

(研究題目)

生物分子モーターの細胞内局在化機構

The mechanism of intracellular localization of biological motors.

(研究者)

祐村 恵彦
Shigehiko Yumura

山口大学理学部生物学教室 助手
Research Associate, Dept. of Biology, Faculty of Science,
Yamaguchi Univ.

英文要旨

Myosin filaments in non-muscle cells, unlike those in muscle cells, do not stay at a single site but can relocate within a cell. I showed a possible mechanism for intracellular localization of myosin via regulation of the release of myosin from the cortical region by phosphorylation of myosin.

研究報告

研究目的

ミオシンは主要な生物分子モーターの一つである。ミオシンは単量体が重合して(組立られて)初めて機能的分子モーターとなる。特殊な骨格筋細胞では、常にミオシンは組立てられた状態にある。しかし、非筋細胞では、ミオシンは単量体として存在し、重合して筋細胞と同様の繊維を形成し、力の発生に関与すると考えられている。その際、細胞が力を発生しようとする局所にミオシン単量体が集まって、そこで組立てられ、機能的分子モーターとなる。そして、仕事が終わると、再び単量体に分解される。例えば、細胞分裂時には、ミオシンは一時的に細胞の分裂面に集積し、2個の娘細胞へとくびり切るための力の発生に関与する。このような力の発生部位へのミオシンの細胞内局在化の機構についてはまったく解明されていない。試験管内では、ミオシンの組立、分解はリン酸化によって調節される。また、細胞を走化性物質で刺激すると、細胞内シグナルが動員され、ミオシンは一時的にリン酸化される。この時、ミオシンが細胞表層部の細胞骨格へ一時的に移行することが、粘菌アメーバや、白血球で示されている。以上のことから、私は、細胞内でミオシン単量体が力発生の部位に移動、組立てられ、機能的分子モーターを形成、その後、分解されるという機構が存在すると考え、その調節にミオシンのリン酸化が関与するという仮説を立てた。本研究は、この仮説を証明するため、リン酸化がミオシンの移動のどの段階で起こっているのか、組立はいつ起こるのか、細胞内の局所にミオシンを集積させる情報は何かを明らかにし、ミオシンモーターの組立と分解を伴った細胞内機能部位への局在化の機構を解明する。

研究経過および成果

材料

細胞性粘菌アメーバを主に用いた。この細胞は活発にアメーバ運動を行うが、ミオシンについて比較的研究が進んでいる点、また、ミオシンの移動を細胞外からの刺激（走化性刺激）で簡単に引き起こせる等の点で、すぐれた材料と考えられる。また、遺伝子操作により容易にミオシン分子の調節部位を欠くミュータントが使える点でもすぐれている。

研究経過

1. 蛍光抗体法を用いて走化性刺激後のミオシンの移動、局在変化のタイムテーブルを作製した。蛍光抗体法は、我々の改良法を用いることにより、繊維化（モーター化）ミオシンを可視化できた。

2. ^{32}P でラベルした細胞を走化性物質で刺激後、抗ミオシン抗体で免疫沈降し、オートラジオグラフィにより、ミオシンのリン酸化の変動を調べた。この結果と、ミオシンの移動のタイムテーブルとから、細胞内質移行時にミオシンのリン酸化が起こっていることが確かめられた。

3. 細胞を基質に強力に接着させた後、細胞上部を水流で除去し、細胞質側が露出した細胞膜と、それに結合する細胞骨格の複合体を得た。これを我々は、MS (membrane cytoskeleton) と呼んでいる。このMSには、ミオシンが結合しているが、ATP処理によってこのミオシンはMSからリリースされる。この現象は、細胞外質から内質へのミオシンの移動に相当するものである。さらに、このミオシンを除去したMSに精製ミオシンを再結合させる。これは、細胞内質から外質へのミオシンの移動に相当する。ATP処理時のリリース時にリン酸化されることがわかった。また、このリン酸化は、Caイオンやカルモジュリンによって阻害された。精製ミオシンの再結合実験も成功した。現在、このミオシンをATP処理して、MSからリリースさせる実験を試みている。

4. ミオシンは、ATP処理により単純にMSからすぐリリースされるのではなく、一連の挙動後、MSからリリースする。この挙動は細胞の形態変化と直接関わるものと思われる。蛍光標識したミオシンのMS上での挙動を超高感度カメラでモニターし、特に、MS上でどのようにミオシンが単量体に分解されていくのかを詳細に現在研究中である。

5. 遺伝子操作によりミオシンのリン酸化部位を欠く組み換え体を用いる。これから単離した変異ミオシンについて、正常なMSとの結合、解離実験を行い、正常なミオシンの場合と比較検討した。変異ミオシンのMSからはミオシンはリリースしなかった。リン酸化がMSで起こることがミオシンの細胞内移行に重要であることの重要な証拠といえる。

以上から、細胞内移行、局在化にミオシンのリン酸化が関与すること、細胞内Caイオンがその制御にかかわることが明らかとなった。

発表論文リスト

- 祐村 恵彦 (1993).
細胞運動におけるミオシンの役割 Mebio. 10: 76-82.
- Yumura, S., and T. Kitanishi-Yumura. (1993).
A mechanism for the intracellular localization of myosin II filaments in the Dictyostelium amoeba. J. Cell Sci. 105: 233-242.
- 祐村 恵彦 (1993).
細胞性粘菌における細胞内シグナル伝達と走化性運動 比較生理生化学 10: 136-144.
- 祐村 恵彦 (1993).
細胞運動の分子メカニズム 医学のあゆみ 167: 693.
- Yumura, S. (1993).
Reorganization of actin and myosin II in Dictyostelium amoeba during stimulation by cAMP. Cell Struct. Func. 18: 379-388.
- Yumura, S. (1994).
Rapid translocation of myosin II in vegetative Dictyostelium amoeba during folate-stimulation. Cell Struct. Func. 19: 143-151.
- Okazaki, K., and S. Yumura (1994).
Differential association of three actin-bundling proteins with microfilaments in Dictyostelium amoebae. Europ. J. Cell Biol. (submitted)
- 頭発表
- Yumura, S. (1993).
Role of Ca²⁺ ion in the distribution of myosin II in Dictyostelium amoebae. XI Internatioanal Botanical Congress.
- Okazaki, K. and S. Yumura. (1993).
Distribution of actin-bundling proteins in Dictyostelium amoebae during chemotaxis. XI International Congress.
- 祐村 恵彦 (1993).
細胞内シグナルとミオシンの細胞内局在化機構。 日本細胞生物学会シンポジウム。
- 祐村 恵彦 (1994).
細胞性粘菌におけるモーター分子の動的構築機構。 日本植物学会中四国大会シンポジウム。
- 松崎 りか、祐村 恵彦 (1994).
蛍光標識アクチンの細胞性粘菌への導入。 日本植物学会中四国大会シンポジウム。
- 祐村 恵彦 (1994). 予定
粘菌ミオシンの細胞内局在化機構。日本植物学会シンポジウム。
- Yumura, S. and T. Q. P. Ueda. (1994). 予定
Regulation of myosin by heavy or light chain phosphorylation is not required for its location to the cleavage furrow in Dictyostelium. The American Society of Cell Biology.