

論文の内容の要旨

分裂酵母においてII型ミオシンが分裂面に集積する機構の解析

茂木文夫

細胞が分裂し二つの娘細胞を生じる細胞分裂は、全ての生物にとって必須の過程である。動物細胞では赤道面表層にアクチン繊維とII型ミオシンを主成分とする収縮環が形成され、この収縮により細胞質分裂が行われる。収縮環のミオシンはアクチン繊維と相互作用して収縮力を発していると考えられているが、収縮環形成におけるミオシンの役割は不明である。本研究ではミオシンが分裂面へ局在する仕組みと収縮環形成における役割を解析することにより、収縮環形成の時間的・空間的な制御機構を明らかにすることを目的としている。

このため私は分裂酵母を対象生物とし、ミオシン遺伝子の同定とその機能解析を行った。分裂酵母では5種類のミオシン重鎖遺伝子 *myo1⁺* (Toya et al., 2001)、*myo2⁺* (Kitayama et al., 1997)、*myo3⁺* (Motegi et al., 1997)、*myo4⁺* 及び *myo5⁺* (Motegi et al., 2001) が同定されている。このうちII型ミオシン重鎖遺伝子の遺伝子産物 Myo2 と Myo3 は、分裂面に集積しリング構造を形成する。Myo2 と Myo3 は、細胞抽出液中で共通の軽鎖(Cdc4 及び Rlc1)と結合していた。どちらか単独のミオシン重鎖遺伝子変異株では分裂面にF-アクチンリング(収縮環)は形成されるが、二重変異株では分裂面でのF-アクチンの集積はみられなかった。以上の結果は、Myo2-Cdc4-Rlc1 と Myo3-Cdc4-Rlc1 が共同してF-アクチンリングの形成と細胞質分裂に働いていることを示唆する。

分裂期における Myo2 の動態を、GFP-Myo2 発現細胞の経時観察と、抗 Myo2 抗体を用いた間接蛍光抗体法により解析した。Myo2 は間期には特に局在を示さないが、分裂期初期には F-アクチンよりも早く分裂面表層にドット状に一定の幅で集積した。この Myo2 ドットは次第に連結して繊維状の構造を形成し、次いでその幅を狭めて緊密なリングを形成した。アクチン細胞骨格の制御に関与するプロフィリン、トロポミオシン、フォルミンのそれぞれの遺伝子変異株では、F-アクチンリングが形成されないが、分裂面周辺に Myo2 ドットは集積していた。また、分裂期直前の細胞をラトランキュリン A で処理して F-アクチンを破壊し、その後細胞を分裂期に進行させたところ、F-アクチンが無くても Myo2 ドットは分裂面に集積していた。しかしこれらの細胞では、分裂面の Myo2 ドットはリング構造を形成しなかった。これらの結果は、分裂面への Myo2 の集積が、F-アクチン非依存的な表層への集積と、その後の F-アクチン依存的なドットからリングへの構造変化という段階を経て行われることを示唆している。

Myo2 の F-アクチン非依存的な分裂面への局在化には、C 末端の 134 アミノ酸 (Myo2t-3) 領域が必要かつ充分であった。また、Myo2 は分裂期から分裂面に集積し始めるが、Myo2t-3 は間期の細胞でも分裂面に局在できることが明らかになった。温度感受性変異株を用いた細胞周期の同調により、Myo2t-3 は G2/M 期の分裂面表層に局在するが、G1 期の分裂面には局在しないことを示した。細胞分離直後 (G2 期初期) から Myo2t-3 の分裂面への集積が観察されたことから、Myo2t-3 は G2 期を通して分裂面に局在できると考えられる。一方、Myo2 の C 末端 280 アミノ酸 (Myo2t-23) 領域は、Myo2 と同様に G2 期の分裂面には観察されず、分裂期の分裂面には局在していた。従って、間期には Myo2t-3 の N 末側領域 (Myo2t-2) が Myo2t-3 領域の局在化を負に制御していると推測される。Myo2t-3 と Myo2t-2 を別々に発現させても、Myo2t-3 の G2 期分裂面への集積は阻害されなかった。また、Myo2t-2 領域と Myo2t-3 領域の連結部は β ターン構造を作る傾向が強く、折れ曲がった構造をとると予測される。従って、Myo2t-2 と Myo2t-3 は分子内で相互作用している可能性がある。分裂面局在能のある Myo2t-3 は、*in vitro* の実験で生理的イオン強度下において会合した。従って、Myo2t-3 領域は、細胞内でも会合し分裂面に局在するようになると考えられる。以上の結果から、Myo2 は分裂期特異的に Myo2t-3 領域と Myo2t-2 領域との分子内相互作用を解除することで Myo2t-3 領域による分子間での会合を促進し、分裂面に局在するようになることが推測される。

次に Myo2 の分裂面への局在化は、収縮環位置の決定因子 Mid1 に依存していることを明らかにした。*mid1 Δ* 細胞では、Myo2t-3 の G2 期における分裂面への局在化および分裂期での Myo2 の分裂面への局在化がおこらなかった。Myo2t-3 と同様に、Mid1 も F-アクチンおよび

微小管に依存せず G2 期初期から分裂面表層に局在することが示されている(Paoletti & Chang, 2000)。従って、Myo2 は Mid1 による分裂面位置のシグナルを受けて分裂面表層に集積し、その後の収縮環形成を正しい位置に誘導していると考えられる。

Myo2t-3 領域は分裂面への局在化と共に、分裂面での F-アクチン構造の編成にもはたらく可能性が示唆された。Myo2t-3 の過剰発現は、収縮環形成を阻害し、分裂面に F-アクチンの異常なスポット構造を形成させた。従って、Myo2t-3 は Myo2 以外の F-アクチン構造の編成にはたらく因子の機能を阻害していると推測される。また、Myo2t-3 領域に変異を持つ Myo2 を発現している細胞では、変異型 Myo2 は分裂面に局在するが、収縮環は形成されず F-アクチンスポットの形成がみられた。従って、分裂面に集積した Myo2 は、Myo2t-3 領域を介して F-アクチン構造の編成に関与している可能性が推測される。

以上の結果より、Myo2 が分裂面に集積する時期は、分子内相互作用の調節(これによる Myo2 の会合状態の制御)によって決定されると推測される。また、Myo2 は Mid1 依存的に分裂面に集積することで収縮環形成を分裂面に誘導すると同時に、分裂面での F-アクチン構造の編成(スポット構造からリング構造への再編成)にはたらくことで、収縮環形成に寄与していると考えられる。

参考文献

- Toya et al. (2001). *Genes to Cells*. 6: 187-200.
- Kitayama et al. (1997). *J. Cell Biol.* 140: 355-366.
- Motegi et al. (1997). *FEBS Lett.* 420: 161-166.
- Motegi et al. (2001). *Mol. Biol. Cell.* 12: 1367-1380.
- Paoletti & Chang (2000). *Mol. Biol. Cell.* 11: 2757-2773.