

論文の内容の要旨

細胞質分裂期における非筋型ミオシン II の機能制御機構の研究

Regulatory mechanism of non-muscle myosin II during cytokinesis.

上原亮太

多くの細胞運動現象に細胞骨格系モータータンパク質の働きが関与している。ミオシン II (以下ミオシン)はアクチン繊維上を運動して収縮力を発生するモータータンパク質であり、種々の筋細胞や非筋細胞で形成される収縮構造の機能的、構造的な主要構成要素として力発生を担っている。非筋細胞ではストレスファイバーや収縮環のような収縮構造は必要なときに一過的に形成されて、役目を果たすと速やかに解体される。この点が筋細胞において長時間安定に存在している収縮構造と大きく異なる。このことから、非筋細胞のミオシンには収縮構造の構築、解体に伴ってその局在と機能をダイナミックに制御される機構が備わっていると考えられる。非筋型ミオシンの一過的な機能発現の制御機構を解明することで、非筋細胞における収縮現象の調節機構全般についての深い洞察が得られると期待される。本研究では非筋細胞の収縮現象の中でも特にダイナミックな細胞質分裂期のミオシン制御に着目して実験を行なった。

本論文の Part1 では、ミオシンの一過的機能発現調節に調節軽鎖 (RLC) のリン酸化が関与している可能性に着目して、ウニ卵を用いて実験を行なった。Part2 では細胞質分裂期のミオシンのダイナミクスに着目して、ミオシンが収縮環形成域に集積する過程を、ハエ S2 細胞を使って調べた。

Part1 ウニ卵内のミオシン II 調節軽鎖リン酸化のミオシン局在および機能制御における役割

In vitro の実験で、動物の非筋型ミオシンはその調節軽鎖 (RLC) の Ser19 のリン酸化 (一リン酸化) により、①重鎖頭部の ATPase 活性が上昇すること、②アクチン繊維上を運動できるようになること、③重鎖尾部が伸長してフィラメントを形成できるようになることが示されている。このうち①と③については RLC の Ser19 に加えて Thr18 がリン酸化 (二リン酸化) されることでさらに促進されることが報告されている。いくつかの先行研究で収縮環にリン酸化 RLC が濃縮して

いることが報告され、RLC リン酸化を介したミオシンの機能調節によって細胞質分裂を制御する機構の存在が示唆された。本研究では、その機構の全容を知るために、未だに明らかにされていない以下の点に着目して実験を行なった。

- ・ 細胞質分裂期における RLC の一リン酸化と二リン酸化、それぞれの重要性
- ・ RLC リン酸化を制御するシグナル伝達系

まず、ウニ卵における RLC リン酸化の細胞質分裂制御への関与を調べるために、分裂溝における RLC のリン酸化状態を生化学的・細胞学的手法で解析した。分裂溝の RLC は表層の他の領域に比べて際立ってリン酸化されており、収縮開始前から終了時まで一貫して主に一リン酸化されていることが分かった。次に RLC を *in vitro* でリン酸化することが報告されているプロテインキナーゼの阻害剤のウニ卵細胞質分裂への影響を調べたところ、MLCK の阻害剤である ML7、ML9、MLCK の autoinhibitory domain を模したペプチド、また ROCK の阻害剤である H1152 で第一卵割が阻害された。一方で別の ROCK 阻害剤である Y27632 はウニ卵 RLC キナーゼ活性阻害能を持っていたが卵割には無影響であった。H1152 に ROCK 以外のターゲットが存在することが示唆された。卵割に影響を及ぼした阻害剤のうち ML7 と H1152 を用いてさらに解析を行ったところ、両者とも分裂溝の RLC のリン酸化を抑えること、ミオシンの収縮環へのリクルートを阻害すること、また濃度依存的に収縮環の収縮速度を低下させることが分かった。以上のことから MLCK を含む少なくとも2種類以上の RLC キナーゼ (H1152 は本実験で使用した濃度では MLCK を阻害しない) により分裂溝ミオシンの RLC がリン酸化されること、そのリン酸化がミオシンの集積および収縮環の収縮のステップに重要であることが示唆された。

Part2. *Drosophila* Schneider2 細胞分裂期における細胞赤道表層へのミオシン集積のダイナミクス

細胞質分裂期におけるミオシンの細胞赤道表層への集積は、収縮環形成過程の最初期におこる重要なイベントである。ミオシン集積過程のモデルとしては①表層を伝わって赤道面上に能動輸送で集積する、②分裂装置の微小管を伝わって輸送されてくる、もしくは③細胞質で拡散しているものを赤道表層でトラップして集積する、などが考えられるが、そのどれ(または別の説)が正しいかは明らかになっていない。また分裂溝ミオシンの RLC がリン酸化されていることが重要であることは Part1 でも触れたが、RLC がいつどこでリン酸化されるかということも解決すべき重要な課題である。上記の説①や②の場合 RLC をリン酸化されたミオシンが選択的に輸送されている可能性が考えられ、③では拡散により無選択に赤道表層にたどりついた分子がそこでリン酸化される可能性が考えられる。

ミオシンの赤道表層への集積過程を追うために GFP 標識したミオシンを発現する S2 細胞を用いて生細胞蛍光観察を行なった。キモグラフ解析によりミオシンが赤道に集まる時期の表層でのミオシンの動きをトレースすると、表層に沿った動きは見られず、ミオシンは主に細胞質から赤道表層に供給されることが示唆された。

次に FRAP 解析により赤道表層におけるミオシンの分子交換のダイナミクスを調べると、ミオシン集積期にあたる metaphase-anaphase transition 時に交換が遅くなることが分かった。細胞質ミオシンは表層ミオシンよりダイナミックであるため、表層からのミオシンの脱離過程が FRAP の律速になっていると考えられるので、ミオシンは metaphase-anaphase transition 時に表層でより安定に存在できるようになることが示唆された。また RLC の擬似リン酸化変異体である RLC20E21E-GFP は収縮環において WT の RLC よりも安定であった。逆に RLC の擬似脱リン酸化変異体である RLC20A21A-GFP はより不安定であった。このことからミオシンは RLC のリン酸化により赤道表層におい

て安定化されて、集積するというモデルが考えられる。

RLC リン酸化がどのようにミオシンを安定化させるか明らかにするのが次の課題である。RLC リン酸化が *in vitro* でミオシンフィラメントを安定化することから、赤道表層におけるミオシンの安定化にフィラメント形成が関与するかを調べた。フィラメント形成に必要な coiled-coil 領域の C 末端を欠損した重鎖変異体 (Δ Cterm) は赤道表層で安定化されず、集積は起こらなかった。このことから RLC リン酸化はフィラメント安定化を介して作用している可能性が示唆された。さらにミオシン結合因子のミオシン安定化への寄与の可能性を検討した。アニリンは RLC リン酸化ミオシンに選択的に結合する収縮環構成因子であり、RLC リン酸化を介したミオシンの安定化に関与することが期待されたが、アニリンの RNAi は metaphase-anaphase transition 時のミオシンのダイナミクスおよび局在には無影響であった。今後の展望としてはミオシン安定化因子を RNAi スクリーニングを用いて網羅的探索する方法が有効であろう。