

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19370079
 研究課題名（和文）細胞遊走、細胞分裂時の極性形成におけるコフィリン制御機構とその役割
 研究課題名（英文） Roles of cofilin regulation for polarity formation during cell migration and division
 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

研究成果の概要：

アクチン脱重合因子であるコフィリンは、アクチン骨格の再構築において中心的な役割を果たしており、リン酸化により活性が制御される。本研究では、生細胞内でのアクチン単量体の時空間的变化の測定系を開発し、細胞遊走時の仮足形成におけるコフィリンの重要性を解明した。また、細胞遊走時の極性形成、細胞分裂時の分裂軸決定、癌細胞浸潤、神経突起形成におけるコフィリンのリン酸化制御機構の重要性を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：アクチン細胞骨格、シグナル伝達、LIM キナーゼ、コフィリン、Slingshot、細胞極性、細胞運動、細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

アクチン細胞骨格の再構築は、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おり、ひいては胚発生、神経系構築、免疫応答、癌細胞転移など多くの生理的、病理的現象においても重要な役割を果たしている。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、細胞の運動や細胞分裂を制御するシグナル伝達機

構の解析も急速に進んでいる。コフィリンはアクチン繊維の切断と脱重合を促進し、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る。私達は、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)の同定に成功した。さらに、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 ファミリーも同定され、コフィリンのリン酸

化と脱リン酸化による活性制御機構が明らかにされた。細胞遊走や細胞分裂におけるコフィリンの重要性は知られているが、細胞遊走、細胞分裂時の極性形成過程において、コフィリンのリン酸化／脱リン酸化経路が時空間的に制御される機構やその機能的役割は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞移動、遊走時の極性（前後軸）形成過程や、細胞分裂時の分裂軸（分裂面）決定過程における LIM キナーゼや Slingshot を介したコフィリン活性の時空間的制御機構を解明し、コフィリンによるアクチン細胞骨格の時空間的な制御経路が細胞遊走、細胞分裂時の極性形成において果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Par-1 による Slingshot のリン酸化とアクチン再構築の制御：Slingshot の Ser-978 をリン酸化するキナーゼとして Par-1 を同定しているので、Par-1 の過剰発現や shRNA による発現抑制を行い、Slingshot と 14-3-3 との結合、Slingshot の活性と局在の変化や、ファロイジン染色によるアクチン骨格の変化を測定した。

(2) FDAP-time lapse imaging によるアクチンモノマー量の時空間的測定法の開発と細胞遊走におけるコフィリンの機能解析：可逆的に蛍光の発色と消光が可能な Dronpa とアクチンの融合蛋白質を培養細胞に発現させ、細胞局所における Dronpa-アクチンの蛍光減衰速度 (FDAP 量) を測定した。また、数秒間隔で Dronpa-アクチンの FDAP 量の測定を可能にするタイムラプスイメージング法を開発し、刺激依存的な細胞内アクチンモノマー量の経時的変化や、細胞内のアクチンモノマーの空間分布を測定した。

(3) 癌細胞の浸潤におけるコフィリン制御系の役割：癌細胞のインビトロ浸潤アッセイとして腹水肝癌細胞の中皮細胞層への transcellular migration アッセイ、およびマトリゲル浸潤アッセイを用いた。また、蛍光ラベルしたゼラチン上で癌細胞を培養し、蛍光のない穴の形成を測定することによ

って浸潤仮足の形成を定量化した。また、3 次元コラーゲンゲル内で HT1080 細胞を培養し、細胞の形状を測定することによって、間葉系細胞運動からアメーバ様運動への変換を定量的に解析した。いずれも LIM キナーゼ、Slingshot、コフィリンの過剰発現や shRNA による発現抑制の効果を測定した。

(4) 細胞分裂中期の紡錘体軸の決定におけるコフィリン制御系の役割：shRNA により LIM キナーゼや Slingshot の発現を抑制した HeLa 細胞を用いて、細胞分裂時の紡錘体の配置や底面に対する角度、細胞表層アクチンや星状体微小管の染色、細胞極性因子 LGN の細胞表層における局在等を測定した。

(5) 神経突起の形成におけるコフィリン制御系の役割：shRNA により LIM キナーゼや Slingshot の発現を抑制した PC12 細胞やトリ脊髄後根神経節ニューロンを用いて、神経突起伸長の速度や成長円錐の動態を解析した。また、カルシウムイオノフォアによる神経突起の伸長におけるコフィリン制御系の役割を解明するため、Neuro-2a 細胞をイオノマイシンで刺激し、LIM キナーゼの活性化や上流のシグナル経路を阻害剤や種々の CaM キナーゼ変異体を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Par-1 による Slingshot のリン酸化とアクチン再構築の制御：細胞極性形成因子として知られる Par1 が Slingshot の Ser-978 をリン酸化し、14-3-3 との結合を促進することを見出した。さらに、Par1 の発現抑制は、Slingshot の Ser-978 非リン酸化型の過剰発現と同様に、アクチンの再構築を誘導することを見出し、細胞極性形成因子 Par1 は Slingshot のリン酸化を介してアクチン細胞骨格の再構築制御に関与することを見出した。

(2) FDAP-time lapse imaging によるアクチンモノマー量の時空間的測定法の開発と細胞遊走におけるコフィリンの機能解析：細胞局所における Dronpa-アクチンの蛍光発色後の蛍光減衰速度 (FDAP 量) を測定することによって、生細胞内でのアクチンモノマー量の測定に成功した。また、Dronpa-アクチンの

FDAP 量のタイムラプスイメージング測定によって、生細胞内でのアクチンモノマー量の時空間的変化の測定にも成功し、ニューレグリン刺激依存的にラメリポディアが形成される際には細胞内アクチンモノマー量が顕著に減少することを見出した。また、FDAP 量の多点測定によって、ラメリポディア後方ではアクチンモノマー濃度が高いことを見出した。さらに、LIM キナーゼ過剰発現によりコフィリンを不活性化した細胞では、アクチンモノマー不足のため、このような仮足形成が見られないことを明らかにした。

(3) 癌細胞の浸潤におけるコフィリン制御系の役割: 腹水肝癌細胞の浸潤アッセイにおいて、LIM キナーゼと Slingshot の両者の活性が必要であることを明らかにした。また、癌細胞の浸潤仮足の形成においても LIM キナーゼと Slingshot の両者の活性が必要であること、3次元培養下での間葉系細胞運動からアメーバ様運動への変換において Rho による LIM キナーゼの活性化が重要な役割を担っていることを明らかにした。

(4) 細胞分裂時の紡錘体軸の決定におけるコフィリン制御系の役割: 細胞分裂時において LIM キナーゼが活性化され、コフィリンのリン酸化レベルが上昇することを見出していたが、その意義は不明であった。本研究において、LIM キナーゼの活性化は、分裂時の細胞表層アクチンと星状体微小管の安定化に必要であり、紡錘体軸の底面に並行な安定な配置に必要であることを明らかにした。また、LIM キナーゼの活性化は、細胞表層アクチンの重合・安定化を介して、細胞極性因子 LGN の紡錘体両極近傍への局在に必要であることを明らかにした。

(5) 神経突起の形成におけるコフィリン制御系の役割: PC12 細胞やトリ脊髄後根神経節ニューロンの神経突起伸長において、コフィリン、LIM キナーゼ、Slingshot がいずれも必須であることを明らかにした。さらに、カルシウムイオノフォアによる神経突起の伸長においても、カルシウムシグナルの下流で CaMKIV が LIM キナーゼを活性化し、コフィリンのリン酸化を誘導することが重要であることを明らかにした。

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 16 件)

(ここに記入した発表論文は全て査読あり)

①Eiseler, 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 via Slingshot. **Nat. Cell Biol.**, 11, 545-556 (2009).

②Chiba, 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).

③Kurita, S., Watanabe, Y., Gunji, E., Ohashi, K., and Mizuno, K. Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1. **J. Biol. Chem.**, 283, 32542-32552 (2008).

④Kato, A., Kurita, S., Hayashi, A., Kaji, N., Ohashi, K., and Mizuno, K. Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells. **Biochem. J.**, 414, 261-270 (2008).

⑤Kim, Y.B., Choi, S., Choi, M.C., Oh, M.A., Lee, S.A., Cho, M., Mizuno, K., Kim, S.H., and Lee, J.W. Cell Adhesion-dependent Cofilin Serine 3 Phosphorylation by the Integrin-linked Kinase · c-Src Complex. **J. Biol. Chem.**, 283, 10089-10096 (2008).

⑥San Martin, A., Lee, M. Y., Williams, H. C., Mizuno, K., Lassegue, B., and Griendling, K. K. Dual regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot-1L phosphatase controls Platelet-derived growth factor-induced migration of human aortic smooth muscle cells. **Circ. Res.**, 102, 432-438 (2008).

⑦Kim, Y. B., Choi, S., Choi, M. C., Oh, M. A., Lee, S. A., Cho, M., Mizuno, K., Kim, S. H., and Lee, J. W. Cell adhesion-dependent cofilin serine

3 phosphorylation by the integrin-linked kinase·c-Src complex. **J. Biol. Chem.**, 283, 10089-10096 (2008).

⑧Horita, Y., Ohashi, K., Mukai, M., Inoue, M., and Mizuno, K. Suppression of the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by knockdown of Slingshot or LIM-kinase. **J. Biol. Chem.**, 283, 6013-6021 (2008).

⑨ Kaji, N., Muramoto, A., and Mizuno, K. LIM-kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle orientation. **J. Biol. Chem.**, 283, 4983-4992 (2008).

⑩Chandramouli, S., Yu, C. Y., Yusoff, P., Lao, D. -H., Leong, H. F., Mizuno, K., and Guy, G. R. TESK1 interacts with Sprouty2 to abrogate its inhibition of Erk phosphorylation downstream of receptor tyrosine kinase signaling. **J. Biol. Chem.**, 283, 1679-1691 (2008).

⑪Han, L., Stope, M. B., Lopez de Jesus, M., Oude Weernink, P. A., Urban, M., Wieland, T., Roskopf, D., Mizuno, K., Jakobs, K. H., and Schmidt, M. Direct stimulation of receptor-controlled phospholipase D1 by phospho-cofilin. **EMBO J.**, 26, 4189-4202 (2007).

⑫Kligys, K., Claiborne, J. N., DeBiase, P. J., Hopkinson, S. B., Wu, Y., Mizuno, K., and Jones, J. C. R. The Slingshot family of phosphatases mediates Rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization and motility behavior of keratinocytes. **J. Biol. Chem.**, 282, 32520-32528 (2007).

⑬ Iida, J, Ishizaki, H, Okamoto-Tanaka, M, Kawata, A, Sumita, K, Ohgake, S, Sato, Y, Yorifuji, H, Nukina, N, Ohashi, K, Mizuno, K., Tsutsumi, T, Mizoguchi, A, Miyoshi, J, Takai, Y, and Hata, Y. Synaptic scaffolding molecule alpha is a scaffold to mediate N-methyl-D-aspartate receptor-dependent RhoA activation in dendrites. **Mol. Cell. Biol.**, 27, 4388-4405 (2007).

⑭Kurita, S., Gunji, E., Ohashi, K., and Mizuno, K. Actin filaments- stabilizing and -bundling

activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1. **Genes Cells**, 12, 663-676 (2007).

⑮ Endo, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. LIM-kinase and Slingshot are critical for neurite extension. **J. Biol. Chem.**, 282, 13692-13702 (2007).

⑯Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S., and Mizuno, K. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. **J. Cell Biol.**, 177, 465-476 (2007).

[学会発表] (計 25 件)

① Otsuki, M., Ikebe, C., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Phosphorylation of Slingshot-1 by Polo-like kinase-1. The 48th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, 2008.12.13-17, San Francisco

②永井友朗、木内泰、大橋一正、水野健作 : ラメリポディア形成過程における細胞内G-アクチン濃度のタイムラプスイメージングーDronpa-アクチンのFDAP解析を用いてーBMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会, 2008.12.9-12.12, 神戸

③林文、黒沢豪、梶紀子、大橋一正、鎌倉幸子、住本英樹、水野健作 : 哺乳類細胞の対称分裂における紡錘体位置決定タンパク質の局在とアクチン骨格の関与. BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会, 2008.12.9-12.12, 神戸

④池田真教、千葉秀平、勝沼功吉、大橋一正、水野健作 : MST2, MST3 によるNDR1 の活性制御と細胞分裂の制御. BMB2008 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会, 2008.12.9-12.12, 神戸

⑤ Mizuno, K. : Molecular mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1 and its roles in cell migration and invasion. International Phosphatase Conference, 2008. 11.12-14, Maebashi

⑥Ohashi, K., Horita, Y., and Mizuno, K. : Cofilin phospho-regulation plays a critical role in

tumor cell motility and invasion. 第67回日本癌学会学術総会, 2008.10.28-30, 名古屋

⑦Miyajima, K., Akatsuka, J., Ohashi, K., and Mizuno, K. : LIM-kinase is required for BDNF-induced dendritogenesis. 第31回日本神経科学大会, 2008.7.9-11, 東京

⑧Ohashi, K., Akatsuka, J., Miyajima, K., Endo, M., and Mizuno, K. : Roles of cofilin phosphorylation in neurite outgrowth and dendritogenesis. 第31回日本神経科学大会ワークショップ, 2008.7.9-11, 東京

⑨Tsuji, T., Ohta, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Identification of Rho-GEFs that mediate Dishevelled-induced RhoA activation. 第60回日本細胞生物学会大会, 2008.6.29-7.1, 横浜

⑩Kitatani, K., Horita, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Involvement of cofilin/ADF, Slingshot and LIM-kinase in invadopodium formation of tumor cells. 第60回日本細胞生物学会大会, 2008.6.29-7.1, 横浜

⑪Otsuki, M., Kaneto, K., Ikebe, C., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Phosphorylation of Slingshot-1 by Polo-like kinase-1. 第60回日本細胞生物学会大会, 2008.6.29-7.1, 横浜

⑫Ohashi, K., Horita, Y., Kiuchi, T., and Mizuno, K. : Roles of cofilin phospho-regulation in tumor cell migration and invasion. 第60回日本細胞生物学会大会, 2008.6.29-7.1, 横浜

⑬辻拓史、太田裕作、大橋一正、水野健作 : Wnt-PCP経路による神経突起退縮に關与するRhoA-GEFの同定. 日本生化学会東北支部例会, 2008.5.17, 盛岡

⑭Mishima, T., Ohta, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Regulation of cofilin-phosphatase activity of Slingshot-1 by Par-1/MARK3. The 47th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, 2007.12.1-5, Washington DC, U.S.A.

⑮栗田宗一、渡辺陽介、大橋一正、水野健作 : コフィリン脱リン酸化におけるSlingshot-1のN末端領域の機能. BMB2007(第30回日本分子生物学会年会、第80回日本分子生物学会大会合同大会), 2007.12.11-15, 横浜

⑯大橋一正、藤原佐知子、木内泰、水野健作 : コフィリンのリン酸化によるラメリポディア内のアクチンターンオーバー制御機構.

BMB2007(第30回日本分子生物学会年会、第80回日本分子生物学会大会合同大会), 2007.12.11-15, 横浜

⑰水野健作 : コフィリンホスファターゼ Slingshotの活性化機構とその細胞骨格、細胞運動における機能. BMB2007(第30回日本分子生物学会年会、第80回日本分子生物学会大会合同大会)ワークショップ, 2007.12.11-15, 横浜

⑱Horita, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Critical roles of cofilin/ADF, Slingshot and LIM-kinase in tumor cell invasion. 第66回日本癌学会学術総会, 2007.10.3-5, 横浜

⑲Akatsuka, J., Kiuchi, T., Endo, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Slingshot regulates primary dendrite formation in rat hippocampal neurons. Neuro2007, 2007. 9.10-12, Yokohama

⑳Kurita, S., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Functional roles of cofilin-phosphatase Slingshot in cell migration and tumor cell invasion. OLS/NUS-Tohoku COE Joint Symposium, 2007. 9.5-6, Singapore

㉑Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S., and Mizuno, K. : The role of cofilin in actin filament assembly during lamellipodium formation. ELSO 2007, 2007.9.1-4, Dresden, Germany

㉒Ohashi, K., Fujiwara, S., Kiuchi, T., and Mizuno, K. : Phosphorylation of cofilin regulates actin-based retrograde flow in lamellipodia and lamellipodial length. 第59回日本細胞生物学会・第40回日本発生生物学会合同大会ワークショップ, 2007.5.28-30, 福岡

㉓Mishima, T., Ohta, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. : Regulation of cofilin-phosphatase activity of Slingshot-1 by Par-1/MARK3. 第59回日本細胞生物学会・第40回日本発生生物学会合同大会, 2007.5.28-30, 福岡

㉔水野健作 : コフィリンのリン酸化、脱リン酸化制御と細胞運動. 第7回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「生体システムの基盤

となる蛋白質の構造変化」, 2007.5.24-26, 仙台

㊥木内泰、大橋一正、栗田宗一、水野健作：
Dronpa融合アクチンを用いた顕微鏡イメージングによるラメリポディア形成におけるコフィリンの機能解析. 日本生化学会東北支部第73回例会, 2007.5.12, 仙台

〔図書〕(計 3 件)

①栗田宗一、水野健作 (分担)

医学書院

生体の科学 (細胞骨格、細胞運動、細胞接着を制御するシグナル伝達機構)、2008、420-421

②木内泰、水野健作 (分担)

羊土社

実験医学増刊 (Dronpa を用いたアクチン動態のライブイメージング)、2008、2748-2754

③栗田宗一、水野健作 (分担)

医学書院

生体の科学 (コフィリンを中心としたタンパク質間相互作用)、2007、444-445

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

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