

## 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：22590268  
 研究課題名（和文）  
 細胞分裂におけるMink1の機能解析  
 研究課題名（英文）  
 Analysis of Mink1 in cell division  
 研究代表者  
 伊藤 聡子（ITO SATOKO）  
 名古屋大学・医学系研究科・助教  
 研究者番号：30432256

研究成果の概要（和文）：細胞分裂の新規調節因子を探索するため siRNA ライブラリを使いスクリーニングを行った。分裂期にリン酸化されるタンパク質のデータベースをもとに遺伝子を選び検討したところ Mammalian Misshapen-like kinase 1 (Mink1)が細胞分裂に必要なタンパク質であることを見出した。Mink1が細胞分裂の中でも特に細胞質分裂の最終段階である離断に関与すること、PP2Aの調節サブユニットであるSTRN4と直接結合しSTRIPAK (striatin interacting phosphatase and kinase)と呼ばれる複合体を形成していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To search for novel regulators of cytokinesis, we performed a screen using a library of siRNAs and found that Mammalian Misshapen-like kinase 1 (Mink1) was essential for cytokinesis. We found that Mink1 is required for the completion of abscission, the final stage 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	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：細胞分裂、Mink1、セリンスレオニンキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂において、細胞は複製した二組の染色体を二つの娘細胞に正確に分配しなければならず、この分配異常は染色体の不安定性を引き起こし、細胞死または細胞の癌化などに繋がる。細胞分裂の過程は多くのタンパク質により複雑かつ精密に制御されている。近年になり細胞分裂に関する複数のプロテオーム解析が行われ、今まで報告されてきたタンパク質よりも更に多くのタンパク質が細胞分裂に関与している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

細胞分裂の最終段階である細胞質分裂によって二つの娘細胞は完全に分離する。この過程の異常は細胞の多核化を引き起こす重要なステップである。しかしながら細胞質分裂のメカニズムにはまだ不明な点が数多く残されている。近年行われた複数の細胞分裂に関するプロテオーム解析により示された個々のタンパク質の機能解析はまだ十分に行われておらず、この中に細胞質分裂の制御に関わる重要なタンパク質が数多く埋もれているのではないかと推測された。そこで本研究課題ではこれらのデータベースを利用

し新規の細胞質分裂制御タンパク質を同定し、さらに詳細な細胞分裂メカニズムの解明を目指すこととした。

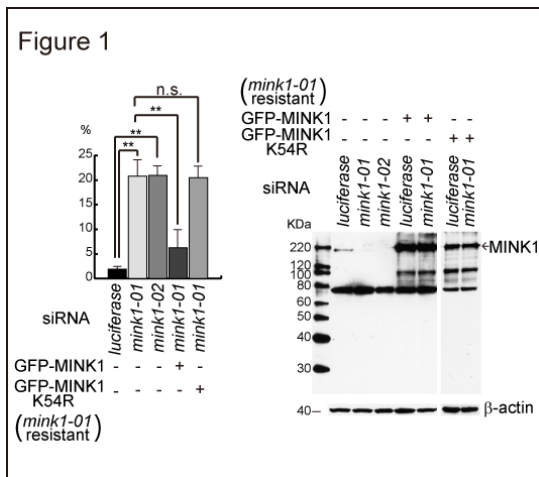
### 3. 研究の方法

細胞質分裂に関わる新規分子を同定するために siRNA スクリーニングを行った。細胞質分裂に関わる分子の多くが細胞分裂期にリン酸化を受けていることが知られている。そこで細胞分裂期にリン酸化されるタンパク質のプロテオーム解析のデータから今まで報告のない 70 の遺伝子をピックアップし、HeLa 細胞を用いて siRNA でノックダウンした。多核細胞の出現を指標に、各遺伝子の細胞質分裂への関与の可能性を調べた。

### 4. 研究成果

siRNA を用いたスクリーニングにより Mammalian Misshapen-like kinase 1 (Mink1) をノックダウンすることにより多核細胞が増加することが分かった。Mink1 は germinal center kinase (GCK) family に属するセリンスレオニンキナーゼで分子量約 200kD のタンパク質である。N 末にキナーゼドメイン、C 末に CNH ドメインがあり、両者間を intermediate domain が繋ぐ構造をとっている。いままでに JNK や Smad の経路を介して、細胞骨格や癌遺伝子誘導性の細胞老化に関与しているとの報告がある。しかしながらその機能の詳細は未だ不明である。

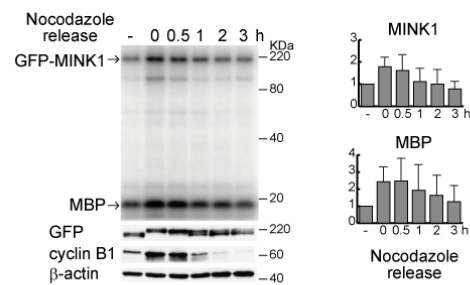
HeLa 細胞を Mink1 の siRNA で処理し、72 時間培養後にチューブリンと核を免疫蛍光染色し細胞の状態を観察した。するとコントロール siRNA で処理した細胞では 2-3% であった多核細胞の出現が Mink1 の 2 種類の siRNA で処理した細胞では 20% 前後に増加していた。また siRNA 抵抗性の Mink1 を強制発現させた場合、多核細胞の出現は抑制されたが、Mink1 の kinase dead 変異体 (K54R) を強制発現させても多核細胞の出現抑制は起こらず、Mink1 が正常な細胞分裂に必要であること、さらに Mink1 のキナーゼ活性が正常



な細胞分裂には必要であることが明らかとなった (Figure 1)。

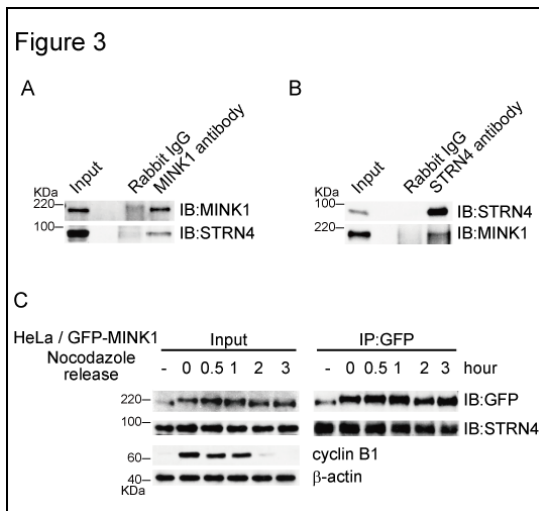
細胞の多核化が細胞分裂のどの段階の異常で起こっているのか検討するために HeLa 細胞を Mink1 の siRNA で処理しタイムラプス顕微鏡で細胞分裂の様子を観察した。その結果細胞分裂の最終段階である細胞質分裂がうまくいかず 2 核になる細胞が多数観察された。また一見正常に細胞分裂が進行していると思われる細胞でも分裂終期から細胞質分裂の終了までの時間の延長が認められた。これらの結果から Mink1 が細胞質分裂の正常な進行と完了に必要なタンパク質であることが明らかとなった。また Mink1 の局在を検討するために GFP-Mink1 の細胞内局在の検討や抗体を用いた免疫蛍光染色を行ったが、間期、細胞分裂期の両時期で Mink1 は細胞質内にびまん性に存在し、特異的な局在を示さなかった。

Figure 2

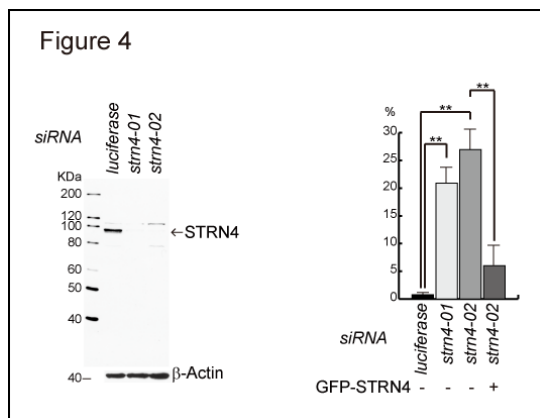


プロテオミクスデータでは Mink1 は細胞分裂期にリン酸化を受けるとされているため HeLa 細胞をノコダゾールで同調し、その後リリースして Mink1 のリン酸化と MBP を基質としたキナーゼ活性の変化を in vitro kinase assay を行い検討した。その結果 Mink1 は分裂期の開始時からリン酸化されており、分裂の進行とともにリン酸化レベルの低下が認められた (Figure 2)。また Mink1 のキナーゼ活性もリン酸化と同様に分裂期の開始時に最大でその後分裂の進行とともに低下することが明らかとなった。次に Mink1 をリン酸化する酵素を検討した。阻害剤を用いた実験と in vitro kinase assay により CDK1 と PLK1 の両者によりリン酸化される可能性が示唆された。

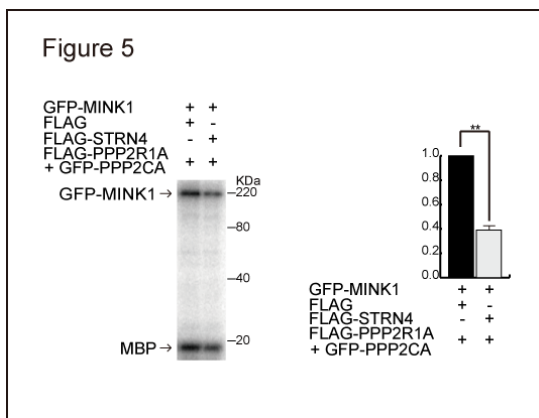
Mink1 の細胞質分裂における機能を解明するために、どのようなタンパク質と相互作用して機能しているか探索した。Mink1 の抗体を用いて Mink1 を免疫沈降し、免疫沈降複合



体を質量分析装置にかけて解析した。その結果、STRN4 や PPP2CA といった phosphatase 2 A を構成するタンパク質が同定されて、これらのタンパク質が Mink1 と複合体を形成していることが推測された。これらのタンパク質の中で最もスコアが高値であった STRN4 について HeLa 細胞での内在性タンパク質間の結合を Mink1 抗体、STRN4 抗体を用いて調べた



ところ両者の結合が確認された。そこで STRN4 の遺伝子をクローニングし 293T 細胞を用いて Mink1 とともに過剰発現させ結合の有無をみた。その結果から特に Mink1 と STRN4 は直接結合していると考えられた。更にプルダウンアッセイも行い結合を確認した。また



この結合が間期、細胞分裂期において何か変化があるかどうかノコダゾールを用いた細胞同調後のリリース実験を行い検討したところ、細胞周期全体をとおして両者は結合していることが明らかになった (Figure 3)。STRN4 や PPP2CA は striatin interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) と呼ばれるタンパク質複合体の構成分子であることが知られている。STRIPAK とはごく最近報告されたタンパク質複合体であり、フォスファターゼの 1 種である PP2A holoenzyme と GCK ファミリーキナーゼをコアとし、その他の機能不明なタンパク質数種からなる。PP2A holoenzyme の調節サブユニットは striatin (STRN) とされている。このことから、Mink1 が STRN4 とともに STRIPAK の 1 種を形成していると考えられた。

細胞分裂期にも Mink1 と STRN4 が結合しているという結果から、STRN4 も細胞分裂に何らかの関与があると考えられた。そこで HeLa 細胞において STRN4 を siRNA を用いてノックダウンし免疫蛍光染色とタイムラプス顕微鏡で細胞分裂異常を観察したところ、Mink1 と同様に多核細胞の増加や細胞分裂異常が認められた。またこの現象は siRNA 耐性の STRN4 遺伝子を導入することにより救済された (Figure 4)。このことから、Mink1 と STRN4 が形成する STRIPAK が複合体として細胞分裂に関与していると考えられた。

最後に Mink1 と STRN4、PP2A holoenzyme との関係性を in vitro kinase assay を用いて検討した。その結果、STRN4 とともに PP2A の触媒サブユニット、構造サブユニットを添加すると、Mink1 のリン酸化の低下、キナーゼ活性の低下が認められた (Figure 5)。

本研究課題により、細胞質分裂に関わる新規分子としてセリンスレオニンキナーゼ Mink1 を見出した。Mink1 はキナーゼとフォスファターゼの両者を含む特異的なタンパク質複合体である STRIPAK を形成していた。STRIPAK の制御機構や生理的機能には不明な点が多く、今後の研究が必要である。

## 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 5 件)

① Asano E, Hasegawa H, Hyodo T, Ito S, Maeda M, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. The Aurora B-mediated phosphorylation of SHCBP1 regulates cytokinetic furrow ingression. *J Cell Sci.* 2013 May 23. [Epub ahead of print]

査読有

②Yuan 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. *Cancer Res.* 2013 Mar 1;73(5):1581-90. 査読有

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

③ 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. *Mol Cell Biochem.* 2013 Feb;374(1-2):105-11  
doi: 10.1007/s11010-012-1509-2. 査読有

④Hyodo T, Ito S, Hasegawa H, Asano E, 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. *J Biol Chem.* 2012 Jul 20;287(30):25019-29. 査読有

⑤Asano 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. *PLoS One.* 2011;6(12) 査読有

[学会発表] (計3件)

①兵頭寿典、伊藤聡子、長谷川仁紀、千賀威  
Mink1 is a novel somponent of STRIPAK and is required for the completion of cytokinesis. 第35回日本分子生物学会  
2012, 12, 11 福岡

②兵頭寿典、伊藤聡子、千賀威 Mink1 is a novel somponent of STRIPAK and is required for the completion of cytokinesis. 第6回ナノメディスン国際シンポジウム  
2012, 11, 30 松江

③伊藤聡子、前田真男、浜口道成、千賀威  
Mink1 is a novel somponent of STRIPAK and is required for the completion of cytokinesis. 71回日本癌学会学術総会  
2012, 9, 26 札幌

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

伊藤 聡子 (ITO SATOKO)  
名古屋大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30432256