

論文の内容の要旨

Identification and characterization of human unconventional myosin-interacting proteins

(ヒト非古典的ミオシン相互作用因子の探索

及びその機能解析)

井上 毅

真核細胞において、オルガネラなどの構成成分を細胞内に秩序立てて配置し、その形態を維持しているのは「細胞骨格」と呼ばれる微小管、アクチンフィラメント、中間径フィラメントである。そして微小管、アクチンフィラメント上を運動し、細胞内の「力」や「動き」を司っているのが、ミオシンをはじめとする「モータータンパク質」群である。

ミオシンは、ATP加水分解による化学的エネルギーをアクチンフィラメントに沿った力や動きといった力学的エネルギーに変換するモータータンパク質で、18クラスにわたる広範なサブファミリーを形成している。ヒトゲノムの解析により、ヒトには12クラスにわたり少なくとも40のミオシン遺伝子が存在していることが明らかになっている。このなかで古典的ミオシン (conventional myosin) と呼ばれる骨格筋より発見されたII型ミオシンについては、筋肉における筋収縮以外にも非筋細胞における細胞運動や細胞分裂に関与するなど多くの知見が得られている。一方、II型ミオシン以外の非古典的ミオシン (unconventional myosin) と呼ばれるミオシンに関しては、細胞運動や小胞輸送などの機能が明らかになりつつある一部のミオシンを除き、大半は細胞内における生理学的機能が明らかになっておらず、近年その研究に注目が集まっている。

ミオシンサブファミリー間において保存性の高いモーター領域はアクチンと相互作用しATPを加水分解して力を発生するという各ミオシンに共通した役割を果たしている。一方、多様性に富む尾部領域は他のタンパク質や細胞膜などと結合することによりそれぞれのミオシン独特の機能を担っていると考えられている。

本研究の目的は、尾部領域を通して相互作用するタンパク質群のハイスループットスクリーニングにより、これら非古典的ミオシンが細胞内でどのようなタンパク質と相互作用し、その結果生じる複

合体がどのような機能をはたしているかを明らかにすることである。私は、17 クラスの非古典的ミオシンのうち、特異な構造あるいは性質を持つ VI 型と XVIIIIB 型ミオシンに着目し研究を行った。

1. ミオシン VI と KPI-2 の相互作用

ミオシン VI は他のクラスのみオシンには見られないアクチンフィラメントのマイナス端方向に運動するという特性を利用し、細胞表層下のアクチンフィラメントの網目構造内を主にプラス端が配向している細胞の外側からマイナス端が配向している内側に向けて物質を輸送する。すなわち、ミオシン VI は、クラスリン被覆小胞の形成や、クラスリン脱被覆後の非被覆小胞の初期エンドソームへの輸送といったエンドサイトーシス初期経路において機能していると考えられている。同時に、ミオシン VI は、ある種の細胞ではゴルジ体に局在し、ゴルジ体の形態維持や形質膜へのエキソサイトーシスにおいて機能していることも示唆されている。

私は、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを用いた酵母 two-hybrid スクリーニングから哺乳類細胞 two-hybrid アッセイ, GST pull-down, 免疫共沈降実験といった *in vivo*, *in vitro* における一連の結合実験により、ミオシン VI の新規相互作用因子として膜貫通型セリン/スレオニンキナーゼ KPI-2 を同定した。これまでの知見により、KPI-2 は広範な組織で発現しており、神経細胞において Cyclin dependent kinase 5/p35 によって活性が制御されることが分かっているが、その細胞内機能の詳細は明らかになっていない。そこで、KPI-2 の細胞内機能解明を目的とし、まず免疫蛍光染色によって過剰発現体や細胞内在性の KPI-2 の細胞内局在を解析したところ、KPI-2 は細胞質全体にドット状に分布し、特に核近傍に凝集した局在を示した。様々なオルガネラマーカークーやトランスフェリンを指標としたクラスリン依存的エンドサイトーシス小胞との局在比較より、この核近傍の構造は初期/リサイクリングエンドソームであることを明らかにした。さらに siRNA による細胞内在性 KPI-2 の発現抑制を行いその表現型を解析したところ、核近傍のリサイクリングエンドソームへのトランスフェリンの凝集阻害を認めた。この KPI-2 の発現抑制による表現型の変化は、外因的に KPI-2 を発現させることで解消された。一方、細胞のトランスフェリン取り込み及び放出の経時的定量的解析により、KPI-2 の発現抑制はトランスフェリン放出には顕著な影響を与えないものの、その取り込みを減少させることを明らかにした。これらの結果は、KPI-2 が細胞内小胞輸送経路、特に初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへの輸送において重要な働きをしていることを示唆している。

先行研究で同定されたミオシン VI 相互作用因子 Dab2, GIPC, Optineurin は、それぞれミオシン VI とクラスリン被覆小胞、クラスリン脱被覆後の非被覆小胞、ゴルジ体で共局在している。このことは、エンドサイトーシス経路の初期過程やゴルジ体からのエキソサイトーシス経路における細胞内小胞輸送にミオシン VI が関与していることを示すものである。しかし、本研究で同定した KPI-2 の解析結果は、ミオシン VI/KPI-2 複合体がエンドサイトーシス小胞輸送経路の比較的遅い過程である初期/リサイクリングエンドソームでの輸送経路で機能している可能性を示唆している。これは、動態や構造の詳細が明らかになっているエンドサイトーシス初期経路に比較して知見の限られているエンドサイトーシスの後期経路、特に受容体タンパク質のリサイクリング経路について、新たな知見を与えるものである。

2. ミオシン XVIIIIB (MYO18B) と Sug1 の相互作用

新規遺伝子 *MYO18B* は、肺がん細胞の約 50% で不活化していること、及び遺伝子を肺がん細胞株に過剰発現させることによりがん細胞の足場非依存性増殖を抑制することから、肺がんの発生・進展に関わる重要な新規がん抑制遺伝子であると考えられている。*MYO18B* 遺伝子産物である MYO18B はクラス 18 に分類されているミオシンであり、尾部のほかにもモーター領域の上流に機能未知のドメインを持つ特異なミオシンであるが、その細胞内機能に関してはほとんど知見が得られていない。私は、細胞内機能の解明を目的として MYO18B と相互作用する因子を酵母 two-hybrid スクリーニングによりヒト肺の cDNA ライブラリーより探索し、その結果、相互作用候補タンパク質の一つとして 26S プロテアソーム構成要素 Sug1 を同定した。

ミオシン VI と同様の *in vivo*, *in vitro* における結合実験により両者の細胞内における相互作用を確認した。また細胞内局在解析により両者は細胞内で共存していることを示した。26S プロテアソームは主としてユビキチン化された標的タンパク質を ATP 依存的に選択的に分解する、総分子量約 2.5 MDa に及ぶ巨大なプロテアーゼ複合体である。p53 をはじめとする主要ながん抑制遺伝子産物の多くがユビキチン-プロテアソームシステムの制御の下、秩序だった分解を受け、その発現レベルが厳密に制御されていることが一般的に知られている。本研究ではプロテアソーム阻害剤や siRNA による Sug1 の発現抑制によって MYO18B タンパク質レベルの上昇が見られたことから、両者が機能的に相互作用していることがわかった。さらに、*in vivo* ユビキチン化実験により MYO18B は細胞内でユビキチン化を受けることも明らかにした。これらのことから、MYO18B の機能がプロテアソームによる分解で調節されていることを示すことができた。

本研究において、私は、非古典的ミオシンとその相互作用因子の細胞生物学的解析から、細胞内における非古典的ミオシンとそれが織り成すネットワークの機能の一端を明らかにした。