

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440061

研究課題名(和文) 2型ミオシンの双極性フィラメント形成素過程の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for bipolar filament formation of type 2 myosin

研究代表者

高橋 正行 (Takahashi, Masayuki)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50241295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：非筋細胞2型ミオシンは、双極性のフィラメントを細胞内で時空間的制御のもと形成することで機能する。本研究は、2型ミオシンの尾部領域に存在するいくつかの電荷クラスターに注目し、フィラメント形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。その結果、C末端に近い二つの正電荷クラスター領域が、会合時の静電相互作用において重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、ミオシンIIAとミオシンIIBアイソフォームのダイナミックな挙動を、遊走中の細胞内で同時に捉えることができた。

研究成果の概要(英文)：Nonmuscle myosin II molecules are able to function by forming a bipolar filament in a cell under spatiotemporal control. We focused on the roles of some charge clusters in the rod region of myosin II molecule and tried to clarify the molecular mechanism of the bipolar filament formation. We revealed that two positive charge clusters close to the C-terminal end play an important role on the electrostatic interaction in assembly processes. In addition, we were able to capture the dynamic behaviors of myosin IIA and myosin IIB isoforms in a migrating cell simultaneously.

研究分野：生物化学

キーワード：ミオシン フィラメント 自己会合 細胞骨格 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

非筋細胞2型ミオシン(以後、ミオシンIIと呼ぶ)はアクチンフィラメントを動かす収縮力を生み出すモータータンパク質であり、細胞形態の変化や維持において中心的な役割を担っている。ミオシンスーパーファミリーの中でミオシンIIの際立った特徴は、会合して双極性のフィラメントを形成することである。両端に頭部を向けた双極性のフィラメント構造をとることにより、アクチンフィラメントを両方向からたぐり寄せ細胞内のアクチン細胞骨格を収縮させたり、細胞骨格に張力をかけることができる。横紋筋のミオシンは常にサルコメア構造内でフィラメントを形成しているのに対し、ミオシンIIは然るべき時に細胞内の然るべき場所で会合して双極性のフィラメントを形成するが、その分子機構は良くわかっていない。

私たちは、ミオシンIIのC末端に近い尾部領域が会合に必須であることを報告し、さらにその領域に一つの負電荷クラスター(N1)と二つの正電荷クラスター(P1とP2)が存在することを見出し、これら三つのクラスター間の静電相互作用による会合モデルを提案した(Nakasawa T. et al., 2005)。

ミオシンIIは不活性なモノマーの状態では、尾部を折り曲げたコンパクトな10S構造をとり、サブユニットの調節軽鎖がリン酸化されると、尾部が伸びた6S構造をとり、自発的に会合するようになることが、*in vitro*の実験によって示されていた。私たちは、尾部の不活性なミオシンIIが10S構造をとるために必要な二つの領域(R1とR2)をミオシンIIの尾部内に同定した。それらを骨格筋のミオシンのものと交換したキメラミオシンIIは10S構造をとれず、細胞が遊走する際に、進行方向の後方部分に取り残されてしまうことを見だし、不活性なミオシンIIがフィラメント内に取り込まれることを防ぐために10S構造をとるということを提案した。(Kiboku T. et al., 2013)。

私たちは、繊維芽細胞が遊走する際に、ミオシンIIAは前方ラメラに多く局在し、ミオシンIIBは主に後方の膜直下に局在することを見だし(Saitoh T. et al., 2001, Hirata N. et al., 2009)、ミオシンIIアイソフォームはそれぞれが細胞の極性化に伴ってフィラメントを局所的に形成することで、進行方向を維持した細胞遊走を可能にしているということを提唱している。

2. 研究の目的

本研究は、ミオシンIIの10S-6S構造変換を含め、双極性フィラメント形成の素過程を明らかにすること、さらに、各アイソフォームの細胞内での局所的なフィラメント形成の分子機構を明らかにすることを目的とし、以下の三つの観点から研究を進めた。

(1) 10S-6S構造変換の素過程: 10S構造形成

時にR1とR2が相互作用する頭部領域を明らかにする。

(2) 双極性フィラメント形成の素過程: 二つのミオシンII分子間の頭部を反対方向に向けたアンチパラレル相互作用および頭部をどう方向に向けたパラレル相互作用に参与する分子内領域を明らかにする。

(3) 細胞内におけるミオシンII双極性フィラメントの時空間的生成機構: 各アイソフォームの細胞内各所での10S-6S構造変換とモノマー-フィラメント変換のダイナミクスの実態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ミオシンIIBの尾部の α ヘリカル-コイルドコイル部分の注目している各領域(R1、R2、N1、P1、P2)の分子表面に露出している電荷を持つアミノ酸残基を逆電荷のアミノ酸に置換したミオシンIIB電荷逆転変異体(R1m、R2m、N1m、P1m、P2m)とEGFPとの融合タンパク質の培養細胞発現系を構築した。それらを用いて以下の解析を行った。①ストレスファイバー(アクチン細胞骨格)への局在の様子を観察した。②光褪色後蛍光回復法(FRAP)により挙動のダイナミクスを解析した。③Triton solubilityアッセイにより、アクチン細胞骨格への取り込み量を定量した。④ミオシンIIAが発現していないCOS-7細胞を用いてミオシンIIBのノックダウン-レスキュー実験を行ない、細胞質分裂時に機能できるかどうかを解析した。

(2) 全長ミオシンIIBのN1mとP1mの昆虫細胞発現系を構築し、それらを発現・精製し、*in vitro*での会合能を解析した。

(3) P1領域にCys残基を導入した尾部フラグメントを大腸菌発現系により調製し、benzophenone-4-iodoacetamide (BPIA)でラベルした。それらの光クロスリンク反応を行なって得られた架橋産物をLC/MS/MSで解析し、会合時の相互作用部位を予測した。

(4) ミオシンIIAとミオシンIIBのmCherryおよびEGFPとの融合タンパク質を同時に細胞に発現させ、それらの細胞遊走時の挙動を観察した。また、それぞれのアイソフォームを特異的siRNAによりノックダウンした細胞に、それぞれのアイソフォームを発現させ、表現型のレスキューにおけるアイソフォーム特異性を解析した。また、各アイソフォームの会合に必須なC末端尾部領域を交換したキメラミオシンII変異体を発現させ、表現型のレスキューに関わる領域を解析した。

4. 研究成果

(1) 10S-6S構造変換の素過程: R1およびR2領域の電荷逆転変異体R1m及びR2mの

HeLa TO 細胞（ミオシン IIB が発現していない）内での局在を観察したところ、R1m が、遊走時に後方に偏って局在することがわかった。また、FRAP 法により、R1m のダイナミクスが野生型 (WT) に比べて劣ることがわかった。R2m は WT と同様の挙動を示した。これらの結果と、提唱されている 10S 構造モデル (Burgess S. A. et al., 2007) から、尾部の R1 領域と頭部の必須軽鎖またはコンバータードメインとの静電相互作用が 10S 構造形成に重要であることが示唆された。

(2) 双極性フィラメント形成の素過程：N1、P1、P2 各クラスターの表面に露出している (α ヘリカル-コイルドコイル構造において b、c、f の位置) 3 つずつのアミノ酸の電荷を逆転させた変異体、N1m、P1m、P2m の会合能を、不死化繊維芽細胞 (MRC-5 SV1 TG1 細胞) 内でのストレスファイバーへの局在の有無によって判断した。P1m と P2m は、ほぼ細胞質内で拡散したのに対し、N1m は WT と同程度のストレスファイバーへの局在を示した。同細胞を用いて FRAP 解析をしたところ、蛍光回復にかかる時間の長さは $WT=N1m \gg P2m > P1m$ の順になった。また、Triton solubility アッセイによって、不溶性画分に存在する割合も $WT=N1m \gg P2m > P1m$ の順になることがわかった。COS-7 細胞を用いたノックダウン-レスキュー実験により、P1m と P2m は、細胞質分裂を適切に行うことができないのに対し、N1m は WT と同程度にレスキューできることがわかった。N1 については、さらに、b、c、f の位置に存在する負電荷アミノ酸残基 7 つ全てを正電荷に変えたもの (N1m2)、3 つを Ala に変えたもの (N1mA)、7 つ全てを Ala に変えたもの (N1mA2) を構築し、ストレスファイバーへの局在の有無を解析したが、変異によるストレスファイバーへの局在の異常はほとんど見られなかった。また、ミオシン IIB のより長い尾部フラグメントのコイルドコイルモデルを作成し、そこに表面電荷をドット状に表示させると、N1 クラスター領域は、そのすぐ N 端側に存在する負電荷クラスター (N0) と共に、非常に大きな負電荷の電場を形成していることがわかった。そこで、N0 と N1 を同時に電荷逆転させた変異体 (N0m-N1m) を構築したが、これも WT と同様にストレスファイバーに局在した。

(3) 昆虫細胞発現系により、リコンビナントの全長ミオシン IIB の N1m および P1m 電荷逆転変異体を発現・精製することに成功した。これらを用いて、*in vitro* における会合の塩濃度依存性を調べたところ、N1m は WT と同様の会合能を示したが、P1m は生理的塩濃度下において会合できないことがわかり、細胞内における挙動と相関する結果が得られた。

(4) P1 クラスター内の c の位置に存在する Arg を Cys に置換したリコンビナントミオシン IIB 尾部フラグメント IIB-BRF-R1846C を BPIA でラベルし、光クロスリンク反応を行なって架橋産物を得ることができた。それをキモトリプシンによって加水分解したペプチドを LC/MS/MS で解析した結果、P1 クラスターと C 末端の nonhelical tailpiece との架橋が起きていることを示す結果を得た。P1 と nonhelical tailpiece の架橋は、電子顕微鏡で観察されているアンチパラレル相互作用の際の尾部間のオーバーラップの長さを考慮すると、アンチパラレル相互作用では起こり得ない。よって、得られた架橋産物は、パラレル相互作用によって得られたものと考えられる。

(5) ヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞 (TIG-1) に mCherry-IIA と EGFP-IIB を同時に発現させ、細胞遊走時のそれぞれのアイソフォームの挙動を観察することに成功した。IIA は前方ラメラにおいて新たにフィラメントを形成し、そこからダイナミックに retrograde flow (遊走方向と逆向きの流れ) を行っていた。IIB は IIA よりも少し後方でフィラメントを形成し、同様に retrograde flow を行う様子が観察された。また、IIA は後方端の接着部位近傍にも多く局在した。これに対し、IIB は後方の細胞膜直下のピンと張った部分に多く局在していく様子が見られた。この細胞において、IIA をノックダウンすると、複数の仮足を伸展させることにより前方の形態が異常になり、一方、IIB をノックダウンすると、細胞体が細長くなった。IIA ノックダウンの表現型は、IIA 自身と C 末端尾部領域を IIA のものに置換し IIA と同様の局在をするようになったキメラ変異体 IIB-Atail によってレスキューされた。一方、IIB ノックダウンの表現型は、IIA とそれぞれの C 末端尾部キメラ変異体によってはレスキューされず、IIB のみによってレスキューされた。IIB が適切に機能するためには、モーター活性を有する頭部とフィラメント形成を担う尾部の両方が IIB の配列である必要があることが示唆できた。

以上の結果から、ミオシン II の双極性フィラメント形成には、尾部 C 末端の二つの正電荷クラスター領域 (特に P1) が重要な役割を果たしていることが示された。負電荷クラスターの N1 も重要であることを予想していたが、本研究によっては、それを確認することはできなかった。しかしながら、光クロスリンク実験によって、P1 と nonhelical tailpiece の相互作用による架橋産物を検出できたことは、パラレル相互作用時に、N1 と P1 が相互作用している可能性を示しているかもしれない。提唱しているパラレル相互作用モデルにおいて、nonhelical tailpiece の位置は表示されていないが (Nakasawa T. et

al., 2005)、このパラレル相互作用モデルにおいて N1 と P1 が向かい合った場合、他の部分で P1 と nonhelical tailpiece との相互作用が起こる可能性が十分にある (図 1)。N1 と P1 の架橋産物を直接検出することはできなかったが、これは、ラベルした BPIA の配向が適切でなかったからかもしれない。導入する Cys 残基の位置を変更するなど、さらなる条件検討が必要である。

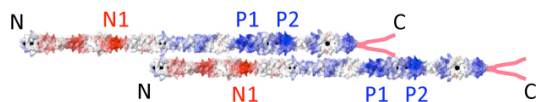


図 1 パラレル相互作用のパッキングモデル

N1 クラスターもやはり双極性フィラメント形成において重要な領域であると仮定すると、以下のことが考えられる。N1 クラスター領域の負電荷を変異させた場合、P1 と P2 の正電荷クラスター領域は、ミオシン II 尾部の他の負電荷領域と相互作用し、本来のものとは少し異なる双極性フィラメントを形成し、それは細胞内できちんと機能できる構造なのかもしれない。双極性フィラメント内におけるミオシン II 分子のパッケージングは、考えているよりも融通が利く、すなわち、アンチパラレルおよびパラレル相互作用がそれぞれ一種類のみの相互作用で起きているわけではないという可能性もあり得る。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kondo, T., Okada, M., Kunihiro, K., Takahashi, M., Yaoita, Y., Hosoya, H., and Hamao, K., Characterization of myosin II regulatory light chain isoforms in HeLa cells. *Cytoskeleton*, 査読有, 72 巻(12 号), (2015), 609-620. doi: 10.1002/cm.21268.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Hamada, E., Takahashi, M., and Murakami, Y., Molecular mode of folding and assembly of nonmuscle myosin II. The 4th Frontier Chemistry Center International Symposium 2016. 2. 23-24, 北海道大学 (北海道・札幌市)
- ② 倉賀野正弘, 上田太郎, 村上洋太, 高橋正行, ミオシン II 頭部ドメインによる生細胞内の張力負荷アクチン構造の可視化. BMB2015, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会, 合同大会 2015. 12. 1-4, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

- ③ 佐藤勇太, 上条桂樹, 村上洋太, 高橋正行, 非筋細胞ミオシン IIB による微小管動態の制御. BMB2015, 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会, 合同大会 2015. 12. 1-4, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ④ 倉賀野正弘, 村上洋太, 高橋正行, 正常ヒト胎児肺繊維芽細胞の方向持続的な遊走においてミオシン IIA と IIB は異なる役割を担う. 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015. 6.30-7.2, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ⑤ 佐藤勇太, 村上洋太, 高橋正行, 非筋細胞ミオシン II による微小管翻訳後修飾の制御. 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015. 6.30-7.2, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ⑥ 花田秀史, 村上洋太, 高橋正行, 上皮細胞の形態維持におけるミオシン II の役割. 第 67 回日本細胞生物学会大会, 2015. 6.30-7.2, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)
- ⑦ 佐藤勇太, 村上洋太, 高橋正行, ミオシン IIA と IIB はそれぞれ異なる機構で微小管の安定性制御に関与する. 第 66 回日本細胞生物学会大会, 2014.6.11-13, 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市)
- ⑧ Takahashi, M., Kuragano, M., Murakami, Y., Myosin II isoforms play distinct roles in directionally persistent migration of normal fibroblast. International Symposium on Mechano-biology 2014 (ISMB 2014). 2014. 5. 20-23, 岡山大学 (岡山県・岡山市)
- ⑨ Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Murakami, Y., Positive charge clusters in the rod region are essential for assembly of vertebrate nonmuscle myosin II. The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions. 2014. 1. 11-1, キャンパスプラザ京都 (京都府・京都市)
- ⑩ Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Nakasawa, T., Sato, M., Igarashi, S.,

Murakami, Y., Positive charge clusters in the C-terminal rod region are essential for assembly of vertebrate nonmuscle myosin II. 第 86 回日本生化学会大会, 2013. 9. 11-13, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑪ Sato, Y., Murakami, Y., Takahashi, M., Myosin II Inhibition Promotes Microtubule Bundling in Fibroblasts. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013. 5. 29-31, ウィンク愛知(愛知県・名古屋市)

⑫ Kuragano, M., Murakami, Y., Takahashi, M., Myosin II isoforms play distinct roles in maintenance of migratory polarity of normal fibroblast. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013. 5. 29-31, ウィンク愛知(愛知県・名古屋市)

6. 研究組織

(1) 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：5 0 2 4 1 2 9 5