

論文の内容の要旨

細胞膜結合性ミオシンによるアクチンフィラメントの 運動・形態の力学的制御

佐藤 優成

〔序論〕

細胞は、細胞膜によって自己と外界の境界を規定し、その形態と内部構造を変化させることで生命の最小単位として成立している。真核生物における細胞形態の制御は主に、多成分のリン脂質からなる二分子膜を主な構成要素とする細胞膜と、細胞内に張り巡らされた微小管やアクチンフィラメントなどといった細胞骨格との協調によって為される。アクチンは、すべての真核生物に高度に保存されており、多くの細胞で最も多量に存在するタンパク質である。単量体アクチンは重合することでフィラメントを形成し、重合状態と脱重合状態をダイナミックに遷移させてフィラメントの長さや細胞内配置を変化させることができる。この重合ダイナミクスによって生み出される力が、細胞膜と結合した細胞皮質や、分裂時に形成される収縮環、細胞運動時に機能する仮足などの構造を制御する力学的基盤となっている。アクチンの重合ダイナミクスに加え、細胞の形態・内部構造の制御に重要な役割を果たしているのが、アクチンフィラメント上を運動するモータータンパク質であるミオシンが発生する力である。ミオシンは、ATP の加水分解エネルギーを利用してアクチンに結合・解離するモータードメインと、膜結合や多量体化などを行うテイルドメインを持ち、膜変形やアクチンネットワークの再編・収縮など多様な機能を担っている。これらのアクチンやミオシンは、分子ひとつひとつでは一方向の力発生や運動しか行うことができないが、それらの分子が組み合わさって分子集合体を形作ることによって複雑な力学的機能や形態をもった細胞が機能する。本研究は、脂質膜やアクチン、ミオシンの分子機構と、それらの分子が作り出す分子集合の力学的性質を明らかにすることで、物質から生命に発展していく過程の一端を解き明かすことが目的である。

研究1：膜結合性ミオシン IC によるアクチンフィラメントの回転運動

[背景・目的]

ミオシンファミリーのひとつであるミオシン IC は、細胞膜を構成するアニオン性リン脂質である PI(4,5)P₂ に特異的に結合する PH ドメインをテイルドメインに有し、アクチンと細胞膜を架橋した状態で ATP の加水分解と共役した力発生を行う。ミオシン IC は、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、核内 DNA の輸送、内耳の有毛細胞でのメカノセンシング、個体発生時の左右軸の形成過程等を担っていることが知られているが、分子レベルでの運動特性は完全には明らかになっていない。本研究では、ミオシン IC の新たな運動特性を明らかにすることを目的とした。

[結果]

多分子のミオシンが吸着した基盤上にアクチンフィラメントと ATP を加えることでアクチンフィラメントの滑り運動(グライディング)を引き起こす、グライディングアッセイと呼ばれる実験系が知られている。グライディングするアクチンフィラメントの変位を光学顕微鏡を用いて定量することで、ミオシンの運動特性についての情報を得ることができる。トラッキング用の量子ドットを結合させたアクチンフィラメントと、ミオシン IC を用いたグライディングアッセイを行い、3次元位置検出顕微鏡を用いて観察を行った。量子ドットの3次元軌跡を取得し解析することで、ミオシン IC の運動特性を定量した。その結果、アクチンフィラメントに結合させた量子ドットの3次元軌跡は螺旋形を示した。このことから、多分子のミオシン IC の発生する力によって運動するアクチンフィラメントは、前進しながら長軸周りに回転するコークスクリュウ運動と呼ばれるふるまいを示すことが明らかになった。この結果は、ミオシン IC は並進方向だけでなく、アクチンフィラメントの長軸に対して垂直な方向にトルクを発生していることを示している。ミオシン IC によってコークスクリュウ運動を示すアクチンフィラメントの回転方向は左であった。ガラス基盤に結合させるミオシン IC の密度を変化させた場合、回転のピッチは一定であった。顕微鏡ステージに取り付けた温度制御装置によって観察チャンバーの温度を 25℃から 35℃に上昇させて実験を行った結果、温度の上昇に伴ってアクチンフィラメントの並進速度、回転速度、コークスクリュウ運動のピッチが上昇した。

PI(4,5)P₂ を含む脂質展開膜にミオシン IC を結合させ、グライディングアッセイを行った。流動的な基盤である脂質展開膜に結合したミオシン IC は、ガラス面上と同様にアクチンフィラメントの左回転のコークスクリュウ運動を駆動することが明らかとなった。コークスクリュウ運動のピッチが PI(4,5)P₂ 濃度が上昇することで短くなることも明らかとなっ

た。

[考察]

本研究により、これまで知られていた二量体を形成するミオシンII、ミオシンV、ミオシンVI、ミオシンXに加え、単量体であるミオシンICがアクチンフィラメントの長軸周りにトルクを発生することでアクチンフィラメントのコークスクリュー運動を引き起こすことが初めて明らかになった。これまでにビーズやガラス面、量子ドットなどの硬い表面に結合したミオシンによるトルク発生については知られていたが、本研究では流動性のある脂質展開膜上でミオシンがトルクを発生することを初めて明らかにした。ミオシンの発生するトルクの細胞内における役割については不明な点が多いが、本研究において脂質展開膜に結合したミオシンICがアクチンフィラメントのコークスクリュー運動を引き起こすことが明らかになったことから、生体内で細胞膜に結合したミオシンICがトルクを発生していることが示唆された。これらの結果から、ミオシンICのトルク成分が、細胞のキラリティ形成や、細胞内輸送、アクチンネットワークの組織化などの生命現象に深く関与している可能性が考えられる。

研究2：閉鎖空間内のアクトミオシンの運動

[背景・目的]

ドロップレットは油相中にリン脂質の単分子膜で囲まれた水相が分散している系であり、リポソームは球殻のように閉じたリン脂質二分子膜が内部の水相を包み込んで作られる会合体である。ドロップレットとリポソームは、脂質膜で囲まれた閉鎖空間を作ることができるため、細胞内のタンパク質と細胞膜の相互作用に関する生命現象を研究する際に有用な実験系として知られる。ドロップレットやリポソームを細胞のモデルとして用いることで、内部に封入されたモータータンパク質と細胞骨格が閉鎖空間で示す特異な性質を明らかにできる可能性がある。本研究では、ミオシンとアクチンフィラメントを封入したドロップレットおよびリポソームの構築を試み、閉鎖空間においてミオシンとアクチンフィラメントが生み出す運動の分子機構を明らかにすることを目的とした。

[結果]

PI(4,5)P₂を含む脂質膜から作られるドロップレットに単量体アクチンを封入し、ミオシンICもしくはミオシンIDを加えた。内部で重合したアクチンフィラメントが、ミオシンIC/IDによって、膜に局在化することを確認した。さらに、ドロップレットの内表面に結合したミオシンIC/IDによって、アクチンフィラメントのグライディングが引き起こされる

ことが明らかになった。続いて、ミオシン II ミニフィラメント、単量体アクチン、ミオシン IC もしくはミオシン ID を加えたドロップレットを作成した。その結果、ミオシン IC/ID を介してアクチンネットワークの収縮力が脂質膜に伝達されることでドロップレットの変形が引き起こされることを明らかにした。

界面通過法を用いて作成された 6% PI(4,5)P₂ を含むリボソームの内部に、アクチンフィラメントとミオシン IC/ID を加えた。その結果、脂質膜の表面でアクチンフィラメントの運動を引き起こす系を構築することができた。続いて、アクトミオシンを内包したリボソームを浸透圧差のある環境に置き、リボソームが自発的に分割する状態で観察を行った。その結果リボソームが内部のアクトミオシンに沿って分割する様子を観察することができた。

[考察]

ドロップレット・リボソームの内表面は、流動性のある脂質膜で構成された変形する球面である。そのため、ドロップレットおよびリボソームの内表面を基盤としたグライディングアッセイは、一般的なガラス表面上でのグライディングアッセイとは条件が著しく異なっている。本研究により、内在性の膜結合ドメインを持つミオシン IC/ID がドロップレットとリボソーム内においてアクチンフィラメントのグライディングを引き起こすことができたことが明らかになった。またミオシン IC/ID を介して膜に結合したアクトミオシンネットワークを用いてドロップレットとリボソームの形状を変化させる系を構築することができた。このことは、ミオシン IC/ID が脂質膜を変形させるために十分な大きさの張力を伝達する能力を持っていることを示している。これらの結果から、生体内で細胞膜に結合したミオシン IC/ID が細胞膜近傍のアクチンネットワークに対して仕事を行い、細胞膜の変形を引き起こしている可能性が示唆される。