



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Functions of Nonmuscle Myosin II Isoforms in Actin--Microtubule Crosstalk [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 勇太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13673号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74155
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Sato_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 佐藤 勇太

学 位 論 文 題 名

Studies on Functions of Nonmuscle Myosin II Isoforms in Actin–Microtubule Crosstalk
(アクチン–微小管クロストークにおける非筋ミオシン II アイソフォームの機能に関する研究)

アクチン、微小管、中間径フィラメントからなる細胞骨格は細胞の形態決定や維持、細胞遊走など多くの細胞機能に重要な役割を果たしている。それぞれの細胞骨格の独立の機能に加え、異なる細胞骨格間のコミュニケーションによって初めて果たされる機能も多く存在している。この細胞骨格間クロストークは、次第にその重要性が認識されてきた。これまでに多くのクロストーク制御因子やそのメカニズムが提唱されているものの、全貌は明らかでない。アクチン–ミオシン II による細胞内収縮マシナリーが微小管ダイナミクスを制御し、内皮細胞や神経細胞の形態形成を調節しているとの報告があるが、ミオシン II、あるいはミオシン II によって生み出された収縮力がどのように微小管ダイナミクスを制御しているのか、そのメカニズムは不明である。本研究では、非筋ミオシン II (NMII) の主要なアイソフォーム、NMIIA と NMIIIB の細胞内における機能の差異に注目することで、アクチン–微小管クロストークにおける各アイソフォームの役割を解明することを目的とした。

1. 半保存的細胞骨格分画手法の開発

細胞は細胞外環境や細胞内シグナルに柔軟に応答し、適切な細胞機能を発揮する。これには細胞骨格のある種の柔軟性が寄与している。すなわち、細胞骨格は重合体として存在するのみではなく、細胞骨格に取り込まれていない遊離成分をもち、シグナルに応答した重合・脱重合を介してその形成状態を変化させている。細胞骨格の形成状態を解析するために、それぞれの細胞骨格に適した手法による、界面活性剤を用いた細胞膜透過を主軸とした骨格画分–遊離画分の分離が行われてきた。しかし、細胞骨格間クロストークの観点から、実験操作中にはいずれの細胞骨格の状態も維持されている必要がある。これまでに用いられてきたアクチン分画法および微小管分画法に従い、細胞膜透過後の細胞骨格を免疫蛍光染色、および免疫ブロッティングにて解析したところ、解析対象となっていない側の細胞骨格の状態が破綻していることが明らかとなった。そこで本章では、透過処理によってアクチン、微小管のどちらの状態も保たれるような分画手法を開発することを目的とした。今回注目した PEM-buffer は、微小管の状態を維持するときに多く用いられている。PEM-buffer に界面活性剤 Triton X-100 を加えた PEMT-buffer を用いて細胞膜透過を行ったのち細胞骨格を観察すると、微小管だけでなくアクチン骨格も高度にその状態が維持されていることがわかった。一方、透過処理の時間を長くすると微小管が次第に脱重合し、遊離画分に移行する様子が見られた。このことは PEMT-buffer では微小管の状態維持にはまだ不十分であることを示している。そこで微小管の安定化剤である taxol を低濃度加えた PEMTT-buffer を調製して再度同様の実験を行ったところ、長時間透過による微小管の脱重合は一切見られなくなった。また、taxol による過剰な微小管安定化も見られなかった。PEMTT-buffer による半保存的細胞骨格分画手法を "semi-retentive cytoskeletal fractionation (SERCYF)" と命名した。この手法により、アクチン–微小管クロストークの一端であ

る、GEF-H1 を介したアクチン骨格の発達を、生化学的に定量化することに成功した。

2. 微小管ダイナミクスの制御における NMIIA と NMIIB の機能

NMII はアクチン–微小管クロストークに関わる因子のひとつである。NMII は ATPase 活性依存的にアクチンフィラメントを動かし細胞内収縮力を発生させることを主要な機能としている。近年、阻害剤、あるいは柔らかい基質上での培養による NMII 活性阻害実験から、細胞内収縮力が微小管の伸長を抑制していることが示唆されたが、その分子メカニズムは不明である。本章では、特性の異なるアイソフォーム、NMIIA と NMIIB それぞれが微小管ダイナミクス制御に関与しているかどうかを明らかにし、またその分子メカニズムを解明することを目的とした。本章で用いた U-2 OS 細胞の NMIIA または NMIIB をそれぞれ特異的な siRNA によりノックダウン (KD) し、細胞内収縮力を解析したところ、主に NMIIA が細胞内収縮力の発生に関わっていることがわかった。続いて微小管ダイナミクスを EB1-EGFP のライブイメージングにより解析したところ、NMIIA-KD 細胞、NMIIB-KD 細胞のいずれもが微小管伸長速度の増加を示した。この結果は、NMII、少なくとも NMIIB は、収縮力の発生に依存しない形で微小管ダイナミクスの制御に関与することを示している。それらのメカニズムを明らかにするため、アクチンの骨格形成状態およびダイナミクスに注目した。SERCYF 法により、NMIIA-KD 細胞、NMIIB-KD 細胞のいずれにおいても骨格画分のアクチンが減少することが示された。また FRAP 法により、NMIIA-KD 細胞ではラメラネットワークの維持ができなくなり、NMIIB-KD 細胞ではアクチン分子の骨格からの解離が加速していることが明らかとなった。以上より、NMII はアクチン骨格の制御を介して微小管ダイナミクスを制御することが考えられた。そこでアクチン脱重合阻害剤である jasplakinolide を低濃度添加したところ、NMIIB-KD による微小管伸長の加速が抑制された。このことから NMIIB はアクチン骨格を安定化することで、微小管の伸長を抑制していることが示唆された。一方で NMIIA-KD 細胞では formin ファミリータンパク質である mDia1, mDia2, mDia3 の発現が大きく減少していた。mDia1 の KD によって微小管伸長速度が増加したことから、NMIIA は mDia タンパク質を量的に維持することで微小管の伸長を抑制していることが示唆された。以上の結果から、NMIIA と NMIIB は異なるメカニズムにより微小管伸長を抑制していることが明らかとなった。また、NMIIB による微小管制御機構はこれまでの知見と異なり、細胞内収縮力に依存しない新規のメカニズムであることが示された。

本研究では、アクチン–微小管クロストークにおける NMII アイソフォームの機能を解析し、これまで広く解析されてきたアクチンとの相互作用だけでなく、微小管との相互作用もまたアイソフォーム NMIIA, NMIIB 間で異なることを示した。またその過程において、アクチン、微小管どちらの解析にも利用できる分画手法を開発した。この手法により、クロストークに関する研究の更なる発展が期待できる。今後、NMII アイソフォーム依存的な微小管制御による細胞形態や細胞運動への影響を詳細に解析することによって、細胞がもつ複雑なプロセスの解明に一步近づくことが期待される。