

平成 21 年 4 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007~2008

課題番号：19790061

研究課題名 (和文) ミオシン 1E は細胞形態の制御に関与する分子である

研究課題名 (英文) Myosin 1E regulates the cell morphology

研究代表者

谷村 進 (TANIMURA SUSUMU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90343342

研究成果の概要：

ミオシン 1E は Tail Homology (TH) 2 領域を介してホスファチジルイノシトール (4,5) ニリン酸 [PI(4,5)P<sub>2</sub>]、あるいは PI(3,4,5)P<sub>3</sub> と結合し、モータードメインを介してアクチンフィラメント上を移動することで、細胞運動先端部位における細胞形態を調節することを見出した。また、ミオシン 1E の TH2 領域に結合する新規タンパク質として SH3P2 を見出し、それがミオシン 1E の機能調節因子である可能性を提示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞生物学

## 1. 研究開始当初の背景

「ミオシン」は、アクチンフィラメントとの相互作用を介して、様々な細胞運動に関与するモータータンパク質である。ミオシンはもともと、骨格筋の収縮タンパク質として同定され、① ATPase 活性を持つ、② アクチンと相互作用する、③ 2つの頭部と長い棒状の尾部を持ち、生理条件下で会合してフィラメントを形成する能力を有するタンパク質と定義された (conventional ミオシン)。一方、その後相次いで発見された

ミオシン様タンパク質にはフィラメント形成能がないと推測されることから、それらの生理機能は上記 conventional ミオシンとは異なっている可能性が示唆され、それらは unconventional ミオシンと総称されている。ミオシンには少なくとも 18 のクラスからなるミオシン・スーパーファミリーが存在し、それらは高い相同性を有するモータードメイン (N 末端)、続いて軽鎖結合部位 (IQ モチーフ)、そして各々固有の結合分子との相互作用部位 (C 末端) から構成さ

れている。なお、各ミオシンにおける IQ モチーフの数は様々で、これがミオシンの機能に大きな影響を与える可能性が示唆されている。

Conventional ミオシン（クラス 2 に属する横紋筋、平滑筋のミオシン、等）の活性制御機構に関しては、自身の活性化（Ca<sup>2+</sup> 依存的なトロポニン/トロポミオシンによる制御 [横紋筋]、あるいはミオシン軽鎖のリン酸化による制御 [平滑筋など]）と、ATP 加水分解に連動したアクチンフィラメントとの結合/解離のサイクルによって、張力を発生させることが明らかにされている。そして、その張力を利用して、conventional ミオシンは筋収縮、細胞質分裂等の細胞運動調節に関与している。

Unconventional ミオシンについては、その多くがカルモジュリンを軽鎖にもつこと、リン脂質と結合すること等が明らかとなっているが、その活性制御機構の詳細に関しては不明な点が多い。一方、unconventional ミオシンの生理機能に関しては、近年ようやく、幾つかのクラスについて解析が進んできた。具体的には、出芽酵母において、クラス 1 ミオシン (Myo3p, Myo5p) がアクチン重合に必要なタンパク質をアクチンフィラメントに沿って輸送すること [J. Cell Biol., 148: 353-362, 2000]、クラス 5 ミオシン (Myo4p, Myo2p) が mRNA、小胞体、ミトコンドリア等をアクチンフィラメントに沿って輸送することが報告されている [Proc. Natl. Acad. Sci., 97: 5273-5278, 2000]。また、ショウジョウバエでは、クラス 1 ミオシン (Myo31DF) が左右決定因子をアクチンフィラメントに沿って輸送することで、内臓の左右非対称性を制御する可能性が示されている [Nature, 440: 798-802, 2006]。さらに、哺乳類においては、クラス 1 ミオシンの 1 種 (Myo1c) がグルコース取込みに関与する分子を、アクチンフィラメントに沿って輸送することが明らかとなってきた [J. Cell Biol., 173: 665-671, 2006]。すなわち、unconventional ミオシンの生理的役割としては、クラス 2 ミオシンでみられた張力発生への関与ではなく、アクチンフィラメントに沿って様々な物質を輸送する、「細胞内輸送タンパク質」として機能する可能性が提示されつつある。その他の unconventional ミオシンについては、その活性調節機構、それらが関与する生理応答を含めて、依然として不明な点が多く残されている。しかし、上述のようにある種の unconventional ミオシンが細胞内輸送タンパク質として機能する可能性が提示されたこと、さらにそれによって輸送される分子が特定されたこと等から、unconventional ミオシンファミリー分子の研究が新たな展開を

見せ始めている。また、ヒトにおいては、クラス 6、7、15 ミオシンの変異が遺伝性難聴に関連する等、その機能異常と難治性疾患との関わりを示す知見も報告されてきた。

これまで我々は、特に細胞運動を制御する細胞内シグナル伝達経路に着目して解析を進めてきた。その一環として、「細胞運動を制御する分子の探索」を進めた結果、ある意味では副産物的に、unconventional ミオシンであるクラス 1 ミオシンの 1 種 (ミオシン 1E) に遭遇した。ミオシン 1E については、その構造的な解析が報告されているだけで、その機能に関してはこれまで全く解明が進んでいない。そこで、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来)、および MKN1 細胞 (ヒト胃癌細胞由来) を用いて解析を進めた結果、(1) 翻訳領域、あるいは非翻訳領域をコードする siRNA を用いて、ミオシン 1E の発現を抑制すると、通常は円形に伸展した各細胞の形態が細長い紡錘形へと劇的に変化する、(2) 非翻訳領域をコードする siRNA を用いてその発現を抑制した後に、ミオシン 1E 遺伝子を再導入すると細胞の形態は回復するが、一方、モータードメインを欠失したミオシン 1E 変異体の遺伝子導入では細胞の形態回復は起こらない、(3) GFP 融合ミオシン 1E を細胞に発現させると、それは細胞膜表面の糸状仮足と考えられる部位に局在するが、血清などで細胞を刺激すると、刺激数分後にはそれが細胞の周辺部位 (特にリーディングエッジ) に移動する、ことを見出した。

上述の幾つかの unconventional ミオシンに関する報告と、我々が得た上記結果を総合的に考察すると、ミオシン 1E が、何らかの分子/細胞内小器官をアクチンフィラメントに沿って細胞の周辺部位に運搬することで、細胞形態の調節に関与している可能性、さらに、その機能は細胞外からの刺激によって制御される可能性、等が示唆される。そこで、上記事項を確認し、その実態を分子レベルで解明することを目的として、本研究課題の提案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでその機能が全く不明であったミオシン 1E について、それが (a) どのような分子/細胞内小器官を運搬するのか? その際に (b) どのアダプター分子の機能が必要か? さらに、(c) 細胞外からの刺激に反応してどのような制御を受けるのか? という点に着目して解析を進める。

これらの解析を通して、ミオシン 1E が細胞外刺激に反応して細胞形態の調節に関与する仕組みを分子レベルで明らかにすることが、本研究の最終目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミオシン 1E 結合分子の同定

上述のように、unconventional ミオシンは細胞内輸送タンパク質である可能性が示されている。そこで、以下の解析により、ミオシン 1E がどのような分子/細胞内小器官を運搬するのかを特定する。

#### GST pull down 法による結合分子の同定

GSH ビーズに結合させた GST 融合ミオシン 1E の C 末端領域を細胞抽出液と反応させる。洗浄によって非特異的な結合を除いた後に、結合タンパク質を SDS-PAGE にて展開分離後、ゲルを染色、脱色する。目的の結合タンパク質をゲルより切り出した後、MALDI-TOF によってそのタンパク質の同定を行う。

#### 抗ミオシン 1E 抗体の作成と免疫共沈法による結合タンパク質の同定/確認

ミオシン 1E については、これを特異的に認識する抗体が市販されていない。そのため、現在抗ミオシン 1E 抗体の作成を進めているところである。今までのところミオシン 1E を特異的に認識する抗血清を得ており、ウエスタンブロット、および免疫沈降法に適用可能であることを確認している。さらに、アフィニティー精製を進めている段階であるが、抗体精製後にはこれを利用して免疫共沈法を行い、ミオシン 1E と結合する分子を MALDI-TOF を利用して解析、同定する。また、同法にてミオシン 1E が上記の各手法によって得られた分子と細胞内において結合することを確認する。

#### 細胞内小器官と結合する可能性の確認

##### ～リン脂質結合能との関連～

アメーバ由来のクラス 1 ミオシン (Myosin IC) は、以前より酸性リン脂質と結合することが報告されている。また、ごく最近になって哺乳類クラス 1 ミオシンの 1 種である Myo1c が PI(4,5)P<sub>2</sub> と強く結合することが見出された。そこで、ミオシン 1E が細胞膜を構成する各種リン脂質と結合する可能性について検討する。具体的には、精製した GST 融合ミオシン 1E と PIP Strips (各種リン脂質がブロットされたメンブラン; Molecular Probes 社等から購入可能) を反応させることによって、特異的に結合するリン脂質の同定を行う。

#### 細胞内小器官と結合する可能性の確認

##### ～細胞内局在を指標とした解析～

出芽酵母等では、unconventional ミオシンが小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官を運搬する可能性が報告されている。そこで上記にて精製した抗体を用いて細胞の免疫染色を行い、各細胞内小器官を特異的に染色するマーカー分子との共局在が認められるかどうかを検討する。また、GFP 融合ミオシン 1E、およびその各種欠失変

異体を細胞に発現させた際に、それらが同様に各マーカー分子と共局在するかどうかを確認する。

#### (2) ミオシン 1E の細胞内動態と細胞形態

これまでの我々の解析より、GFP 融合ミオシン 1E を MKN1 細胞等に発現させると、それは細胞膜表面の糸状仮足と考えられる部位に局在すること、また血清刺激によって細胞周辺部位に局在するようになることを確認している。そこで、ミオシン 1E の細胞内における動態変化に着目して、特に下記の項目を中心に解析を進める。

#### GFP 融合ミオシン 1E の細胞内局在の変動と細胞形態の関連について

GFP 融合ミオシン 1E、あるいはその各種欠失変異体を発現させた MKN1 細胞を血清や各種増殖因子等で刺激した後、タイムラプス顕微鏡を用いて、その細胞内動態を経時的に観察する。これらの解析により、ミオシン 1E が細胞内輸送タンパク質としての機能することと、細胞形態変化との関連について検討を行う。

#### 各種阻害剤がミオシン 1E の細胞内局在性と細胞形態に及ぼす影響について

ミオシン 1E の細胞内局在が細胞外からの刺激によって変化することから、それは何らかの細胞内シグナル伝達系によって調節されている可能性が考えられる。そこで、いくつかの細胞内シグナル伝達経路に作用する阻害剤 (Y-27632; RhoA-ROCK 経路阻害剤、PP2; Src 経路阻害剤、PD184352; ERK 経路阻害剤、LY294002; PI3K-Akt 経路阻害剤)、あるいは細胞骨格に作用する薬剤 (アクチン骨格; サイトカラシン D、微小管; ビンクリスチン) が、ミオシン 1E の細胞内局在、および細胞形態にどのような影響を及ぼすか検討する。

#### (3) ミオシン 1E による細胞形態の制御機構

上記の項目(1)、(2)の解析結果を踏まえながら、以下の点について検討を進めることによってミオシン 1E による細胞形態の制御機構を分子レベルで明らかにする。

#### ミオシン 1E の発現抑制と過剰発現が細胞形態および結合分子に及ぼす影響について

siRNA によってミオシン 1E の発現を抑制した際には、劇的な細胞の形態変化が引き起こされるが、このような条件下において、(1) で同定した結合分子の変動を免疫共沈法、免疫染色法、あるいはタイムラプス顕微鏡等を駆使しながら多角的に解析する。また、同条件において (2) で利用した各種ミオシン 1E 変異体遺伝子を再発現させた際の細胞形態変化に着目して解析を進める。さらに、ミオシン 1E を一過性に過剰発現させた細胞においても、同様に各

分子の変動、および細胞形態変化について検討を行う。

#### がん細胞におけるミオシン 1E の発現量と細胞形態との関連について

様々な組織由来のがん細胞株を利用して、各細胞におけるミオシン 1E、および (1) で同定した結合分子の発現量と、細胞形態との関連について解析を進める。

### 4. 研究成果

#### (1) ミオシン 1E 結合分子の同定

ミオシン 1E が各種リン脂質と結合する可能性について検討した結果、それは PI(4,5)P<sub>2</sub>、および PI(3,4,5)P<sub>3</sub> と直接結合すること、PI(4,5)P<sub>2</sub> の方により高い親和性を持つことを見出した。また、GFP 融合ミオシン 1E の各種欠失変異体を利用した解析により、ミオシン 1E と PI(4,5)P<sub>2</sub> の結合にはミオシン 1E の TH 2 領域が必要であり、これによってミオシン 1E は細胞膜画分に移行することを見出した。

免疫共沈法、あるいは GST pull-down 法を用いてミオシン 1E と特異的に結合する分子の同定を進めた結果、SH3 ドメインを有する分子量約 26 kDa の新規タンパク質「SH3P2」を見出した。さらに、SH3P2 はミオシン 1E の TH2 領域に結合すること、それによって SH3P2 はミオシン 1E の細胞膜画分への移行を抑制する (ミオシン 1E と PI(4,5)P<sub>2</sub>、あるいは PI(3,4,5)P<sub>3</sub> との結合を阻害する) 可能性を見出した。

#### (2) ミオシン 1E の細胞内動態について

MKN1 細胞において、ミオシン 1E は血清飢餓状態においては細胞膜表面上の糸状仮足 (あるいはマイクロスパイク) と考えられる部位にドット状に局在するが、血清刺激に応答して速やかに細胞周辺部位の葉状仮足形成部位に局在することを見出している。ここで、各種阻害剤を用いた解析より、LY294002 によって PI3 キナーゼを阻害した条件下において、ミオシン 1E の葉状仮足形成部位への局在が阻害されることを明らかにした。

GFP 融合ミオシン 1E、あるいはその各種欠失変異体を発現させて、それらの細胞内動態を比較検討したところ、血清飢餓状態におけるドット状の局在には TH2 領域が、一方、血清刺激に伴う葉状仮足形成部位への移行にはモータードメインが必要であることを明らかにした。なお、HeLa 細胞 (血清刺激に伴う葉状仮足形成促進が顕著でない) を用いた場合には、ミオシン 1E は主に糸状仮足部位に局在しており、それには TH2 領域が必要であることを見出した。

さらに、SH3P2 がミオシン 1E の細胞内

動態に及ぼす影響を検討したところ、SH3P2 を発現させた MKN1 細胞では、血清飢餓状態におけるドット状に局在、及び細胞外刺激に伴うミオシン 1E の葉状仮足形成部位への移行、いずれもが阻害されることを見出した。

#### (3) ミオシン 1E による細胞形態の制御機構

GFP 融合ミオシン 1E、あるいはその各種欠失変異体を発現させた際に細胞形態が如何に変化するかを比較検討したところ、MKN1 細胞ではミオシン 1E の過剰発現によって葉状仮足形成の亢進に伴い細胞面積が増大すること、また、それにはミオシン 1E の TH2 領域が必要であることを見出した。一方、HeLa 細胞ではミオシン 1E の過剰発現によって糸状仮足形成が促進されたが、TH2 領域を欠失した変異体ではそのような効果は認められなかった。さらに、SH3P2 を発現させた場合には MKN1 細胞では葉状仮足の形成が、一方、HeLa 細胞では糸状仮足の形成が抑制されて、細胞が収縮した形態となることを明らかにした。なお、RNAi 法によってミオシン 1E の発現量を低下させると、円形に伸展した細胞が細長い紡錘形へと変化すること、逆に、SH3P2 の発現量を低下させると、より伸展した細胞形態へ変化することが明らかとなった。

各種組織由来培養がん細胞株 36 種類におけるミオシン 1E、及び SH3P2 の発現量について、正常二倍体繊維芽細胞と比較検討した結果、14 種類 (約 39%) のがん細胞株において SH3P2 の発現低下が認められた。

本研究により、ミオシン 1E はモータードメインを介してアクチンフィラメントと結合するとともに、TH2 領域を介して PI(4,5)P<sub>2</sub>、および PI(3,4,5)P<sub>3</sub> と結合することで細胞膜ラフリング領域における細胞形態の変動を制御すること、また、SH3P2 はミオシン 1E の Negative regulator として機能する可能性を見出した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Tanimura S., Uchiyama A., Watanabe K., Yasunaga M., Inada Y., Kawabata T., Iwashita K., Noda S., Ozaki K., Kohno M. Blockade of constitutively activated ERK signaling enhances cytotoxicity of microtubule-destabilizing agents in tumor cells.

- Biochem. Biophys. Res. Commun., 378, 650-655, 2009, 査読有
- (2) Kakiashvili E., Speight P., Waheed F., Seyh R., Lodyga M., Tanimura S., Kohno M., Rotstein OD., Kapus A., Szaszi K.  
GEF-H1 mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced Rho activation and myosin phosphorylation: Role in the regulation of tubular paracellular permeability.  
J. Biol. Chem., (in press), 2009, 査読有
- (3) Okumura Y., Sugiyama N., Tanimura S., Nishida M., Hamaoka K., Kohno M., Yokoyama T.  
ERK regulates renal cell proliferation and renal cyst expression in *inv* mutant mice.  
Acta Histochem. Cytochem., (in press), 2009, 査読有
- (4) Fujishiro SH., Tanimura S., Mure S., Kashimoto Y., Watanabe K., Kohno M.  
ERK1/2 phosphorylates GEF-H1 to enhance its guanine nucleotide exchange activity toward RhoA.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 368, 162-167, 2008, 査読有
- (5) Ozaki K., Kishikawa F., Tanaka M., Sakamoto T., Tanimura S., Kohno M.  
Histone deacetylase inhibitors enhance the chemosensitivity of tumor cells with cross-resistance to a wide range of DNA-damaging drugs.  
Cancer Sci., 99, 376-384, 2008, 査読有
- (6) Tanimura S., Hirano A., Hashizume J., Yasunaga M., Kawabata T., Ozaki K., Kohno M.  
Anticancer drugs up-regulate HspBP1 and thereby antagonize the prosurvival function of Hsp70 in tumor cells.  
J. Biol. Chem., 282, 35430-35439, 2007, 査読有

[学会発表] (計5件)

- (1) 橋詰淳哉  
SH3P2 は MMP-9、OPN の発現抑制を介して浸潤能を負に制御する  
日本薬学会 第129年会  
2009年3月26日、京都
- (2) 瀬井香奈子  
Myo1E はホスホイノシタイドとの結合を介して細胞形態を制御する  
第81回 日本生化学会大会  
2008年12月11日、神戸
- (3) 黒崎由希子  
SH3 ドメインを含む新規タンパク質 (p26) による細胞運動制御の分子機構  
第81回 日本生化学会大会  
2008年12月11日、神戸
- (4) Tanimura S.

- A novel SH3-containing 30 kDa protein suppresses the invasiveness of tumor cells by inhibiting the secretion of MMP-9  
第67回 日本癌学会学術総会  
2008年10月28日、名古屋
- (5) 渡司雅弘  
Myosin 1E は細胞形態の制御に関与する分子である  
日本薬学会九州支部大会  
2007年12月8日、福岡

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
谷村 進 (TANIMURA SUSUMU)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90343342
- (2) 研究分担者  
該当なし
- (3) 連携研究者  
該当なし