

平成22年 4月26日現在

研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19590058
 研究課題名(和文) オルガネラ動態制御に関わるリン酸化シグナルを介した細胞分裂制御機構の研究
 研究課題名(英文) Regulation of cell division by tyrosine phosphorylation-mediated control of organelle dynamics
 研究代表者
 中山 祐治 (NAKAYAMA YUJI)
 千葉大学・大学院薬学研究院・講師
 研究者番号： 10280918

研究成果の概要(和文)： 細胞分裂は精巧に制御され、細胞分裂制御の破綻は細胞の癌化、癌の悪性化、細胞死に繋がる。本研究では、Src型チロシンキナーゼによるチロシンリン酸化シグナリングが細胞分裂制御に重要であり、ミッドボディーやスピンドルなどの細胞内オルガネラの動態制御を介していることを明らかにした。特にERK/MAPKシグナルやRab11などの分子の関与も明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Cell division is tightly regulated in order to prevent cancers, cancer progression and cell death. In this study, we showed that tyrosine phosphorylation signaling by Src-family tyrosine kinases are important for regulation of cell division through mediating organelle dynamics. Especially, involvement of ERK/MAPK and Rab11 were shown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 生物

科研費の分科・細目： 薬学・生物系薬学

キーワード：細胞分裂, チロシンリン酸化, Src型チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞は染色体複製と細胞分裂を繰り返して増殖していく。細胞周期は厳密に制御されており、細胞分裂制御機構の崩壊は染色体不安定性を引き起こす。染色体不安定性は癌化および癌の悪性化を誘導するため、細胞周期制御機構の理解は癌化の予防のみならず、癌治

療の新たな戦略へと繋がる可能性を持つ。

これまで我々は、非受容体型チロシンキナーゼであるSrc型チロシンキナーゼ(SFK)を研究対象としてきた。SFKなどの非受容体型チロシンキナーゼの多くは細胞膜直下で働くが、細胞内オルガネラなどの局在部位で独

自の役割を担っており、非受容体型チロシンキナーゼの細胞内局在選別は機能制御と強く関連している。核膜、核マトリックス、ゴルジ装置などは細胞分裂開始時に崩壊し、細胞分裂終了とともに再構築される。ゴルジ装置の断片化の阻害が細胞分裂の開始を阻害するように、オルガネラ動態が細胞周期進行に応じて制御され、また、逆に細胞周期の進行を制御する。我々は、分裂期細胞の小胞(エンドソーム)などのオルガネラ上でチロシンリン酸化が亢進していること、その一部はSFK阻害剤PP2により阻害されることから、これらのチロシンリン酸化へのSFKの関与や細胞分裂時におけるオルガネラ動態へのSFKの関与を推定している。しかしながら、SFKが関与する細胞分裂制御機構はほとんど未解明のままである。

2. 研究の目的

細胞質分裂の最終段階に形成されるミッドボディーにはゴルジ装置タンパク質や小胞輸送に関係するタンパク質が多く存在する。ミッドボディーにおいてチロシンリン酸化が観察され、PP2により阻害されたことから、分裂期の小胞輸送に関与し、なおかつSFKの制御を受けるタンパク質の研究にはミッドボディーの解析が有用であると考えられる。また、c-Srcの局在が観察された収縮環は、小胞輸送の関与により形成されることが知られている。本研究は、細胞分裂時のミッドボディーおよび収縮環などのオルガネラ動態に着目し、チロシンリン酸化による細胞分裂の制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞株であるHeLa, HeLaS3を用い、チロシンリン酸化シグナルを抗リン酸化チロシン抗体(4G10)により検出した。

4. 研究成果

(1) ミッドボディー動態制御におけるチロシンリン酸化シグナリングの役割:

① Src型チロシンキナーゼ阻害剤であるPP2処理、あるいは、Src型チロシンキナーゼを不活性化するCskの過剰発現を行った結果、Src型チロシンキナーゼの活性阻害により細胞質分裂が阻害された。

② 培養細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、抗チロシンリン酸化抗体で免疫染色したが、特徴的なチロシンリン酸化タンパク質の局在は観察されなかった。しかし、細胞を固定する前に、サポニンあるいはTritonX-100などの界面活性剤で細胞を処理すると、ミッドボディー上にチロシンリン酸化シグナルが観察された。ERK/MAPKの阻害、あるいは不活性化型Rab11の発現によりミッドボディー上のチロシンリン酸化シグナルが消失した。

③ PP2処理あるいはCskの過剰発現によりミッドボディー上におけるチロシンリン酸化シグナルが阻害された。細胞周期同調実験系において、細胞質分裂がおきるよりも前の段階でSrc型チロシンキナーゼが機能していることを明らかとした。

(2) スピンドル制御におけるチロシンリン酸化シグナリングの役割:

① CDK1阻害剤であるRO-3306により細胞周期をG2/M期に同調し、リリースして細胞分裂を観察した。Src型チロシンキナーゼ特異的阻害剤SU6656で処理することにより、分裂時間の延長および染色体の分配異常が観察された。分裂時間の延長は、前中期から中期への進行の遅延が顕著であった。また、チロシンキナーゼの阻害剤であるgenisteinによっても同様な結果が観察された。さらに、染色体の分配異常である、chromosome bridgeが観察された。このような分裂異常の原因としてスピンドルへの影響を解析した結果、阻害剤処理により、スピンドル形態の変化が観察された。

(3) プロテオミクスのための条件検討:

① タンパク質同定のためには、細胞周期を同調する必要がある。これまでHeLa細胞を用いて細胞分裂時におけるチロシンリン酸化の局在を解析してきたが、HeLaの亜株であるHeLaS3は浮遊状態で培養が可能であり細胞同調しやすい。例えば、ノコダゾール同調細胞を培養ディッシュから剥がし、細胞洗浄後に浮遊状態のまま細胞周期を進行させ、適度に進行した後に細胞を集めることができる。今回、HeLaとHeLaS3を比較した結果、細胞分裂期の終期において同様なリン酸化パターンを検出したので、HeLaS3を用いる事が可能であることがわかった。

- ② タンパク質同定を目指し、細胞可溶化画分を調製するための可溶化方法の検討を行った。0.1%サポニンを用いて細胞を可溶化してから細胞を固定することで、特徴的なチロシンリン酸化が観察されたため、この条件では、特徴的なチロシンリン酸化タンパク質は細胞から可溶化されないことが示唆された。この細胞をさらに 1% TritonX-100 を用いて可溶化すると、このチロシンリン酸化が消失した。これらの結果から、細胞を 1% TritonX-100 により可溶化することで目的のタンパク質が可溶化され、予め 0.1%サポニンで可溶化することで不必要なタンパク質をある程度除けることがわかった。
- ③ HeLaS3 細胞をチミジンを用いて S 期に停止させ、その後、ノコダゾールにより細胞分裂期前中期に同調した。この細胞を薬剤を含まない培地に戻して、細胞周期を開始させ、その後の進行を顕微鏡を用いて解析した。この方法により、細胞分裂の進行を同調できることがわかった。この方法により細胞分裂期に同調し、細胞可溶化に用いる予定である。
- ④ 抗リン酸化チロシン抗体を産生するハイブリドーマをマウス腹腔に移植し、約 2 週間後に腹水を採取した。硫酸沈澱により粗精製した後プロテイン G アガロースにより精製し、精製抗体として約 6 mg を得た。この抗体を用いた免疫沈降によりチロシンリン酸化されたタンパク質の取得を目指して条件検討中である。

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 17 件)

- ① A decrease in cyclin B1 levels leads to polyploidization in DNA-damage induced senescence. Kikuchi I, Nakayama Y, Morinaga T, Fukumoto Y, and Yamaguchi N. Cell Biology International, In press, 査読有
- ② Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, Hattori Y, Tsuda K, Nakayama Y, and Yamaguchi N. Cytotechnology, In press, 査読有
- ③ Dynamin participates in the

maintenance of anterior polarity in the *C. elegans* embryo. Nakayama Y, Shivas JM, Poole DS, Squirrell JM, Kulkoski JM, Schleede JB, and Skop AR. Dev. Cell, 16: 889-900, 2009. 査読有

- ④ Bleomycin-induced over-replication involves sustained inhibition of mitotic entry through the ATM/ATR pathway. Nakayama Y, Igarashi A, Kikuchi I, Obata Y, Fukumoto Y, and Yamaguchi N. Exp. Cell Res., 315: 2515-2528, 2009. 査読有
- ⑤ Differential trafficking of c-Src, Lyn, c-Yes, and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain. Sato I, Obata Y, Kasahara K, Nakayama Y, Fukumoto Y, Yamasaki T, Yokoyama KK, Saito T, and Yamaguchi N. J. Cell Sci., 122: 965-975, 2009. 査読有
- ⑥ Requirement of the SH4 and tyrosine-kinase domains but not the kinase activity of Lyn for its biosynthetic targeting to caveolin-positive Golgi membranes. Ikeda K, Nakayama Y, Ishii M, Obata Y, Kasahara K, Fukumoto Y, and Yamaguchi N. Biochim. Biophys. Acta, 1790: 1345-1352, 2009. 査読有
- ⑦ Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. Takahashi A, Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kasahara K, Kuga T, Higashiyama Y, Saito T, Yokoyama KK, and Yamaguchi N. Exp. Cell Res., 315: 1117-1141, 2009. 査読有
- ⑧ Induction of chromatin condensation by nuclear expression of a novel arginine-rich cationic protein genetically engineered from the enhanced green fluorescent protein. Higashiyama Y, Takahashi A, Fukumoto Y, Nakayama Y, and Yamaguchi N. Cytotechnology, 60: 153-159, 2009. 査読有
- ⑨ Nuclear localization of Lyn tyrosine kinase mediated by inhibition of its kinase activity. Ikeda K, Nakayama Y, Togashi Y, Obata Y, Kuga T, Kasahara K, Fukumoto Y, and Yamaguchi N. Exp. Cell Res., 314: 3392-3404, 2008. 査読有
- ⑩ v-Src and c-Src, nonpalmitoylated Src-family kinases, induce perinuclear accumulation of

- lysosomes through Rab7 in a kinase activity-independent manner. Kasahara K, Nakayama Y, and Yamaguchi N. *Cancer Lett.*, 262: 19-27, 2008. 査読有
- ⑪ Role of Src-family kinases in formation of the cortical actin cap at the dorsal cell surface. Kuga T, Hoshino M, Nakayama Y, Kasahara K, Ikeda K, Obata Y, Takahashi A, Higashiyama Y, Fukumoto Y, and Yamaguchi N. *Exp. Cell Res.*, 314: 2040-2054, 2008. 査読有
- ⑫ Nuclear localization of magphinins, alternative splicing products of the human trophinin gene. Aoyama J, Akazawa Y, Kasahara K, Higashiyama Y, Kikuchi I, Fukumoto Y, Saburi S, Nakayama Y, Fukuda M, and Yamaguchi N. *J. Cell. Biochem.*, 103: 765-777, 2008. 査読有
- ⑬ Separation of a disulfide-linked phosphoprotein by diagonal SDS-PAGE with optimized gel crosslinking. Kuga T, Nakayama Y, Iwamatsu A, Fukumoto Y, Yokomori K, and Yamaguchi N. *Anal. Biochem.*, 370: 252-254, 2007. 査読有
- ⑭ Rapid trafficking of c-Src, a non-palmitoylated Src-family kinase, between the plasma membrane and late endosomes/lysosomes. Kasahara K, Nakayama Y, Kihara A, Matsuda D, Ikeda K, Kuga T, Fukumoto Y, Igarashi Y, and Yamaguchi N. *Exp. Cell Res.*, 313: 2651-2666, 2007. 査読有
- ⑮ Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. Kasahara K, Nakayama Y, Nakazato Y, Ikeda K, Kuga T, and Yamaguchi N. *J. Biol. Chem.*, 282: 5327-5339, 2007. 査読有
- ⑯ Role of Src-family kinases in formation and trafficking of macropinosomes. Kasahara K, Nakayama Y, Sato I, Ikeda K, Hoshino M, Endo T, and Yamaguchi N. *J. Cell. Physiol.*, 211: 220-232, 2007. 査読有
- ⑰ Differential mitotic activation of endogenous c-Src, c-Yes, and Lyn in HeLa cells. Kuga T, Nakayama Y, Hoshino M, Higashiyama Y, Obata Y, Matsuda D, Kasahara K, Fukumoto Y, and Yamaguchi N. *Arch. Biochem. Biophys.*, 466: 116-124, 2007. 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 中山祐治, 松井優紀, 津田邦彦, 福本泰典, 山口直人
細胞分裂期スピンドル制御に関わるチロシンリン酸化シグナリング
第 130 年会日本薬学会 (岡山) 2010 年 3 月
- ② 添田修平, 中山祐治, 田村直樹, 松井優紀, 青木杏未, 福本泰典, 山口直人
癌遺伝子 v-Src 発現による細胞周期異常の誘導と癌化への関与
第 130 年会日本薬学会 (岡山) 2010 年 3 月
- ③ 津田邦彦, 福本泰典, 松井優紀, 服部泰之, 中山祐治, 山口直人
Src 型チロシンキナーゼ Lyn の細胞分裂期における局在
第 130 年会日本薬学会 (岡山) 2010 年 3 月
- ④ 青木杏未, 中山祐治, 田村直樹, 添田修平, 松井優紀, 福本泰典, 山口直人
癌遺伝子 v-Src により誘起される細胞分裂異常
第 130 年会日本薬学会 (岡山) 2010 年 3 月
- ⑤ 田村直樹, 中山祐治, 添田修平, 久保田翔, 松井優紀, 福本泰典, 山口直人
癌遺伝子 v-Src 発現による細胞周期への影響
第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2009 年 12 月
- ⑥ 盛永敬郎, 福本泰典, 中山祐治, 岩間厚志, 山口直人
ダブルタグ Lyn 安定発現株を用いた Lyn のゴルジ局在化シグナリング機構の解析
第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2009 年 12 月
- ⑦ 松井優紀, 中山祐治, 青木杏未, 福本泰典, 山口直人
Src を介したチロシンリン酸化シグナリングによる細胞分裂制御
第 82 回日本生化学会大会 (神戸) 2009 年 10 月
- ⑧ 添田修平, 中山祐治, 田村直樹, 松井優紀, 福本泰典, 山口直人
癌遺伝子 v-Src 発現による細胞周期異常の誘導
第 53 回日本薬学会関東支部大会 (埼玉) 2009 年 10 月
- ⑨ 松井優紀, 中山祐治, 福本泰典, 山口直人
Src 型チロシンキナーゼによる細胞分裂特異的なチロシンリン酸化の解析
第 129 回日本薬学会年会 (京都) 2009 年 3 月
- ⑩ 松井優紀, 中山祐治, 福本泰典, 山口直人
細胞分裂後期における Src 型チロシンキ

ナーゼによるチロシンリン酸化の役割
BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会-
第 81 回日本生化学会大会合同大会(神戸)
2008 年 12 月

- ⑪ 田村直樹, 中山祐治, 菊地郁江, 松井優紀,
福本泰典, 山口直人
v-Src 発現によるリソソームの動態への
影響
BMB2008 第 31 回日本分子生物学会年会-
第 81 回日本生化学会大会合同大会(神戸)
2008 年 12 月
- ⑫ 松井優紀, 中山祐治, 福本泰典, 山口直人
細胞分裂の進行における Src 型チロシン
キナーゼの関与
第 52 回日本薬学会関東支部大会 (千葉)
2008 年 10 月
- ⑬ 田村直樹, 中山祐治, 菊地郁江, 松井優紀,
福本泰典, 山口直人
癌遺伝子 v-Src の細胞内オルガネラでの
発現解析
第 52 回日本薬学会関東支部大会 (千葉)
2008 年 10 月
- ⑭ 久家貴寿, 中山祐治, 東山幸弘, 小幡裕
希, 福本泰典, 山口直人
Src 型キナーゼ c-Src, c-Yes, Lyn の細胞
分裂期での異なった活性化様式.
第 51 回日本薬学会関東支部大会 (東京)
2007 年 10 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/maku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 祐治 (NAKAYAMA YUJI)
千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：10280918

(2) 研究分担者

福本 泰典 (FUKUMOTO YASUNORI)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：10447310

山口 直人 (YAMAGUCHI NAOTO)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：00166620

(3) 連携研究者

()

研究者番号：