

論文の内容の要旨

論文題目 細胞骨格ダイナミクス維持基盤としての α B-crystallin のシャペロン機能の解析

Analysis of chaperone function of α B-crystallin as sustainable basis
of cytoskeleton dynamics

氏名 藤田 恵理

第1章 序論

脊椎動物では歩行、走運動、水泳、飛行などの運動は全て骨を足場とした骨格筋の速い収縮に依存し、心臓のポンプ機能をうみだす自律的な拍動は心筋細胞の協調した収縮に依存する。どちらの横紋筋の収縮も actin と myosin タンパク質がつくる両フィラメントの高度に組織化された滑り運動によって起こる。骨格筋の収縮が繰り返し可能になるには、収縮による骨格筋細胞の形態変化を可能にし、かつ戻すことができる柔軟な構造と、収縮を張力へ変換するための収縮に抗する構造的な基盤が必要である。このように、細胞形態を形作る細胞骨格は、特異的なモータータンパク質と協働することにより細胞運動や収縮による張力発揮をおこなうことができる。細胞骨格は伸縮を生み出し、かつ伸縮に抗する繊維構造体である。そのような相反する機能は、細胞骨格自体が動的な特性を持ち、その構成単位が速い速度でダイナミックに入れ替わると同時に繊維構造を維持構築しているというきわめて特異的な性質をもつからである。

微小管は、有糸分裂、細胞運動、細胞内輸送、神経機能などの細胞機能に関わるが、骨格筋では筋芽細胞から筋線維への融合時の極性維持に必須であることや actin フィラメントとの相互作用により細胞骨格のダイナミクスを維持していることが明らかにされている。tubulin/微小管は自己の制御をタンパク質の重合・脱重合の状態で行い、細胞の動的な状態を維持していると考えられる。このように細胞は、繊維でありながらも不安定で動的な細胞骨格の性質を利用して、細胞の形態変化や、運動を可能にする。骨格筋細胞が伸張・収縮による長さの変化に対応できるのは、内部に高度に組織化されている細胞骨格がこの不安定性をもつからであると考えられる。そして、常に拍動する心筋細胞や持続的に収縮する骨格筋(とりわけ遅筋)ではこうした細胞骨格の動的特性(ダイナミクス)の維持が収縮機能に必須であると思われる。

α B-crystallin は筋線維タイプ依存的に発現が高く、代謝活性の高い組織で発現が高い。ストレスタンパク質は筋収縮の時間の延長に伴う代謝の亢進、温度の上昇やエネルギーの枯渇等で増大する変性(中間体)のタンパク質の蓄積を防ぎ、タンパク質の構造を正常化するか、もしくは分解系へ移行させるタンパク質ケア

システムの分子基盤をなすと考えられる。HSPは運動中の筋の適応や機械的刺激による細胞内環境の維持に重要であることを示している。 α B-crystallinの発現量の高い心筋、遅筋では常に張力が発生し、微小管にとってもストレス負荷がかかっていると考えられる。特に細胞内で動的に重合、脱重合を繰り返している微小管・tubulinはその構造から引っ張り張力に対して弱いとされている。骨格筋に高発現する α B-crystallinは、筋収縮活動時に動的に筋細胞構造を維持している細胞骨格のケアシステムを担っている可能性がある。

本研究の目的

このような背景の下に、本研究では α B-crystallinが細胞骨格ダイナミクスを維持するメカニズムの解明を目指して、主に2つのアプローチを用いて研究した。第2章で細胞骨格系タンパク質 tubulin に対する α B-crystallinのシャペロン活性メカニズムを明らかにすることを目的とした。つぎに第3章で持続的収縮刺激に対する応答機構としての α B-crystallinの心筋でのダイナミクスを可視化することを目的とした。

第2章 α B-crystallin欠失変異体を用いたtubulinへのシャペロン活性部位の検討

まず、 α B-crystallinの細胞骨格 tubulin に対するシャペロン活性部位と作用様式を明らかにした。 α B-crystallinの欠失変異体を用いた実験の結果から、tubulinに対するシャペロン活性には α B-crystallinのC末端側が関与することが明らかになった。一方、ADH、CS等のモデル基質に対するシャペロン活性には α B-crystallinのN末端が関与していた。さらに、 α B-crystallinのtubulinに対するシャペロン活性メカニズムは、NaCl添加により静電的な相互作用をうち消した時、tubulinはNaClの濃度依存的に α B-crystallinのC末端領域から解離した。

これらの結果から得られた考察を以下に述べる。tubulinに対する作用部位であった領域はsHSPに保存されている α -crystallin領域を含んでおり、この点から、この結合がsHSPに普遍的なものであることが示唆される。この領域には α B-crystallinの3つのリン酸化領域はいずれも含まない。actinの脱重合に対する α B-crystallinの作用はリン酸化依存性であるといわれているが、シャペロン活性にはリン酸化は必ずしも必要ではない。tubulinの凝集抑制にもリン酸化による制御の可能性は低いと考えられる。tubulinへのシャペロン活性にはsHSP間で保存性の高い α -crystallinドメインが重要であり、その結合には静電的な結合が関与すること、また α B-crystallinのシャペロン活性部位は基質により異なる複数の部位があることを本研究において示した。

α B-crystallinはtubulinの熱誘導性の凝集を抑制すること、とくにnativeなtubulinではなく変性中間体に結合し、MAPs (microtubule associated proteins)を介して微小管に結合しているといわれており、当研究室で報告している。変性tubulinはnativeなtubulinの重合を阻害するといわれているので、 α B-crystallinの役割はnativeなtubulinの量を維持することにより微小管を保護する可能性がある。すなわち α B-crystallinはnon-nativeなtubulinに結合して微小管の脱重合を抑制し、変性tubulin二量体の構造異常を避けることにより異常な微小管形成を抑制するのだろう。細胞骨格の役割は、タンパク質のホメオスタシスを通じて達成さ

れる構造のホメオスタシスを保持することである。sHSP は心筋や骨格筋(遅筋)に構成的に発現しているが、その理由は明らかにされていなかった。レンズの α -crystallinとは異なり、sHSP の α -crystallinドメインは心筋や骨格筋で細胞骨格のダイナミクスを維持しているのだろう。actin/actin フィラメントのトレッドミリングと tubulin/微小管細胞骨格の性質には α -crystallinドメインをもった sHSP が必要であることが本研究から示唆された。sHSP はタンパク質の構造の初期変化を認識するといわれている。重合の際のタンパク質の構造変化を変性とは呼ばないまでも、そのコンフォメーションは少なからず変化する。細胞骨格のダイナミクスは sHSP により保持されていると考えられる。

第3章 心筋細胞での α B-crystallinのダイナミクス

つぎに、 α B-crystallin の心筋細胞収縮時の挙動を時間的・空間的に明らかにした。GFP- α B-crystallin は生心筋細胞内で横紋構造を示し、 α B-crystallin は収縮という機械的刺激の過程で Z 帯に存在していた。生細胞内での α B-crystallin を可視化し、FRAP 分析・FLIP 分析により、収縮中の心筋細胞の横紋構造に α B-crystallin が非常に速い速度で相互作用することを示した。一方、熱ストレス時には、 α B-crystallin の細胞内でのダイナミクスは劇的に低下する。

これらの結果から、 α B-crystallin は細胞骨格系タンパク質と動的に相互作用し、恒常的に機械的刺激を受けている生心筋細胞内で Z 帯に存在するタンパク質とダイナミックに相互作用していることが示唆された。骨格筋の収縮過程には細胞骨格系タンパク質の再構築が必須である。 α B-crystallin の発現が高い心筋、骨格筋などにおいては、収縮機能を発揮する上で重要なその動的構造を維持するために、3 種類の細胞骨格のいずれとも相互作用する α B-crystallin のシャペロン機能が必要とされることが考えられる。

第4章 論議

2つのアプローチから得られた知見を総括する。本研究で適度に細胞(構造を)安定化しながら動的性質を保持し続けることは、細胞外からのストレスシグナルに応答することで可能になる。細胞のストレス応答系(ストレスタンパク質発現)はストレス応答時に機能するだけでなく、非ストレス時においても細胞の生存を維持するのに必須である。細胞の形態や運動を構成する細胞骨格系タンパク質は細胞内で固定された物ではなく動的な骨格構造をもつとともに運動する性質を持つが、ストレスタンパク質 α B-crystallin はその細胞骨格の動的特性を安定化しているのだろう。そしてこの機能を維持することがストレスタンパク質 α B-crystallin の機能と言えるのではないだろうか。すなわち、張力発揮システムの維持には細胞骨格ダイナミクスが必須であり、分子シャペロン α B-crystallin はそのシステムの維持に必要であること、収縮活動依存的に発現が亢進するストレスタンパク質の発現を誘導する環境刺激が重要であることが示唆される。その環境刺激こそが身体運動にほかならない。身体運動は細胞の環境に働きかけ、細胞の応答性を高める刺激である。このような機構により身体運動は細胞内の新陳代謝の回転率を上昇させるという人間の健康にとって重要な意義を持つ。本研究で、分子シャペロン α B-crystallin の細胞骨格ダイナミクス維持基盤としてのシャ

ペロン活性の研究から、この活性が健康維持・運動刺激へ応答し細胞骨格のリモデリングに必須であるという新たな機能の一端が解明されたと思われる。