

機関番号：16301  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21870029  
 研究課題名（和文） アポトーシス時におけるミオシン II リン酸化・脱リン酸化  
 制御機構の総合的な解明  
 研究課題名（英文） Regulation of myosin II phosphorylation and dephosphorylation  
 during apoptosis  
 研究代表者  
 岩崎 隆宏 (IWASAKI TAKAHIRO)  
 愛媛大学・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー・研究員  
 研究者番号：40542999

研究成果の概要（和文）：細胞がアポトーシスを起こす際、ミオシン II が過剰にリン酸化される現象が知られている。しかしこの時のミオシンホスファターゼ（MP）の活性調節は不明であった。本研究では、アポトーシス時の MP はカスパーゼ 3 による切断を受け、ミオシン II 脱リン酸化活性が低下している事を明らかにした。これは、ミオシンキナーゼの活性化に加え、MP の不活性化によりミオシン II 過剰リン酸化が誘導されている事を示唆している。

研究成果の概要（英文）：It is known that myosin II is hyperphosphorylated in apoptotic cells. However, the regulation of myosin phosphatase (MP) in apoptosis is still unclear. In this study, we demonstrated that the activity of MP is reduced by caspase-3 mediated cleavage of myosin binding subunit. This result suggests that hyperphosphorylation of myosin II is induced by activation of myosin kinase and inactivation of MP during apoptosis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：アポトーシス、ミオシン、脱リン酸化、カスパーゼ、ミオシンホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

細胞骨格蛋白質ミオシン II は、細胞分裂、アポトーシス等、細胞ダイナミクスの基本となる細胞運動の中心的な役割を担うモーター分子である。ミオシン II は、モーター活性をもつ重鎖および、調節軽鎖、必須軽鎖の 3 種類の蛋白質から構成されており、その活性は調節軽鎖の 19 番スレオニンおよび 20 番セリンのリン酸化と脱リン酸化により制御されている。通常の細胞内では、キナー

ゼによるリン酸化と、ミオシンホスファターゼ（MP）による脱リン酸化を介してその恒常性が保たれているが、アポトーシス時にはミオシン II のモーター活性が急激に上昇し、細胞の収縮並びに細胞膜表面の泡形成（ブレッピング）を引き起こす。その結果、急激な収縮活動により細胞内小器官が断片化され、アポトーシス小体と呼ばれる細胞片となって細胞は死に至ることが知られている (Mills et al., 1999, J. Cell Biol., 703-7)。現

在のモデルでは、低分子量 G 蛋白質依存性キナーゼである ROCK1 の調節領域がアポトーシスプロテアーゼであるカスパーゼ 3 により切断されることで、ミオシン II 調節軽鎖の過剰リン酸化が誘導されると考えられている (Coleman et al., 2001, Nat. Cell Biol., 339-345)。その一方ミオシン II にはホスファターゼを介した脱リン酸化による不活性化機構も存在しているため、アポトーシス時において MP の活性が空間的・時間的にどのように調節されているかを調べることは、アポトーシス時のミオシン II リン酸化機構を解明する上で非常に重要となる。

## 2. 研究の目的

MP はプロテインホスファターゼ 1、ミオシン結合サブユニット (MYPT1)、スモールサブユニットから成る三量体である。アポトーシス時における MP の制御機構を明らかにするために、MP を構成するサブユニットがアポトーシス時にどのような修飾を受け、その結果 MP の活性がどう変化するかを解明する。

## 3. 研究の方法

コムギ無細胞タンパク質合成系を用い MP 各サブユニットを合成し、in vitro におけるカスパーゼに対する感受性を調べる。アミノ酸配列解析によりカスパーゼ切断サイトを同定し、切断サイト変異体、並びに切断型変異体を作製する。カスパーゼにより切断を受けるサブユニットのアポトーシス時における局在や、翻訳後修飾を解析する。また、アポトーシスを誘導した際の MP の活性変化を解析する。

## 4. 研究成果

(1) in vitro カスパーゼ解析により、MP を構成するサブユニットのうちミオシン II との結合に重要な役割を果たしている MYPT 1 がカスパーゼ 3 による切断を受ける事を明らかにした (図 1)。アミノ酸配列解析の結果、MYPT1 は Asp884 で切断されること、その切断サイトは MYPT1 のミオシン II 結合領域に位置することを明らかにした。これは、MYPT1 がカスパーゼ 3 により切断を受ける事で、ミオシンに対する結合能が低下する事を示唆している。更に切断耐性型変異体を用いた実験等により、カスパーゼによる Asp884 における切断は TNF/CHX でアポトーシスを誘導した HeLa 細胞内で実際に起こっている現象である事を示した (図 2)。また、組織特異的に発現する MYPT1 のホモログである MYPT3、MBS85 もカスパーゼ 3 による切断をう

ける事から、アポトーシス時における MYPT の切断は様々な組織で普遍的に起こる現象である事が示唆された。

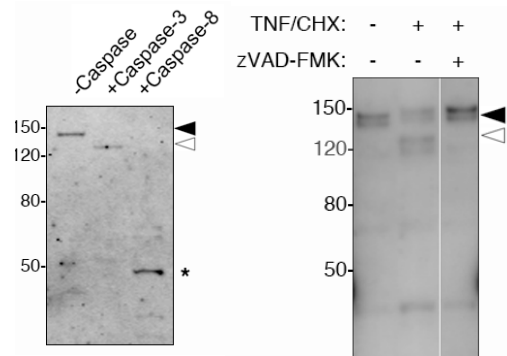


図 1 (左) in vitro カスパーゼ 3 解析による MYPT1 の切断

図 2 (右) アポトーシス誘導細胞における MYPT1 の切断

(黒矢印:全長 MYPT1、白矢印: MYPT1 切断断片)

(2) 通常 MYPT1 はリン酸化によりミオシン II 結合能が阻害されるため、アポトーシス時における MYPT1 のリン酸化状態を調べた。その結果、TNF/CHX でアポトーシスを誘導した HeLa 細胞の破碎液に対し、リン酸化 MYPT1 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、MYPT1 の Thr696 並びに Thr853 がリン酸化されている事が明らかになった。Y-27632 存在下でリン酸化が減少する事から、このリン酸化は ROCK を介していること、zVAD-FMK 存在下においても阻害されていることから、アポトーシス依存的に起こる事が示された。また、切断を受けた MYPT1 が強くリン酸化されていた (図 3)。

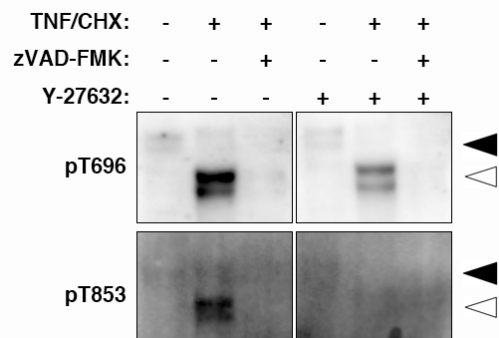


図 3 ROCK による MYPT1 のリン酸化 (黒矢印:全長 MYPT1、白矢印: MYPT1 切断断片)

(3) 野生型 MYPT1 を HeLa 細胞に発現させ、抗 V5 タグ抗体を用いて免疫沈降を行ったと

ころ、生細胞では MYPT1 とミオシン II が共沈したのに対し、アポトーシス誘導細胞ではミオシン II との共沈が見られなかった (図 4)。また、同様の免疫沈降によって得られた MP を用い、リン酸化ミオシン II に対する脱リン酸化能を検討した。その結果、アポトーシス細胞から得られた MP は生細胞のものと比較して脱リン酸化能が 20% 程度低下している事が明らかになった。

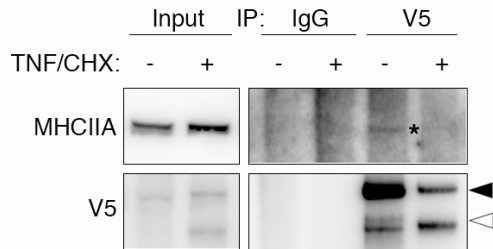


図 4 アポトーシス時における MYPT1 とミオシン II の結合能

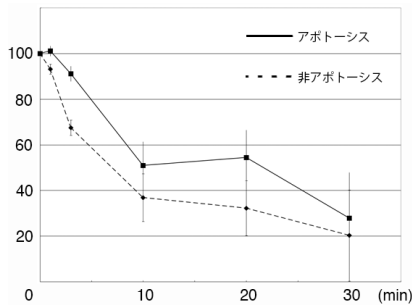


図 5 アポトーシス時における MP のミオシン II 脱リン酸化活性

(4) カスパーゼ 3 による切断が MYPT1 の細胞内局在に与える影響について検討するため、野生型、カスパーゼ 3 耐性型 (D884A)、カスパーゼ 3 切断型 (1-884) MYPT1 を HeLa 細胞にそれぞれ発現させ、蛍光抗体染色を行った (図 6)。その結果、野生型とカスパーゼ 3 耐性型 MYPT1 は共に細胞辺縁部においてミオシン II と共局在したが (矢印)、カスパーゼ 3 切断型はその局在が消失していた。これはミオシン II 結合領域の切断によりミオシン II 結合能を失った MYPT1 は、細胞内においてミオシン II と共局在できず、その結果として脱リン酸化活性の低下が起こっていることを示唆している。

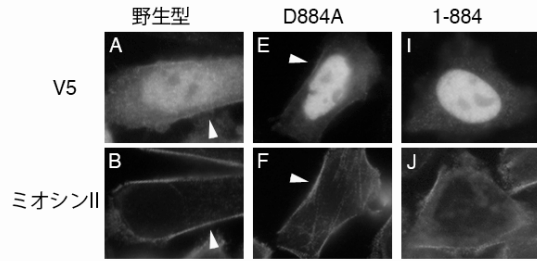


図 6 カスパーゼ 3 切断 MYPT1 の細胞内局在

(5) MP のミオシン II 脱リン酸化活性がアポトーシスに与える影響について、MYPT1 に対する RNAi を行うことで検討した (図 7)。MYPT1 の発現をノックダウンした HeLa 細胞では TNF/CHX によるアポトーシス誘導細胞が顕著に増加した (MYPT1 siRNA)。この現象は siRNA 耐性型 MYPT1 遺伝子の発現により抑制された (MYPT1 siRNA+DNA)。この結果は MP の脱リン酸化経路が阻害された細胞においては、容易にアポトーシスが引き起こされることを示唆している。

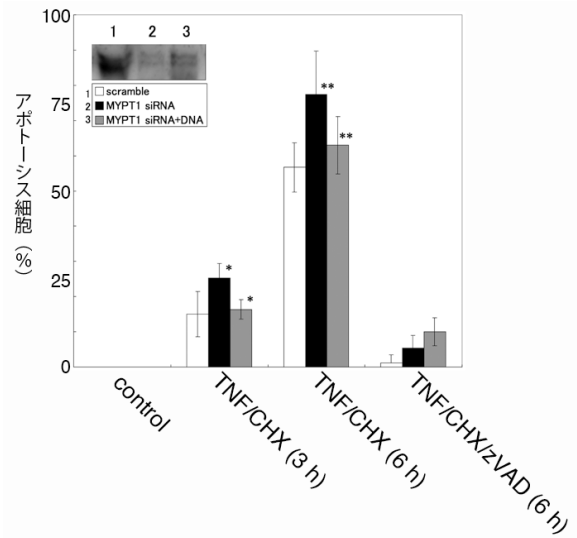


図 7 MYPT1 siRNA によるアポトーシスの誘導

### 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 2 件)

(1) A. Nozawa, T. Ogasawara, S. Matsunaga, T. Iwasaki, T. Sawasaki, Y. Endo  
Production and partial purification of membrane proteins using a liposome-supplemented wheat cell-free translation system.

BMC Biotechnology, 11:35, (2011), 査読有

(2) T. Akagi, K. Shimizu, S. Takahama, T. Iwasaki, K. Sakamaki, Y. Endo, T. Sawasaki  
Caspase-8 cleavage of the interleukin-21 (IL-21) receptor is a negative feedback regulator of IL-21 signaling.

FEBS letters, 585, (2011), 1835-1840, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

(1) T. Iwasaki, T. Sawasaki, Y. Endo  
Regulation of membrane blebbing during apoptosis by caspase cleavage of myosin phosphatase.

The 7th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences  
2009年9月24日、松山

(2) T. Iwasaki, T. Sawasaki, Y. Endo  
Role of myosin phosphatase cleavage by caspase-3 during apoptosis.

American Society for Cell Biology 46th annual meeting  
2009年12月6日、San Diego, USA

(3) 岩崎隆宏、遠藤弥重太、澤崎達也  
アポトーシス時におけるミオシンホスファターゼ活性調節機構

第62回日本細胞生物学会年会  
2010年5月19日、大阪

(4) T. Iwasaki, T. Sawasaki, Y. Endo  
Downregulation of myosin phosphatase targeting subunit 1 during apoptosis.

The 8th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences  
2010年9月28日、松山

(5) 岩崎隆宏、遠藤弥重太、澤崎達也  
Regulation of myosin phosphatase during apoptosis

第33回日本分子生物学会年会  
2010年12月8日、神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 隆宏 (IWASAKI TAKAHIRO)

愛媛大学・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー・研究員

研究者番号：40542999

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者