

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570129

研究課題名（和文）2型ミオシンアイソフォームの細胞内動態の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of intracellular dynamics of type 2 myosin isoforms

研究代表者

高橋 正行（TAKAHASHI MASAYUKI）

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：50241295

研究成果の概要（和文）：不活性化ミオシン II は尾部が折り畳まれたコンパクトな構造（10S 構造）をとることが *in vitro* の研究により提唱されているが、その生理的意義は解明されていない。本研究により、10S 構造を形成できない変異ミオシン II は脱会合しにくくなり、細胞が遊走する際に後方に蓄積されることがわかった。10S 構造は不活性化になったミオシン II が再び会合するのを防ぎ、新たな細胞内領域にリクルートされることを可能にする役割をもつということを提唱した。

研究成果の概要（英文）：Myosin II forms a folded conformation (10S form) in the inactivated state; however, the physiological significance of the 10S form is still unclear. To investigate the role of 10S form, we generated a mutant of myosin II, which cannot fold into a 10S form under physiological condition. The mutant myosin II was less dynamic by stabilizing the filamentous form, and accumulated in the posterior region of migrating cells. We proposed that the 10S form is necessary for maintaining inactive nonmuscle myosin II in an unassembled state and for recruitment of nonmuscle myosin II to a specific region of the cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ミオシン、細胞運動、細胞骨格、フィラメント、アイソフォーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 2型ミオシンに属する非筋細胞ミオシン II（以後、ミオシン II）は、細胞形態の変化と維持に重要な役割を示す。ミオシン II が機能するためには、自己会合してフィラメントを形成することが必須である。ヒトを含む哺乳動物には3種類のミオシン II 重鎖からなるアイソフォーム（IIA, IIB, IIC）が存在し異なる

機能を担っていることが予想されている。各アイソフォームが細胞内において、いつどこで機能できるようになるのか、すなわち、それらの細胞内動態の制御機構は未解決のままである。

(2) ミオシン II のモーター活性とフィラメント形成は、その調節軽鎖のリン酸化によって

可逆的に制御されている。調節軽鎖の Ser19 がリン酸化されるとモーター活性が上昇する。それと同時に、尾部が折り畳まれたコンパクトな 10S 構造から尾部が伸びた 6S 構造に変化し、フィラメントが形成できるようになると考えられている。この説は、主に平滑筋ミオシンを用いた *in vitro* の実験によって得られた結果から考えられたものであり、細胞内で実際に 10S \leftrightarrow 6S のコンフォメーション変化が起きているかどうかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

3 種類あるミオシン II アイソフォーム (IIA、IIB、IIC) のうち、脊椎動物に発現している IIA と IIB が、細胞内においていかにして時空間的にフィラメントを形成し機能するかを明らかにすることを目的とした。以下の 3 点を、特に重鎖の尾部に重要な領域のある可能性に注目し研究を進めた。

- (1) ミオシン II の各アイソフォームの自己認識に関わる分子基盤を明らかにする。
- (2) ミオシン II の各アイソフォームの細胞内局在に関わる分子基盤を明らかにする。
- (3) 細胞内での 10S \leftrightarrow 6S のコンフォメーション変化の実態を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ミオシン IIA と IIB の様々な C 末端尾部フラグメントを大腸菌発現系により調製した。精製したフラグメントの CD スペクトルを測定し、それらの構造の比較を行なった。さらに、測定温度をスキャンすることにより、フラグメントの熱安定性を解析した。
- (2) ミオシン IIA と IIB、及びそれらの C 末端領域のキメラ変異体の重鎖の N 端に EGFP または mCherry を融合したタンパク質を培養細胞に発現させ、それらの局在を解析した。間期の細胞においては、移動時と停止時の細胞を形態により区別して解析した。細胞質分裂時においては、収縮環への局在に加えて、両極に伸展する領域にも注目して解析した。
- (3) ①重鎖に変異を導入した全長ミオシン II の *in vitro* での解析を行なうために、ミオシン II の昆虫細胞発現系を構築した。精製したリコンビナントミオシン II を、生理的塩濃度と高塩濃度条件下で電子顕微鏡観察を行い、分子のコンフォメーションを解析した。また、EGFP 融合タンパク質としてミオシン IIB 及びその変異体を培養細胞に発現させ、そこから調製した抽出液を用いて蛍光相関分光法 (FCS) による解析を行い、ミオシン II 分子のコンフォメーションの違いを検出することを試みた。
- ②ミオシン IIB の野生型 (IIB-WT) 及び各変異体の重鎖の N 端に蛍光タンパク質を融合したタンパク質を培養細胞に発現させ、それ

らの局在を解析した。細胞内局在または FRAP 解析を行なう際には、変異体を EGFP ラベルし、常に同時に発現させた mCherry-IIB-WT と比較することにより、変異体の挙動の変化を解析した。

③IIB-WT 及び各変異体の細胞内における存在状態(モノマー or フィラメント)は、0.05% Triton X-100 を含むバッファーに対する溶解度によって判断した。溶出液に回収される分子はモノマーで、培養ディッシュに残る分子は会合してアクチン骨格に取込まれているものと判断した。

④アクチン骨格に取込まれた変異体ミオシン II 分子のダイナミクスは非常に低いことが予想されたので、この解析にはラベルした分子自体の挙動を追跡することが可能な Photoconversion 法を採用した。WT 及び変異体の N 端に monomeric Kikume GR を融合したタンパク質の挙動を解析した。

⑤変異体ミオシン IIB の細胞内での機能を解析するために、ミオシン IIB 重鎖の siRNA 処理によるノックダウン-レスキューアッセイを行なった。COS-7 細胞に対して siRNA 処理してから、24 時間に IIB の野生型または変異体のコンストラクトをトランスフェクションし、さらに 48 時間インキュベーションを続け、多核化した細胞の割合を調べた。

⑥細胞遊走に対する変異体ミオシン IIB の影響は、mCherry-NLS を発現させることでラベルした核の挙動をタイムラプスにより追跡し、遊走の速度と方向持続性を ImageJ software と MTrackJ plugin を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 各アイソフォームの約 100 アミノ酸残基の C 末端尾部フラグメントの ARF93 と BRF102、及びそれらの nonhelical tailpiece の欠損変異体、さらに nonhelical tailpiece を交換したキメラ変異体を用いて CD スペクトルの測定を行なった。その結果、nonhelical tailpiece の高次構造がアイソフォーム間で異なる可能性を見いだした。また、これらの尾部フラグメントの α -helical coiled-coil 構造の熱安定性を解析したところ、ARF93 が BRF102 よりも熱安定性が高いことがわかった。さらに、この安定性の違いは nonhelical tailpiece のみにはならず、そこから少し N 端側の部分に関与することが示唆された。

(2) 重鎖全長の IIA 及び IIB の C-63 領域を交換したキメラミオシン II の細胞内局在が交換した C-63 領域に依存することがわかった。この C-63 領域は nonhelical tailpiece とその N 端側の部分を含む。

①細胞移動時において、ミオシン IIA は細胞の後方に加えて前方のラメラにも局在する。これに対し、ミオシン IIB は後方の細胞膜直

下に多く局在する。静止時においては、ミオシン IIA はストレスファイバーの端から端まで存在する。ミオシン IIB もストレスファイバーに局在するが、その両端には局在することができない。各アイソフォームの C-63 領域を交換したキメラ変異体の局在は短い C 末端領域側のアイソフォームに支配されることがわかった。

②細胞質分裂時において、ミオシン IIB のほとんどが赤道面の収縮環に局在するのに対し、ミオシン IIA は収縮環のみならず両極にも局在した。分裂後に両極へ伸展する際には、移動時のラメラに相当する両極近傍にはミオシン IIA が多く局在し、ミオシン IIB は移動時の後方に相当する中央付近に多く局在した。各アイソフォームの C-63 領域を交換したキメラ変異体は C 末端領域側のアイソフォームと同様の局在を示した。これらの結果は、間期の局在と同様に、細胞質分裂時においても、この短い C 末端領域がミオシン II の各アイソフォームの細胞内局在を決めている可能性を示唆する。

以上の結果から、ミオシン II の各アイソフォームの自己認識に関わる分子基盤と細胞内局在に関わる分子基盤は、密接に関係している、それぞれのアイソフォームの C-63 領域が重要な働きをしていることが示唆された。ミオシン IIB はミオシン IIA に比べて会合しやすいことが、尾部フラグメントを用いた *in vitro* の実験により明らかになっている。この領域が両アイソフォームの会合能の違いを決めている可能性もある。今後は、会合能の違いが自己認識及び細胞内局在に重要なファクターである可能性もふまえて研究を進めていく必要があると考えている。

(3) 10S 構造を形成しない変異体ミオシン II を作成し、その細胞内での挙動を調べることで、細胞内で 10S⇌6S のコンフォメーション変化が実際に起こっている可能性を示すことができた。本研究課題の研究期間内には、この点に関する研究が最も進んだ。

①10S 構造の形成に必須な尾部領域の特定を行なった。10S 構造を形成する非横紋筋タイプと 10S 構造を形成しない横紋筋タイプのミオシンのアミノ酸配列を比較し、同じタイプにおいて相同性が高く、異なるタイプにおいて相同性が低い領域が候補であると考えた。10S 構造を形成した際に頭部と相互作用する可能性のある尾部の部分 (1,400-1,700) から探し、3 箇所 (Region 1、Region 2、Region 3) の領域を割り出した。ミオシン IIB の 3 箇所の領域それぞれを、骨格筋ミオシンの相当配列に置換したキメラ変異体を MRC-5 SV1 TG1 細胞 (ヒト繊維芽細胞 MRC-5 の SV40 transformant) に発現させ、それらの細胞内での挙動を解析した。その結果、Region

1 (1462-1490) と Region 2 (1551-1577) の 2 箇所を置換したキメラ変異体 IIB-SK1・2 (当初、IIB-NM と呼んでいたが改名した) が細胞内で偏った局在を示すことがわかった (図 1)。

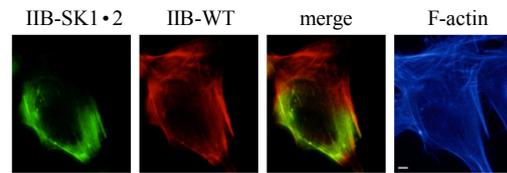


図 1 IIB-SK1・2 の偏った局在

さらに、TritonX-100 Solubility Assay により、IIB-SK1・2 は野生型 (IIB-WT) に比べて細胞内で高度に会合していることが分かった。

②昆虫細胞発現系により、リコンビナントの全長 IIB-WT と IIB-SK1・2 を調製し、電子顕微鏡観察によりそれらの分子形態を調べた。精製したリコンビナントミオシン II の調節軽鎖は脱リン酸化されていることを、Phos-tag SDS-PAGE で確認した。IIB-WT は生理的塩濃度条件下 (+ATP) で、10S 構造を形成していたが、IIB-SK1・2 は同条件下において、双極性のフィラメントを形成することがわかった。また、その際に観られたモノマーは 6 S 構造を示していた (図 2、図 3)。IIB-SK1・2 は調節軽鎖が脱リン酸化された不活性な状態でも 10S 構造を形成できず、会合してフィラメントを形成することがわかった。これらの結果は、Region 1 と Region 2 の 2 箇所が 10S 構造形成に重要であるということを示す。さらに、蛍光相関分光法によって細胞抽出液中のミオシン II 分子のコンフォメーションを見分けることができることを見出した。この方法によってもこの 2 箇所の領域が 10S 構造形成に重要であることを確認した。

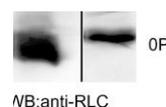


図 2 生理的条件下での IIB-SK1・2 の分子形態

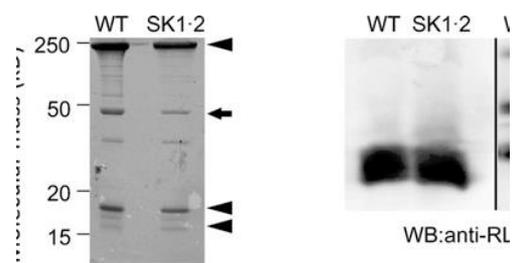


図 3 WT と SK1・2 の各コンフォメーションの割合

③自由遊走している MRC-5 細胞のタイムラプス観察、および MEF 細胞の Wound healing assay の結果から、IIB-SK1・2 は細胞の移動に伴って細胞後方に集積し、偏った局在を示すということがわかった。会合に重要である正電荷クラスターの P1 の電荷逆転変異をさらに加えた変異体 IIB-SK1・2-P1m は、細胞の遊走時に後方への極度の局在を示さなくなり、後方への偏った集積には、ミオシン II の会合能が必用であることがわかった。

④EGFP-IIB-SK1・2 と mCherry-IIB-WT を同時に MRC-5 SV1 TG1 細胞に発現させ、細胞内の同じ領域での挙動を FRAP 法により解析したところ、EGFP-IIB-SK1・2 の蛍光回復が常に遅いという結果を得た。さらに、mKikGR との融合タンパク質を用いた photoconversion 法による解析を行い、10S を形成できないミオシン IIB-SK1・2 は、高度に細胞骨格に取り込まれてしまい、ダイナミクスを失っていることを示すことができた (図 4)。

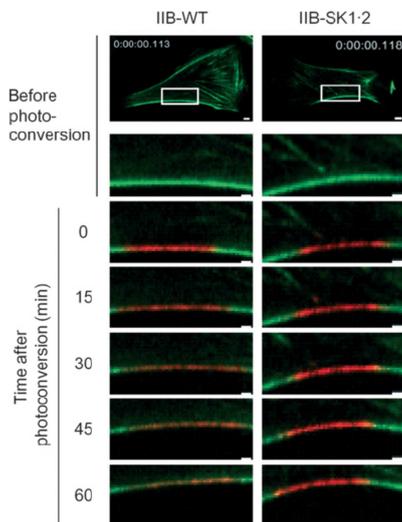


図 4 mKikGR 融合 IIB の Photoconversion 解析

⑤ミオシン IIA の同様の変異体 (IIA-SK1・2) も遊走時に前方にリクルートされにくくなることから変異した 2 箇所の領域はアイソフォームを問わず 10S 構造形成に重要であることが示された。また、IIA-SK1・2 は IIB-SK1・2 に比べると少し前方に局在したことから、後方への集積の程度はアイソフォームの性質に依存することがわかった。

⑥10S 構造形成がミオシン II の機能発現にとって重要であるかを検討するために、COS-7 細胞を用いて細胞質分裂に対するノックダウン-レスキュー実験を行なった。COS-7 細胞はミオシン IIA を発現しておらず、ミオシン IIB 重鎖のノックダウンによって細胞質分裂に失敗し多核化してしまう。この欠陥に対し IIB-SK1・2 は IIB-WT と比較し得る程に、レスキューできた。この結果は細胞質分裂において 10S 構造形成は必須ではないことを示

す。次に、ミオシン IIB を発現していない HeLa 細胞の運動能に対する IIB-SK1・2 の発現による影響を解析した。IIB-SK1・2 を発現させた細胞では、IIB-WT を発現させた細胞と比べて移動速度および移動の直進性が大きく増加することがわかった。また、興味深いことに、IIB-SK1・2 が局在した後方の領域からミオシン IIA が完全に排除されることがわかった (図 5)。これは、高度に細胞骨格に取り込まれた IIB-SK1・2 がミオシン IIA の細胞骨格への取り込みを阻害したことによっておこり、その結果、細胞の運動能が変化したのではないかと考えている。

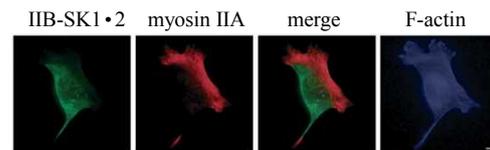


図 5 IIB-SK1・2 を発現した細胞の myosin IIA の局在

本研究によって、アイソフォーム特異的な細胞内局在には、C 末端領域が重要な役割を担っていることが示された。また、細胞内において、ミオシン II の 10S ⇌ 6S コンフォメーション変化が実際に起きていて、その細胞運動過程における重要性がはっきりした。細胞の遊走時にミオシン II が前方にリクルートされるためには、モノマーになることが重要であり、10S 構造はミオシン II が不活性化時に会合してフィラメントになることを抑制する役割をもつということが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kiboku, T., Katoh, T., Nakamura, A., Kitamura, A., Kinjo, M., Murakami, Y., and Takahashi, M. Nonmuscle myosin II folds into a 10S form via two portions of tail for dynamic subcellular localization. *Genes to Cells*, 査読有, 18 巻(2 号), (2013), 90-109. doi:10.1111/gtc.12021.
- ② Ubukawa, K., Guo, Y.-M., Takahashi, M., Hirokawa, M., Michishita, Y., Nara, M., Tagawa, H., Takahashi, N., Komatsuda, A., Nunomura, W., Takakuwa, Y., and Sawada, K. Enucleation of human erythroblasts involves nonmuscle myosin IIB. *Blood*, 査読有, 119 巻(4 号), (2012), 1036-1044. doi:10.1182/blood-2011-06-361907.
- ③ Kondo, T., Hamao, K., Kamijo, K., Kimura, H., Morita, M., Takahashi, M., and Hosoya, H. Enhancement of myosin II /actin turnover at the contractile ring

induces slower furrowing in dividing HeLa cells. *Biochem. J.*, 査読有, 435 巻, (3 号), (2011), 569-576.
doi:10.1042/BJ20100837.

- ④ Mitsuhashi, M., Sakata, H., Kinjo, M., Yazawa, M., and Takahashi, M. Dynamic assembly properties of nonmuscle myosin II isoforms revealed by combination of fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation Spectroscopy. *J. Biochem.*, 査読有, 149 巻(3 号), (2011), 253-263. doi:10.1093/jb/mvq134. <http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/47493>

[学会発表] (計 20 件)

- ① 倉賀野正弘 (高橋正行)、繊維芽細胞の遊走極性維持におけるミオシン II アイソフォームの役割. 2013 年生体運動研究合同班会議, 2013. 1. 12、広島大学
- ② 倉賀野正弘 (高橋正行)、繊維芽細胞の遊走極性維持におけるミオシン II アイソフォームの役割. 第 7 回細胞運動研究会、2012. 9. 7、北海道大学
- ③ 對馬志織 (高橋正行)、収縮環へのミオシン II アイソフォームの局在機構. 第 7 回細胞運動研究会、2012. 9. 7、北海道大学
- ④ 高橋正行、非筋細胞ミオシン II の細胞内ダイナミクス. 北海道大学ニコイメーjingセンター開所記念講演会、2012. 8. 30、北海道大学
- ⑤ 木ト貴之 (高橋正行)、Role of folded conformation of nonmuscle myosin II. 第 64 回日本細胞生物学会大会、2012. 5. 30、神戸国際会議場
- ⑥ 倉賀野正弘 (高橋正行)、Myosin II isoform play distinct roles in maintenance of polarity for migration of normal fibroblast. 第 64 回日本細胞生物学会大会、2012. 5. 30、神戸国際会議場
- ⑦ 佐藤勇太 (高橋正行)、Proper nuclear shape requires balance of organization between actin cytoskeleton and microtubules. 第 64 回日本細胞生物学会大会、2012. 5. 30、神戸国際会議場
- ⑧ 高橋正行、非筋細胞ミオシン II の folded conformation の役割. 2012 年生体運動研究合同班会議、2012. 1. 7、筑波大学
- ⑨ 高橋正行、Charge clusters in the C-terminal rod region are essential for assembly of vertebrate nonmuscle myosin II. 第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 22、国立京都国際会館
- ⑩ 高橋正行、非筋細胞ミオシン II の folded conformation の役割. 第 6 回細胞運動研究会、2011. 9. 10、広島大学
- ⑪ 高橋正行、ミオシン II 尾部電荷クラスターのフィラメント形成における役割. 第 6 回細胞運動研究会、2011. 9. 10、広島大学
- ⑫ 木ト貴之 (高橋正行)、非筋細胞ミオシン II のフォールデッドコンフォメーション (10S 構造) の役割. 第 48 回日本生化学会北海道支部例会、2011. 8. 5、札幌医科大学
- ⑬ 倉賀野正弘 (高橋正行)、High cell adhesiveness is related to diphosphorylation of regulatory light chain of nonmuscle myosin IIA in normal human fibroblast. 第 63 回日本細胞生物学会大会、2011. 6. 28、北海道大学
- ⑭ 木ト貴之 (高橋正行)、Role of folded conformation of nonmuscle myosin II. 第 83 回日本生化学会大会、2010. 12. 7、神戸ポートアイランド
- ⑮ 秀永洋平 (高橋正行)、非筋細胞ミオシン II アイソフォームの C 末端領域の構造と機能. 第 83 回日本生化学会大会、2010. 12. 7、神戸ポートアイランド
- ⑯ 倉賀野正弘、ヒト繊維芽細胞 MRC-5 とその SV40 トランスフォーマントの細胞運動性の違い. 第 5 回細胞運動研究会、2010. 8. 28、理化学研究所 CDB
- ⑰ 木ト貴之、ミオシン II の folded conformation の役割. 第 5 回細胞運動研究会、2010. 8. 28、理化学研究所 CDB
- ⑱ 高橋正行、非筋細胞ミオシン II 尾部の機能領域. 第 47 回日本生化学会北海道支部例会、2010. 7. 23、北海道大学
- ⑲ 木ト貴之 (高橋正行)、Role of folded conformation of nonmuscle myosin II. 第 62 回日本細胞生物学会大会、2010. 5. 19、大阪国際会議場
- ⑳ 倉賀野正弘 (高橋正行)、Difference of cell

motility between human fibroblast MRC-5 and its SV40 transformant. 第 62 回日本細胞生物学会大会、2010. 5. 19、大阪国際会議場

[その他]

- ① 高橋正行、日本細胞生物学会ホームページ細胞生物学用語集、非筋ミオシン II の分子種の特徴。
<http://www.jscb.gr.jp/glossary/>
- ② 高橋正行、日本細胞生物学会ホームページ細胞生物学用語集、非筋ミオシン II の会合。<http://www.jscb.gr.jp/glossary/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 正行 (TAKAHAHSI MASAYUKI)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：50241295

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし