

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22570182

研究課題名（和文）

細胞質分裂に必須な遺伝子であるSupervillin (SVIL) の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of physiological role of SVIL for cytokinesis

研究代表者

千賀 威 (SENGA TAKESHI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80419431

研究成果の概要（和文）：

我々は今回の研究において Supervillin (SVIL) が分裂時に Central spindle (CS) と呼ばれる構造体に局在することを見出した。この局在は SVIL の 238 番目のセリンのリン酸化により制御されていた。細胞に 238 番目のセリンをアラニン変えた S238A を発現させた細胞では分裂の異常が観察された。さらに詳しく解析したところ、リン酸化した SVIL は分裂期における細胞膜の収縮に関与していることが明らかとなった。以上より、SVIL のリン酸化は細胞質分裂に重要な働きをしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We found that Supervillin (SVIL) was localized to the central spindle during cytokinesis. The localization was dependent on the phosphorylation of Ser238 of SVIL. Expression of SVIL with the substitution of Ser238 (SVIL-S238A) to alanine inhibited progression of cytokinesis. Furthermore, aberrant ingression of cytokinetic furrow was observed in SVIL-S238A expressing cells. Our results show that phosphorylation of SVIL is essential for the completion of cytokinesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞質分裂

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂において、細胞は複製した DNA を正確に娘細胞に分配しなければならず、この分配異常は染色体を不安定化し、細胞死、または細胞の癌化などを引き起こすと考えられている。分裂期において複製した染色体は凝縮し、細胞の赤道面に整列した後、微小管によりそれぞれの娘細胞に運ばれていく。その後細胞質分裂により二つの

細胞に分割される。これらの過程は多くのタンパク質により複雑に制御されており、その詳細はいまだ明らかでない部分が多い。近年の研究により、PLK1、また Aurora などのプロテインキナーゼが細胞分裂の進行に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。癌においてはこれらの遺伝子発現が亢進しており、癌との関連が注目されている。また、PLK1 や Aurora に対

する阻害剤は抗がん剤として注目されている。我々はこれらのプロテインキナーゼの細胞分裂における詳細な役割を検討するため、**siRNA**を用いたスクリーニングをおこなった。プロテオミクス解析から得たデータベースを基に、**PLK1**、**Aurora**などにより分裂期にリン酸化されている未知のタンパク質を探索した。そしてこれらの遺伝子に対する **siRNA** を **HeLa** 細胞に導入し、細胞分裂の異常が誘導されるか調べた。その結果、**Supervillin (SVIL)** の発現抑制により、細胞分裂が顕著に阻害されることが確認できた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞分裂において **SVIL** がどのような役割を果たしているか明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1). 免疫染色による **SVIL** の局在の検討。  
**SVIL** の局在を明らかにするため、**SVIL** の抗体を作成した。**SVIL** の N 末領域を **GST** との融合タンパク質として大腸菌内に発現させ、タンパク質を精製した。そしてそのタンパク質をアジュバントを混和し、ウサギの皮下に注射した。2週間ごとに4回免疫した後、ウサギを安楽死させ、全血を採取した。次に抗原カラムを作成し、抗体を精製した。ウエスタンブロットの結果、この抗体は **SVIL** を特異的に認識することが確認され、免疫染色をおこなった。**HeLa** 細胞を **ノコダゾール** を用いて分裂期に同調させ、その後 **ノコダゾール** を抜き、細胞を分裂期の様々な段階で **アセトン/メタノール** を用いて固定した。そしてこの抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて **SVIL** の局在を観察した。

さらに局在を検討するため、蛍光タンパク質を融合した **SVIL** を細胞内に発現させ、その局在を観察した。**RT-PCR** を用いて **HeLa** 細胞の **cDNA** から **SVIL** をクローニングした。全長のシーケンスを確認した後、レトロウイルスベクターの **GFP** の下流に組み込んだ。次に **GFP-SVIL** を発現する **HeLa** 細胞を作製した。**293T** 細胞を用いて **SVIL** を含むリコンビナントのレトロウイルスを作成し、それを **HeLa** 細胞に感染させ、恒常的に **GFP-SVIL** を発現する細胞を確立した。そして **GFP-SVIL** の局在を抗 **GFP** 抗体を用いて観察した。

(2). *In vitro* kinase assay による **SVIL** のリン酸化部位の同定。

**SVIL** のアミノ酸配列を調べたところ、238番目のセリンが **PLK1** によりリン酸化される可能性があることが判明した。そこでこのセリン、**S238** がリン酸化されるか *in vitro* kinase assay を用いて検討した。**S238** をアラニン変

えた **SVIL** を作成し (**S238A**)、野生型、**S238A** 変異型 **SVIL** を大腸菌で作成し、精製した。次に **P32** でラベルした **ATP** 存在下で **PLK1** を混ぜ、30分30度で反応させた。これをゲルに流し、リン酸化を検出した。その結果、**S238** 変異型はリン酸化されないことが分かった。

(3). 免疫沈降による **SVIL** 結合タンパク質の同定。

**SVIL** がどのようなタンパク質と結合するか検討するため、免疫沈降を行った。細胞を **ノコダゾール** を用いて分裂期に同調させ、**SVIL** 抗体を用いて内在性の **SVIL** を免疫沈降した。そして様々な抗体を用いて結合するタンパク質を探索した。

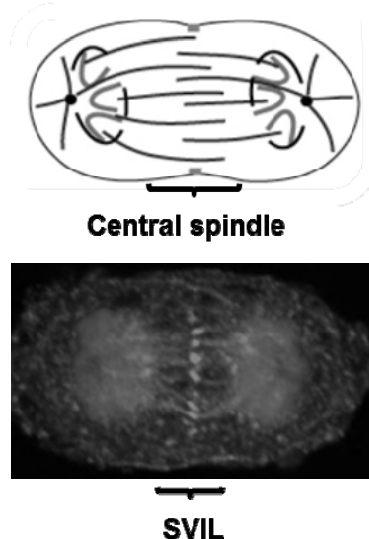
## 4. 研究成果

(1). **SVIL** の発現抑制は細胞質分裂を阻害する。

**SVIL** に対する **siRNA** を用いてその発現を抑制したところ、多核細胞が顕著に増加することが確認された。さらに詳しく解析するため、タイムラプス顕微鏡を用いて経時的に **SVIL** の発現を抑制した細胞の分裂を観察した。その結果、細胞質分裂は開始するが、途中で分裂が止まり、分裂途中の細胞が融合することが判明した。この結果より、**SVIL** は細胞質分裂において、分裂溝の収縮に関与していることが判明した。

(2). **SVIL** は **Central Spindle** に局在する。  
免疫染色により、**SVIL** は細胞質分裂時において **Central Spindle (CS)**、また **midbody** に局在することが判明した。**CS** とは細胞の両極に分かれた中心体から伸びた微小管が逆方向に交差する部位である (図1)。さらに **GFP-SVIL** を導入して局在を検討したところ、同様な局在が観察された。これらの結果から、**SVIL** は細胞質分裂において **CS**、そして **midbody** に局在することが明らかとなった。

図1



(3). SVIL の 238 番目のセリンは PLK1 によりリン酸化される。PLK1 は細胞分裂の進行に必須なプロテインキナーゼである。SVIL のアミノ酸配列を調べたところ、238 番目のセリンがリン酸化される可能性があることが分かった。In vitro kinase assay をおこなったところ、PLK1 が直接この部位をリン酸化することが分かった。S238 のリン酸化特異的な抗体の作成を試みたが、作成は失敗に終わった。タンパク質のリン酸化が見かけ上の分子量の増加を起すことがある。PLK1 を過剰発現すると SVIL の分子量の増加がウエスタンブロットにて観察された。そこで S283 をアラニンに変えた S238A SVIL を細胞内に PLK1 と共に発現させ、ウエスタンブロットを行ったところ、見かけ上の分子量の増加がみられなかった。以上より、SVIL の S238 は PLK1 によりリン酸化されると考えられる。さらにこの局在が SVIL の CS への局在に必要なか検討した。細胞を PLK1 阻害剤存在下で培養し、分裂期における SVIL の局在を検討した。その結果、PLK1 の活性が低下した状態では SVIL が CS に局在できないことが判明した。さらに変異型 PRC1 を用いて確認した。PRC1 は CS に局在するタンパク質であり、そのリン酸化は PLK1 が CS に局在するのに重要である。リン酸化されない変異型 PRC1 を発現すると PLK1 は CS に局在できない。この条件で SVIL の局在を検討したところ、SVIL の CS への局在が顕著に抑制された。さらに S238A-SVIL は CS へ局在できなかった。これらの結果は、PLK1 による S238 のリン酸化が SVIL の CS への局在に重要であることを強く示唆する。

(4). SVIL のリン酸化は PRC1 との結合を制御する。リン酸化された SVIL が CS に局在するためには、SVIL は CS に存在する何らかのタンパク質と結合すると推測される。そこで免疫沈降により、SVIL とどのようなタンパク質が結合するか探索した。その結果、PRC1 と呼ばれる CS の構造タンパク質が SVIL と結合することが確認できた。SVIL と PRC1 の結合は分裂期に特異的であった。SVIL の中央部分と PRC1 の N 末端が結合に重要であった。この結合は SVIL のリン酸化特異的であり、S238 をアスパラギン酸に変換すると、結合が顕著に低下した。セリンをアスパラギン酸に変換すると、リン酸化された状態をまねることができる。これらの結果は SVIL の S238 のリン酸化が PRC1 との結合を制御することを意味する。

(5). SVIL の収縮環の収縮に必須である。細胞分裂時に二つの娘細胞に分離した染色体の中間における細胞膜直下に収縮環と呼ばれる構造体が形成される。収縮環は主にア

クチンとミオシンからなり、ミオシンの活性化により収縮環は収縮する。SVIL の発現を抑制した細胞の分裂をタイムラプス顕微鏡を用いて経時的に観察した。その結果、収縮環の縦幅が顕著に増加することが観察された。さらに SVIL のリン酸化が収縮環の正常な収縮に必須であるか検討した。S238A-SVIL を細胞に発現させ、内在性の SVIL を siRNA を用いて抑制し、細胞分裂をタイムラプスで観察した。S238A を発現させると SVIL を抑制した時と同様に、収縮の異常が観察された。この結果は、S238 のリン酸化収縮環の収縮に重要であることを示唆する。SVIL にはミオシンとアクチンに結合する部位がある。アクチンもミオシンの細胞質分裂に重要である。そこで SVIL とアクチン、またはミオシンとの結合が重要であるか検討した。アクチンとの結合領域を欠損した  $\Delta$ Act-SVIL、またはミオシンとの結合領域を欠損した  $\Delta$ Myo-SVIL を細胞に発現させ、siRNA を用いて内在性の SVIL の発現を阻害し、細胞分裂を観察した。その結果、ミオシン SVIL との結合が収縮環の収縮に必須であることが判明した。

(6). SVIL は収縮環におけるミオシンのリン酸化に関与する。収縮環の収縮には RhoA タンパク質が重要な働きをしている。CS に局在する MgcRacGAP や Ect2 が RhoA の収縮環への局在と活性化に必須である。活性化した RhoA は RHO kinase などの下流シグナルを活性化し、ミオシン軽鎖のリン酸化を促進する。そのリン酸化の結果、ミオシンが活性化され収縮環は収縮する。SVIL の発現抑制が収縮環の収縮を阻害することから、SVIL がミオシンの活性化に重要であるか調べた。SVIL の発現を抑制した分裂期の細胞をリン酸化ミオシンの抗体で染色したところ、リン酸化が顕著に抑えられていることが分かった。さらに SVIL のリン酸化がミオシンのリン酸化必須であるか検討したところ、S238A-SVIL 発現細胞では収縮環におけるミオシンのリン酸化が低下した。また、ミオシン結合部位を欠損した SVIL 発現細胞では収縮環におけるミオシンのリン酸化は低下した。これらの結果は、SVIL のリン酸化、またミオシンとの結合が、収縮環におけるミオシンの活性化に重要であることを意味する。

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 7 件)

①Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Yoshikawa N, Hyodo T, Asano E, Hasegawa H, Maeda M, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Senga

T. ALX1 induces Snail expression to promote epithelial to mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. (2013) Cancer Research. 73:1581-90. 査読有

② Sayeed S, Asano E, Ito S, Ohno K, Hamaguchi M, Senga T. S100A10 is required for the organization of actin stress fibers and promotion of cell spreading. (2013) Mol. Cell. Biochem. 374: 105-11. 査読有

③ Hyodo T, Ito S, Hasegawa H, Asano E, Maeda M, Urano T, Takahashi, M, Hamaguchi M, Senga T. Misshapen-like kinase 1 (MINK1) is a novel component of striatin interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) and is required for the completion of cytokinesis. (2012) J Biol Chem. 287: (30):25019-29 査読有

④ Asano E, Maeda M, Hasegawa H, Ito S, Hyodo T, Yuan H, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. Role of palladin phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in cell migration. (2011) PLoS One. e29338. 査読有

⑤ Maeda M, Hasegawa H, Hyodo T, Ito S, Asano E, Yuan H, Funasaka K, Shimokata K, Hasegawa Y, Hamaguchi M, Senga T. ARHGAP18, a GTPase-activating protein for RhoA, controls cell shape, spreading, and motility. (2011) Mol Biol Cell. 22(20):3840-52. 査読有

⑥ Ito S, Takahara Y, Hyodo T, Hasegawa H, Asano E, Hamaguchi M, Senga T. The roles of two distinct regions of PINCH-1 in the regulation of cell attachment and spreading. (2010) Mol Biol Cell. 21(23):4120-9. 査読有

⑦ Funasaka K, Ito S, Hasegawa H, Goldberg GS, Hirooka Y, Goto H, Hamaguchi M, Senga T. Cas utilizes Nck2 to activate Cdc42 and regulate cell polarization during cell migration in response to wound healing. (2010) FEBS J. 277(17):3502-13. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

① 千賀 威

Supervillin のリン酸化は細胞分裂時の収縮環形成を制御する。

日本癌学会

平成 24 年 9 月 20 日

札幌

〔その他〕

ホームページ等

研究室のホームページに研究結果、業績を載せている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者 千賀 威  
(SENGA TAKESHI)

研究者番号： 80419431

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし