

症を効率的に収束させる新たな治療応用が期待される。

- 1) Yamada, T., Tani, Y., Nakanishi, H., Taguchi, R., Arita, M., & Arai, H. (2011) *FASEB J.*, **25**, 561–568.
- 2) Kang, J.X. (2007) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **77**, 263–267.
- 3) Arita, M. (2012) *J. Biochem.*, **152**, 313–319.
- 4) Arita, M., Iwamoto, R., & Isobe, Y. (2012) in *Lipidomics, Technologies and Applications* (Ekroos, K. ed.), pp. 219–230, Wiley-VCH, Weinheim.
- 5) Nathan, C. & Ding, A. (2010) *Cell*, **140**, 871–882.
- 6) Serhan, C.N., Chiang, N., & Van Dyke, T.E. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 349–361.
- 7) Gilroy, D.W., Lawrence, T., Perretti, M., & Rossi, A.G. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 401–416.
- 8) Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O’Neil, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., & Wallace, J.L. (2007) *FASEB J.*, **21**, 325–332.
- 9) Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., & Serhan, C.N. (2007) *Nature*, **447**, 869–874.
- 10) Gronert, K., Maheshwari, N., Khan, N., Hassan, I.R., Dunn, M., & Laniado Schwartzman, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 15267–15278.
- 11) Gilroy, D.W., Colville-Nash, R.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., & Willoughby, D.A. (1999) *Nat. Med.*, **5**, 698–701.
- 12) Rothenberg, M.E. & Hogan, S.P. (2006) *Annu. Rev. Immunol.*, **24**, 147–174.
- 13) Wu, D., Molofsky, A.B., Liang, H., Ricardo-Gonzalez, R.R., Jouihan, H.A., Bando, J.K., Chawla, A., & Locksley, R.M. (2011) *Science*, **332**, 243–247.
- 14) Oh, S.F., Oillai, P.S., Recchiuti, A., Yang, R., & Serhan, C.N. (2011) *J. Clin. Invest.*, **121**, 569–581.
- 15) Isobe, Y., Arita, M., Matsueda, S., Iwamoto, R., Fujihara, T., Nakanishi, H., Taguchi, R., Masuda, K., Sasaki, K., Urabe, D., Inoue, M., & Arai, H. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 10525–10534.
- 16) Uderhardt, S., Herrmann, M., Oskolkova, O.V., Aschermann, S., Bicker, W., Ipseiz, N., Sarter, K., Frey, B., Rothe, T., Voll, R., Nimmerjahn, F., Bochkov, V.N., Schett, G., & Kronke, G. (2012) *Immunity*, **36**, 1–13.

有田 誠

(東京大学大学院薬学系研究科衛生化学,  
JST さきがけ)

Mediator lipidomics revealed novel roles of eosinophils in the resolution of inflammation

Makoto Arita (Department of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, and PRESTO, JST, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

## 収縮環はどのようなメカニズムで収縮するのか？ —未解明のミオシンⅡ機能の解明に挑戦する—

### 1. はじめに

動物細胞の細胞分裂時には、分裂細胞の赤道面に収縮環と呼ばれる構造が形成され、収縮環がくびれることにより細胞質分裂が完了する。収縮環には、アクチン繊維 (F-アクチン) やミオシンⅡを始めとする多数の細胞骨格関連タンパク質が集積していることが知られている。また、抗体を用いた細胞分裂の阻害実験等から、ミオシンⅡの機能が細胞質分裂の進行に必要であることも併せて明らかにされている<sup>1,2)</sup>。これらの事実を基にして、収縮環はF-アクチン同士をミオシンⅡ繊維が滑らせる筋収縮と同様のメカニズムで収縮するものと一般に考えられてきた<sup>3)</sup>。

ところが、収縮環では、骨格筋のサルコメア構造で見られるような「繊維状のミオシンⅡ」がいまだ観察されていない。Maupin ら<sup>4)</sup>は電子顕微鏡を用いて HeLa 細胞の収縮環を詳しく観察し myosin filament 様の構造体を見だしているが、それが実際の「ミオシンⅡ繊維」かどうか検証はされていない。またサルコメア構造も観察されていない。従って、収縮環にサルコメア構造が見られない現状で、「収縮環の収縮のメカニズムは筋収縮と同様である」と単純に結論づけてしまうことには無理がある。我々は、ミオシンⅡがどのように収縮環の収縮に貢献しているかまだ不明である現況を踏まえ、ミオシンⅡ調節軽鎖 (myosin II regulatory light chain : MRLC) に着目し、高等動物培養細胞における細胞質分裂のメカニズムの解明を進めている。

### 2. なぜ MRLC に着目するのか？

非筋型ミオシンⅡは二つのミオシンⅡ重鎖 (myosin II heavy chain : MHC)、二つの必須軽鎖 (myosin II essential light chain)、および二つの MRLC で構成される。ミオシンⅡの  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性は、MRLC がリン酸化されることで上昇する。このリン酸化 MRLC には、Ser19 がリン酸化された一重リン酸化型 (1P-MRLC) と Thr18/Ser19 の両方がリン酸化された二重リン酸化型 (2P-MRLC) の2種類があり (図 1A)、後者がより一層ミオシンⅡ活性を上昇させるという *in vitro* の結果が既に報告されている<sup>5)</sup>。我々は、*in vitro* でミオシンⅡ活性の上昇や阻害効果を示

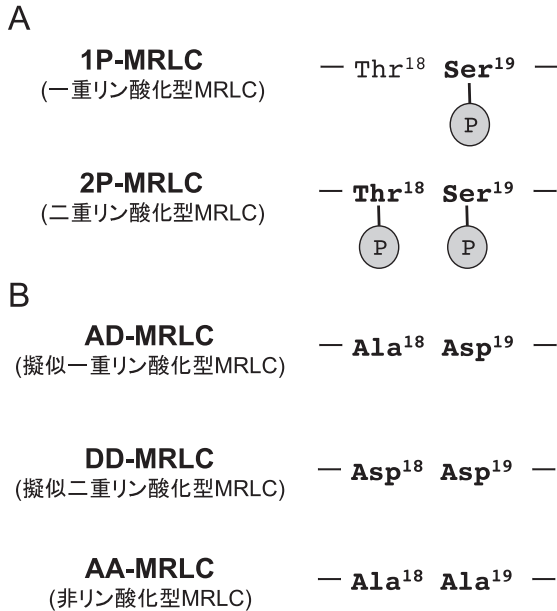


図1 MRLCが受けるリン酸化

(A) *In vitro*においてミオシンIIの活性化を引き起こすMRLCのリン酸化には、Ser19がリン酸化された一重リン酸化型MRLC (1P-MRLC) と Thr18/Ser19の両方がリン酸化された二重リン酸化型MRLC (2P-MRLC) の2種類がある。(B) これらのThr18, Ser19残基を適宜AspやAlaに置換することによって、擬似一重リン酸化型MRLC (AD-MRLC) や擬似二重リン酸化型MRLC (DD-MRLC)、さらには非リン酸化型MRLC (AA-MRLC) を作製することができる。

すという先行研究<sup>9</sup>を基に、MRLCのリン酸化部位をAlaないしはAspに置換した擬似一重リン酸化型MRLC (AD-MRLC) および擬似二重リン酸化型MRLC (DD-MRLC)、全てAlaに置換した非リン酸化型MRLC (AA-MRLC) をそれぞれ作製した(図1B)<sup>7</sup>。さらに我々は、可視化したMRLCを培養細胞に導入し、免疫沈降実験でMRLC変異体とMHCが複合体を作りミオシンIIの内在性MRLCと置換することを確認した<sup>8</sup>。そこで、これらMRLCリン酸化変異体の挙動を追究することは、活性化されたミオシンIIの細胞分裂時における役割の解明につながるのではないかと考え、以降に述べる様々な検討を行うこととした。

### 3. 互いに独立して進行するアクチンとミオシンIIの収縮環への集積

収縮環には1P-MRLCや2P-MRLCがMHCと共に局在していることが従来型の光学顕微鏡を用いて既に明らかにされている<sup>7,9</sup>。最近我々は、上述のどの変異型MRLCでも収縮環に集積できることを報告した<sup>10</sup>。この集積はミオ

シンIIの活性阻害剤プレビスタチン (blebbistatin) 存在下でも起こるので、MRLCの収縮環への移動はそのリン酸化状態やミオシンII自身の活性に依存しない現象であると考えられる。次に我々は各種変異型MRLCの収縮環への「集積のタイミング」を定量的に測定することにより調べた。その結果、DD-MRLCは、AA-MRLCやアクチンより早いタイミングで収縮環領域に集積した。また、プレビスタチンの投与、ないしはAA-MRLCの過剰発現のいずれによっても、アクチンの収縮環領域への集積のタイミングは影響されなかった。アクチンの脱重合剤ラトランクリンA (latrunculin A) を作用させたときは、MRLCの集積開始時間に変化は見られなかった。以上のことから、ミオシンIIの収縮環への集積はミオシンIIの活性に依存しないこと、MRLCのリン酸化によるミオシンIIの活性化はミオシンIIの収縮環への集積速度を上昇させるが、その後続くアクチン集積のタイミングには影響を与えないことが明らかになった<sup>11</sup>。

### 4. MRLCのリン酸化による収縮環の収縮速度の制御

我々は、AA-MRLCを過剰発現した細胞では、収縮環におけるF-アクチンと活性型/不活性型を問わない総ミオシンIIの集積量に変化はないが、収縮環の収縮速度が低下することを見だしていた<sup>12</sup>。F-アクチンやミオシンIIの総量に変化がないにもかかわらず、収縮環の収縮速度が低下する理由を調べるため、我々は各種変異型MRLCおよびアクチンをHeLa細胞に発現させ、fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いて収縮環領域におけるターンオーバー (TO) をそれぞれのタンパク質について計測した。プレビスタチンを投与した場合、収縮環収縮速度の低下だけでなく、MRLCおよびアクチンのTOの加速が観察された。AA-MRLCとアクチンを共発現させた細胞でも、MRLCだけでなくアクチンのTOの加速も観察された。さらに、Rhoキナーゼ阻害剤Y-27632存在下で各種変異型MRLCおよびアクチンのTOを計測すると、AD-MRLCやDD-MRLC発現細胞ではY-27632の阻害効果がキャンセルされていた。以上のことから、ミオシンIIの活性阻害によって収縮環におけるミオシンIIとアクチンのTOが上昇して両者の秩序が保てなくなり、その結果収縮速度の低下が見られたと我々は考えた<sup>13</sup>。

最近、ミオシンIIは収縮環領域全体の張力の発生に必要であるという報告がなされた<sup>14</sup>。この事実と上述の我々の成果を合わせると、ミオシンIIの活性は収縮環領域にあるF-アクチンとミオシンIIの「秩序の維持」に重要で、正し

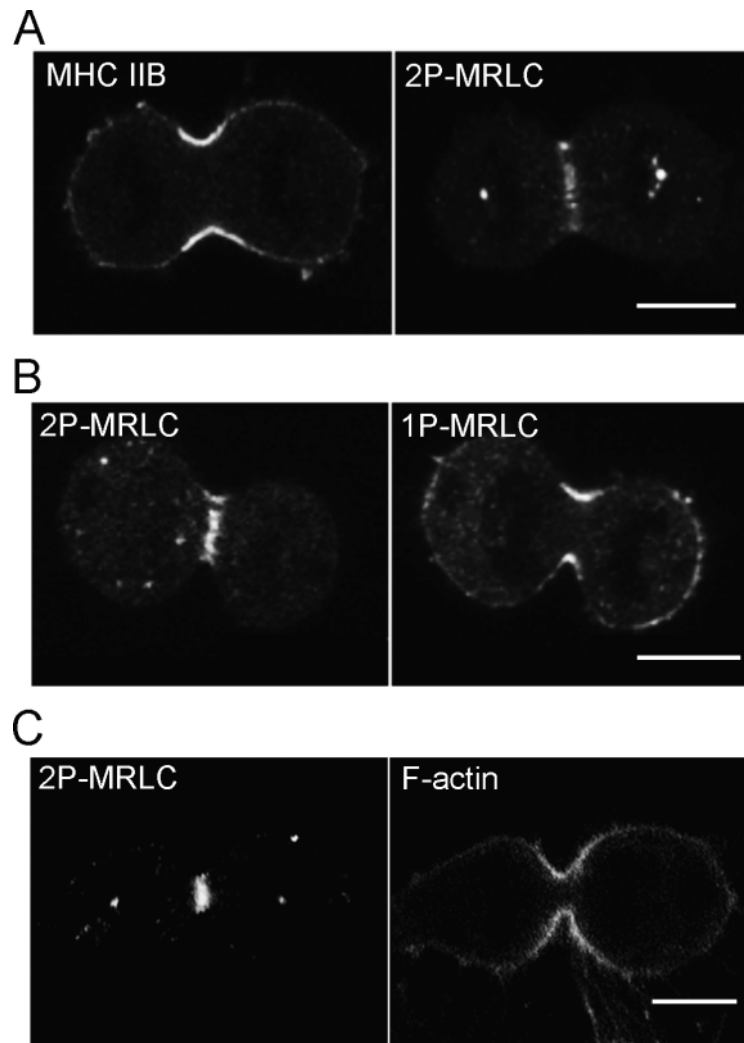


図2 ミッドゾーンに局在する 2P-MRLC  
HeLa 細胞において MHC IIB (ミオシン II B 重鎖) 抗体と 2P-MRLC 抗体 (A), 2P-MRLC 抗体と 1P-MRLC 抗体 (B), 2P-MRLC 抗体と ファロイジン (C) を用いた蛍光染色像. 許可を得て文献 15 より転載.

い秩序のもとで初めて収縮環は適切な張力を発し、最も効率的に収縮しているものと考えられる。この秩序の実体を解明することは我々の喫緊の課題である。

##### 5. 収縮環領域における MRLC の予想外の局在

分裂期におけるリン酸化 MRLC の局在については、長い間従来の光学顕微鏡を用いた観察に留まっていた。そこで我々は、1P-MRLC および 2P-MRLC に対する特異的抗体を用いて様々な哺乳類培養細胞を染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡を使用して分裂期におけるそれぞれの三元局在の観察を行った。その結果、1P-MRLC は収縮環の

みに局在していたが、2P-MRLC は収縮環に加えその内部領域 (ミッドゾーン) にも局在し、リング状ではなくディスク状の局在を示していることを見いだした (図 2)<sup>15)</sup>。このとき用いた 2P-MRLC 特異的抗体は、予め 2P-MRLC を吸収させておくと、このような 2P-MRLC の染色パターンは見られなくなる。現在までに、ミッドゾーンでは MHC や F-アクチンの局在は観察されていない。これらの事実は、2P-MRLC が MHC に依存しない新奇機能を細胞質分裂時に担っている可能性を示すものと考えられた。興味深いことに、Aurora B をノックダウンすると 2P-MRLC がミッドゾーンに局在しなくなる。一方で、従来収縮環の

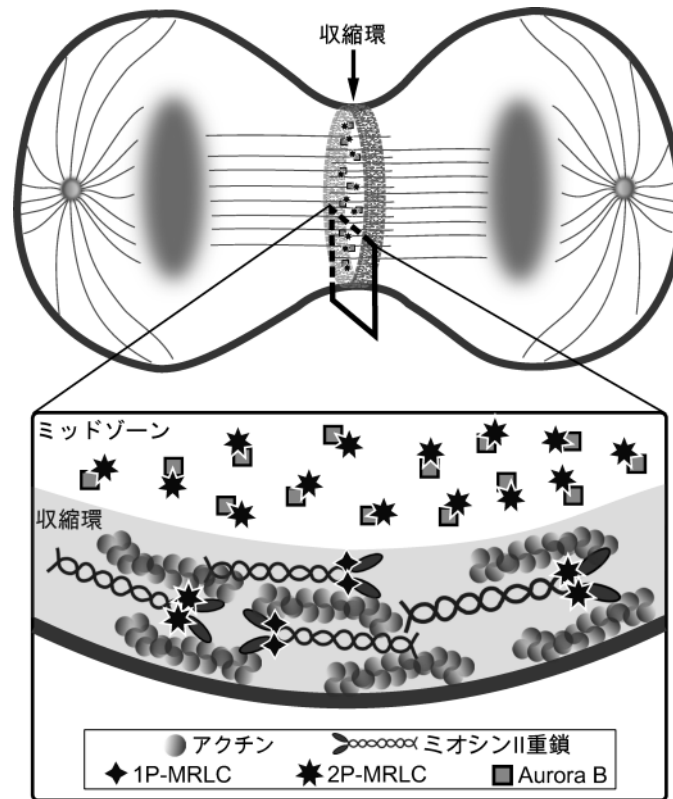


図3 分裂細胞におけるリン酸化MRLCの局在とその結合タンパク質

(上段) 分裂細胞の模式図。赤道面に収縮環が形成される。(下段) ミッドゾーン/収縮環領域の拡大図。ミッドゾーンでは、2P-MRLCがミオシンII重鎖ではなくAurora Bと結合している。一方収縮環では、1P-MRLCおよび2P-MRLCはそれぞれミオシンII重鎖と結合し、「ミオシンII」として機能しているものと考えられる。

1P-MRLCや2P-MRLCを制御していると考えられているRho依存性キナーゼを阻害しても2P-MRLCのミッドゾーンにおける局在に変化は見られない(著者ら、未発表データ)。2P-MRLCの局在や興味深い役割についてはまだまだ不明な点が多く、今後様々な方法で検討を重ねていく必要がある(図3)。

## 6. おわりに

本稿では、細胞分裂期におけるリン酸化MRLCの機能について最近の知見をまとめた。特に5節に関しては、これまで全く指摘されてこなかった「ミオシンIIの員ではないMRLC」が分裂を制御している可能性を示唆する結果である。重鎖を伴わない2P-MRLCの機能解析という新たな切り口から細胞分裂のメカニズム解明を目指そうという我々の挑戦は、もう既に始まっている。

## 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究成果は、上条桂樹博士(東北大学)、高橋正行博士(北海道大学)、木村宏博士(大阪大学)らとの共同研究により得られたものです。すべての協力者各位に深謝致します。また、これらの研究は、笹川科学研究助成や科研費などの援助によって進められました。

- 1) Mabuchi, I. & Okuno, M. (1977) *J. Cell. Biol.*, 74, 251-263.
- 2) Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R., & Mitchison, T.J. (2003) *Science*, 299, 1743-1747.
- 3) Pollard, T.D. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22, 50-56.
- 4) Maupin, P. & Pollard, T. (1986) *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, 94, 92-103.
- 5) Ikebe, M. (1989) *Biochemistry*, 28, 8750-8755.
- 6) Kamisoyama, H., Araki, Y., & Ikebe, M. (1994) *Biochemistry*,

- 33, 840–847.
- 7) Iwasaki, T., Murata-Hori, M., Ishitobi, S., & Hosoya, H. (2001) *Cell Struct. Funct.*, **26**, 677–683.
  - 8) Fumoto, K., Uchimura, T., Iwasaki, T., Ueda, K., & Hosoya, H. (2003) *Biochem. J.*, **370**, 551–556.
  - 9) Matsumura, F., Ono, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., & Yamashiro, S. (1998) *J. Cell Biol.*, **140**, 119–129.
  - 10) Miyauchi, K., Yamamoto, Y., Kosaka, T., & Hosoya, H. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 543–548.
  - 11) Kondo, T., Itakura, S., Hamao, K., & Hosoya, H. (2012) *Exp. Cell Res.*, **318**, 915–924.
  - 12) Asano, S., Hamao, K., & Hosoya, H. (2009) *Genes Cells*, **14**, 555–568.
  - 13) Kondo, T., Hamao, K., Kamijo, K., Kimura, H., Morita, M., Takahashi, M., & Hosoya, H. (2011) *Biochem. J.*, **435**, 569–576.
  - 14) Ma, X., Kovács, M., Conti, M.A., Wang, A., Zhang, Y., Sellers, J.R., & Adelstein, R.S. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4509–4514.
  - 15) Kondo, T., Isoda, R., Uchimura, T., Sugiyama, M., Hamao, K., & Hosoya, H. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 686–691.

近藤 興, 濱生 こずえ, 細谷 浩史  
 (広島大学大学院理学研究科  
 生物科学専攻細胞生物学研究室)

Roles of myosin II regulatory light chain at the constricting area of dividing cells  
 Tomo Kondo, Kozue Hamao and Hiroshi Hosoya (Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739–8526, Japan)

## Slp2-a によるシグナル伝達分子 podocalyxin の apical 輸送と細胞間相互作用への影響

### はじめに

腎臓尿細管や消化管(胃・腸)の管腔面に見られる上皮細胞は, その細胞の形態から単層上皮と呼ばれ, 基底膜上に細胞が互いに接着しながら一層に並んだ構造を持つ。このような上皮細胞は, 基底膜や隣接する細胞と接する basolateral 膜, いずれとも接しない apical 膜を有し, 頂端部-基底部軸に沿った極性 (apicobasal polarity) を持つ<sup>1)</sup>。apical 膜と basolateral 膜の境界部には密着結合 (tight junction) および接着結合 (adherens junction) と呼ばれる細胞間接着構造が存在し, それらを境に特異的な脂質やタンパク質

分子が方向性を持ってそれぞれの膜に輸送されることで細胞極性を維持している<sup>2)</sup>。極性輸送に関わる分子として, 近年低分子量 G タンパク質 Rab とそのエフェクター分子 (Rab 結合分子) が注目を集めているが, その詳細な役割はいまだ十分に解明されていない<sup>2–4)</sup>。最近筆者らは, Rab27 の特異的なエフェクター分子として同定された Slp (スリップ: synaptotagmin-like protein)<sup>5)</sup> が, 上皮細胞の極性輸送に関与することを見いだした<sup>6,7)</sup>。本稿では, Slp ファミリーの基本的な構造と性質について概説すると共に, Rab27 と Slp による細胞極性形成と細胞間相互作用への関与について最近の知見を紹介する。

### 1. Slp ファミリーの構造と Rab27 エフェクターとしての機能

Slp ファミリーはカルボキシル末端側に Ca<sup>2+</sup> 結合モチーフとして知られる C2 ドメインをタンデム (それぞれ C2A ドメイン, C2B ドメインと呼ばれる) に持つシナプトタグミン類似分子として, 筆者らの研究室で同定・命名されたタンパク質群である<sup>8)</sup>。哺乳動物では 5 種類 (Slp1–5), ショウジョウバエでは 1 種類 (dm-Slp/Bitesize) のアイソフォームが報告されているが, 線虫ではホモログは見つかっていない<sup>8–11)</sup>。Slp ファミリーの最大の特徴は, アミノ末端側に SHD (Slp homology domain) という保存領域を持つ点である (図 1A)。ショウジョウバエの Bitesize もゲノム上には SHD 類似配列を有しているが, mRNA/タンパク質レベルでの発現はこれまで確認されていない。筆者らは, Slp と同様に C2 ドメインを有するタンパク質 rabphilin の Rab3A 結合ドメインと SHD が類似することに着目し, ヒトおよびマウスに存在する全ての Rab との結合を試すことにより, Rab27A/B が SHD の特異的なリガンドであることをこれまでに明らかにしている<sup>5,12)</sup>。なお, Slp4-a のみが例外的に Rab3/8/27 と結合する<sup>5,11)</sup>。Rab27 に対する親和性が最も高く, 生体内では主に Rab27A/B と結合して機能するものと考えられている。Slp ファミリーの最も良く知られた機能は, Rab27 が局在する分泌顆粒などを細胞膜につなぎ止める役割である<sup>12)</sup>。例えば, Slp2-a は C2A ドメインが細胞膜のリン脂質と直接結合することで, 分泌顆粒やメラノソームを細胞膜につなぎ止める。一方, Slp4-a はリンカードメイン (SHD と C2A ドメインの間の領域) を介して, Munc18・syntaxin と結合することで分泌顆粒の細胞膜へのつなぎ止めを行う (図 1B)<sup>3,11–13)</sup>。

これまでの Slp の研究は, 主に内分泌細胞 (クロマフィン細胞由来の PC12 細胞, 膵臓 α 細胞, β 細胞など), 細