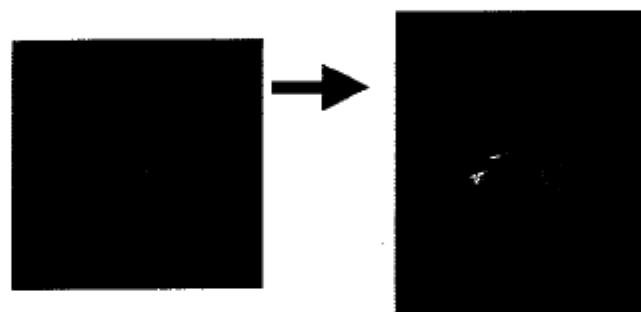


C. 細胞質分裂での Rho エフェクター分子の機能解析

a. Citron キナーゼとその細胞質分裂への関与の発見

Citron に N 端にキナーゼドメインをもつ splice variant が存在することを見出し、これが細胞分裂時に分裂溝に集積すること、Citron 変異体の発現により細胞質分裂が阻害され多核細胞が出現することを見出し、Citron キナーゼが細胞質分裂に働く Rho エフェクターの一つであることを明らかにした (*Nature*, 394, 491-494, 1998)。ついで、Citron キナーゼの分裂溝集積機構を解析し、これが Rho 不活性化状態では anaphase の細胞の central spindle に局在し、Rho の活性化に伴い分裂溝へ移行する passenger protein の一つであることを見出した (図 6) (*J. Cell Sci.*, 114, 3273-3284)。

図 6. 分裂細胞での Citron Kinase の局在。Citron kinase は通常左のように分裂溝に濃縮するが Rho を不活性化すると central spindle への結合が明らかになる。



b. mDia の紡錘体局在の解明

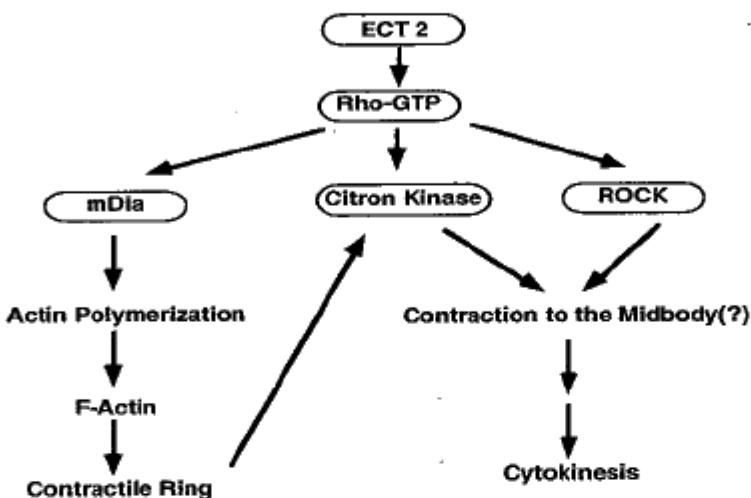
mDia のショウジョウバエ homolog である diaphanous 遺伝子の変異が細胞質分裂の障害を惹起することから、分裂細胞での mDia の局在を解析し mDia が分裂細胞の紡錘体微小管に結合して存在すること、この結合が mDia の FH3 ドメインを介して起こることを明かにした (*J. Cell Sci.*, 114, 775-784, 2001)。

c. GTP 型 Rho の pull-down assay の開発と ECT-2 の細胞分裂時の Rho 活性化因子としての役割の証明

mDia の Rho 結合ドメインを用いた GTP 型 Rho の pull-down assay を開発し、細胞周期での GTP 型 Rho の変動を解析し、細胞分裂時の telophase で GTP-Rho の大量の集積が起こること、これに対し細胞中の Rho-GEF 活性は metaphase で最大になることを示し、分裂時には生成した GTP-Rho を安定化する機構が存在することを明らかにした。また、最近分裂時に働く Rho family の GEF として報告された ECT-2 の dominant negative 体を発現させることにより Rho-GEF 活性の上昇も telophase での GTP-Rho の集積も起こらないことを示し、ECT-2 が実際に分裂時の Rho の交換因子であることを明らかに

した(*J. Biol. Chem.*, 275, 17233-17236, 2000).

以上の結果から明らかになった細胞質分裂での Rho シグナル伝達経路を図 7 (下図) に示す。



D. Rhophilin と関連分子の精子尾部での複合体形成の解析

Rhophilin 分子の中央部に PDZ ドメインが存在することを見出し、これを bait として two hybrid screening を行い、これに結合する新規分子 ropporin を単離、同定した。これら 2 つの分子の組織・細胞分布を検討し両者が精巣に高発現し、ともに精子の尾部に存在することを見出した (*FEBS Lett.*, 445, 9-13, 1999; *J. Cell Sci.*, 113, 103-112, 2000)。また、ropporin がそのアミノ末端で dimer を形成し AKAP (A-kinase anchoring protein)-110 と結合することを示した (*J. Biol. Chem.*, 276, 17332-17338, 2001)。AKAP-110 は、やはり、精子尾部に豊富に存在する蛋白質である。

2. Rho 標的蛋白質の Rho 結合モチーフと Rho の標的蛋白質結合モチーフの同定（当初計画④に相当）

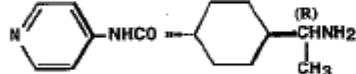
各 Rho 標的蛋白質の Rho 結合領域と Rho GTPases に対する結合特異性を検討するとともに (例、*J. Biol. Chem.*, 271, 23022-23028, 1996; *J. Biol. Chem.*, 271, 13556-1356, 1996; *FEBS Lett.*, 385, 221-224, 1996)、Rho と Rac のキメラ蛋白質を多種類作製し、各々の標的蛋白質の結合に関与する Rho のドメインを検討した (*J. Biol. Chem.*, 273, 18943-18949, 1998)。

3. Rho 標的蛋白質の個体内での働きの解析（当初計画⑤に相当）

本研究で見出された特異的 ROCK 阻害薬 Y-27632 を動物個体に投与することにより、各種の病態での Rho-ROCK 経路の意義の解析を行った。まず、Y-27632 を各種の高血圧モデルラットに投与しこの薬物が高血圧動物の血圧の矯正は行うが正常動物の血圧に対する効果は少ないことを示し、高血圧では血管平滑筋の Rho-ROCK 経路を介するカルシウム感受性収縮の寄与が大であることを示した (*Nature* 389, 990-994, 1997)。さらに、Y-27632 と ROCK 変異体を用いることにより Rho-ROCK 経路が癌細胞の転移・浸潤に関与することを、*in vitro*、*in vivo* の実験系で明らかにした (*Nature Med.*, 5, 221-225, 1999; *Hepatology*, 30, 1027-1036, 1999)。また、膵臓がんの臨床例で Rho 遺伝子発現を解析し、転移・浸潤能と RhoC 遺伝子の発現亢進が相關していることを示した (*Br. J. Cancer*, 77, 147-152, 1998)。さらに、ウサギ眼球に Y-27632 を適用することで、これが眼房水の流出を促進して眼圧を低下させることを見出し、Rho-ROCK 経路の制御が緑内障の治療に有用であることを示した (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42, 137-144, 2001)。

Y-27632, a specific ROCK inhibitor

Effect of Y-27632 on the Peritoneal Dissemination of MM1 cells.



K_i values (μM)

ROCK	0.14
c-kinase	25
A-kinase	26
MLCK	> 250



図 8. Y-27632 の構造（左）と図 9（右）ラット肝細胞癌の腹膜播種にたいする効果

【当該学問研究分野及び関連学問分野への影響】

当初計画のうち、新規 Rho 標的蛋白質のスクリーニングと細胞接着斑・ストレスファイバー形成など Rho からアクチン細胞骨格構築に至る経路は、概ね解明できたと考えている。この経路の解析から、Rho 研究は、アクチンと微小管の統合制御という新しい地平へ到達したが、これは大きな成果と考えている。その他の Rho 作用のうち、SRF の活性化は我々自身ではできなかったが、本研究での mDia の発見が契機になって作用機構が解明された。また、Rho の細胞

悪性化については、ROCK 経路の関与という手がかりが得られた。この詳細と Rho による細胞の G1 → S 進行制御機構の解明は今後の課題として残っている。また、エフェクター単離の副産物としてこれらの Rho 結合領域を用いた GTP-Rho の pull-down assay が開発され、これを用いて Rho の活性化をモニターすることが世界中で行われるようになった。Rho 標的蛋白質と Rho 結合インターフェイスの解明は、変異体を用いた解析を行ったが、得られた情報は限定的なものに止まった。これについては、途中より各蛋白質の結晶化による構造生物学的解明を目指したが、期間内に成果を挙げるに至らなかった。Rho の個体内での働きの解析では、予定していた KO マウスの作製は、担当者の不慮の死により期間内に解析に至らなかったが、ROCK 阻害薬 Y-27632 の発見は、Rho 研究を細胞レベルでの研究から、個体全体の発生・生理・病態での役割研究という医学・生物学全体にまで拡げた。この化合物は、報告以来、現在まで、国内外の 700 ケ所以上の研究室で使用され、各々の研究者の対象とする系での Rho-ROCK 経路の関与を検討するのに使用されている。

【研究成果公表の状況】

1. Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A. & Narumiya, S. (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science*, **271**, 645-648
2. Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Ohkawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. & Narumiya, S. (1996) The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.*, **15**, 1885-1893
3. Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. & Narumiya, S. (1996) Rhotekin, a new Rho target protein bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the Rho-binding domain. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13556-13560
4. Fujisawa, K., Fujita, A., Ishizaki, T., Saito, Y. & Narumiya, S. (1996) Identification of the Rho binding domain of p160 ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23022-23028
5. Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. & Narumiya, S. (1996) ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.*, **392**, 189-193
6. Shibata, H., Mukai, H., Inagaki, Y., Homma, Y., Kimura, K., Kaibuchi, K., Narumiya, S. & Ono, Y. (1996) Characterization of the interaction between RhoA and the amino-terminal region of PKN. *FEBS Lett.*, **385**, 221-224
7. Yano, Y., Saito, Y., Narumiya, S. & Sumpio, B.E. (1996) Involvement of rho p21 in cyclic strain-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK), morphological changes and migration of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 508-515
8. Narumiya, S. (1996) The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J. Biochem. (Tokyo)*, **120**, 215-228
9. Tilly, B.C., Edixhoven, M.J., Tertoolen, L.G.J., Morii, N., Narumiya, S. and de Jong, H.R. (1996) Activation of the osmo-sensitive chloride conductance involves p21 rho and is accompanied by a transient reorganization of the F-actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1419-1427
10. Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M. & Narumiya, S. (1997) p140 mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.*, **16**, 3044-3056
11. Hirai, A., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Tatsuno, I., Oeda, T., Tahara, K., Terano, T., Narumiya, S., Kohn, L.D. & Saito, Y. (1997) Geranylgeranylated Rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27^{Kip1} and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13-16.
12. Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y. & Narumiya, S. (1997) p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett.*, **404**, 118-124

13. Narumiya, S., Ishizaki, T. & Watanabe, N. (1997) Minireview: Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.*, **410**, 68-72.
14. Fujita, A., Saito, Y., Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Ushikubi, F. & Narumiya, S. (1997) Integrin-dependent translocation of p160ROCK to a cytoskeletal complex in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem. J.*, **328**, 769-775.
15. Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. & Narumiya, S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-994.
16. Suwa, H., Ohshio, G., Imamura, T., Watanabe, G., Arii, S., Imamura, M., Narumiya, S., Hiai, H. & Fukumoto, M. (1998) Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br. J. Cancer*, **77**, 147-152.
17. Altun-Gultekin, Z.F., Chandriani, S., Bougret, C., Ishizaki, T., Narumiya, S., de Graaf, P., van Bergen en Henegouwen, P., Hanafusa, H., Wagner, J.A. & Birge, R.B. (1998) Activation of rho-dependent cell spreading and focal adhesion biogenesis by v-Crk adaptor protein. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3044-3058.
18. Narumiya, S. (1998) Rho effectors mediating reorganization of actin cytoskeleton. In "Cytoskeleton and G-proteins in the Regulation of Cancer" (Kuzumaki, N, ed.), pp.107-110.
19. Wijk, T. V. D., Dorrestijn, J., Narumiya, S., Maassen, J. A., De Jonge, H. R., and Tilly, B. C. (1998) Osmotic swelling-induced activation of the extracellular-signal-regulated protein kinases Erk-1 and Erk-2 in Intestine 407 cells involves the Ras/Raf-signalling pathway. *Biochem J.*, **331**, 863-869.
20. Fujisawa, K., Madaule, P., Ishizaki, T., Watanabe, G., Bito, H., Saito, Y., Hall, A. & Narumiya, S. (1998) Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18943-18949.
21. Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (1998) Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, **394**, 491-494.
22. Tominaga, T., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Barber, D.L. (1998) p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J.*, **17**, 4712-4722.
23. Hirose, M., Ishizaki, T., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H. & Narumiya, S. (1998) Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Cell Biol.*, **141**, 1625-1636.
24. Busca, R., Bertolotto, C., Abbe, P., Englano, W., Ishizaki, T., Narumiya, S., Boquet, P., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998) Inhibition of RHO is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol. Biol. Cell*, **6**, 1367-1378.
25. Furuyashiki, T., Fujisawa, K., Fujita, A., Madaule, P., Uchino, S., Mishina, M., Bito, H. and Narumiya, S. (1998) Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J. Neuroscience*, **19**, 109-118.

26. Takeda, H., Matozaki, T., Fujioka, Y., Takada, T., Noguchi, T., Yamano, T., Tsuda, M., Ochi, F., Fukunaga, K., Narumiya, S., and Kasuga, M. (1998) Lysophosphatidic acid-induced association of SHP-2 with SHPS-1: roles of RHO, FAK and a SRC family kinase. *Oncogene*, **16**, 3019-3027.
27. Tanaka T, Tatsuno I, Noguchi Y, Uchida D, Oeda T, Narumiya S, Yasuda T, Higashi H, Kitagawa M, Nakayama K, Saito Y, Hirai A (1998) Activation of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) in growth-stimulated rat astrocytes. Geranylgeranylated Rho small GTPase(s) are essential for the induction of cyclin E gene expression. *J. Biol. Chem.* **273**, 6772-6778.
28. Tsuzuki S, Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Tsuboi H, Ando J, Sakurai T, Morii N, Narumiya S, Miyasaka M (1998) Intracellular Signal-transducing elements involved in transendothelial migration of lymphoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, **8**, 571-577.
29. Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Med.*, **5**, 221-225.
30. Sahai, E., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Treisman, R. (1999) Transformation mediated by RhoA requires ROCK family kinase activity. *Curr. Biol.*, **9**, 136-145.
31. Murakami, H., Iwashita, T., Asai, N., Iwata, Y., Narumiya, S. and Takahashi, M. (1999) Rho-dependent and -independent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin and p130^{cas} mediated by Ret kinase. *Oncogene*, **18**, 1975-1982.
32. Suzuki, Y., Yamamoto, M., Wada, H., Ito, M., Nakano, T., Sasaki, Y., Narumiya, S., Shiku, H., and Nishilawa, M. (1999) Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelet through activation of Rho-kinase. *Blood*, **93**, 3408-3417.
33. Nakamura, K., Fujita, A., Murata, T., Watanabe, G., Mori, C., Fujita, J., Watanabe, N., Ishizaki, T., Yoshida, O. and Narumiya, S. (1999) Rhophilin, a small GTPase Rho binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of sperm tail. *FEBS Lett.*, **445**, 9-13.
34. Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. and Narumiya, S. (1999) Cooperation between mDia and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nature Cell Biol.*, **1**, 136-143.
35. Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999) Signalling from Rho- to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, **285**, 895-898.
36. Shiraishi, Y., Mizutani, A., Bito, H., Fujisawa, K., Narumiya, S., Mikoshiba, K., and Furuichi, T. (1999) Cupidin, an isoform of Homer/Vesl, interacts with the actin cytoskeleton and activated Rho family small GTPases and is expressed in developing mouse cerebellar granule cells. *J. Neuroscience*, **19**, 8389-400.
37. Genda, T., Sakamoto, M., Ichida, T., Asakura, H., Kojiro, M., Narumiya, S., and Hirohashi, S. (1999) Cell motility mediated by Rho and Rho-associated protein kinase plays a critical role in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **30**, 1027-1036.
38. Fujita, A., Nakamura, K., Kato, T., Watanabe, N., Ishizaki, T., Kimura, K., Mizoguchi, A., and Narumiya, S. (2000) Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J. Cell Sci.*, **113**, 103-112.

39. Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.*, **275**, 3577-3582.
40. Narumiya, S., Ishizaki, T., and Uehata, M. (2000) Use and properties of specific ROCK inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol.*, **325**, 273-284.
41. Kimura, K., Tsuji, T., Takada, Y., Miki, T., and Narumiya, S. (2000) Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17233-17236.
42. Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M., and Narumiya, S. (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinase. *Mol. Pharmacol.*, **57**, 976-983
43. Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2000) A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, **26**, 431-441.
44. Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., narumiya, S., and Inagaki, M. (2000) Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/mocsin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*, **19**, 6059-6064..
45. Ishizaki, T., Morishima, Y., Furuyashiki, T., Kato, T., and Narumiya, S. (2001) Coordination of microtubules and actin cytoskeleton by a Rho effector, mDia1. *Nature Cell Biol.*, **3**, 8-14.
46. Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2001) LIM-kinase 2 induces formation of stress fibers, focal adhesions and membranc blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalyzed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J.*, **354**, 149-159.
47. Kato, T., Watanabe, N., Morishima, Y., Fujita, A., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2001). Localization of a mammalian homolog of Diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J. Cell Sci.*, **114**, 775-784.
48. Honjo, M., Tanihara, H., Inatani, M., Kido, N., Swamura, T., Yue, BY, Narumiya, S., and Honda, Y. (2001) Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **42**, 137-144.
49. Carr, D. W., Fujita, A., Stentz, C.L., Liberty, G.A., Olson, G.E. and Narumiya, S. Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins (AKAPs) in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA. *J. Biol. Chem.*, **276**,17332-17338.
50. Eda, M., Yonemura, S., Kato, T., Watanabe, N., Ishizaki, T., Madaule, P. and Narumiya, S. Rho-dependent tansfer of Citron-kinase to the cleavage furrow of dividing cells. *J. Cell Sci.*, **114**, 3273-3284.