

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21370086
 研究課題名（和文） 細胞分裂期の表層アクチン-星状体微小管相互作用と紡錘体位置決定の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of mitotic spindle organization and positioning

研究代表者
 水野 健作（MIZUNO KENSAKU）
 東北大学・大学院生命科学研究所・教授
 研究者番号：70128396

研究成果の概要（和文）：

細胞分裂時の紡錘体形成と位置決定の制御機構を解明することを目的に研究を実施し、以下の結果を得た。分裂期における Slingshot の活性制御に Plk1 のリン酸化と結合が関与することを解明した。また、動原体と微小管の結合を制御し、紡錘体形成と染色体整列に関わる新規因子として NDR, MST, Furry を同定し、その作用機作を解明した。さらに、Furry は紡錘体極において Aurora A による Plk1 の活性化を促進する機能を持つことを解明した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the mechanisms of mitotic spindle organization and positioning and obtained the following results. 1) Plk1 binds to and phosphorylates cofilin-phosphatase Slingshot during mitosis. 2) NDR kinase and its upstream regulators, MST and Furry, are crucial for bipolar spindle organization and chromosome alignment in metaphase. 3) Furry is involved in the maintenance of spindle bipolarity by promoting Aurora A-mediated Plk1 activation on spindle poles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：コフィリン、紡錘体、細胞分裂、細胞極性、アクチン骨格

1. 研究開始当初の背景

アクチン骨格の再構築は、細胞の運動、分

裂、極性形成など細胞の動的活動を支える重要な役割を担っている。近年、アクチン骨格の再構築を制御する分子機構の解明が進み、そのシグナル伝達機構の解析も急速に進展している。私達は、アクチン脱重合因子であるコフィリンの Ser-3 を特異的にリン酸化（不活性化）するキナーゼとして LIM キナーゼ (LIMK) を同定し、コフィリンを脱リン酸化（活性化）するホスファターゼとして Slingshot を同定した。また、LIMK と Slingshot の活性を制御するシグナル伝達機構や細胞遊走、神経突起伸長における役割を解明し、コフィリンのリン酸化・脱リン酸化による活性制御機構とその機能を解明した。コフィリンはアクチン骨格の再構築を制御する最も重要な因子の一つであり、これらの成果はアクチン骨格を制御する重要なシグナル経路を解明したものである。私達はまた、細胞分裂におけるコフィリンリン酸化の役割について解析し、分裂期中期では LIMK の活性化と Slingshot の不活性化によりコフィリンが顕著にリン酸化（不活性化）されることを見出した。さらに最近、LIMK の発現抑制によって HeLa 細胞の分裂期中期のコフィリンのリン酸化を抑制すると、コフィリンは細胞表層アクチンの不安定化を誘導し、細胞極性化因子 LGN の局在の異常と、紡錘体の不規則な回転が生じることを見出し、正常な紡錘体の配向には分裂期中期のコフィリンのリン酸化が重要であることを明らかにした。しかし、分裂期におけるコフィリンの活性制御機構は不明である。私達はまた、酵母からヒトまで真核生物に広く保存された Ser/Thr キナーゼである NDR とその制御因子である MST、Furry を発現抑制すると、紡錘体形成と染色体整列に異常が生じることを見出したが、その作用機構は不明である。

2. 研究の目的

細胞分裂時の紡錘体の軸方向と位置の決定は、分裂軸・分裂面を決定する上で重要であり、発生過程における細胞運命決定や組織構築などにおいて重要な役割を担っている。

線虫やハエの遺伝学的解析から非対称分裂における紡錘体位置決定に関与する多くの分子が同定されているが、哺乳類細胞の対称分裂、非対称分裂における紡錘体位置決定機構についてはほとんど不明である。紡錘体の位置決定において、細胞表層アクチンと星状体微小管の相互作用が必須の役割を担っていると考えられるが、それらを仲介する分子機構や制御機構についても詳細は不明である。私達は最近、アクチン脱重合因子であるコフィリンの分裂期特異的なリン酸化（不活性化）が、表層アクチンの安定化ならびに紡錘体の位置決定に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究では、1) 細胞周期制御因子による分裂期のコフィリン活性制御機構の解明、2) 分裂期の染色体整列、紡錘体形成における NDR とその活性制御因子である MST と Furry の作用機構を解明し、細胞分裂時の紡錘体形成と位置決定機構を解明することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞分裂期におけるコフィリンの活性制御機構を解明するため、コフィリンを活性化するホスファターゼ Slingshot の分裂期特異的なリン酸化による不活性化機構を解析した。Slingshot 結合蛋白質を解析し Plk1 が同定されたので、インビトロキナーゼアッセイや結合アッセイにより、Plk1 の結合部位、Plk1 によるリン酸化部位を決定する。

(2) 分裂期特異的なアクチン動態を解析するため、Dronpa を用いて生細胞内のアクチン単量体濃度変化を測定できる新たな蛍光イメージング手法 (s-FDAP 法) を開発する。

(3) NDR とその上流因子である MST、Furry の発現抑制によって染色体整列異常と多極紡錘体形成が生じることを見出したので、微小管動態、動原体-微小管結合を細胞免疫染色、蛍光イメージングを用いて解析する。

(4) Furry 結合蛋白質として Plk1 と Aurora A を同定したので、Aurora A による Plk1 の活性化における Furry の機能をインビトロキナーゼアッセイや結合アッセイを用いて解析

する。また、Aurora A や Plk1 による Furry のリン酸化が Furry の微小管結合能に与える効果を解析する。

4. 研究成果

本研究では紡錘体の形成と位置決定を制御する分子機構を解明することを目的に研究を行い、以下の結果を得た。1) 分裂期における Slingshot の活性制御において、Slingshot の Cdk1 によるリン酸化依存的に Plk1 が Polo-box domain を介して結合すること、Plk1 によってホスファターゼドメインを含む複数部位がリン酸化されることを明らかにした。また、細胞周期依存的なアクチン動態を解明するため、生細胞内で G-アクチン濃度変化を測定する新しいイメージング技術 (s-FDAP 法) を開発した。本法は、分裂期のアクチン動態の時空間的制御機構を解明する上で有効な手段となると考えられる。2) 紡錘体形成と染色体の分配において、動原体と動原体微小管の結合の制御が重要である。NDR と MST は動原体と微小管の結合を制御し、染色体整列と双極性紡錘体の形成を維持すること解明した。また、分裂時の紡錘体極の安定性を維持する機構として、Furry が微小管結合蛋白質として重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、Furry は Cdk1 によるリン酸化依存的に Polo-box を介して Plk1 と結合し、さらに Aurora A とも結合し、Aurora A による Plk1 のリン酸化、活性化を促進する足場蛋白質として機能することを解明した。また、Furry は分裂期特異的に微小管と結合するが、Aurora A や Plk1 による Furry の C 末端領域のリン酸化が Furry の微小管結合能を制御していることを解明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

(ここに記入した発表論文は全て査読あり)

① Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., and Mizuno, K. Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *BioTechniques*, 52, 45-50 (2012)

② Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., Watanabe, N., and Mizuno, K. Live-cell imaging of G-actin dynamics using sequential FDAP. *BioArchitecture*, 1, 240-244 (2011)

③ Freeman, S. A., Lei, V., Dang-Lawson, M., Mizuno, K., Roskelley, C. D., and Gold, M. R. Cofilin-mediated F-actin severing is regulated by the Rap GTPase and controls the cytoskeletal dynamics that drive lymphocyte spreading and BCR microcluster formation. *J. Immunol.*, 187, 5887-5900 (2011)

④ Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kondo, H., Kiuchi, T., Sato, M., and Mizuno, K. LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. *J. Biol. Chem.*, 286, 36340-36351 (2011)

⑤ Spratley, S. J., Bastea, L. I., Doppler, H., Mizuno, K., and Storz, P. Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4. *J. Biol. Chem.*, 286, 34254-34261 (2011)

⑥ Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. *J. Cell Biol.*, 193, 365-380 (2011)

⑦ Itoh, G., Kanno, S., Uchida, K. S. K., Chiba, S., Sugino, S., Watanabe, K., Mizuno, K., Yasui, A., Hirota, T., and Tanaka, K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of

kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J.*, 30, 130-144 (2011)

⑧Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villen, J., Haas, W., Kovacs, J. J., Shukla, A. K., Hara, M., Hernandez, M., Lachmann, A., Zhao, S., Lin, Y., Cheng, Y., Mizuno, K., Ma'ayan, A., Gygi, S. P., and Lefkowitz, R. J. Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 15299-15304 (2010)

⑨Tsuji, T., Ohta, Y., Kanno, Y., Hirose, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. Involvement of p114-RhoGEF and Lfc in Wnt-3a- and Dishevelled-induced RhoA activation and neurite retraction in N1E-115 mouse neuroblastoma cells. *Mol. Biol. Cell*, 21, 3590-3600 (2010)

⑩Garg, P., Verma, R., Cook, L., Soofi, A., Venkatareddy, M., George, B., Mizuno, K., Gurniak, C., Witke, W., and Holzman, L. B. Actin depolymerizing factor cofilin-1 is necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J. Biol. Chem.*, 285, 22676-22688 (2010)

⑪Mishima, T., Naotsuka, M., Horita, Y., Sato, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392, 577-581 (2010)

⑫Toshima, J. Y., Nakanishi, J., Mizuno, K., Toshima, J., and Drubin, D. G. Requirements for recruitment of a G protein-coupled receptor to clathrin-coated pits in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*, 20, 5039-5050 (2009)

⑬Takemura, M., Mishima, T., Wang, Y., Kasahara, J., Fukunaga, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. Ca²⁺/calmodulin-dependent

protein kinase IV-mediated LIM-kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 284, 28554-28562 (2009)

⑭Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Curr. Biol.*, 19, 675-681 (2009)

⑮Eiseler, T., Doppler, H., Yan, I. K., Kitatani, K., Mizuno, K., and Storz, P. Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through Slingshot. *Nat. Cell Biol.*, 11, 545-556 (2009)

[学会発表] (計 23 件)

1. 木内泰、渡邊直樹、水野健作 : ラメリポデア伸長時におけるアクチンモノマー濃度の役割 2012 年 生体運動研究合同班会議、2012. 1. 6-8、筑波大学

2. Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Furry is involved in bipolar spindle formation through Plk1 activation. 第 34 回日本分子生物学会、2011. 12. 13-12. 16、横浜

3. Mizuno, K. : Live-cell measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its key role in stimulus-induced actin assembly and cell extension. The 26th European Cytoskeletal Forum (ECF) Meeting on "Actin-based motility: from molecules to model organisms", 2011. 10. 29-11. 2., Stresa, Lake Maggiore, Italy

4. 水野健作 : Regulation mechanisms of actin cytoskeleton and membrane transport for the formation of cellular protrusions. 第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 21-24、京都

5. 木内泰、永井友朗、大橋一正、水野健作 : Multipoint measurements of fluorescence

decay after photoactivation of Dronpa-actin reveal spatial distribution of G-actin concentration between lamellipodium and cell body. 第63回日本細胞生物学会大会、2011.6.27-6.29, 札幌

6. Chiba, S., Amagai, Y., Kanno, S., Yasui, A., Fukuda, M., and Mizuno, K. : NDR-mediated Rabin8 phosphorylation is required for ciliogenesis. 50th American Society for Cell Biology Annual meeting, 2010.12.10-12.17., Pennsylvania, USA

7. 高橋 克宣、吉田 圭一、梅原 里奈、大橋 一正、水野 健作 : 細胞移動時の接着斑のターンオーバーにおけるSlingshotファミリーの機能解析 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会 合同大会、2010.12.7-12.10、神戸

8. Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Regulation of Furry localization to spindle microtubules. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会 合同大会、2010.12.7-12.10、神戸

9. Mizuno, K. : Critical roles of NDR and Furry in chromosome alignment and spindle formation. 国際シンポジウム "Cell Cycle and Cell differentiation From A to Z" 2010.11.4-11.6、名古屋

10. 永井友朗、木内泰、大橋一正、水野健作 : 細胞内アクチンモノマー濃度と刺激依存的なラメリポディア形成との強い相関関係 第62回日本細胞生物学会大会ワークショップ(口演) + ポスター、2010.5.19-21、大阪

11. 東海林和康、大橋一正、三瓶かおり、木内泰、水野健作 : High-throughput screening for low-molecular weight inhibitors of protein-protein interactions using BiFC probes. 第32回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12.12、横浜

12. 三嶋利明、直塚萌、堀田祐司、大橋一正、水野健作 : 癌細胞の mesenchymal-amoeboid transitionにおけるLIMキナーゼの役割 第

32 回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12.12、横浜

13. 佐上彩、太田裕作、栗田宗一、大橋一正、水野健作 : Identification of filamin A as the Slingshot-binding protein. 第32回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12.12、横浜

14. 池田真教、千葉秀平、大橋一正、水野健作 : Mitotic activation of NDR1 kinase and its role in chromosome alignment. 第32回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12.12、横浜

15. Chiba, S., Ikeda, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. : MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. The 49th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, 2008.12.4-11, San Diego, Dec.

16. 大橋一正、水野健作 : コフィリンホスファターゼ Slingshot の活性制御機構と細胞遊走、細胞分裂における機能 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-10.24、神戸

17. 水野健作、千葉秀平、池田真教、大橋一正 : NDR キナーゼの活性制御機構と染色体整列における機能 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-10.24、神戸

18. 永井友朗、木内泰、大橋一正、水野健作 : 生細胞内アクチンモノマー濃度変化測定のための FDAP タイムラプスイメージング法の開発とラメリポディア形成過程におけるコフィリン、アクチンモノマーの重要性 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-10.24、神戸

19. 辻拓史、太田裕作、菅野祐哉、大橋一正、水野健作 : Wnt-PCP 経路による RhoA 活性化と神経突起退縮に關与する Rho-GEF の同定 第82回日本生化学会大会、2009.10.21-10.24、神戸

20. Ohashi, K., Miyajima, K., Saito, A., Kiuchi, T., Akatsuka, J., and Mizuno, K. : Role of cofilin phosphorylation in

BDNF-induced dendritogenesis. 第 52 回日本神経化学会大会（シンポジウム）、2009. 6. 21-24、伊香保、

21. 千葉秀平、池田真教、勝沼功吉、大橋一正、水野健作：MST2 と Furry による NDR1 の活性化は分裂期染色体の赤道面への整列に必要である 第 61 回日本細胞生物学会大会ワークショップ（口演）、2009. 6. 2-4、名古屋、

22. 永井友朗、木内泰、大橋一正、水野健作：Dronpa を用いた細胞内 G-アクチン濃度の経時測定によるコフィリンの機能解析 日本生化学会東北支部例会、2009. 5. 9、仙台

23. 北谷佳那恵、堀田祐司、大橋一正、水野健作：invadopodia 形成におけるコフィリン酸化制御の機能 日本生化学会東北支部例会、2009. 5. 9、仙台

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/ohashi1234/Top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 健作 (MIZUNO KENSAKU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70128396

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし