

学 位 論 文 題 名

Studies on Role of 10S form of Nonmuscle Myosin II

(非筋細胞ミオシン II の10S 構造の役割に関する研究)

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）は細胞の運動や形態維持、細胞質分裂に関わっているモータータンパク質である。ミオシン II は 1 対ずつの重鎖、調節軽鎖、必須軽鎖から構成されるヘテロ六量体のタンパク質で、2 つの球状の頭部と 1 本の長い尾部を持つ双葉状の構造をしている。哺乳動物には 3 種類のアイソフォーム、ミオシン IIA、IIB、IIC が存在し、それぞれ異なる機能を持っている。ミオシン II はモノマーでは機能せず、会合してフィラメントを形成することでアクチンフィラメントを動かすモーター機能を発揮できるようになる。この会合能とモーター活性は調節軽鎖のセリン 19 のリン酸化によって制御されている。*In vitro* において、セリン 19 が脱リン酸化された状態ではモーター活性は低く、また尾部領域が折りたたまれたコンパクトな構造を形成する。この構造は一般に 10S 構造と呼ばれている。セリン 19 がリン酸化されるとモーター活性が上昇するだけでなく、折りたたまれていた尾部が伸び、6S 構造と呼ばれる伸びた構造を形成する。フィラメントを形成するためにはこの 6S 構造になる必要がある。現在、10S 構造状態はミオシン II の自己阻害状態だと考えられている。

この 10S-6S 構造変化に関する過去の研究のほとんどは、ミオシン II 同様に *in vitro* において 10S 構造を形成する平滑筋ミオシンを用いて *in vitro* で行われてきた。また、これらの研究では調節軽鎖にのみ焦点が当てられてきた。しかし、平滑筋組織内では 10S 構造状態の平滑筋ミオシンが観察されなかったという報告があり、生体内で 10S 構造が本当に形成されるのかは疑問視されることもある。一方、ミオシン II は細胞内の必要な時に必要な場所で会合し、必要ない時は脱会合するというダイナミックな細胞内動態を示すことから、ミオシン II は細胞内で 10S 構造を形成するだろうと考えられているが、その生理的役割については解明されていない。また、10S 構造形成における尾部領域の重要性についても依然として不明である。

本研究は 10S 構造形成に関わる重鎖の尾部領域の特定と、10S 構造を形成できない変異体の細胞内動態や細胞への影響を解析することで 10S 構造形成の生理的意義を解明することを目的とした。

まず初めに 10S 構造形成に関わる尾部領域の特定を行った。10S 構造を形成するミオシン II および平滑筋ミオシンと、10S 構造を形成しない骨格筋ミオシンおよび心筋ミオシンのアミノ酸配列の相同性比較から 3 か所の領域に着目し、ミオシン IIB におけるそれぞれの領域を骨格筋ミオシンの相当する領域のアミノ酸配列に置換した変異体を作製した。作製した変異体を培養細胞に導入しその挙動を観察した結果、ミオ

シン IIB の 1462-1490 と 1551-1577 の 2 ヶ所の領域が正常な会合能と細胞内局在を示すのに重要であることが明らかとなった。この 2 ヶ所を両方変異させた変異体 (IIB-SK1-2) と野生型 (IIB-WT) を精製しその構造を電子顕微鏡により観察した結果、IIB-WT が 10S 構造を形成する生理的条件下で IIB-SK1-2 は 10S 構造を形成できず、会合してフィラメントを形成することが明らかとなった。また FCS 法を用いた解析を行った結果、FCS 法により細胞抽出液中のミオシン II が 10S 構造か 6S 構造かを簡便に見分けられることを見出し、FCS 法によっても上記の 2 ヶ所の領域が 10S 構造形成に重要であることが確かめられた。

次に 10S 構造形成がミオシン II の会合能および細胞内局在に与える影響について詳しく検討した。FRAP 法および photoconversion 法の結果から、10S 構造を形成できない IIB-SK1-2 は IIB-WT と比べて高度に細胞骨格に取り込まれており、ダイナミクスが失われていることが明らかとなった。また wound healing assay およびタイムラプス観察の結果から、この IIB-SK1-2 は細胞の移動に伴って細胞後方に集積した局在を示すことが明らかとなった。これは細胞骨格に安定に取り込まれてしまうことで細胞前方へのリクルートが阻害された結果と考えられる。

この 2 ヶ所の領域が他のミオシン II アイソフォームでも 10S 構造形成に関与しているかを調べるために、ミオシン IIA で同様の変異体を作製した (IIA-SK1-2)。細胞内局在を観察すると、IIA-SK1-2 も野生型のミオシン IIA (IIA-WT) とは異なった局在を示し、IIB-SK1-2 と同様に集積した局在を示した。このことからこの 2 ヶ所の領域はアイソフォームを問わず 10S 構造形成に重要であることが明らかとなった。さらに IIA-SK1-2 と IIB-SK1-2 の局在の比較から、その集積度合いはもともとのアイソフォームの性質に依存することも明らかとなった。

最後に 10S 構造形成がミオシン II の機能発現にとって重要であるかについて解析を行った。ノックダウン-レスキュー実験の結果から、細胞質分裂にとっては 10S 構造形成は必要ではないことが明らかとなった。次にタイムラプス観察を用いて細胞の運動能について解析した結果、IIB-SK1-2 を発現させた細胞では、IIB-WT を発現させた細胞と比べて移動速度および移動の直進性が大きく増加することが明らかとなった。このような細胞では内在性のミオシン IIA の局在にも影響が見られた。IIB-WT を発現させた細胞では過去の報告同様にミオシン IIA は細胞全体に局在した。一方、IIB-SK1-2 を発現させた細胞では、IIB-SK1-2 が局在した領域からミオシン IIA が排除されていた。これは高度に細胞骨格に取り込まれた IIB-SK1-2 がミオシン IIA の細胞骨格への取り込みを阻害したためだと考えている。また、この阻害がミオシン IIA の正常な機能発現に影響した結果、細胞の運動能が変化したと考えられる。

本研究により、ミオシン II の 10S 構造形成に関わる尾部領域が明らかとなった。また 10S 構造形成は、働きを終えて不活性になったミオシン II が細胞骨格に再度取り込まれることを防ぎ、別の場所へのリクルートに重要であることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	村上	洋太
副査	教授	坂口	和靖
副査	教授	藤田	恭之
副査	教授	佐田	和己
副査	准教授	高橋	正行

学位論文題名

Studies on Role of 10S form of Nonmuscle Myosin II

(非筋細胞ミオシン II の10S 構造の役割に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

非筋細胞ミオシン II (以下ミオシン II) は細胞の遊走や分裂等の形態変化を含む様々な細胞過程に関与するモータータンパク質である。ミオシン II は 1 対ずつの重鎖、調節軽鎖、必須軽鎖からなり、2 つの球状の頭部と 1 本の長い尾部を持つユニークな構造をもつ。ミオシン II はモノマーでは機能することができず、会合してフィラメントを形成することでアクチンフィラメントを動かすモーター機能を発揮する。この会合能とモーター活性は調節軽鎖の Ser19 のリン酸化によって制御されている。In vitro において、Ser19 が脱リン酸化された不活性な状態ではモーター活性は低く、また尾部領域が 2 箇所折りたたまれた 10S 構造と呼ばれるコンパクトな構造を形成する。Ser19 がリン酸化されるとモーター活性が上昇すると共に折りたたまれていた尾部が伸び、6S 構造と呼ばれる構造を形成する。フィラメントを形成するためにはこの 6S 構造になる必要があり、10S 構造状態は不活性なミオシン II の自己阻害構造だと考えられている。この 10S-6S 構造変化に関する研究のほとんどは平滑筋ミオシンを用いて in vitro で行われてきたが、平滑筋組織内では 10S 構造状態が観察されなかったという報告があり、生体内で 10S 構造が本当に形成されるのかは疑問視されることもある。一方、ミオシン II はダイナミックな細胞内動態を示すことから、10S 構造を形成している可能性がある。しかしながら、その生理的役割については未だ明らかにされていない。また、10S 構造を形成する際のミオシン II の尾部領域の重要性についても不明のままである。

申請者は、本学位論文で 10S 構造形成に関わる重鎖の尾部領域の特定を行うこと、さらに 10S 構造を形成できない変異体の細胞内動態や細胞運動に対する影響を解析することで 10S 構造形成の生理的意義を明らかにすることを目的に研究を展開した。

申請者は、初めに 10S 構造形成に関わる尾部領域の特定を行った。10S 構造を形成する非横紋

筋タイプと 10S 構造を形成しない横紋筋タイプのみオシンのアミノ酸配列を比較し、同じタイプで相同性が高く、異なるタイプで相同性が低くなる領域を 10S 構造を形成した際に頭部と相互作用する可能性のある尾部の部分から探し、3 か所の領域に注目した。みオシン IIB におけるそれぞれの領域を骨格筋みオシンの相当する領域のアミノ酸配列に置換した変異体を作製し、それらを培養細胞に導入しその挙動を観察した。その結果、みオシン IIB の 1462-1490 と 1551-1577 の 2 箇所の領域が正常な会合能と細胞内局在を示すのに重要であることを明らかにした。この 2 箇所の領域を変異させた変異体 (IIB-SK1・2) と野生型 (IIB-WT) を昆虫細胞発現系により調製し、精製したみオシン II の構造を電子顕微鏡により観察した。その結果、IIB-WT が 10S 構造を形成する生理的条件下で IIB-SK1・2 は 10S 構造を形成できず、会合してフィラメントを形成することを明らかにした。また蛍光相関分光法 (FCS 法) によって細胞抽出液中のみオシン II が 10S 構造か 6S 構造かを簡便に見分けられることを見出し、この方法によっても上記の 2 箇所の領域が 10S 構造形成に重要であることを確かめた。

次に 10S 構造形成がみオシン II の会合能および細胞内局在に与える影響について検討し、FRAP 法および photoconversion 法の結果から、10S 構造を形成できない IIB-SK1・2 は IIB-WT と比べて高度に細胞骨格に取り込まれてダイナミクスを失うことを明らかにした。また wound healing assay およびタイムラプス観察の結果から、IIB-SK1・2 は細胞の移動に伴って細胞後方に集積し、偏った局在を示すことを明らかにした。みオシン IIA の同様の変異体 (IIA-SK1・2) も同様な集積した局在を示すことから変異した 2 箇所の領域はアイソフォームを問わず 10S 構造形成に重要であることを明らかにした。さらに IIA-SK1・2 は IIB-SK1・2 に比べると少し前方に局在したことから、その集積の程度はもともとのアイソフォームの性質に依存することも明らかにした。

最後に 10S 構造形成がみオシン II の機能発現にとって重要であるかを検討し、ノックダウン・レスキュー実験の結果から、細胞質分裂において 10S 構造形成は必須ではないことを明らかにした。次にタイムラプス観察を用いて細胞の運動能について解析し、IIB-SK1・2 を発現させた細胞では、IIB-WT を発現させた細胞と比べて移動速度および移動の直進性が大きく増加すること、IIB-SK1・2 が局在した領域からみオシン IIA が完全に排除されることを明らかにした。申請者は、高度に細胞骨格に取り込まれた IIB-SK1・2 がみオシン IIA の細胞骨格への取り込みを阻害し、この阻害がみオシン IIA の正常な機能発現に影響した結果、細胞の運動能が変化するのではという興味深い仮説を提唱している。

本学位論文により、申請者はみオシン II の 10S 構造形成に関わる尾部領域を明らかにした。また 10S 構造形成は、機能を終えて不活性化されたみオシン II が再び細胞骨格に取り込まれることを防ぎ、別の場所へリクルートさせるために重要であるという仮説を提唱した。本論文で特筆すべきは、従来、困難と考えられていたリコンビナントの全長みオシン II を昆虫細胞発現系により調製し、変異体 (IIB-SK1・2) が 10S 構造を形成できないことを *in vitro* において確認し、その変異体の細胞内での挙動や、変異体が細胞の運動に関わる過程に及ぼす影響を解析している点である。このことにより、細胞内でのみオシン II の 10S-6S 構造変化と、その細胞運動過程における重要性がはっきりした。本学位論文は、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と考えられる。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。