

学 位 論 文 題 名

非筋細胞ミオシンⅡの会合機構に関する研究

学位論文内容の要旨

ミオシンは ATP を分解することによって得たエネルギーを運動エネルギーに変換して、アクチンフィラメントをレールとして動くモータータンパク質である。筋肉細胞を含め、ほとんど全ての細胞に存在する非筋細胞ミオシンⅡは、骨格筋や心筋、平滑筋のミオシンと同様にⅡ型ミオシンに分類され、細胞質分裂、細胞の遊走、細胞の形態変化などの様々な細胞運動に関与している。非筋細胞ミオシンⅡは2つの球状の頭部と1本の紐状の長い尾部を持つ双葉様の構造をしており、会合して双極性のフィラメントを形成し、2本のアクチンフィラメントを逆方向に動かす。ミオシンⅡの頭部にはアクチン結合部位やATPase 活性部位が存在し、尾部は α -helical coiled-coil 構造を形成して双極性のフィラメント形成に関与している。ミオシンⅡが会合して双極性のフィラメントを形成するためには、各分子が逆方向にパッキングするアンチパラレル相互作用と、同方向にパッキングするパラレル相互作用が必要である。筋細胞内で常にフィラメントを形成している骨格筋ミオシンとは異なり、非筋細胞ミオシンⅡは細胞内で必要な時に必要な場所で会合してフィラメントを形成する。逆に必要が無い時はフィラメントが脱会合しモノマーになる。このように、非筋細胞ミオシンⅡは分子同士のダイナミックな会合・脱会合を伴って機能するため、骨格筋には無い緻密なフィラメント形成の制御機構が存在するものと考えられる。

本研究では、非筋細胞ミオシンⅡのフィラメント形成に必須な分子内領域を明らかにし、さらに、同定できた会合必須領域の相互作用に基づく会合の分子機構を解明することを目的とした。骨格筋ミオシンの尾部のC末端付近にはフィラメント形成に必須な29残基の領域 (assembly competence domain: ACD) があり、このACDと良く似た配列 (ACD様配列) が非筋細胞ミオシンⅡにも存在する。私は、非筋細胞ミオシンⅡBのACD様配列を含む尾部フラグメント (248アミノ酸残基からなるBRF248と305アミノ酸残基からなるBRF305) とそれらの様々な領域の欠損変異体 (deletion mutants) および電荷逆転変異体 (charge-reversal mutants) を構築して溶解度の塩濃度依存性を解析し、また形成した会合体の電子顕微鏡観察像から、会合必須領域を同定することを試みた。

BRF248は生理的な塩濃度条件下 (125 mM NaCl) ではほぼ100%が会合し、その後塩濃度が上がるにつれて徐々に沈殿しづらくなり、300 mM NaCl 付近で全く会合しなくなるという溶解度の塩濃度依存性を示した。この溶解度の塩濃度依存性はミオシンⅡBの尾部の3分の2に当たり、ミオシンⅡの会合性質を調べるための指標とされるフラグメント (LMM) と同様であった。また、低塩濃度条件下で沈殿した会合体もLMMと同様に針状構造をしていた。これらの結果から、BRF248がミオシンⅡの会合に対する必須領域を全て持っていると判断した。BRF248の欠損変異

体の会合能を解析したところ、2カ所の領域 D1729-T1763 と A1875-A1913 を欠損すると BRF248 は生理的な塩濃度条件下 (125 mM NaCl) でのみならず、それより低塩濃度条件下でも会合しなかった。この2カ所内に会合に必須な領域が存在すると判断し、それぞれを nonmuscle myosin ACD (nACD) 1、nACD2 と命名した。nACD2 の N 端部分は ACD 様配列に対応する領域である。次に、BRF-248 の α -helical coiled-coil 部分の分子モデルを Crick の coiled-coil モデルに基づいて構築し、表面電荷をマッピングしたところ、非常に負電荷に偏ったクラスター1カ所 (N1; E1742-E1753) と正電荷に偏ったクラスター2カ所 (P1; K1842-K1852 と P2; K1874-R1884) が存在することがわかった。これら3つの電荷クラスターのうち、N1 は nACD1 内に、P2 は nACD2 内に存在していた。また、欠損変異体を用いた実験では重要視しなかった nACD2 よりも N 端側に P1 が存在していた。これらの電荷クラスター内の分子表面に配置しているアミノ酸の電荷を逆転させた変異体の会合能を解析したところ、3種類の変異体全てが生理的な塩濃度で会合せず、低塩濃度条件下でも正常な会合体を形成できなかった。また、nACD2 内に含まれる P2 以外の領域の電荷逆転変異体の解析結果から、nACD2 の C 端側も会合に必須であることもわかった。これらの結果と構築した分子モデルに基づき、2本のフラグメントが最も静電相互作用しやすいパッキングの仕方を考えた。その結果、アンチパラレル会合は主に N1 と P2 の間の、パラレル会合は主に N1 と P1 の間の強い静電相互作用によって形成されていることが示唆された。アンチパラレルモデルから見積もった分子間の重なり部分の長さは約 43 nm であり、この長さは様々なミオシン II で報告されている実測値に近かった。一方、パラレルモデルから見積もった分子間のずれの長さは 14.3 nm であり、この長さも報告されている実測値と非常に近い値となった。本研究で明らかにしたこれらの会合に必須な領域は、脊椎動物の他のミオシン II 内でも保存されていることから、これらの分子間相互作用は非筋細胞ミオシン II のみならず、脊椎動物のミオシン II 全体に共通していることが示唆された。

本研究により、非筋細胞ミオシン II の会合には N1、P1、P2 の3つの電荷クラスターと nACD2 領域が必須であることを明らかになった。また、これらの電荷クラスター間のアンチパラレル及びパラレル相互作用により周期性を持つフィラメントが形成されるという分子機構を提案した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	矢 澤 道 生
副 査	教 授	坂 口 和 靖
副 査	教 授	菊 池 九二三
副 査	教 授	田 村 守
副 査	教 授	畠 山 昌 則
副 査	教 授	及 川 英 秋
副 査	助教授	高 橋 正 行

学 位 論 文 題 名

非筋細胞ミオシンIIの会合機構に関する研究

ミオシンは、ATPの加水分解反応によって得た化学エネルギーを運動エネルギーに変換して、アクチンフィラメント上を滑り運動するモータータンパク質である。骨格筋・心筋や平滑筋ミオシンと同じII型ミオシンに分類される非筋細胞ミオシンIIは、ほとんど全ての真核細胞に存在し、細胞質分裂、細胞の遊走、細胞の形態変化などの様々な細胞運動に関与している。非筋細胞ミオシンIIは2つの球状の頭部と1本の棒状の長い尾部を持つ双葉様の構造をしており、頭部にはATPase活性部位とアクチン結合部位が存在する。 α -helical coiled-coil構造をとる尾部は自己会合能を持ち、ミオシン分子のフィラメント形成に関与している。ミオシンIIは、筋細胞内では常にフィラメントを形成して機能しているが、非筋細胞ミオシンIIの機能は分子同士のダイナミックな会合・脱会合を伴って進行している。このため、非筋細胞にはフィラメント形成の緻密な制御機構が存在すると考えられる。ミオシンIIが会合して双極性のフィラメントを形成するためには、各分子が逆方向にパッキングするアンチパラレル相互作用と、同方向にパッキングするパラレル相互作用が必要であるが、それぞれの作用部位の同定を含めた自己会合機構の詳細な解析はなされていない。本学位論文は、ミオシン尾部のフィラメント形成の分子機構について論じたものである。

申請者は、非筋細胞ミオシンIIの尾部C末端付近に骨格筋ミオシンのフィラメント形成に必須な29残基の領域 (assembly competence domain: ACD) と良く似た配列 (ACD様配列) があることに着目し、これを含む尾部フラグメント (248アミノ酸残基からなるBRF248、および305アミノ酸残基からなるBRF305) とそれらの様々な領域の欠損変異体 および電荷逆転変異体を構築し、溶解度の塩濃度依存性から自己会合能力について解析するとともに、形成した会合体の構造を電子顕微鏡を用いて観察した。フラグメントBRF248は、生理的な塩濃度条件下 (125 mM NaCl) でほぼすべて会合し沈殿したが、塩濃度を上げるにつれて徐々に沈殿し難くなり、300 mM NaCl付近で全く会合しなくなった。この溶解度の塩濃度依存性は、ミオシンIIBの尾部の2/3に当たりミオシンIIの自己会合能を保持するとされるフラグメントLMMについて得られた結果と同様であった。また、低塩濃度条件下で沈殿した会合体は、LMMの会合体と同様に針状構造をしていた。ついで、BRF248の欠損変異体の会合能を解析したところ、2カ所の領域D1729~T1763とA1875~A1913の欠損により生理的な塩濃度条件下 (125 mM NaCl) でのみならず、それより低塩濃度条件下でも会合しなくなった。会合に必

須な領域がこの2カ所内に存在すると判断し、それぞれをnonmuscle myosin ACD 1 (nACD1)、およびnACD2と命名した。nACD2のN端部分はACD様配列に対応する領域である。

次に、BRF248の α -helical coiled-coil部分の分子モデルをCrickのcoiled-coilモデルに基づいて構築し、表面電荷をマッピングしたところ、顕著な負電荷クラスター1カ所(N1: E1742~E1753)と正電荷クラスター2カ所(P1: K1842~K1852とP2: K1874~R1884)を見出した。これら3つの電荷クラスターのうち、N1はnACD1内に、P2はnACD2内に存在していた。P1は、構築したモデルを評価して初めて検出された領域であり、nACD2よりもN端側に存在していた。これらの電荷クラスターの重要性を確認するために、それぞれのクラスター内で分子表面にあるアミノ酸残基の電荷を逆転させた変異体フラグメントを作製して会合能を解析したところ、3種類の変異体全てが生理的な塩濃度で会合しないことが明らかになった。また、同様の電荷逆転変異体の解析結果から、nACD2のC端部分にある荷電領域も重要であることがわかった。

申請者は、これらの結果と構築した分子モデルに基づき、2本のフラグメントが最も静電相互作用しやすいパッキングの仕方考えた。その結果、アンチパラレル会合は主にN1とP2の間の、パラレル会合は主にN1とP1の間の強い静電相互作用により形成されることが示唆された。アンチパラレルモデルから分子間の重なり部分の長さを見積もると約43 nmであり、この値は様々なミオシンIIフィラメントの電子顕微鏡観察に基づく実測値43~45 nmと一致する。一方、パラレルモデルから分子間のずれの長さを見積もると14.3 nmであり、この値も報告されている実測値と合う。本研究で明らかになったこれらの会合に必須な領域と、そのアミノ酸配列は、脊椎動物の他のミオシンIIでも保存されていることから、これらの分子間相互作用は非筋細胞ミオシンIIのみならず、脊椎動物のミオシンII全体に共通していることが示唆された。

本論文で述べられたこれらの結果は、非筋細胞ミオシンIIの会合にはN1、P1、P2の3つの電荷クラスターとnACD2領域が必須であることを明らかにしたうえで、さらに、これらの電荷クラスター間のアンチパラレル及びパラレル相互作用を基準にして周期性を持つフィラメントが形成されるという新たな分子機構を提案したものであり、非筋細胞ミオシンIIの多岐にわたる生理機能の基盤となる動的構造変化に関する基礎的知見を与えた成果として高く評価される。審査員一同は、申請者が、北海道大学博士(理学)の学位を得るに十分な資格を有すると認めた。