

学位論文題名

非筋細胞ミオシン IIB のアイソフォーム特異的会合に
関する研究

学位論文内容の要旨

非筋細胞ミオシン II (以下ミオシン II) は細胞内で会合し、フィラメントを形成して機能する。その会合-脱会合はダイナミックに行われている。フィラメント形成は静電相互作用が原動力となっており、ミオシン II の C 末端側に存在する正電荷および負電荷に富んだ領域が会合に重要な役割を担っている。哺乳類のミオシン II では三種類のアイソフォーム (ミオシン IIA、IIB、IIC) が発現しており、その発現量は組織によって異なっている。各ミオシン II アイソフォームは異なるモーター活性を有していることおよび培養細胞内で異なる局在を示す場合があることから、それぞれ同種タンパク質間で会合してホモフィラメントを形成していることが示唆されている。しかし *in vitro* で、フィラメント形成に必須な領域を含むミオシン IIA およびミオシン IIB 尾部フラグメントを混合した場合、ヘテロ会合体を形成してしまう。*in vivo* には、ミオシン II アイソフォームが自己を認識して会合するための何らかの機構が存在していることが予測される。その場合、ミオシン IIB 尾部フラグメントを細胞内に発現させると、内在性ミオシン IIB と特異的に相互作用してその機能を阻害し、特異的表現型が得られることになる。ミオシン IIB ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞は、不安定な細胞形態という表現型を示す。尾部フラグメントの発現によるミオシン IIB 特異的機能阻害が行われた場合、同様の表現型が得られることが期待される。本研究では様々な尾部フラグメントを発現させ、ミオシン IIB 特異的機能阻害による表現型が得られるかどうかを調べた。その結果に基づき、ミオシン II アイソフォームの自己認識に必要な領域の同定を試みた。

ミオシン IIB 重鎖の C 末端側 305 アミノ酸残基のフラグメント (BRF305) を、N 末端に GFP を融合させて (GFP-BRF305) ヒト繊維芽細胞 MRC-5 の SV40 トランスフォーマントに発現させた。その結果、細胞形態は破綻し、ミオシン IIB ノックアウト繊維芽細胞と同様の表現型が得られた。この表現型は (1) 会合能を持たない BRF305、(2) BRF305 の N 末端側 57 残基 (N-57 領域) または (3) C 末端側 63 残基 (C-63 領域) を欠損させたフラグメントの発現では得られなかった。また、BRF305 に相当するミオシン IIA 尾部フラグメント (ARF296) を発現させても、細胞形態の破綻を誘導しなかった。しかし、ARF296 の N-57 および C-63 相当領域を BRF305 のものに置換した場合 (ARF296exNC)、細胞形態の破綻を誘導するようになった。細胞形態を破綻させた BRF305 および ARF296exNC は、細胞内で内在性ミオシン IIB と相互作用していることが、免疫共沈降実験からわかった。これらのことより、BRF305 はミオシン IIB

を特異的に認識して相互作用しており、その認識には N-57 領域と C-63 領域が必要であることが明らかとなった。

細胞形態の破綻の誘導機構を明らかにするために、BRF305 発現細胞におけるアクチン細胞骨格の様子を調べた。BRF305 発現細胞では、細胞膜直下の骨格構造の喪失が観察された。ミオシン IIB が会合-脱会合の平衡状態にあるときに、過剰量発現させた BRF305 が特異的に相互作用すると、ミオシン IIB-BRF305 複合体が形成され、ミオシン IIB の正常な会合体が消失する。その結果、細胞は細胞膜直下のミオシン IIB を失い、アクチン骨格構造を維持することができなくなり、細胞形態が破綻したものと考えられる。

本研究により、ミオシン IIB 特異的会合に必要な二箇所の領域を同定し、ホモフィラメント形成機構の構造的基盤を提案することができた。今後、X線結晶構造解析を行い、詳細な認識機構を解明することで、タンパク質分子認識の分野の発展にも貢献できるだろう。

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 石 森 浩 一 郎
副 査 助 教 授 高 橋 正 行

学 位 論 文 題 名

非筋細胞ミオシン IIB のアイソフォーム特異的会合に 関する研究

非筋細胞ミオシンII (以下ミオシンII) は、筋肉のミオシンと同じII型ミオシンに分類されるモータータンパク質であり、ATPの加水分解と共役してアクチンフィラメントを滑らせることで細胞の運動や形態変化を引き起こす。ミオシンIIは、二つの球状頭部と一本の長い尾部を持つ双葉様の構造をしていて、頭部にはアクチン結合部位とATP加水分解反応触媒部位がある。尾部はコイルドコイル構造をとり、他のミオシンII分子と相互作用しミオシンフィラメント形成に関与する。ミオシンIIは細胞内で会合しフィラメントを形成して機能するが、非筋細胞ではその会合・脱会合がダイナミックに制御されている。会合の原動力は静電相互作用であり、ミオシンIIのC末端側に局在する正電荷または負電荷に富んだ会合に必須の領域が同定されている。哺乳類の細胞には三種類のミオシンIIアイソフォーム (ミオシンIIA、IIB、IIC) が発現しており、その発現量は組織によって異なる。各アイソフォームは異なるモーター活性を有していること、および培養細胞内で異なる局在を示す場合があることから、同種のアイソフォームが会合しホモフィラメントを形成して機能することが示唆されている。しかし、フィラメント形成に必要な領域を含むミオシンIIAおよびミオシンIIB尾部フラグメントを*in vitro*実験系で混合した場合、ヘテロ会合体を形成する。細胞内には、ミオシンIIアイソフォームが自己を認識して会合するための何らかの機構が存在すると考えられる。申請者は、本学位論文でミオシンIIBの自己認識機構を明らかにすることを目的に研究を展開した。その結果ミオシンIIB尾部に2箇所自己認識領域を同定し、ミオシンIIBの特異的機能を阻害することに成功した。これによりミオシンIIアイソフォームはホモフィラメントを形成し、それぞれが特異的な機能を果たしている可能性を明らかにした。

申請者は、最近報告されたミオシンIIBノックアウトマウス由来の繊維芽細胞についての実験結果に注目し、ミオシンIIBの特異的機能を阻害したことに起因すると考えられる「不安定な細胞形態」という表現型を指標にして独自の研究を展開することを思いついた。すなわち、細胞内に各アイソフォームを認識する機構が備わっているのならば、自己認識領域をもつミオシンIIB尾部フラグメントを細胞内に強制発現すると、内在性ミオシンIIBと特異的に相互作用してフィラメント形成を阻害するはずであり、これによりミオシンIIBノックアウトマウス由来の繊維芽細胞と同様の表現型が得られるのならば、この方法によりミオシンIIBの自己認識領域を同定できると考えた。この発想に基づき、まず*in vitro*実験系で自己会合能をもつことが明らかになっている尾部フラグメントを培養細胞内に過剰発現させ、ミオシンIIB特異的機能阻害による表現型が得られるかどうかを調べることから開始した。

in vitro実験系で自己会合能を示すことが明らかになっているミオシンIIB重鎖のC末端側305アミノ酸残基のフラグメント (BRF305) を用いて、そのN末端にGFPを融合させ (GFP-BRF305) ヒト繊維芽細胞MRC-5のSV40トランスフォーマントに過剰発現させたところ、ミオシンIIBノックアウト繊維芽細胞と同様の表現型が得られた。この表現型は(1) 会合能を持たないBRF305変異体、(2) BRF305のN末端側57残基 (N-57領域) または(3) C末端側63残基 (C-63領域) を欠損させたフラグメントを発現しても得られなかった。また、ミオシンIIA尾部にあるBRF305に相当する領域のフラグメント (ARF296) を過剰発現させても同様の表現型は見られなかった。しかし、ARF296のN-57およびC-63相当領域をBRF305のものに置換した場合 (ARF296exNC)、GFP-BRF305と同様の「不安定な細胞形態」という表現型が得られた。細胞抽出液についての免疫共沈降実験から、「不安定な細胞形態」という表現型を示したBRF305およびARF296exNCは、細胞内で内在性ミオシンIIBと相互作用していることを確認した。以上の結果から、BRF305はミオシンIIBを特異的に認識して相互作用しており、その認識にはN-57領域とC-63領域が必要であることを明らかにした。

ついで、「不安定な細胞形態」を誘導する機構を検討した。細胞の形態を維持するアクチン細胞骨格の様子を免疫染色法で検出して未処理の細胞と比較したところ、BRF305発現細胞では、細胞膜直下のアクチン骨格構造を喪失していることを見出した。この結果に基づき、過剰量発現させたBRF305が、会合・脱会合のダイナミックな平衡状態にあるミオシンIIBモノマーを認識し特異的に相互作用することで、ミオシンIIB-BRF305複合体が形成され、細胞膜直下のミオシンIIBの正常な会合体が消失しアクチン骨格構造を維持できなくなるという機構を提案した。

本研究により、申請者はミオシンIIBの特異的会合に必要な二箇所の領域を同定し、ホモフィラメント形成機構の構造的基盤を提案することができた。また、これにより、ミオシンIIアイソフォームがホモフィラメントを形成して、それぞれ特異的な機能を分担している可能性を示すことに成功した。

本論文で述べられたこれらの結果は、非筋細胞内でミオシンIIBフィラメントが、特異的な機能を果たすこと、その特異的相互作用の基盤となる分子機構を細胞を試験管に用いるタンパク質化学的実験により明らかにしたものであり、今後の非筋細胞の生理機能発現におけるミオシンIIの機能解明の研究に貢献するところが大きい。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。