

論文の内容の要旨

## MYO18A の生化学的機能解析

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

五十川 泰史

(研究背景) ミオシンは 18 のクラスに分類される巨大な「スーパーファミリー」を形成するタンパク質群である。その中で、ミオシン XVIII は最も新しく同定された 18 番目のクラスに属するミオシンであり、XVIII A と XVIII B ふたつのサブクラスが存在する。ミオシン XVIII A は初め、マウスの骨髄間質細胞に由来する培養細胞から同定され、モーター領域の N 末端側に PDZ (PSD-95/Discs-Large/ZO-1) ドメインを持つという顕著な特徴を持っているため、MysPDZ (Myosin containing PDZ domain) と命名された。マウスにおいてミオシン XVIII A は、間質細胞由来の培養細胞のうち、高い血球分化支持能を持った系統で特に多く発現しているが、筋肉など他の複数の組織においても比較的普遍的に発現している。また、ミオシン XVIII A はヒトとマウスにおいて、 $\alpha$  と  $\beta$ , 2 つのスプライスバリエントを持っている。ミオシン XVIII A $\alpha$  は N 末端側から順に、リジン (K) とグルタミン酸 (E) に富む領域 (KE 領域) と PDZ ドメインを含む特徴的な N 末端領域、モーター領域、1 ヶ所の IQ モチーフ、コイルドコイル、および球状になっていると予想される尾部 (球状尾部) で構成されている。ミオシン XVIII A $\beta$  はミオシン XVIII A $\alpha$  から N 末端領域が欠落した形をしている。一方、ミオシン XVIII B は肺がんの抑制遺伝子の

候補として同定された。ミオシン XVIIIIB はミオシン XVIIIIA と似た構造をしているが、N 末端領域の PDZ ドメインは機能未知のアミノ酸配列に置き換わっている。

特徴的な N 末端領域に加え、クラス 18 に属するミオシンは、モーター領域に他のクラスには見られない特徴的配列を持っている。例えばスイッチ 2 ループは ATP 加水分解活性にとって必須の役割を担っており、ミオシンスーパーファミリーの間で最も高度に保存されている配列の一つであるが、クラス 18 に属するミオシンはこのスイッチ 2 ループの直後に、他のどのクラスにも見られない特徴的な挿入配列を持っている。実際、モーター領域の配列をもとに進化系統樹を作成すると、ミオシン XVIII はミオシンスーパーファミリーの中で他のクラスから最もかけ離れたミオシンの一つであることがわかる。

ミオシン XVIIIIA の発現量は、それを発現している間質細胞の血球分化支持能と相関があることが報告されている。また、ミオシン XVIIIAB は調べられた限りすべての間質細胞由来の培養細胞の系統で発現しているが、ミオシン XVIIIA $\alpha$  はそのうちの一部でのみ発現している。さらに、マクロファージ様の細胞に分化する培養細胞においては、分化誘導後にミオシン XVIIIA $\alpha$  の発現が誘導される。このように、ミオシン XVIIIIA は血球分化に関与していることが示唆されているが、その細胞内機能および生化学的性質に関しては全く知見が得られていない。そこで本研究ではヒトのミオシン XVIIIIA である MYO18A に関して、N 末端領域およびモーター領域に注目して機能解析を行った。

(結果) MYO18A の機能に関する知見を得るため、MYO18A $\alpha$  の全長の N 末端に GFP を融合したコンストラクト(GFP-M18A)を作成し、その細胞内局在を観察した。GFP-M18A は細胞質中に広く分布していたが、その一部分はアクチン繊維と共局在していた。この結果から、MYO18A $\alpha$  が細胞内でアクチン繊維と相互作用する可能性が示唆された。

次にアクチン繊維との共局在に対する MYO18A の球状尾部の関与を検証するため、MYO18Aα の全長から頸部と球状尾部を除き、N 末端領域とモーター領域のみからなるコンストラクト (GFP-ND-motor)を作成し、細胞内局在を観察した。GFP-ND-motor は核内および細胞質中にもほぼ均一に分布したが、一部はアクチン繊維と明確に共局在した。このことから、アクチン繊維と共局在するためには MYO18Aα の球状尾部は必要ではなく、N 末端領域とモーター領域のみで十分であることが示された。次に、GFP-ND-motor からさらに N 末端領域を欠失し、モーター領域のみからなるコンストラクト(GFP-motor)を作成した。観察の結果、GFP-motor は細胞質中に拡散的に分布するのみで、アクチン繊維とは共局在しなかった。この結果から、MYO18A の N 末端領域にアクチン結合部位が存在するという可能性が示唆された。

MYO18Aα の尾部にはコイルドコイルが存在するため、MYO18Aα は二量体を形成すると予想される。一方、GFP-ND-motor および GFP-motor はいずれもコイルドコイルを含まず、単量体であると予想されるため、MYO18Aα 全長における N 末端領域やモーター領域の本来の活性を厳密には保持していない可能性がある。よってより全長に近い形態を持つと予想される heavy mero myosin (HMM)様のコンストラクトを作成した。HMM とはミオシン II において、N 末端のモーター領域、IQ 領域、および短いコイルドコイルを含む部分を指す名称である。MYO18Aα においては、N 末端領域、モーター領域、IQ 領域、およびコイルドコイルの一部を含む部分を HMM とする。MYO18Aα の HMM コンストラクトの C 末端には、短いコイルドコイルを安定的に二量体化させるため、GCN4 のロイシンジッパー配列を融合し、ロイシンジッパーの C 末端に GFP を融合した(HMM-L-GFP)。GCN4 のロイシンジッパー配列は、安定な二量体を形成することが報告されているアミノ酸配列である。HMM-L-GFP は細胞内で M18A-GFP より明確にアクチン繊維と共局在した。次に、HMM-L-GFP コンストラクトから N 末端領域を欠失した HMMΔN-L-GFP コンストラクトを作成した。HMMΔN-L-GFP は細胞内でアクチ

ン繊維と共局在せず、細胞質中に拡散的に分布した。

次に HMM-L-GFP, HMMAN-L-GFP および N 末端領域のみからなる ND-L-GFP を HeLa で発現し、アクチン繊維との共沈降実験を行ったところ、N 末端領域に ATP 非依存的なアクチン結合部位が存在することが示された。また、モーター領域は ATP の非存在下においてもアクチン繊維と共沈降せず、ミオシンモーターとしての活性を保持していない可能性も示唆された。

さらに N 末端領域の欠失変異体を大腸菌で発現して共沈降実験を行うことで、より詳細にアクチン結合部位を探索した。その結果、アクチン結合部位は N 末端領域のうち KE 領域と PDZ ドメインの間の領域(MD 領域と命名した)に存在することが示された。この領域の配列は、既知のアクチン結合部位とは相同性が見られなかった。

また、共沈降実験の結果から、MYO18A のモーター領域がミオシンモーターとしての活性を保持していない可能性が示唆されたが、このことをより直接的に検証するため、モーター領域の ATP 加水分解活性を測定した。MYO18A の N 末端領域およびモーター領域を含むコンストラクトを昆虫細胞において発現、精製し、ATP 加水分解活性を測定したところ、滑り運動を駆動するのに十分な活性はほとんど検出されなかった。これらの結果から、MYO18A のモーター領域は他のクラスのみオシンのモーター領域と異なり、アクチン繊維に沿った滑り運動をする活性は持っていないと考えられる。

(考察) 本研究では、MYO18A の N 末端領域の MD に ATP 非依存的アクチン結合部位が存在することを示した。この MD は既知のいかなるアクチン結合部位とも相同性が見られない。尾部に第二のアクチン結合部位を持つミオシン I やミオシン III は単量体であるのに対し、MYO18A は二量体を形成するため、2 個の ATP 非依存的アクチン結合部位が 1 個の二量体上に存在することになる。よって MYO18A は細胞内において、アクチン繊維同士を安定的に架橋することで、アクチン繊維による高次構造の形成に関与

している可能性がある。

また、MYO18A は非常に安定的にアクチン繊維と結合することが示されたが、細胞内において MYO18A がアクチン繊維と結合したまま解離しないとは考えにくく、結合活性に対して何らかの制御機構が働いている可能性が高い。たとえば球状尾部を欠失した HMM-L-GFP は、球状尾部を含む GFP-M18A よりも明確にアクチン繊維と共局在した。よって球状尾部は、MYO18A のアクチン結合活性を制御している可能性がある。また、N 末端領域に存在する PDZ ドメインに対しては、何らかのタンパク質が相互作用する可能性が高く、そのタンパク質が MYO18A の ATP 非依存的アクチン結合活性を制御している可能性もある。いずれにせよ、MYO18A の ATP 非依存的アクチン結合活性の制御機構に関しては、さらなる研究が必要である。