

学 位 論 文 題 名

Stretch-induced cellular response in the
contractile force originated in the phosphorylation and
dephosphorylation of myosin II regulatory light chain

（Ⅱ型ミオシン調節軽鎖のリン酸化と脱リン酸化に起因した
伸長刺激に対する細胞の収縮力の応答）

学位論文内容の要旨

細胞にかかる外力は、運動、増殖、分化など様々な生理的機能に対して重要な役割を果たしている。例えば、筋肉細胞の増殖には、重力や伸縮刺激が必要である。もし、外力に応じた細胞の増殖がなければ、筋肉組織は衰えていく。また、結合組織に存在する繊維芽細胞は、伸縮刺激に応じて細胞内に発生する収縮力を調節する。外部からの伸縮刺激に対する調節機能のおかげで、皮膚組織にかかる張力は一定に保たれている。しかしながら、伸縮刺激に対する細胞の収縮力応答の時間スケールとその生化学的なメカニズムは不明である。そこで本研究では、細胞への外力を伸長刺激に限定し、伸長刺激に対する細胞の収縮力応答のメカニズムを解明することを目的とした。

最初に、細胞に伸長刺激を印加して、細胞の収縮力の時間変化を測定した。シリコンゴム製の弾性基盤上に培養した繊維芽細胞を基盤の変形を通じてステップ的に伸長し、走査型プローブ顕微鏡(SPM; Scanning Probe Microscopy)によって収縮力の変化を測定した。伸長前、細胞の収縮力は一定値をとっていた。伸長 15 分後に収縮力を測定したところ、収縮力は増加していた。その後、100 分程度にわたって収縮力は減少し、一定の値に落ち着いた。細胞の収縮力は、主に、アクチンとミオシンから構成される収縮性の束(ストレスファイバー)が起源であると考えられている。そこで、ストレスファイバーの収縮力を抑える薬剤を細胞に投与し、薬剤存在下で細胞を伸長した。その結果、伸長前後において細胞の収縮力は変化せず、一定の値をとった。以上の結果から、①伸長刺激に対する細胞の収縮力応答は刺激後の増加と 100 分程度にわたる減少から成る事、②細胞の収縮力変化はストレスファイバーの収縮力の変化に起因していること、が明らかとなった。

では、何が伸長刺激に反応してストレスファイバーの収縮力を調節しているのだろうか。ストレスファイバーの収縮力は、Ⅱ型ミオシン調節軽鎖(MRLC; Myosin II Regulatory Light Chain)のリン酸化によって調節されている。更に、MRLC のリン酸

化は結合したリン酸の数によって 0、1 もしくは 2 リン酸化の 3 つの状態をとる。*in vitro* の実験系において 1 リン酸化よりも 2 リン酸化の方がミオシンの ATPase 活性が高いことが知られている。しかしながら、実際の細胞内において、MRLC の 2 もしくは 1 リン酸化と収縮力の大小関係については、明らかになっていない。そこで本研究では、①2 リン酸化 MRLC が 1 リン酸化 MRLC よりも多くの収縮力を発生させる、更に、②伸長刺激に対する収縮力の変化が MRLC に結合したリン酸の数によって調節される、との 2 つの仮説を立てた。

ここで、伸長後 15 分以内での収縮力測定を確実なものとするために、新たな装置を開発する必要があった。上記の実験では、100 μm という SPM の最大測定領域内における細胞の収縮力を測定した。長さが 100 μm 以上の細胞に対して伸長前後において測定領域を一致させなければ、細胞内の同一領域における収縮力の変化を測定することは出来ない。実際、既存の SPM では伸長前後における測定領域を一致させるのに時間がかかってしまい、伸長後 15 分以内における収縮力の変化を測定することが出来ないケースがあった。もし、SPM の測定領域が細胞一つを十分にカバーするくらい広いものであれば、厳密に測定領域を合わせることなく収縮力の変化を測定することができるはずである。そこで、最大測定領域を 500 μm にまで拡張した広域走査型プローブ顕微鏡(WR-SPM; Wide-Range Scanning Probe Microscopy)を開発した。WR-SPM を用いることによって、伸長後 15 分以内に収縮力を測定できるようになった。

さて、上述の仮説①を証明するために、1 リン酸化はできるが 2 リン酸化することが出来ない変異体 MRLC (MRLC^{T18A})を発現させた細胞に対して MRLC のリン酸化を促す薬剤を投与し、収縮力の変化を測定した。その結果、MRLC^{T18A} を発現した細胞では収縮力が変化しなかった。一方、wild-type の MRLC を発現した細胞では収縮力が増加した。このことから、2 リン酸化 MRLC は、1 リン酸化よりも大きな収縮力を発生させることが明らかとなった。

次に、仮説②を証明するために、MRLC^{T18A} を発現した細胞を伸長し、収縮力の変化を測定した。その結果、収縮力は変化せず一定値のままであった。一方、wild-type の MRLC を発現した細胞では、刺激直後に収縮力が増加し、その後 100 分程度にわたって減少した。これらの結果から、伸長刺激に対する収縮力の応答は、2 リン酸化 MRLC に起因することが明らかとなった。

本研究によって、外力に対する細胞の収縮力の応答が MRLC のリン酸化と脱リン酸化に起因することが明らかになった。また、WR-SPM を開発することにより、伸長後 15 分以内に細胞の収縮力を測定することが容易になった。今後、繊維芽細胞がどのようにして外力を感知し、MRLC のリン酸化を調節しているのかを調べる必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	芳 賀	永
副 査	教 授	川 端	和 重
副 査	教 授	佐々木	直 樹
副 査	助教授	高 橋	正 行

学 位 論 文 題 名

Stretch-induced cellular response in the contractile force originated in the phosphorylation and dephosphorylation of myosin II regulatory light chain

(Ⅱ型ミオシン調節軽鎖のリン酸化と脱リン酸化に起因した
伸長刺激に対する細胞の収縮力の応答)

重力、流れ、伸縮等の外力は、細胞の運動や増殖などの生理的機能に影響を与えることが知られている。例えば、結合組織に存在する繊維芽細胞は、伸縮刺激に応じて細胞内に発生する収縮力を調節する。外部からの伸縮刺激に対する収縮力の調節機能のおかげで、皮膚組織にかかる張力は一定に保たれている。多くの研究グループでは、伸縮刺激に対する収縮力の調節機構を明らかにするために、タンパク質や転写因子などの活性に注目し研究を進めている。しかし、細胞が発生する収縮力応答の時間変化についてはほとんど明らかになっていない。本論文では、細胞への外力を伸張による刺激に限定し、細胞の収縮力応答とその生化学的な調節機構の解明を目的とした。

最初に、細胞に伸長刺激を印加して、細胞の収縮力の時間変化を測定した。シリコンゴム製の弾性基盤上に培養した繊維芽細胞を基盤の変形を通じてステップ的に伸長し、走査型プローブ顕微鏡によって収縮力の変化を測定した。伸長前、細胞の収縮力は一定値をとっていた。伸長 15 分後に収縮力を測定したところ、収縮力は増加していた。その後、100 分程度にわたって収縮力は減少し、一定の値に落ち着いた。細胞の収縮力は、主に、アクチンとミオシンから構成される収縮性の束(ストレスファイバー)が起源であると考えられている。そこで、ストレスファイバーの収縮力を抑える薬剤を細胞に投与し、薬剤存在下で細胞を伸長した。その結果、伸長前後において細胞の収縮力は変化せず、一定の値をとった。以上の結果から、①伸長刺激に対する細胞の収縮力応答は刺激後の増加と 100 分程度にわたる減少から成る事、②細胞の収縮力変化はストレスファイバーの収縮力の変化に起因していること、が明らかとなった。

では、何が伸長刺激に反応してストレスファイバーの収縮力を調節しているのだろうか。ストレスファイバーの収縮力は、Ⅱ型ミオシン調節軽鎖(MRLC; Myosin II Regulatory Light Chain)のリン酸化によって調節されている。更に、MRLC のリン酸化は結合したり

ン酸の数によって0、1もしくは2リン酸化の3つの状態をとる。*in vitro*の実験系において1リン酸化よりも2リン酸化の方がミオシンのATPase活性が高いことが知られている。しかしながら、実際の細胞内において、MRLCの2もしくは1リン酸化と収縮力の大小関係については、明らかになっていない。そこで本研究では、①2リン酸化MRLCが1リン酸化MRLCよりも大きな収縮力を発生させる、更に、②伸長刺激に対する収縮力の変化がMRLCに結合したリン酸の数によって調節される、との2つの仮説を立てた。

上述の仮説①を証明するために、1リン酸化はできるが2リン酸化することが出来ない変異体MRLC (MRLC^{T18A})を発現させた細胞に対してMRLCのリン酸化を促す薬剤を投与し、収縮力の変化を測定した。その結果、MRLC^{T18A}を発現した細胞では収縮力が変化しなかった。一方、wild-typeのMRLCを発現した細胞では収縮力が増加した。このことから、2リン酸化MRLCは、1リン酸化よりも大きな収縮力を発生させることが明らかとなった。

次に、仮説②を証明するために、MRLC^{T18A}を発現した細胞を伸長し、収縮力の変化を測定した。その結果、収縮力は変化せず一定値のままであった。一方、wild-typeのMRLCを発現した細胞では、刺激直後に収縮力が増加し、その後100分程度にわたって減少した。これらの結果から、伸長刺激に対する収縮力の応答は、2リン酸化MRLCに起因することが明らかとなった。

以上を要するに、著者は、伸張刺激に対する細胞の収縮力応答とその生化学な調節機構との関係に新たな知見を得たものである。加えて、これまで明らかとなっていなかった細胞内におけるMRLCのリン酸化の役割を解明したことも大きな発見である。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。