



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Roles of Nonmuscle Myosin II Isoforms in Stress Fiber Organization and Directionally Persistent Migration of Fibroblasts [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	倉賀野, 正弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	乙第7063号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71857
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_KURAGANO_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 倉賀野 正弘

学 位 論 文 題 名

Studies on Roles of Nonmuscle Myosin II Isoforms in Stress Fiber Organization and Directionally Persistent Migration of Fibroblasts

(線維芽細胞のストレスファイバー形成と方向持続的遊走における
非筋細胞ミオシン II アイソフォームの役割に関する研究)

非筋細胞ミオシン II (以下 NMII) は、ATP を加水分解して得たエネルギーを利用してアクチンフィラメント (以下 F-actin) を動かすモータータンパク質であり、様々な細胞運動において重要な役割を果たす。NMII は一対ずつの重鎖、必須軽鎖、調節軽鎖から構成され、その頭部は ATPase 活性とモーター活性を持ち、尾部は双極性フィラメントの形成に関与する。哺乳類には 3 種類のアイソフォーム (NMIIA、NMIIB、NMIIC) が存在する。これらのアイソフォームは各組織や細胞での発現量比が異なることが報告されている。線維芽細胞において主要なアイソフォームである NMIIA と NMIIB は、*in vitro* の研究から、異なる分子特性をもつことが示されている。NMIIA は、NMIIB よりも高い ATPase 活性とモーター活性を持ち、F-actin を活発に動かす。一方、NMIIB は NMIIA より高い Duty Ratio (ATPase cycle において、F-actin に対して強い結合状態にいる時間の割合) を示す。そのため、NMIIB は F-actin を架橋・保持する能力に優れている。しかしながら、細胞レベルでの NMII アイソフォームの機能の差異に関しては、不明な点が多く残されている。本研究は、NMII と F-actin が主要な構成因子である収縮装置のストレスファイバー (以下 SF) の形成と機能、およびそれらが時空間的に制御されることによって可能となる細胞遊走における NMIIA と NMIIB の機能を解明することを目的とした。

1 : NMII 頭部ドメイン S1 を用いた新規な張力プローブの開発

一般に、細胞が発生する張力は、変形を可視化できる様々な基質の変形度合いによって解析されているが、張力負荷がかかった細胞骨格構造自体を直接、解析することができない。最近、細胞性粘菌において NMII 頭部ドメイン S1 の変異体が、張力を発生していると推測される領域の F-actin に優先的に結合することが報告された。本章では、アイソフォームの違い、並びにモーター特性が異なる変異体に注目し、各種 S1-EGFP の細胞内局在を解析することで、張力発生領域プローブとしての可能性を検討した。その結果、IIB-S1-R709C 変異体が SF、および細胞質分裂時に形成される収縮環に局在できることを見出した。また、Triton X-100 solubility assay により、この変異体が他の S1 に比べて細胞骨格画分に多く含まれることを確認した。この変異は *in vitro* の研究から、NMIIB の duty ratio をさらに高くすることが示されている。IIB-S1-R709C が張力の増加した SF を特異的に認識するかを確認するために、伸縮性シリコンチャンバーを用いて、細胞を 14% 伸展した。その結果、伸展方向に配向した SF では IIB-S1-R709C の結合が増加した。以上の結果は、IIB-S1-R709C-EGFP (S1 プローブ) は細胞内における張力発生領域プローブとして機能し得ることを示す。

2 : SF subtype の形成・機能発現における NMIIA と NMIIIB の機能

SF は、主に transverse arc (TA)、ventral SF (vSF)、dorsal SF (dSF) の 3 種の subtype に分類される。本章は、ヒト不死化線維芽細胞 MRC-5 SV1 TG1 細胞を用いて、SF subtype の形成と機能発現における NMIIA と NMIIIB の役割を解明することを目的とした。siRNA によるアイソフォーム特異的な Knockdown (KD) の結果、NMIIA と NMIIIB はそれぞれ TA と vSF の形成に必須であることを見出した。dSF は NMIIA と NMIIIB いずれのアイソフォームの KD においても、消失した。遊走中の細胞の前方領域にはアクチン重合による lamellipodia とその後方のアクチンネットワークを含む薄いシート状構造である lamella が形成される。最近、lamella を薄く保つ (lamellar flattening) 為に TA が必要であることが報告された。本研究では NMIIIB-KD 細胞において TA が形成されるにもかかわらず、lamellar flattening に失敗する、すなわち lamella の厚みが増加することを見出した。さらに、KD-Rescue 実験の結果、NMIIA-KD 細胞において、過剰発現させた NMIIIB は TA の形成不全を回復できたが、その TA は lamella を薄い状態に維持することはできなかった。一方、NMIIIB-KD による vSF の形成不全と lamellar flattening の欠陥は過剰発現させた NMIIA によって回復されなかった。以上の結果から、NMIIA と NMIIIB の両方が TA の正常な機能に必要であること、また、vSF の形成は NMIIIB に特異的な役割であることが明らかになった。さらに、S1 プローブが直線状の vSF に選択的に局在することを見出した。この結果は、SF subtype 間で F-actin の構造に違いがある可能性を示す。

3 : 正常線維芽細胞の方向持続的遊走における NMIIA と NMIIIB の機能

方向性持続的な細胞遊走は、胚形成、免疫応答および創傷治癒にとって重要なプロセスである。細胞が遊走を行う為には前後極性の形成と維持が必要である。NMII は細胞遊走において、収縮力の発生や形態制御という観点から、重要な役割を担う。本章では、ヒト正常線維芽細胞 TIG-1 の方向持続的な遊走における NMII アイソフォームの機能解明を目的とした。NMIIA-KD 細胞は、前方領域において不安定な細胞膜の突出が起き、方向持続性はわずかに低下したが、おおよその遊走方向（前後の極性）は維持されていた。一方、NMIIIB-KD 細胞は、2 時間程遊走方向を維持するが、細胞後部の尾部の付け根の部分から細胞膜の突出が起こり、突然遊走方向が 180°逆転した。その結果、方向持続性が NMIIA-KD 細胞よりも大きく低下した。さらに、NMIIIB-KD 細胞は、後方領域の SF における S1 プローブの局在が通常よりも弱くなった。これらの結果は、NMIIA は前方領域で安定な細胞膜の突出を維持することで遊走方向の舵取りとして機能し、一方で、NMIIIB は後方領域の SF で張力を発生させて不要な細胞膜の突出を抑制することで、前方-後方の極性を維持している可能性を示す。

本研究では、細胞骨格制御過程である SF の形成・機能発現と、正常な細胞骨格制御による方向持続的な遊走に焦点をあて、NMIIA と NMIIIB の特異的機能を総括的に研究した。その結果、頭部領域の ATPase 活性・モーター活性や尾部領域のフィラメント形成能の違いという分子レベルの特性の違いが、SF の集合・脱集合の過程と細胞の極性形成や遊走様式の制御機構に大きく影響することを明らかにした。今後、SF subtype の特性と方向持続的な細胞遊走との関係における NMII アイソフォームの役割を詳細に解析することによって、細胞運動およびメカノバイオロジー分野のさらなる発展が期待される。