

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5月22日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21770143

研究課題名（和文）分裂期微小管とダイナミンの結合を制御する新規メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism for control the interaction between mitotic microtubules and dynamin.

研究代表者

濱生 こずえ（HAMAOKOZUE）

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10403578

研究成果の概要（和文）：分裂期微小管のダイナミクスの制御機構の解明を目的として、分裂期微小管とダイナミンの結合を制御する新規機構の解明を試みた。その結果、ダイナミンは、(1) 分裂期に Cyclin B-cdc2 キナーゼによるリン酸化で微小管との結合が抑制されること、(2) 間期細胞内で SNX9 と結合すること、(3) 微小管結合部位はプロリンリッチドメインであること、(4) ダイナミックな微小管と結合することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To analyze the regulatory mechanisms for the dynamics of mitotic microtubules, I tried to elucidate the novel mechanisms for the binding of dynamin to mitotic microtubules. I revealed that (1) phosphorylation of dynamin by Cyclin B-cdc2 kinase reduces the binding ability of dynamin to microtubules, (2) dynamin binds to SNX9 in interphasic cells, (3) the microtubule binding domain of dynamin is the proline-rich domain, (4) dynamin binds to dynamic microtubules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	531,837	159,551	691,388
2011年度	168,163	50,448	218,611
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,500,000	1,049,999	4,549,999

研究分野：細胞生物学・生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞骨格，細胞分裂，微小管，ダイナミン

1. 研究開始当初の背景

(1) ダイナミンはPRDで微小管と結合する

ダイナミンは微小管結合蛋白質としてウシ脳から初めて精製され (Shpetner, 1989), プロリンリッチドメイン (PRD) で微小管と結合することが *in vitro* の実験から明らかにされている (Herskovits, 1993)。

(2) ダイナミンのリン酸化は微小管結合能を減少させる

cdc2 キナーゼや ERK によるダイナミンのリン酸化は微小管との結合を抑制する (Hosoya, 1994, Earnest, 1996)。

(3) ダイナミンは間期微小管とは共局在せず、分裂期微小管と共局在する

間期のダイナミンは、エンソームに局在し、微小管との共局在は観察されない (Damke,

1994)。これは、上述の *in vitro* でダイナミンと微小管が結合するという結果と一致しなかった。申請者は、ダイナミンが分裂期の中央微小管と共局在することを明らかにした。以上の結果から、ダイナミンは間期微小管とは結合できないが、分裂期微小管と結合できることが示唆された。

(4) ダイナミン PRD の N 末領域が微小管結合部位であり C 末領域が微小管結合阻害部位である

申請者は、ダイナミン PRD の C 末領域の欠失変異体 (1-786) が間期の微小管と共局在することを明らかにした。また、野生型ダイナミン (WT) やダイナミン PRD の全領域の欠失変異体 (1-743) では、間期の微小管と共局在しなかった。申請者は以上の事実から、「ダイナミン PRD 全領域が微小管結合部位である」過去の報告 (Herskovits, 1993) と異なり、「ダイナミン PRD の N 末領域が微小管結合部位であり、C 末領域は微小管阻害部位である」ことを初めて見出した。

(5) 微小管結合型ダイナミンの発現は間期微小管を安定化する

微小管結合型ダイナミン変異体 (1-786) を発現させた細胞の間期微小管は、野生型ダイナミン発現細胞の微小管よりも低温耐性があることを見出した (申請者, 投稿中)。これは、「ダイナミンが間期微小管を安定化する」ことを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、分裂期微小管のダイナミクスの制御機構を解明するために、分裂期微小管とダイナミンの結合を制御する新規メカニズムを明らかにすることを試みた。申請者は、研究開始当初の背景に記述した (2) ~ (4) の結果から、ダイナミンが間期では微小管と結合できないように、分裂期では微小管と結合できるように制御されていると考えた。本研究は、間期と分裂期でのダイナミンの微小管結合能の変化についてリン酸化や結合蛋白質による制御機構の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) ダイナミンのリン酸化によるダイナミンと微小管の結合制御

A. 間期、分裂期特異的なダイナミンのリン酸化の探索

大腸菌で発現させた GST-ダイナミン全長および GST-ダイナミン-PRD を間期と分裂期の細胞抽出液を用いてリン酸化させた。細胞抽出液による GST-ダイナミンのリン酸化実験で、キナーゼ阻害剤を処理することにより、

ダイナミンをリン酸化するキナーゼを同定した。

B. ダイナミンのリン酸化サイトの同定

リン酸化されたダイナミン-PRD のバンドを切り出し、質量分析によりダイナミンのリン酸化サイトを決定した。また、同定されたサイトをリン酸化されないアミノ酸に置換した変異体を用いてリン酸化実験を行うことで、リン酸化サイトを確認した。

C. リン酸化によるダイナミンと微小管の結合制御

大腸菌で発現させた GST-ダイナミンを (1)-A で同定したキナーゼでリン酸化させた。リン酸化されたダイナミンと微小管の結合能を非リン酸化ダイナミンの結合能と比較した。

(2) ダイナミン結合蛋白質によるダイナミンと微小管の結合制御

A. ダイナミン結合蛋白質の探索

大腸菌で発現させた GST-ダイナミン-PRD を用いて、HeLa 細胞抽出液から pull down アッセイを行った。ダイナミン-PRD 結合蛋白質を質量分析により同定した。

B. ダイナミン結合タンパク質とダイナミンの結合

細胞内でダイナミンとダイナミン結合タンパク質が結合していることを確認するために、免疫沈降法によりダイナミンとダイナミン結合タンパク質の共沈を調べた。

(3) ダイナミンの微小管結合部位の決定

ダイナミン欠失変異体を大腸菌で発現させ、微小管との結合実験を行った。

(4) 微小管結合型ダイナミン変異体と微小管の結合メカニズムの解析

微小管結合型変異体ダイナミンの GFP-dynamin-2-(1-786) を HeLa 細胞に発現させて、ライブイメージングを行った。

4. 研究成果

(1) ダイナミンのリン酸化によるダイナミンと微小管の結合制御

A. 間期、分裂期特異的なダイナミンのリン酸化の探索

大腸菌で発現させた GST-ダイナミン全長および GST-ダイナミン-PRD を、間期と分裂期の細胞抽出液を用いてリン酸化を行った。その結果、分裂期抽出液によるダイナミンのリン酸化活性が間期抽出液よりも非常に高いことを明らかにした。分裂期抽出液による GST-ダイナミン-PRD のリン酸化は、Cyclin B-cdc2 キナーゼ阻害剤により抑制されることを明らかにした。このことから、分裂期に

ダイナミンをリン酸化するキナーゼは、主に Cyclin B-cdc2 キナーゼであることが示唆された。

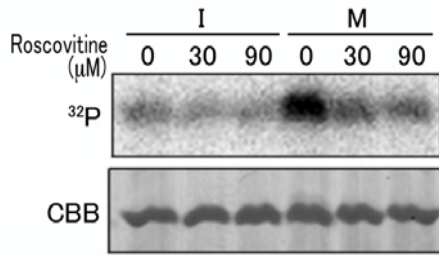


図1 分裂期および間期抽出液によるダイナミンのリン酸化

分裂期抽出液に高いダイナミン-PRDをリン酸化する活性が存在する。バンドはリン酸化ダイナミン-PRDを示す。また、分裂期のダイナミンのリン酸化は、Cyclin B-cdc2 キナーゼ阻害剤である Roscovitine により抑制される。

B. ダイナミンのリン酸化サイトの同定

Cyclin B-cdc2 キナーゼによりリン酸化されたダイナミン-PRDの質量分析から、リン酸化サイトは、746-786の中に含まれることを明らかにした。ダイナミンの746-786に存在する Cyclin B-cdc2 キナーゼのリン酸化のコンセンサス配列のうち Ser764 と Thr766 をリン酸化できないアミノ酸 (Ala) に置換した変異体を作製した。この変異体は、分裂期の細胞抽出液や精製された Cyclin B-cdc2 キナーゼによりリン酸化されないことから、分裂期での Cyclin B-cdc2 キナーゼによるダイナミンのリン酸化サイトは Ser764 と Thr766 であることが明らかとなった。

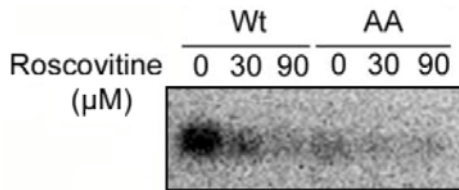


図2 ダイナミンのリン酸化サイトの同定

ダイナミン-PRDの Ser764 と Thr766 を Ala に置換した変異体は、Cyclin-cdc2 キナーゼでリン酸化されない。

C. リン酸化によるダイナミンと微小管の結合制御

大腸菌で発現させたダイナミン-PRDを精製 Cyclin B-cdc2 キナーゼでリン酸化させ、ダイナミン-PRDと微小管の結合をリン酸化の有無で比較した。その結果、Cyclin B-cdc2 キナーゼでリン酸化されたダイナミン-PRDは、非リン酸化状態のダイナミン-PRDと比べて、微小管への結合が抑制されることが明らかとなった。

Cyclin B-cdc2キナーゼは、細胞分裂の制御において重要な役割を担っているキナー

ゼである。本研究成果は、分裂期における Cyclin B-cdc2キナーゼによるダイナミンのリン酸化が分裂期微小管とダイナミンの結合を抑制している可能性を示唆する結果であり、細胞分裂の制御機構を明らかにする上で重要であると考えられる。

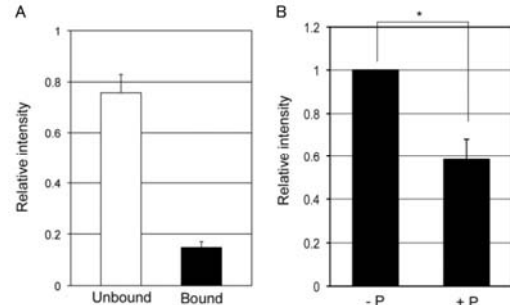


図3 ダイナミンの微小管結合能

(A) 非リン酸化ダイナミンの微小管結合能。約20%のダイナミンが微小管と結合する。(B) Cyclin-cdc2 キナーゼによりリン酸化されたダイナミンは、非リン酸化ダイナミンと比較して、微小管結合が抑制される。

(2) ダイナミン結合蛋白質によるダイナミンと微小管の結合制御

A. ダイナミン結合蛋白質の探索

間期の HeLa 細胞抽出液と GST-ダイナミン-PRDを用いて pull down アッセイを行った。その結果、GST-ダイナミン-PRDに結合する特異的な3本のバンド (150, 75, 70 kDa) を得た。質量分析により、150 kDa は intersectin-1, 75 kDa と 70 kDa は sorting nexin 9 (SNX9) であると同定した。

B. ダイナミン結合タンパク質 SNX9 とダイナミンの結合

細胞内でダイナミンと SNX9 が結合していることを確認するために、抗 SNX9 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、SNX9 と共にダイナミンが沈降することを明らかにした。これは、HeLa細胞内でダイナミンと SNX9 が複合体を形成していることを示している。

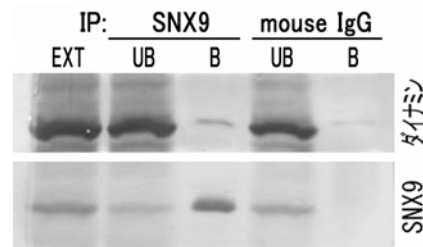


図4 ダイナミンと SNX9 の結合

HeLa 細胞抽出液から抗 SNX9 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、SNX9 と共にダイナミンが沈降した。EXT は免疫沈降に使用した細胞抽出液、UB は結合しなかった蛋白質、B は免疫沈降物を示す。

(3) ダイナミンの微小管結合部位の決定

様々なダイナミン欠失変異体を大腸菌で発現させ、微小管との結合実験を行った。まず、ダイナミン-PRD(714-870)、-N-PRD(714-786)および-C-PRD(787-870)の3種類のダイナミンについて微小管とのco-sedimentation assayを行った。ダイナミン-PRDは30%結合することが確認できた。一方、ダイナミン-N-PRD及び-C-PRDは微小管と結合しない(5%以下の結合)ことが明らかとなった。このことから、ダイナミンPRDは微小管と結合するが、ダイナミンPRD領域のみでは細胞内でのダイナミンと微小管の結合制御【背景(4)】を再現できないことが明らかとなった。次に、全長ダイナミン、ダイナミン-(1-786)、ダイナミン-(1-745)及びそれぞれのGTPase不活性型の計6種類のダイナミンについて微小管とのco-sedimentation assayを行った。どのダイナミンも微小管非存在下で沈殿するため、微小管との結合を判断できなかった。さらに、GTPase領域とPRDを融合させたダイナミン変異体を用いて微小管とのco-sedimentation assayを行ったが、この変異体も全長ダイナミンと同様にダイナミンのみで沈殿するため、微小管との結合を判断することができなかった。これらのことから、co-sedimentation以外の方法で微小管とダイナミンの結合を調べる必要があることが明らかとなった。

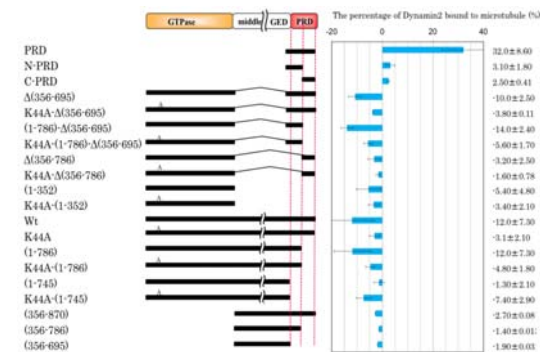


図5 様々なダイナミン変異体の微小管結合

(4) 微小管結合型ダイナミン変異体と微小管の結合メカニズムの解析

微小管結合型変異体ダイナミンの GFP-ダイナミン-(1-786)をHeLa細胞に発現させて、ライブイメージングを行った。GFP-ダイナミン-(1-786)が微小管の伸長端に局在していること、その局在はEB1やEB3と隣接していることを明らかにした。また、この局在は微小管の安定化剤であるタキソール(パクリタケセル)により抑制されることから、ダイナミンはダイナミックな微小管にのみ結合することが示唆された。さらに、ダイナミン阻害剤の dyngo-4a により EB3 のコメット数や EB3 の移動速度が減少することから、伸長している微小管が減少すること、微小管の伸長

速度が抑制されることを明らかにした。このことは、ダイナミンが微小管のダイナミクスを制御している可能性を示している。

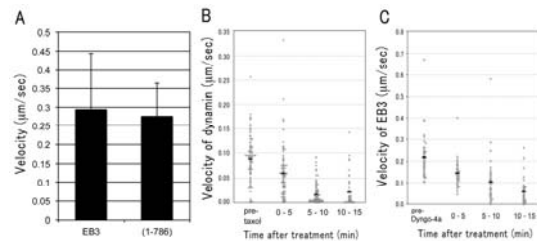


図6 ダイナミンと微小管の結合

(A) ダイナミンと微小管結合タンパク質 EB3 の移動速度が一致する。(B) 微小管安定化剤タキソールにより、ダイナミンの移動速度が抑制される。(C) ダイナミン阻害剤により EB3 の移動速度が抑制される。

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6件)

1. Kondo Tomo, Itakura Shiho, Hamao Kozue, Hosoya Hiroshi, Phosphorylation of myosin II regulatory light chain controls its accumulation, not that of actin, at the contractile ring in HeLa cells, *Experimental Cell Research*, 318 巻 8 号, 査読有, 2012, pp915-924

2. Kondo Tomo, Isoda Rieko, Uchimura Takashi, Sugiyama Mutsumi, Hamao Kozue, Hosoya Hiroshi, Diphosphorylated but not monophosphorylated myosin II regulatory light chain localizes to the midzone without its heavy chain during cytokinesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417 巻 2 号, 査読有, 2012, pp686-691

3. Kondo Tomo, Hamao Kozue, Kamiyo Keiju, Kimura Hiroshi, Morita Makiko, Takahashi Masayuki, Hosoya Hiroshi, Enhancement of myosin II/actin turnover at the contractile ring induces slower furrowing in dividing HeLa cells, *Biochemical Journal*, 435 巻 3 号, 査読有, 2011, pp569-576

4. Morita Makiko, Hamao Kozue, Izumi Shunsuke, Okumura Eiji, Tanaka Keita, Kishimoto Takeo, Hosoya Hiroshi, Proline-rich domain in dynamin-2 has a low microtubule-binding activity: how is this activity controlled during mitosis in HeLa

cells?, Journal of Biochemistry, 148巻5号, 査読有, 2010, pp533-538

5. Asano Satoshi, Hamao Kozue, Hosoya Hiroshi, Direct evidence for roles of phosphorylated regulatory light chain of myosin II in furrow ingression during cytokinesis in HeLa cells, Genes to Cells, 14巻5号, 査読有, 2009, pp555-568

6. Hamao Kozue, Morita Makiko, Hosoya Hiroshi, New function of the proline rich domain in dynamin-2 to negatively regulates its interaction with microtubules in mammalian cells, Experimental Cell Research, 315巻7号, 査読有, 2009, 1336-1345

[学会発表] (計 27 件)

1. 細谷浩史, 濱生こずえ, 森田真規子, 田中啓太, 世良康如, 國弘佳代, GTPase ダイナミンによる微小管制御機構の解明-ダイナミン依存性疾患のメカニズム解明を目的として-, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日-14 日, 福岡, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

2. 田中啓太, 森田真規子, 濱生こずえ, 細谷浩史, Dynamin-2 の Proline Rich Domain と微小管の結合制御メカニズムの解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日-14 日, 福岡, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

3. 國弘佳代, 濱生こずえ, 森田真規子, 細谷浩史, 細胞周期依存的な微小管と Dynamin2 の共局在の制御機構の解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日-14 日, 福岡, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

4. 森田真規子, 濱生こずえ, 細谷浩史, The live imaging analysis of dynamin-2 dynamics on microtubules in the cell, 第 45 回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012 年 5 月 29 日-31 日, 神戸, 神戸国際会議場・神戸商工会議所

5. 田中啓太, 森田真規子, 濱生こずえ, 細谷浩史, The study for regulatory mechanism of dynamin2 binding to microtubules, 第 45 回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012 年 5 月 29 日-31 日, 神戸, 神戸国際会議場・神戸商工会議所

6. 近藤興, 上条桂樹, 濱生こずえ, 細谷浩史, Diphosphorylated myosin II regulatory light chain localizes to the midzone without its heavy chain during cytokinesis,

第 45 回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012 年 5 月 29 日-31 日, 神戸, 神戸国際会議場・神戸商工会議所

7. 森田真規子, 濱生こずえ, 大木高志, 田中啓太, 白井福寿, 石渡信一, 細谷浩史, HeLa 細胞内における微小管結合蛋白質ダイナミン2のダイナミクス解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 13 日-16 日, 横浜, パシフィコ横浜

8. 戸屋幸, 近藤興, 近藤茉莉絵, 濱生こずえ, 細谷浩史, 分裂期の哺乳類培養細胞における AuroraB によるリン酸化ミオシン II 調節軽鎖の局在制御機構, 第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 13 日-16 日, 横浜, パシフィコ横浜

9. 近藤興, 上条桂樹, 濱生こずえ, 細谷浩史, Diphosphorylated myosin II regulatory light chain localizes to the midzone independently of myosin II heavy chain during cytokines, 第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 13 日-16 日, パシフィコ横浜

10. 氏弘一也, 平木栄志, 鉄川公庸, 山新良彦, 濱生こずえ, 細谷浩史, ミドリゾウリムシ (Paramecium burusaria) に蓄積する遊離糖の利用に関する研究, 第 34 回日本分子生物学会年会, 平成 23 年 12 月 13 日-16 日, 横浜, パシフィコ横浜

11. 森田真規子, 田中啓太, 濱生こずえ, 細谷浩史, 細胞内における微小管結合蛋白質としてのダイナミン2の機能解析, 2011 年 9 月 21 日-24 日, 第 84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館

12. 森田真規子, 田中啓太, 濱生こずえ, 細谷浩史, HeLa 細胞における微小管結合タンパク質ダイナミン2の機能解析, 2011 年 9 月 21 日-23 日, 日本動物学会第 82 回大会, 旭川, 大雪アリーナ

13. 近藤興, 板倉志帆, 濱生こずえ, 細谷浩史, Live imaging of the process of contractile ring assembly during cytokinesis in mammalian cells, 第 63 回日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日-29 日, 札幌, 北海道大学 クラーク会館・学術交流会館

14. Morita Makiko, Hamao Kozue, Izumi Shunsuke, Okumura Eiichi, Tanaka Keita, Kishimoto Takeo, Hosoya Hiroshi, Proline-Rich Domain is not a Sole Positive Regulator for Enhancing Dynamin-2-Microtubule Interaction during

Cytokinesis, The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, December 11-15, 2010, Philadelphia, PA, Pennsylvania convention center, USA

15. Kondo Tomo, Hamao Kozue, Kamiyo Keiju, Kimura Hiroshi, Morita Makiko, Hosoya Hiroshi, Enhancement of Myosin II/F-Actin Turnover at the Contractile Ring Induces Slower Furrowing of Hela Cells, The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, December 11-15, 2010, Philadelphia, PA, Pennsylvania convention center, USA

16. 濱生こずえ, 森田真規子, 細谷浩史, ダイナミンと微小管の相互作用におけるダイナミンGTPase活性の必要性, 日本動物学会第81回大会, 2010年9月23日-25日, 東京, 東京大学教養学部 (駒場キャンパス)

17. 森田真規子, 濱生こずえ, 泉俊輔, 奥村英一, 田中啓太, 岸本健雄, 細谷浩史, ダイナミン2の細胞分裂期特異的なリン酸化: キナーゼの同定とダイナミン2機能の制御, 日本動物学会第81回大会, 2010年9月23日-25日, 東京, 東京大学教養学部 (駒場キャンパス)

18. 濱生こずえ, 森田真規子, 上条桂樹, 細谷浩史, The GTPase activity of dynamin is necessary for the interaction of dynamin and microtubules, 第62回日本細胞生物学会大会, 2010年5月19日-21日, 大阪, 大阪国際会議場

19. 森田真規子, 濱生こずえ, 細谷浩史, HeLa細胞における微小管結合タンパク質ダイナミン2の分裂期特異的なリン酸化の解析, 第62回日本細胞生物学会大会, 2010年5月19日-21日, 大阪, 大阪国際会議場

20. 近藤興, 森田真規子, 木村宏, 上条桂樹, 濱生こずえ, 細谷浩史, リン酸化ミオシンII調節軽鎖による収縮環の収縮速度の制御, 第62回日本細胞生物学会大会, 2010年5月19日-21日, 大阪, 大阪国際会議場

21. 森田真規子, 濱生こずえ, 上条桂樹, 細谷浩史, HeLa細胞におけるダイナミン2-PRDの細胞分裂期特異的なリン酸化, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9日-12日, 横浜, パシフィコ横浜

22. 近藤興, 森田真規子, 上条桂樹, 濱生こずえ, 細谷浩史, F-actin dynamics in the contractile ring is dependent on the phosphorylation state of regulatory light chain of myosin II during cytokinesis, 第

32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9日-12日, 横浜, パシフィコ横浜

23. 森田真規子, 濱生こずえ, 細谷浩史, 微小管結合タンパク質ダイナミン2の細胞分裂特異的なリン酸化, 日本動物学会第80回大会, 2009年9月17日-20日, 静岡, 静岡コンベンションアーツセンター

24. 板倉志帆, 濱生こずえ, 細谷浩史, 収縮環におけるリン酸化ミオシンII局在のライブイメージング, 日本動物学会第80回大会, 2009年9月17日-20日, 静岡, 静岡コンベンションアーツセンター

25. 濱生こずえ, 森田真規子, 上条桂樹, 細谷浩史, Dynamin-2 stabilizes microtubules in mammalian cultured cells, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009年6月2日-4日, 名古屋, 名古屋国際会議場

26. 浅野智志, 濱生こずえ, 細谷浩史, リン酸化ミオシンII調節軽鎖による分裂細胞の収縮環収縮速度の調節, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009年6月2日-4日, 名古屋, 名古屋国際会議場

27. 近藤興, 磯田理恵子, 大草教行, 上条桂樹, 濱生こずえ, 細谷浩史, 哺乳動物培養細胞の細胞質分裂時におけるRhoおよびAurora Bシグナルを介したリン酸化ミオシンII調節軽鎖の局在制御機構, 第61回日本細胞生物学会大会, 2009年6月2日-4日, 名古屋, 名古屋国際会議場

[その他]
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/bio/CELLB IOL/index1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱生こずえ (HAMA O KOZUE)
広島大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 10403578

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: