

細胞伸展におけるミオシン II アイソフォームの 局在とリン酸化状態に関する研究

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 1 対ずつの重鎖、必須軽鎖、調節軽鎖 (RLC) からなる 6 量体のモータータンパク質で細胞移動において重要な役割を果たしている。ミオシン II には ATP を加水分解して (ATPase 活性)、アクチンフィラメントを滑らすモーター活性がある。ミオシン II の活性は RLC のリン酸化によって調節されている。RLC の 19 番目の Ser がリン酸化されることで上昇し (1 重リン酸化状態、1P-RLC)、18 番目の Thr も同時にリン酸化された 2 重リン酸化状態 (2P-RLC) では ATPase 活性がさらに上昇する。哺乳類の非筋細胞には 3 種類のミオシン II 重鎖 (MHC) アイソフォーム (MHC-IIA、IIB、IIC) が発現している。これらが 2 対の軽鎖と結合して、ミオシン IIA、IIB、IIC アイソフォームを形成する。これらのアイソフォームは組織での発現量や ATPase 活性、モーター活性が異なる。ミオシン IIA、IIB に関しては細胞の移動時に異なる細胞内局在を示すことが報告されている。ヒト繊維芽細胞 MRC-5 では、移動時にミオシン IIA が細胞の前方にも局在するのに対し、ミオシン IIB は前方には局在しない。この局在の違いは他の細胞種においても同様の結果が報告されている。これらは細胞内においてミオシン II アイソフォームが異なる機能を担っていることを示唆するが、細胞内での各アイソフォームの機能の違いは明らかになっていない部分が多い。また、2P-RLC は移動時の MRC-5 において細胞前方のラメラと呼ばれる部位に局在するのに対し、他の繊維芽細胞や内皮細胞では後方に局在するという異なる報告がされているなどその意義や 1P-RLC との機能の違いについてはほとんど明らかになっていない。

本研究では、細胞移動におけるミオシン IIA と IIB の機能の違いや 2 重リン酸化の意義を明らかにすることを目的とした。まず、ヒト繊維芽細胞 MRC-5 を用いて Wound healing assay を行い、方向性を持った移動時にミオシン IIA と IIB の細胞内局在の違いと細胞前方における 2 重リン酸化を確認した。このとき、2P-RLC が 1P-RLC よりも先端に近いところに局在していることを見出した。さらに詳細な解析をするために、細胞移動の最初のステップとして考えられており、活発な仮足の伸展が観察できる Cell spreading assay を行い、ミオシン II アイソフォームの細胞内局在、及び、RLC の細胞内でのリン酸化状態、さらにアイソフォームとリン酸化状態の関係を調べた。その結果、細胞伸展時において、ラメラ部位に F-アクチンが集積して環状の構造を形成し、この構造にミオシン IIA とミオシン IIB が共に強い局在を示すことがわかつ

た。ミオシン IIB が F-アクチンの環状の構造の内縁に局在していたのに対し、ミオシン IIA はミオシン IIB よりも外側にまで局在していた。また、いくつかの細胞ではミオシン IIB が細胞中心部に分散した局在を示し、これらの細胞では F-アクチンの集積は見られなかった。この結果はミオシン IIB の局在が F-アクチンのラメラにおける集積に関係があることを示唆する。また、この F-アクチンの環状の構造上で RLC の顕著なリン酸化が見られたが、2 重リン酸化は 1 重リン酸化よりもより細胞の外側で起こっていた。この伸展時に、ミオシン IIB と 2P-RLC の共局在が観察されなかったことから、ミオシン IIA の RLC が 2 重リン酸化されていると判断した。また、細胞形態に極性が生じた細胞では、ミオシン IIB の局在が伸展の止まったと考えられる領域の細胞膜直下にも観察された。これは細胞膜の伸展の制御と細胞形態の極性形成にミオシン IIB が関与していることを示唆する。次に、細胞伸展時の RLC のリン酸化にどのキナーゼが関与しているかを調べた。細胞内での RLC のリン酸化への関与が報告されているミオシン軽鎖キナーゼと Rho キナーゼを候補として、それぞれの阻害剤、ML-7 と Y-27632 を用いた。ML-7 存在下では 1P-、2P-RLC 共に局在にほとんど影響がなかったが、Y-27632 存在下では 2P-RLC のラメラ部位での局在が見られなくなった。このとき、環状のアクチン構造と接着斑の消失が観察された。阻害剤存在下での RLC のリン酸化レベルを Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE で解析した結果、蛍光抗体染色の結果と同様に Y-27632 存在下で 2 重リン酸化レベルが顕著に減少していた。これらはラメラ部位における RLC の 2 重リン酸化に Rho キナーゼが関与していることを示唆する。さらに、細胞伸展時の面積と周囲長を測定したところ、Y-27632 存在下において、有意な増加が見られた。この結果は 2 重リン酸化の減少により、細胞の伸展が促進されたことを示す。この伸展の促進はアクチン重合による細胞膜の伸展に対抗する力が減少したためと考えられ、その力の発生に Rho キナーゼによって 2 重リン酸化され、高度に活性化されたミオシン IIA が関与していることを示唆する。さらに時間が経過し伸展が進んだ状態において、Y-27632 存在下では異常な細胞形態を示した。タイムラプス観察により、円形の細胞形態から、膜の伸展が進む一方で、細胞体の一部が収縮する過程が観察された。血清からのシグナルが存在しない無血清条件下で細胞の伸展を観察したところ、ミオシン II のリン酸化が見られたものの、複数の仮足を伸ばした異常な形態で伸展した。これらの結果は、Rho キナーゼによるミオシン IIA の時空間的な 2 重リン酸化が正常な細胞の伸展に関わっていることを示す。また、MRC-5 を SV40 で形質転換した MRC-5 SV1 TG1 細胞では移動時の前方のラメラにおいて RLC の 2 重リン酸化が見られなかった。ラメラにおける RLC の 2 重リン酸化はノーマルな繊維芽細胞に特有のものである可能性が考えられる。

本研究の結果から、Rho キナーゼにより高度に活性化されたミオシン IIA が強い収縮力で内側に引っ張った F-アクチンをミオシン IIB が安定化することで環状の構造を形成し、正常な細胞の伸展が行われるというモデルを提案した。また、ミオシン IIB が細胞膜直下の F-アクチンを安定化することで伸展を抑制し、細胞の極性形成と形態維持を行っている」と推論した。この機構は細胞が移動する過程においても同様に働くと考えられる。今後、細胞移動におけるミオシン II アイソフォームの機能の詳細が解明されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖

副 査 教 授 石 森 浩一郎

副 査 教 授 高 岡 晃 教

副 査 准教授 高 橋 正 行

学 位 論 文 題 名

細胞伸展におけるミオシンⅡアイソフォームの 局在とリン酸化状態に関する研究

細胞の移動は、胚発生、組織の再生、好中球の食作用などの免疫応答、創傷治癒、癌細胞の浸潤・転移など、様々な生命活動において、重要なプロセスである。細胞移動において、アクチンとミオシンからなる細胞骨格が重要な役割を担っている。非筋細胞ミオシンⅡ（以下ミオシンⅡ）は、一対ずつの重鎖、必須軽鎖、調節軽鎖（RLC）からなり、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モータータンパク質である。脊椎動物のミオシンⅡは、RLCのSer19がリン酸化される（一重リン酸化；1P-RLC）とアクチン活性化ATPaseが上昇する。Ser19に加えてThr18もリン酸化された二重リン酸化（2P-RLC）状態になると、アクチン活性化ATPaseがさらに上昇する。これらのリン酸化状態を見分けることが可能な抗体を用いた研究により、細胞内に二重リン酸化されたミオシンⅡが存在することが明らかになり、その働きが注目され始めてきている。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。各アイソフォームが異なるモーター活性を有していること、また、ミオシンⅡAとミオシンⅡBに関しては、それぞれの重鎖のノックアウトマウスが胎生致死になることから、お互いに補うことができない機能を持っていることが予想されているが、現時点では良くわかっていない。

細胞移動において、ミオシンⅡは細胞体の前方への移動と後部の収縮に関与する。しかし、アイソフォームを区別した研究がほとんどないこと、また、ミオシンⅡアイソフォームの時空間的な活性化状態、すなわち、RLCのリン酸化状態の違いに注目した研究もほとんどないことから、細胞移動におけるミオシンⅡアイソフォームの機能の違いに関しては良くわかっておらず、今後の発展が待たれている状況にある。

申請者は、本学位論文でミオシンⅡAとミオシンⅡBが、細胞内のどこで、移動のどの段階で、どのようなリン酸化状態で機能しているのかを解析し、細胞移動時におけるミオシンⅡアイソフォームのそれぞれの機能を明らかにすることを目的に研究を展開した。その結果、繊維芽細胞では、伸展時にラメラにおいて、ミオシンⅡAがRLCの二重リン酸化により高度に活性化されてアクチンフィラメントを内側に動かしアクチンファイバー構造を形成し、ミオシンⅡBがその構造を維持す

ることで、正常に伸展が進行するというモデルを考案した。また、ミオシンIIBが細胞膜直下のF-アクチンを安定化することで仮足の伸展を抑制し、細胞の極性形成と形態維持を行なうことで正常な細胞移動を行う可能性を示した。

申請者は、本論文において、細胞移動の最初の段階である仮足の伸展が全方向に渡って観察できる細胞伸展時におけるミオシンIIアイソフォームの役割に特に注目した。抗体の種類（ウサギIgGとマウスIgG）の組み合わせを工夫して免疫染色すること、さらにアクチンフィラメントを同時に蛍光染色することによって、同一の細胞内におけるミオシンIIAとミオシンIIB、1P-RLCと2P-RLC、アクチンファイバー構造の局在を詳細に解析した。その結果、ヒト胎児肺由来繊維芽細胞MRC-5が伸展する際に、ラメラ部位にアクチンフィラメントが集積して環状の構造を形成し、ミオシンIIBはこの構造の外側には局在せず、その内縁に多く局在すること、ミオシンIIAはそこから外側にも局在することを明らかにした。ミオシンIIBが内側で拡散している細胞では、アクチンの環状構造が形成されないことも見出した。さらに、アクチンの環状構造上でRLCの顕著なリン酸化が見られること、二重リン酸化は一重リン酸化よりも外側で起こっていることを見出した。伸展時にミオシンIIBと2P-RLCの共局在が全く観察されないことから、ミオシンIIAのRLCが二重リン酸化されていると判断した。Rhoキナーゼの阻害剤であるY-27632存在下において細胞を伸展させると、この二重リン酸化が消失し、それに伴いアクチン環状構造と成熟した接着斑が消失した。また、タイムラプス観察により、この時に細胞の伸展速度が上昇し、最終的に異常な伸展形態を導いてしまうことを見出した。以上の結果と既に提唱されているモデルを組み合わせ、申請者は、繊維芽細胞が伸展する際のミオシンIIアイソフォームの役割に関する新しいモデルを提案している。1. アクチン重合による伸展が細胞の周縁で起き、ラメラ部位で張力が発生する。2. ラメラ部位でRhoA/Rhoキナーゼ経路が活性化し、ミオシンIIAのRLCの二重リン酸化を導く。3. 高度に活性化されたミオシンIIAにより、アクチンフィラメントの内側への引き込みと接着斑の成熟が起きる。4. ミオシンIIBにより、アクチンフィラメントが安定化し、環状構造が形成される。これらの過程が秩序だてて進行することにより、細胞は正常に伸展できるというモデルである。

申請者は、さらに、今後の研究の発展につながるいくつかの興味深い発見をしている。1. 細胞形態に極性が生じた細胞では、伸展の止まったと考えられる領域の細胞膜直下にミオシンIIBが局在し、その領域で2P-RLCが局在しないことを見出し、細胞膜の伸展の制御と細胞形態の極性形成にミオシンIIBが関与していることを示唆した。2. 無血清条件下では、RLCの二重リン酸化が起きるが、複数の仮足を伸ばした異常な形態で伸展した。この結果は、基質への接着の刺激に加えて、血清成分由来の刺激によるミオシンIIAの時空間的な二重リン酸化が正常な細胞の伸展に関わっていることを示す。3. MRC-5をSV40で形質転換したMRC-5 SV1 TG1細胞では移動時の前方のラメラにおいてRLCの二重リン酸化が見られなかった。ラメラにおけるRLCの二重リン酸化は正常な繊維芽細胞に特有のものである可能性が考えられ、細胞の不死化や癌化と細胞移動の関係に新たな視点を与える結果である。

本論文で提唱した細胞伸展時におけるミオシンIIアイソフォームの機能は、細胞移動の最初の段階の仮足の伸展時にも当てはめられることが予想され、今後の細胞運動の分子機構の解明の研究に貢献するところが大きい。また、これらの結果は、現段階で、国際誌に一報の原著論文として発表されている。以上のことより、審査員一同は、申請者が、北海道大学博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。