

非筋細胞ミオシンIIアイソフォームの機能

北海道大学大学院理学研究科化学専攻

高橋正行, 中沢隆史, 佐藤政秋, 平田尚也, 三橋万梨子, 矢澤道生

All vertebrate cells, including muscle cells, contain nonmuscle myosin II which plays a role in a number of cell motility processes. Dynamic filament assembly-disassembly transition of myosin II molecules is particularly important in nonmuscle cells. In this review, we describe our recently proposed molecular mechanism for the filament formation of nonmuscle myosin II. We also discuss the distinct functions of two myosin II isoforms, IIA and IIB, during cell migration.

myosin II / nonmuscle cells / filament / phosphorylation / cell migration / subcellular localization

1. はじめに

ミオシンは、最も古くから研究されたモータータンパク質であり、ATPを加水分解することによってエネルギーを得て、アクチンとの相互作用による運動に変換する。我々の身体には、非筋細胞ミオシンIIとよばれているミオシンが、筋細胞を含めたすべての細胞に存在し、細胞質分裂、細胞の移動、細胞の形態変化等の細胞運動において重要な役割を担っている^[1,2]。

非筋細胞ミオシンII（以後、単にミオシンIIとよぶ）は筋肉のミオシンと同様に2本ずつの重鎖（200 kDa）、必須軽鎖（17 kDa）、調節軽鎖（20 kDa）の6サブユニットで構成され、2個の球状の頭部と細長い棒状の尾部からなる（Fig. 1a）。頭部は、ミオシンの基本的な特徴であるATPase活性部位とアクチン結合部位を含むモータードメインと、軽鎖結合部位であるネックからなる。尾部は α -helical coiled-coil構造をとり、ミオシンIIが会合して双極性のフィラメントを形成することに関与する。C末端はcoiled-coil構造をとらない短い領域にあり、non-helical tail pieceとよばれる。フィラメント構造が双極性であることによって、極性をもつアクチンフィラメントをたぐり寄せることができ、アクチンフィラメントの一方の端（プラス端）が細胞膜にアンカーされていると細胞の形態が変化することになる。筋細胞は、ミオシンとアクチンを基盤とするフィラメント群が細胞内に常に安定に存在し、収縮運動に特化した形態をしている。それに対して非筋細胞では、

ミオシンIIとアクチンを含む細胞骨格タンパク質が、必要なときに必要な場所に集合して細胞運動を可能にする構造体（収縮装置）を一時的に形成する。

脊椎動物のミオシンIIは、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK）により調節軽鎖のSer19がリン酸化されるとアクチン活性化ATPaseが上昇し、それとともにフィラメントを形成できるようになる。ミオシン軽鎖ホスファターゼ（MLCP）のミオシン結合サブユニット（MBS）がRho-キナーゼによってリン酸化されホスファターゼ活性が抑制されると、ミオシンII調節軽鎖のリン酸化状態が上がり活性化するという経路の発見後、他の経路も報告され、細胞内で

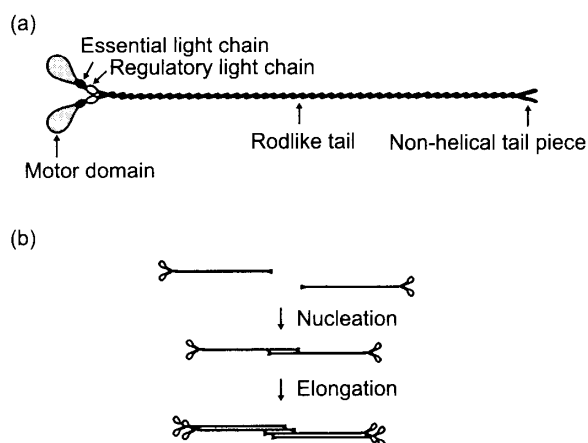


Fig. 1 Schematic diagram of a nonmuscle myosin II molecule (a), and a model for assembly processes of myosin II molecules (b).

Functions of Nonmuscle Myosin II Isoforms

Masayuki TAKAHASHI, Takashi NAKASAWA, Masaaki SATO, Naoya HIRATA,
Mariko MITSUHASHI and Michio YAZAWA

Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University

のミオシンIIの活性調節はかなり多様であることが示されてきた³⁾。また、平滑筋ミオシンでは、Ser19に加えてThr18もリン酸化された二重リン酸化状態になるとアクチン活性化ATPaseがさらに上昇し、フィラメントもより安定化される。非筋細胞でも、リン酸化状態を見分けることが可能な抗体を用いて細胞内に二重リン酸化されたミオシンIIが存在することが明らかにされ、その働きが注目されはじめてきた。

脊椎動物には3種類のミオシンII重鎖アイソフォーム(MHC-IIA, IIB, IIC)が存在し、それぞれがホモダイマーを形成してミオシンIIA, IIB, IICとなる^{1), 3), 5)}。IIAとIIBに関する研究は少しずつではあるが蓄積されてきた。IICについてはヒトゲノムの全解読の過程で存在が予想され、実際に発現していることが確認されたばかりである⁹⁾。これら3種類のアイソフォームはそれぞれ異なる組織発現と異なるモーター活性を示す。IIBにはモータードメインのLoop1とLoop2に挿入配列をもつサブアイソフォームがあり、中枢神経組織特異的に発現している^{6), 7)}。またIIAとIIBに関しては、それぞれの重鎖のロックアウトマウスが胎性致死になる^{8), 9)}ことから、お互いに相補できない機能をもっていることが予想される。ところが、細胞内でのミオシンIIの機能に関してはアイソフォームの区別なく議論される場合が多かった。本稿では、アイソフォームの違いにこだわって行ってきた我々の研究を、最近の報告と関連づけて紹介したい。

2. フィラメント形成の分子機構

ミオシンIIはフィラメントを形成することによって機能するので、フィラメントがいかにして必要なときに必要な場所で形成されるのかは非常に重要な問題である。ミオシンIIは、横紋筋ミオシンのフィラメントに比べて小さな、15-30分子からなる双極性のフィラメントを形成する。双極性のフィラメントは、ミオシンIIがアンチパラレルに相互作用しオリゴマーとなる核形成過程と、形成されたオリゴマーにミオシンIIがパラレルに相互作用し両方向へ伸長するという2つの過程により形成されると考えられている(**Fig. 1b**)。ミオシンII分子内においてフィラメント形成に必須な領域をつきとめる試みが古くから行われ、それはC末端近傍に存在することがわかってきた。Sohnらは骨格筋のミオシン重鎖の尾部フラグメントを用いて、C末端近傍の29残基のアミノ酸配列がフィラメント形成に必須な領域であると特定し、assembly competence domain (ACD)と命名した¹⁰⁾。それと相応する配列が平滑筋ミオシンやミオシンIIにも存在する。

我々はミオシンIIB重鎖のC末端248アミノ酸残基

からなる尾部フラグメント(BRF248; 尾部の約4分の1)とそのさまざまな欠損変異体を作製し、溶解度の塩濃度依存性を解析した。その結果、会合に必要な2カ所の領域を特定することができ、それぞれをnACD1(D1729-T1763)、nACD2(A1875-A1913)と命名した。nACD2のN末端部分は骨格筋のACDに対応する領域である。さらに、BRF248の α -helical coiled-coil部分の分子モデルをCrickのcoiled-coilモデルをもとに構築し、表面電荷をマッピングしたところ、極端に負電荷に偏ったクラスター(E1742-E1753; N1)と正電荷に偏ったクラスター(K1874-R1884; P2)が、それぞれnACD1とnACD2内に存在することがわかった。また、nACD2より少しN末端側の部分にもう1つの正電荷クラスター(K1842-K1852; P1)が存在していた。

構築したモデルを用いて2本のフラグメントが最も静電相互作用しやすいパッキングの仕方考えた。その結果、アンチパラレル会合はおもにN1とP2の間の、パラレル会合はおもにN1とP1の間の強い静電相互作用によって形成されていることが示唆された(**Fig. 2**)。アンチパラレルモデルから見積もった分子間の重なり部分の長さは、さまざまなミオシンIIで報告されている43 nmに近いことが(non-helical tail piece)の高次構造が未決定なので少々強引ではあるが)予想された。一方、パラレルモデルから見積もった分子間のずれの長さも、報告されている14.3 nmに非常に近い値となった。以上の結果から、非筋細胞ミオシンIIのフィラメントが、おもにアンチパラレル分子間のN1とP2の静電相互作用による核形成過程と、それに引き続くパラレル分子間のN1とP1の静電相互作用による伸長過程によって形成されるという分子機構を提案した¹¹⁾。最近、重鎖フラグメントのN1とP2領域で溶媒に接する表面にある極性残基の電荷を逆にした変異フラグメントが、生理的塩濃度において会合しないことがわかった。一次構造から推測すると、平滑筋、横紋筋、心筋のミオシンにも同様な電荷クラスターが存在する可能性がある。提唱したモデルはミオシンII分子に共通な分子機構であるかもしれない。

細胞内で、複数のミオシンIIアイソフォームが発現している場合、フィラメントの形成様式、すなわちアイソフォームを区別しあってホモフィラメントを作るのか、あるいはヘテロフィラメントを作るのかについてはまったくわかっていない。アイソフォーム間でモーター活性が異なること、また、後述するようにアイソフォームの細胞内局在が異なる場合があることから、アイソフォームがそれぞれ機能を発揮するには、ホモフィラメントを形成したほうが都合がよいと思われる。その際、アイソフォーム間で一次構造が最も異なるnon-

非筋細胞ミオシンIIアイソフォームの機能

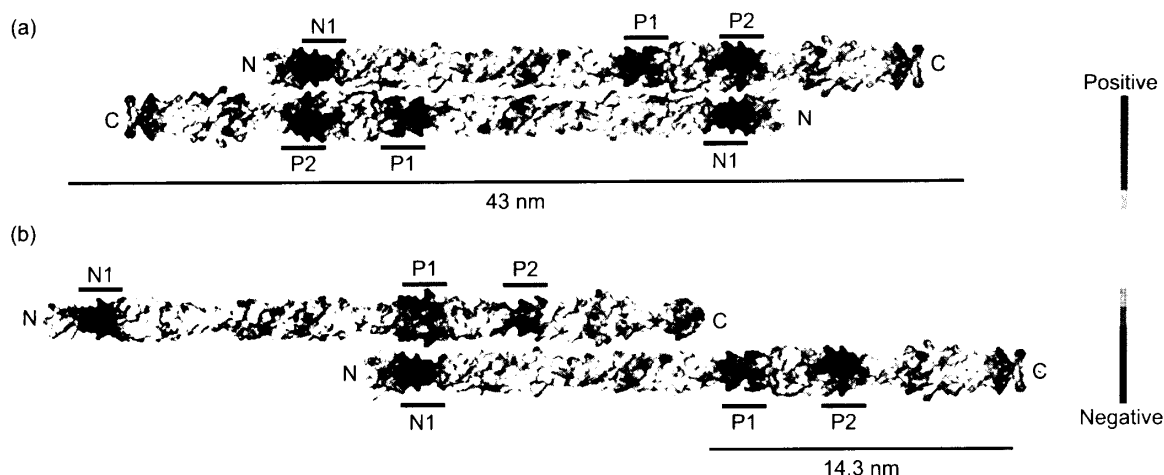


Fig. 2 Molecular packing models of BRF-248. (a) Antiparallel model. Interaction between N1 and P2 of each fragment is major in this mode. An underline indicates the expected overlap length (43 nm) of each molecule including the non-helical tail piece. Note that each molecule faces the same surface to the viewer. (b) Parallel model. Interaction between N1 and P1 of each fragment is major in this mode. An underline indicates the stagger length (14.3 nm) between each molecule. Note that the upper molecule faces a surface of a view of 40° counterclockwise rotation relative to the lower one.

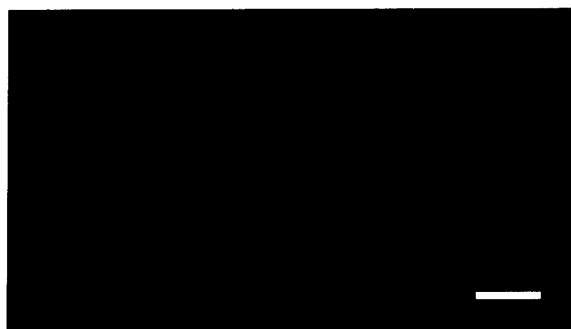


Fig. 3 Localization of myosin II isoforms in migrating MRC-5 cell. The red and green colors indicate myosin IIA and IIB, respectively. Bar: 20 μm .

helical tail piece がそれぞれのアイソフォームを見分ける役割を担っているのではと予想した。

そこで、IIA と IIB アイソフォームの尾部フラグメントを *in vitro* で混ぜ、どのような会合体が形成されるのかを、蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross correlation spectroscopy; FCCS) によって調べた。Fig. 2 のアンチパラレルモデルを見ると、BRF248 は non-helical tail piece と相互作用する領域を欠いていることがわかる。そこで、BRF248 の N 末端側に 57 アミノ酸残基を加えたフラグメント BRF305 とそれに相当する IIA の尾部フラグメント ARF296 を解析に用いた。その結果、*in vitro* においては BRF305 と ARF296 はそれぞれを区別することなくヘテロ会合体を作ることがわかった。また、一度形成された会合体が安定に存在せず、フラグメントの解離、会合を動的に繰り返していることもわかった^[2]。もし、細胞内でホモフィラメントが優勢的に形成され

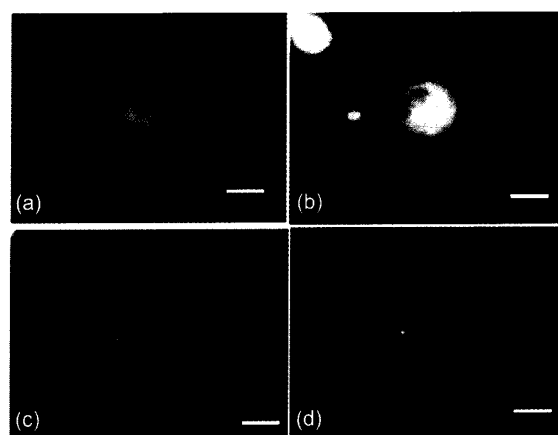


Fig. 4 Distribution of phosphorylated regulatory light chains (RLCs) in spreading MRC-5 cells. The red color indicates diphosphorylated RLCs. The green color indicates monophosphorylated RLCs (a, c), vinculin (b) and myosin IIB (d). Yellow indicates area of colocalization. Bars: 20 μm .

るのであれば、それを可能にする調節機構があるにちがいない。IIA と IIB アイソフォームのフィラメント形成が、それぞれ mts-1 (S100 ファミリーの 1 つ) が non-helical tail piece 近傍へ結合すること、または non-helical tail piece が PKC によってリン酸化されることにより、抑制されるという報告がある^[3]。最近我々は FCCS の測定により、BRF305 と ARF296 のヘテロ会合体に Ca^{2+} 存在下で mts-1 を加えると、ARF296 のみを脱会合状態にし、BRF305 のホモ会合体が形成されることを見いだした。今後、フィラメント形成様式のさらなる *in vitro* での解析、また *in vivo* における解析が必要である。

3. 細胞の移動時におけるミオシンIIアイソフォームの機能

細胞は、仮足（糸状仮足及び葉状仮足）の伸長、基質への接着、細胞質の前方への移動、後方の脱接着及び退縮の過程を繰り返すことによって移動することができる^{14), 15)}。その際に細胞内に前方と後方という明らかな極性ができる。仮足の伸長はおもにアクチンの重合-脱重合による形態変化が関与している。先端端に近い部分では小さな接着点の形成がダイナミックに起きていて、それらが集まると安定な接着斑になる。この過程の制御には低分子量Gタンパク質のRhoファミリーが関与している。活性型Racにより仮足が伸長し新たな接着点形成され、活性型Rhoにより安定な接着斑とストレスファイバーが形成される¹⁶⁾。

ミオシンIIがどの過程で働いているかは細胞の種類によって異なる。細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)の走化性の運動時に、ミオシンIIは細胞の側部から後方にかけて局在し、おもに後部の退縮にかかわっている¹⁷⁾。側部からの新たな仮足の伸長を抑えている可能性も指摘されている²⁾。同じく走化性を示す好中球においてもミオシンIIは同様な局在を示す。一方、繊維芽細胞は移動時に前方が広がった扇型を示すが、このときミオシンIIは側部から後方にかけての局在に加えて、さらに仮足と細胞体の間のラメラ（アクチンフィラメントが豊富に存在する）にも局在し、細胞質の前方への移動にも関与する¹⁸⁾。極端な例であるが、魚の角質細胞ではミオシンIIはほとんどラメラに局在している¹⁹⁾。

我々はミオシンIIアイソフォームの機能の差異を探索する過程で、ヒトの繊維芽細胞MRC-5が移動する際に、IIAとIIBの局在が異なることを見いだした²⁰⁾。IIAの局在パターンは上述の典型的な繊維芽細胞のミオシンIIの局在と同様であったが、IIBは後方の側部にのみ限定的に局在した。さらに、調節軽鎖が二重リン酸化されて高度に活性化しているミオシンIIは、前方ラメラに多く局在していることがわかった。また、最近、MRC-5細胞をシリコン基板上で培養したところ、移動時にIIAとIIBの局在がきわだって異なる場合があることがわかった。IIAは細胞の前方と後方末端部に、IIBはその間の細胞質部分にそれぞれ完全に棲み分けて局在していた（Fig. 3）。以上の結果から、おもにIIAが高度に活性化されて細胞質の前方への移動と後部の退縮をおこない、直接的に細胞の移動に寄与するという仮説を立てた。

繊維芽細胞は、一度剥がされてから再度基質に接着する過程で、薄い葉状仮足を全方向に伸展させ同心円

状に広がる。その後、伸展方向が不均一になりはじめ、ある方向の葉状仮足が特に発達すると、そこが前方となって移動する。我々はこの伸展段階と極性形成段階に注目し、ミオシンIIアイソフォームの局在と調節軽鎖のリン酸化状態の局所性を解析したところ、興味深い結果を得た²¹⁾。細胞が同心円状に伸展する際にIIAは細胞全体、特に細胞周縁部に強い局在を示し、IIBは中心部に局在し周縁部には局在しなかった。その際、周縁部において調節軽鎖の二重リン酸化は一重リン酸化よりわずかに外側で起こっていた（Fig. 4a）。また、二重リン酸化調節軽鎖ができたての接着斑近傍に局在し、その内側の成熟した接着斑近傍には局在しなかった（接着斑はピンキュリンの局在で判断した）（Fig. 4b）。さらに、周縁部で全く二重リン酸化されていない細胞も存在したことから（Fig. 4c）、細胞が均一に広がる過程において、伸展部で調節軽鎖のリン酸化状態が周期的に同調して変化している可能性が示唆された。

松村らのグループから、移動時の先端端においては調節軽鎖を脱リン酸化するMLCPの活性は常に高く、MLCK活性が低いときに仮足が伸長し、MLCK活性が高くなると新たな接着点形成され、さらにMLCPの活性を抑制するRho-キナーゼの活性が高くなると安定な接着斑が形成されるというモデルが提唱されている²²⁾。我々の結果は、この過程においてIIAの調節軽鎖の二重リン酸化状態がダイナミックに変化することを示すものではないだろうか。調節軽鎖を二重リン酸化することができるキナーゼの候補として、MLCK、Rho-キナーゼが考えられていたが、最近、ZIP-キナーゼが有望な候補としてあげられている^{23), 24)}。

一方のIIBは細胞の移動に関与しているのであろうか？ IIB重鎖のノックアウトマウス由来の繊維芽細胞は、細胞体のあちこちから突起を出し方向が定まらない移動をする。この異常はIIB重鎖を強制発現させることにより回復するが、IIA重鎖によっては相補できないことが報告された²⁵⁾。我々は、基質に再度接着した後、伸展段階が進んで方向に極性が現れ始めた細胞では、周縁部において伸展を止めた部分にIIBが局在し、そこで二重リン酸化が起きていないことを示唆する結果を得た（Fig. 4d）²¹⁾。Sellersらのグループから、ミオシンIIは筋肉のミオシンに比べて、アクトミオシンのADP親和性が高く、かつADPの放出速度が遅いという結果が報告されている^{26), 27)}。特にIIBにおいては、ADPの放出速度が定常状態のATPase活性速度と同等のレベルであったことから、ATPaseサイクルのうちでアクチンに対する強い結合状態が長い可能性が考えられる。IIBは高度に活性化されないことが重要で、アクチンフィラメントを保持することによって、細胞の形態を維持

しているのではないだろうか。その結果、仮足の伸展を前方に限定させることにより間接的に移動に関与していると考えられる。アイソフォームが特異的な機能を発現するには、それぞれが必要なときに必要な場所に局在することが必須であるが、その分子機構はよくわかっていない。血管内皮細胞の移動時におけるIIBの後方への局在に、Rho-キナーゼによる調節軽鎖のリン酸化が寄与しているという報告があるのみである²⁸⁾。

前述の尾部フラグメントBRF305を細胞内に強制発現させると、ドミナントネガティブ効果によりIIB重鎖のノックアウトマウス由来の繊維芽細胞と同様の形態変化が起きるが、ARF296では起きないことがわかった²⁹⁾。この結果は、尾部フラグメント内にアイソフォームを見分けるしくみが隠されていることを示すと同時に、それらによってアイソフォーム特異的に機能を阻害できる可能性を示す。

4. おわりに

数々のunconventionalなミオシンの発見によってミオシンスーパーファミリーの構成が明らかにされてきた。近年、細胞の極性形成にかかわるタンパク質とミオシンIIとの相互作用が示唆されている^{30), 31)}。いろいろなミオシンのなかで、ミオシンIIが行えることは、さまざまなシグナルの一番下で、せっせとアクチン繊維をたぐりよせるという単純なことではあるが、その結果生じる細胞のかたちの変化は、今まで考えられている以上に細胞にとって重要な現象にかかわっているかもしれない。そこにアイソフォーム特異的な機能が関与している可能性も十分に考えられる。

謝 辞

分子モデリングを行っていただいた東京都臨床研の松澤史子氏、相川聖一氏に感謝致します。蛍光相互相関分光測定において共同研究していただいた北大電子研の金城政孝助教授、北海道研究成果活用プラザの坂田啓司氏に感謝いたします。貴重な抗体をご供与いただいた北里大学薬学部の佐々木泰治教授、群馬大学医学部の白尾智明教授、広島大学大学院理学研究科の細谷浩史教授に感謝致します。本研究を遂行するにあたり、いろいろとご助言、ご協力いただいたNIH, NHLBIのRobert S. Adelstein博士、東京大学大学院理学研究科の山岸皓彦教授に感謝致します。

文 献

- 1) Sellers, J. R. (1999) *Myosins*, 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford, U.K.
- 2) Spudich, J. A. (1989) *Cell Regulation* **1**, 1-11.
- 3) Bresnick, A. R. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 26-33.
- 4) 高橋正行 (1994) 生化学 **66**, 1515-1519.
- 5) Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R. and Adelstein, R. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 2800-2808.
- 6) Takahashi, M., Kawamoto, S. and Adelstein, R. S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17864-17871.
- 7) Miyazaki, T., Watanabe, M., Yamagishi, A. and Takahashi, M. (2000) *Neurosci. Res.* **37**, 299-306.
- 8) Conti, M. A., Even-Ram, S., Liu, C., Yamada, K. M. and Adelstein, R. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 41263-41266.
- 9) Tullio, A. N., Accili, D., Ferrans, V. J., Yu, Z., Takeda, K., Grinberg, A., Westphal, H., Preston, Y. A. and Adelstein, R. S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12407-12412.
- 10) Sohn, R. L., Vikstrom, K. L., Strauss, M., Cohen, C., Szent-Györgyi, A. G. and Leinwand, L. A. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 317-330.
- 11) Nakasawa, T., Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Togashi, Y., Saitoh, T., Yamagishi, A. and Yazawa, M. (2005) *Biochemistry* **44**, 174-183.
- 12) 三橋万梨子, 坂田啓司, 金城政孝, 高橋正行, 矢澤道生: 第42回日本生物物理学会年会 (京都, 2004年12月13日).
- 13) Murakami, N., Kotula, L. and Hwang, Y. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 11441-11451.
- 14) Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996) *Cell* **84**, 359-369.
- 15) Mitchison, T. J. and Cramer, L. P. (1996) *Cell* **84**, 371-379.
- 16) Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004) *Dev. Biol.* **265**, 23-32.
- 17) Yumura, S. and Fukui, Y. (1985) *Nature* **314**, 194-196.
- 18) Verkhovsky, A. B., Svitkina, T. M. and Borisy, G. G. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 989-1002.
- 19) Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., McQuade, K. M. and Borisy, G. G. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 397-415.
- 20) Saitoh, T., Takemura, S., Ueda, K., Hosoya, H., Nagayama, M., Haga, H., Kawabata, K., Yamagishi, A. and Takahashi, M. (2001) *FEBS Lett.* **509**, 365-369.
- 21) Hirata, N., Takahashi, M. and Yazawa, M. (2005) *Cell Struct. Funct.* **30**, Suppl. 110.
- 22) Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D. J., Yamakita, Y., Yamashiro, S. and Matsumura, F. (2004) *J. Cell Biol.* **164**, 427-439.
- 23) Murata-Hori, M., Fukuta, Y., Ueda, K., Iwasaki, T. and Hosoya, H. (2001) *Oncogene* **20**, 8175-8183.
- 24) Komatsu, S. and Ikebe, M. (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 243-254.
- 25) Lo, C. M., Buxton, D. B., Chua, G. C., Dembo, M., Adelstein, R. S. and Wang, Y. -L. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 982-989.
- 26) Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E. V. and Sellers, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27439-27448.
- 27) Kovacs, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y. and Sellers, J. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 38132-38140.
- 28) Kolega, J. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 4745-4757.
- 29) Sato, M., Takahashi, M., Ashio, M. and Yazawa, M. (2005) *Cell Struct. Funct.* **30**, Suppl. 109.
- 30) Guo, S. and Kempfues, K. J. (1996) *Nature* **382**, 455-458.
- 31) Ohshiro, T., Yagami, T., Zhang, C. and Matsuzaki, F. (2000) *Nature* **408**, 593-596.