

学 位 論 文 題 名

Studies on Subcellular Localization and Function of Nonmuscle Myosin II Isoforms

(非筋細胞ミオシン II アイソフォームの細胞内局在と機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

ミオシンはモータータンパク質の一種であり、アクチンと相互作用することでそのモーター活性を上昇させる。現在、ミオシンには 18 種類のファミリーが存在することが知られている。ミオシン I、ミオシン II に関してはその性質がよく解明されているが、その他のファミリーの機能についてはまだ不明な点が多い。

ミオシン II は、1 組の重鎖と 1 組の必須軽鎖、1 組の調節軽鎖からなる 6 量体である。ミオシン II は骨格筋細胞の構成タンパク質として同定された。その後の研究により骨格筋のみでなく平滑筋、また筋肉以外の細胞にも発現していることが解明された。

非筋細胞ミオシン II は、細胞質分裂、細胞の移動、形態変化に深く関わっていることが知られている。脊椎動物の非筋細胞ミオシン II 重鎖には少なくとも 2 種類のアイソフォーム (MHC-IIA、MHC-IIB) が存在することが知られている。MHC-IIA、MHC-IIB は 1 次構造において高い相同性を有するが、C 末端に存在する nonhelical tail region においては全く相同性を示さない。これらのアイソフォームは組織特異的な発現様式を示すことが知られている。また、細胞内におけるその機能の相違を解明するために、種々の細胞におけるこれらの局在が報告されている。細胞内局在に相違があることから 2 種類のアイソフォームは異なる機能を有することが予想されるが、統一的な見解はまだ得られていない (Chapter 1)。

著者は本研究において非筋細胞ミオシン II アイソフォームの機能の相違を解明するため、神経細胞、線維芽細胞におけるそれらの局在を解析した。

Chapter 2 において、著者はヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y、ラット小脳のブルキンエ細胞、顆粒細胞をモデルとして、神経細胞における非筋細胞ミオシン II アイソフォームの細胞内局在を示した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y はレチノイン酸によって神経細胞様へと分化する。未分化の SH-SY5Y 細胞において、ミオシン IIA、IIB はともに細胞質に瀰漫的に存在していた。しかし、ミオシン IIB は突起には局在していなかった。レチノイン酸によって分化した細胞は、双極性および多極性の形態をとった。双極性の細胞において、ミオシン IIA の発現はほとんど認められなかった。ミオシン IIB は細胞膜直下および神経突起の根元に強い局在を示した。また多極性の細胞においては、両アイソフォームの存在が確認できた。ミオシン IIA は細胞全体に瀰漫的に発現していたが、ミオシン IIB は細胞体の膜直下に非常に強い局在を示した。双極性の細胞はその形態から神経細胞の特徴を有しているが、多極性の細胞は神経細胞の特徴を失っていることから、神経細胞とは異なる性質を持った細胞に分化したと考えられる。また、アクチン結合タンパク質の一種であり、神経細胞特異的に発現する Drebrin とミオシン II アイソフォームの共局在について解析を行った。未分化の細胞においては Drebrin と両アイソフォームの共局在が観察された。双極性の形態に分化した細

胞では、神経突起の根元に近い部分の細胞膜直下においてミオシン II とドレブリンの共局在が観察された。多極性の細胞において、ミオシン IIB とドレブリンは細胞膜直下に共局在していた。ラット顆粒細胞とプルキンエ細胞には、ミオシン IIA の存在はほとんど認められなかった。顆粒細胞においてミオシン IIB は細胞体の膜直下に強い局在を示した。これは、双極性に分化した SH-SY5Y におけるミオシン IIB の局在に類似していた。プルキンエ細胞において、ミオシン IIB は細胞体の一部と樹状突起の一部に強く局在していた。これらのことから、また、ミオシン IIB のモーター活性はミオシン IIA よりも低いことを考慮すると、ミオシン IIB は細胞の運動性にはあまり関与せず、細胞膜構造の安定性および、シナプス可塑性といった現象に関わっていると予想される。

Chapter 3 では、ヒト線維芽細胞 MRC-5 を用いて移動している細胞、静止している細胞におけるミオシン II アイソフォームの局在を示した。また、ミオシン II の Mg^{2+} -ATPase 活性は、調節軽鎖の 19 番目のセリン残基がリン酸化（一重リン酸化）されると上昇することが知られている。また、ある条件下では 19 番目のセリン残基に加えて 18 番目のスレオニン残基もリン酸化される（二重リン酸化）。二重リン酸化ミオシン II は一重リン酸化ミオシン II と比べて、約 2 倍大きい Mg^{2+} -ATPase 活性を有する。そこで、一重リン酸化された調節軽鎖に対する特異的な抗体（P1）、二重リン酸化された調節軽鎖に対する特異的な抗体（PP1）を用いて、ミオシン II が活性化されている領域を解析した。

線維芽細胞は非常に運動性に富んだ細胞である。移動している細胞において、ミオシン IIA はラメラと細胞後方に分布していた。ミオシン IIB はミオシン IIA と細胞後方において共局在していたが、最後端には局在していなかった。一重リン酸化ミオシン II は細胞後方の細胞質内に多く存在していた。また、先端端にも局在が観察された。PP1 は、ミオシン IIA と非常によく似た領域を染色した。一方、静止した細胞において、ミオシン IIA とミオシン IIB はストレスファイバーに共局在していたが、その端にはミオシン IIA のみが局在していた。P1 はミオシン IIA と同様にストレスファイバー全体を染色したが、PP1 はストレスファイバーの端を非常に強く染色した。そこは接着斑に隣接した領域であることが、ピンキュリンに対する抗体を用いた免疫染色から解明された。これらの結果から、移動している細胞において、ミオシン IIA が主に二重リン酸化され、細胞運動における移動の方向や形態の制御に深く関わっていることが示唆された。また、静止している細胞において、接着斑は細胞内を移動していることが解明されている。接着斑に隣接した領域にミオシン IIA が局在し、また二重リン酸化され非常に高い活性を有している可能性があることから、このような接着斑の運動にミオシン IIA が関わっていることが示唆された。接着斑の運動は、細胞の移動に関係していると考えられている。よって、細胞の移動には、ミオシン IIA が重要な役割を果たしているということが示唆された。

以上のことから、細胞内においてミオシン IIA とミオシン IIB はそれぞれ独自の機能を有することが示唆された。特にミオシン IIA は調節軽鎖が二重リン酸化されることで、より高い Mg^{2+} -ATPase 活性を持つ可能性があることから、細胞内において主に力の発生に関与していると考えられる。また、ミオシン IIB は細胞膜直下に局在することから、また、ミオシン IIA と比べてモーター活性が低いことから、力の発生には関与せず、細胞の構造を安定させることに関わっているのではないかと推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 岸 皓 彦

副 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 矢 澤 道 生 (化学専攻)

副 査 助 教 授 高 橋 正 行 (化学専攻)

学 位 論 文 題 名

Studies on Subcellular Localization and Function of Nonmuscle Myosin II Isoforms

(非筋細胞ミオシンIIアイソフォームの細胞内局在と機能に関する研究)

ミオシンはアクチンと相互作用し、ATP加水分解によって得た化学エネルギーを、機械的エネルギーに変換することによりアクチンフィラメントを動かす、またはアクチンフィラメント上を動くモータータンパク質である。現時点で、ミオシンには18種類という多くのファミリーの存在が知られていて、それぞれのミオシンが細胞内で様々な機能を担っていると考えられている。最も良く知られているミオシンIIは、1組ずつの重鎖、必須軽鎖、調節軽鎖からなる6量体で、もともと筋肉の収縮タンパク質として同定された。後に筋肉以外の細胞にも筋肉のものとは異なるミオシンIIが発現していることがわかり、非筋細胞ミオシンIIと名付けられた。非筋細胞ミオシンIIは、細胞質分裂、細胞の移動、形態変化等の細胞運動において重要な役割をしていると考えられている。脊椎動物の非筋細胞ミオシンII重鎖には少なくとも2種類のアイソフォーム(MHC-IIA, MHC-IIB)が存在し、組織によって発現量が異なる。また、いくつかの細胞におけるそれらの局在が報告されているが、統一的な見解はまだ得られていない。

申請者は本研究において非筋細胞ミオシンIIアイソフォームの機能の相違を解明するために、神経細胞(第2章)、繊維芽細胞(第3章)におけるそれらの局在を様々な抗体の組み合わせで免疫染色することにより解析した。得られた結果からそれぞれのアイソフォームの機能について新しい仮説を提唱している。以下にこれらについて詳述する。

1. 神経細胞における非筋細胞ミオシンIIアイソフォームの細胞内局在の解析(第2章)

ここで申請者は、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y、ラット小脳の初代培養のプルキンエ細胞及び顆粒細胞をモデルとして、神経細胞における非筋細胞ミオシンIIアイソフォームの細胞内局在を明らかにした。ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yはレチノイン酸によって神経細胞様へと分化するが、その分化前後における局在を解析した。未分化のSH-SY5Y細胞において、ミオシンIIA、IIBは共に細胞質に散漫して存在し、小突起におい

てはIIAのみの局在が見られた。双極性に分化した細胞においてはミオシンIIAの発現はほとんど認められなかった。ミオシンIIBは細胞体の細胞膜直下及び神経突起の根元に非常に強い局在を示した。また、アクチン結合タンパク質のひとつであり、神経細胞特異的に発現するドレブリンとミオシンIIアイソフォームの共局在について解析した。未分化の細胞においてはドレブリンと両アイソフォームの共局在が観察された。双極性の形態に分化した細胞では、神経突起の根元に近い部分の細胞膜直下においてミオシンIIBとドレブリンの共局在が観察された。初代培養したラット小脳顆粒細胞とプルキンエ細胞には、ミオシンIIAの発現はほとんど認められなかった。顆粒細胞においてミオシンIIBは細胞体の膜直下に強い局在を示した。これは双極性に分化したミオシンIIBの局在に類似していた、プルキンエ細胞ではミオシンIIBは細胞体と樹状突起の一部に強く局在していた。以上の結果とミオシンIIBのモーター活性はIIAよりも低いことを考慮すると、ミオシンIIBは細胞の運動性にはあまり関与せず、細胞膜構造の安定性に関わっていると仮説を提唱している。

2. 繊維芽細胞における非筋細胞ミオシンIIアイソフォームの細胞内局在の解析 (第3章)

次に、ヒト繊維芽細胞MRC-5を用いて細胞が移動している状態と静止している状態を区別して、それぞれの状態におけるミオシンIIアイソフォームの局在を示した。さらに細胞内でミオシンIIが実際に活性化している領域を、一重リン酸化された調節軽鎖及び二重リン酸化された調節軽鎖をそれぞれ特異的に認識する抗体 (P1, PP1)を用いて解析した。移動している細胞において、ミオシンIIAは先端端のラメラと細胞後方に局在していた。ミオシンIIBは細胞後方の膜直下においてミオシンIIAと共局在していたが、最後端には局在していなかった。P1は主に細胞後方の細胞質内を染色した。また、先端端のラメラにおける染色も観察された。PP1はP1に比べてより限定された領域、すなわちラメラと細胞後方の膜直下の一部を染色した。一方、静止した細胞においては両アイソフォーム共にストレスファイバーに局在していたが、その端にはミオシンIIAのみが局在していた。P1はストレスファイバー全体を染色したが、PP1はストレスファイバーの端を特に強く染色した。そこは接着斑に隣接した領域であることが、ビンキュリンに対する抗体との同時染色から解明された。静止している細胞において、ストレスファイバーの短縮運動に二重リン酸化されたミオシンIIAが関わっていることが示唆された。ストレスファイバーの短縮運動は繊維芽細胞がいつでも移動できるように準備をしているため起こっていると考えられている。以上の結果から、細胞移動には静止している場合も含めて、ミオシンIIAが主に二重リン酸化されて移動の方向や形態の制御に重要な役割を果たしているということが示唆された。

さらに、二つのアイソフォームのモーター活性と細胞内局在からミオシンIIAが主に力の発生に関与していて、ミオシンIIBは細胞の形態の維持に関与しているのではないかという仮説を提唱している。二つのミオシンIIアイソフォーム、特に活性化されているミオシンIIの局在を細胞の動態を考慮して議論した研究はこれまで例がなく、本論文はこの分野の研究の発展に著しく貢献するものと思われる。

これらの結果は現段階で、国際誌に1報の原著論文として公表されている。これらのことより、審査員一同は本研究が博士(理学)の学位に値する内容であると結論した。