

Title	Phosphorylation of MYL12 by Myosin Light Chain Kinase Regulates Cellular Shape Changes in Cochlear Hair Cells
Author(s)	大矢, 良平
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85266
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	大矢 良平
論文題名 Title	Phosphorylation of MYL12 by Myosin Light Chain Kinase Regulates Cellular Shape Changes in Cochlear Hair Cells (ミオシン軽鎖キナーゼによるMYL12のリン酸化が蝸牛有毛細胞の形態変化に及ぼす影響)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
<p>蝸牛有毛細胞は聴覚において重要な役割を担っている。発生段階の有毛細胞の形態変化は聴毛の適切な配置に関与しており、また成熟した有毛細胞ではCochlear Amplificationと呼ばれる音の増幅機構に必須であることが知られている。近年、神経上皮細胞の形態変化を起こす分子機構として頂端結合複合体の収縮（頂端収縮）が、有毛細胞にも存在することが発見された。頂端収縮は神経上皮細胞水平方向の形態変化を制御し神経堤の発達に必須である。神経上皮細胞と同様に、有毛細胞の頂端結合複合体もF-actinとnon-muscle myosin II (NMMII) から構成され、NMMII上のミオシン調節軽鎖のリン酸化により頂端収縮が制御されている。しかし、有毛細胞のNMMIIを構成するミオシン制御軽鎖 (MRLC) とそのリン酸化酵素であるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) のアイソフォームは未知である。よって、本研究の目的は、有毛細胞の頂端収縮に関与する分子を同定し、MLCKによるMRLCのリン酸化が有毛細胞の形態変化への関与を調査することである。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>まず、有毛細胞における頂端結合複合体の存在を確認するため、ラット（生後0日、Wistar rat）の蝸牛コルチ器を摘出しwhole mountで免疫染色（抗NMMII抗体およびPhalloidin）を行った。その結果、有毛細胞の頂端部分、細胞膜直下にF-actinとnon-muscle myosin II (NMMII) からなるベルト状の構造が確認された (Actomyosin cable)。次に、有毛細胞に発現するMRLCとMLCKのアイソフォームを同定するため、ラット（生後0日、7日、21日）のコルチ器を単離してRNAを回収してMRLCおよびMLCKの各アイソフォームに対するdroplet digital PCRを行った。その結果、コルチ器に発現するMRLCとしては、心筋型 (MYL2) と骨格筋型 (MYLPP) は認められず、非筋型/平滑筋型として知られるMYL12A/BとMYL9のみが認められた。また、コルチ器に発現するMLCKとしては、心筋型 (MYLK1) と骨格筋型 (MYLK2) の発現は認めず、平滑筋型 (MYLK1) のみ発現が認められた。また、生後0日のラットのコルチ器の免疫染色において、MYL12のみが有毛細胞のActomyosin cableに存在することが確認された。一方で、有毛細胞以外の細胞にはMYL9とMYL12の両方の発現が認められた。次に、smMLCKがMYL12をリン酸化することを確認するために、in vitroリン酸化反応を行った。酵素であるsmMLCKタンパク質は293T細胞から精製し、基質であるMYL12Bタンパク質は大腸菌を用いて精製した。精製したMYL12BとsmMLCKを150 nM calmodulin、1 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂の条件下で30℃、1時間反応させた後、phos-tag SDS-PAGEを用いて電気泳動を行った。その結果、リン酸化されたMYL12Bが検出され、MYL12がsmMLCKにより直接的にリン酸化されることが分かった。さらに、リン酸化MRLC抗体を用いた免疫染色においても蝸牛内でMYL12がリン酸化されることが分かった。最後に、smMLCKによるMYL12のリン酸化が蝸牛有毛細胞の形態変化に影響を及ぼすかを調べるために、コルチ器にMLCK特異的阻害薬であるML-7 (1 μM) を投与し免疫染色を行い、有毛細胞の細胞面積の変化を測定した。その結果、添加前 (34.3 ± 2.90 μm²) に比べ添加後 (38.2 ± 3.25 μm²) は細胞面積が有意に拡大した (p = 0.01, N = 10, one-way ANOVA post hoc Turkey's test)。また、ML-7のwashout後1時間では添加前と有意な差がないまでに有毛細胞系が回復した (34.9 ± 2.07 μm²)。さらに、リン酸化MRLC抗体を用いた免疫染色でも、ML-7添加により蝸牛有毛細胞のMYL12リン酸化レベルの減少とwashout後のリン酸化レベルの回復が観察され、蝸牛有毛細胞径とMYL12リン酸化レベルとの間に負の相関が認められた。</p> <p>以上より、蝸牛有毛細胞のactomyosin cableではsmMLCKによりMYL12がリン酸化され、smMLCKを阻害によりMYL12のリン酸化レベルが低下することで蝸牛有毛細胞径が拡大することが証明された。</p>	
〔総 括(Conclusion)〕	
<p>蝸牛有毛細胞の頂端結合複合体には、神経上皮細胞と同様のF-actinとNMMIIからなるActomyosin cableが存在する。平滑筋型ミオシン調節軽鎖キナーゼ (smMLCK) によるミオシン調節軽鎖 (MYL12) のリン酸化は、蝸牛有毛細胞のActomyosin cableの収縮を介して水平方向の細胞形態変化を制御している。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 大矢 良平	
論文審査担当者	(職) 氏 名 主 査 大阪大学教授 猪 原 寿 典
	副 査 大阪大学教授 島 田 昌 一
	副 査 大阪大学教授 原 田 彰 宏

論文審査の結果の要旨

蝸牛有毛細胞の形態変化は聴覚において重要な役割を担っている。近年、神経上皮細胞の形態変化を起こす分子機構として知られる頂端結合複合体の収縮が、有毛細胞でも見られることが発見された。有毛細胞の頂端結合複合体はF-actinとnon-muscle myosin II (NMII) から構成され、NMIIのミオシン調節軽鎖 (MRLC) がリン酸化されることで頂端収縮が制御されていると考えられる。しかし、有毛細胞のNMIIを構成するMRLCとそのリン酸化酵素であるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) のアイソフォームは未知であった。

本研究において蝸牛有毛細胞にはMRLCとしてMYL12と、MLCKとして平滑筋型MLCK (smMLCK) の発現が見られることが分かった。さらにMYL12とsmMLCKを精製することに成功しin vitroでリン酸化が起きることが確認された。MLCKの阻害薬を用いた実験では有毛細胞のMLCKを阻害することでリン酸化は低下し、有毛細胞径が拡大することが確認された。以上よりsmMLCKによるMYL12のリン酸化は、蝸牛有毛細胞の水平方向の細胞形態変化を制御していることが解明された。これらは聴覚の生理機構の解明や難聴の治療につながる重要な発見であり、学位に値すると考える。