm were compared in control and Arp4 KD cells.

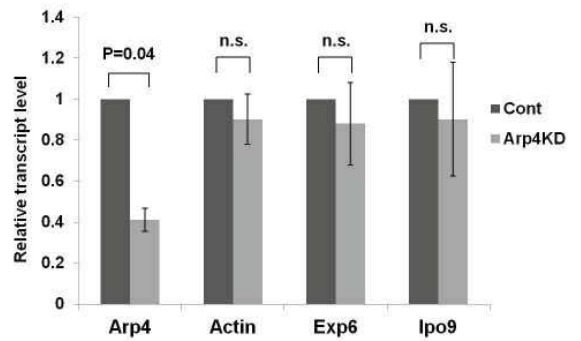


Fig. 11. Effects of Arp4 KD on the expression of actin transporters. Expressions of the indicated genes were detected by qRT-PCR. The expressions of Exp6 and Ipo9 were not affected by Arp4 KD.

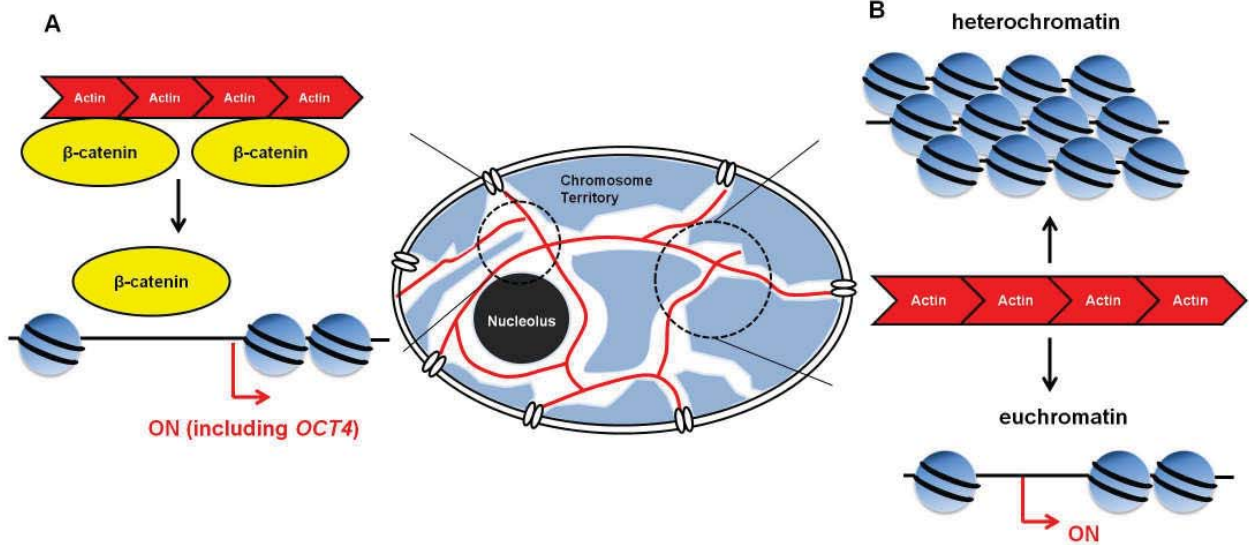


Fig. 12. A schematic model of epigenetic regulation by nuclear F-actin. (A) Nuclear actin has an ability to form filaments in the nucleus and regulates gene transcription through tethering  $\beta$ -catenin near chromatin. (B) Regulation of chromatin structure and spatial arrangement in the nucleus by nuclear F-actin.

<References>

Dopie, J., Skarp, K.P., Rajakylä, E.K., Tanhuanpää, K., Vartiainen, M.K. (2012) Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 544-552.

Fenn, S., Breitsprecher, D., Gerhold, C.B., Witte, G., Faix, J., Hopfner, K.P. (2011) Structural biochemistry of nuclear actin-related proteins 4 and 8 reveals their interaction with actin. *EMBO J.* 30, 2153-2166.

Gurdon, J.B. (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 10, 622-640.

Li, J., Li, J., Chen, B. (2012) Oct4 was a novel target of Wnt signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.*, 362, 233-40.

Miyamoto, K., Pasque, V., Jullien, J., Gurdon, J.B. (2011) Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. *Genes Dev.*, 25, 946-958.

Oma, Y., Harata, M. (2011) Actin-related proteins localized in the nucleus: from discovery to novel roles in nuclear organization. *Nucleus*, 2, 38-46

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., Wedlich-Soldner, R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Method*, 5, 605-607

Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M., Nishida, E. (1998) Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J.*, 17, 1635-1641.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	山崎 祥他
審査委員	主査：准教授 原田 昌彦 副査：教授 阿部 敬悦 教授 高橋 英樹
学位論文題目	細胞核内アクチンフィラメントの機能と制御機構の研究

### 論文審査の結果の要旨

真核生物のゲノム機能は、クロマチンの構造とその核内配置を分子基盤とするエピジェネティック制御を受けている。すなわち、ゲノムは細胞核内で、様々な機能に対応した機能構造を形成して存在している。そのような細胞核機能構造におけるエピジェネティック制御は、発生・分化や、疾病・老化に関与しているが、その分子機構については不明な点が多い。山崎は、細胞核内のアクチンに注目して、真核生物における新規なエピジェネティック制御機構の解明を試みた。これまでに、体細胞核のリプログラミングの過程で核内に形成されるアクチンフィラメントが、初期化因子 Oct4 の転写に必要であることが報告されている。山崎は、核アクチンによる遺伝子発現制御のメカニズムを解明するため、核移行シグナル(NLS)を付加したアクチンの発現によって HeLa 細胞核内にアクチンフィラメントを人為的に形成させ、解析を行った。

マイクロアレイによる網羅的な転写解析の結果、核内アクチンフィラメント

形成によって OCT4 を含む多様な転写因子の発現上昇が認められた。核内アクチンによる転写活性化のメカニズムの一つとして、細胞内の主要なシグナル伝達因子である Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の関与を考えた。転写因子  $\beta$ -catenin は細胞質のアクチン繊維に結合して安定化されることが知られている。NLS-アクチンを発現した細胞の核内では核内ではアクチンフィラメントと  $\beta$ -catenin 共局在が観察され、さらに Wnt/ $\beta$ -catenin 結合プロモーターの活性化が認められた。この結果は、核内アクチンフィラメントが転写因子  $\beta$ -catenin を核内に保持することによって、遺伝子発現に関与することを示唆している。さらに山崎は、核内でアクチンフィラメント形成を制御する因子の探索を行った。その候補因子として、核に局在しており、進化的に高く保存されているアクチン関連タンパク質の一つである Arp4 に注目した。Arp4 は、*in vitro* の実験系においてアクチン重合を阻害することが報告されている。HeLa 細胞において Arp4 をノックダウンしたところ、核内でのアクチンの重合促進や核内アクチンフィラメントが観察され、さらにこの細胞で初期化因子 OCT4 の発現誘導が観察された。

本研究は、核内のアクチンフィラメントが初期化因子 OCT4 をはじめとする転写因子の発現に重要な役割を果たすこと、また Arp4 が核内アクチンの重合の調節を介して、遺伝子発現制御に関与する機能を有することなどをはじめて明らかにしたものである。これらの発見は世界に先駆けたものであり、関連分野への波及効果も期待されるものである。このような観点から、本論文は博士課程修了に十分に値するものであると判断される。