

## 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 4月27日現在

機関番号： 34306  
 研究種目： 基盤研究(C)  
 研究期間： 2010～2012  
 課題番号： 22590056  
 研究課題名（和文）チロシンリン酸化シグナリングによる細胞分裂制御とその破綻による細胞癌化  
 研究課題名（英文）Regulation of cell division by tyrosine phosphorylation signaling and its role in cancer development  
 研究代表者  
 中山 祐治（NAKAYAMA YUJI）  
 京都薬科大学・薬学部・教授  
 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分裂期スピンドル形成に関与することを見出した。また、Src 活性の異常亢進により細胞質分裂が阻害され、二核細胞が形成されることを見出した。

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 is important for regulation of mitotic spindle formation. In addition, cytokinesis fails upon an increase in Src activity, resulting in generation of binucleated cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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： 生物系薬学

キーワード： 細胞分裂，チロシンリン酸化，Src チロシンキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂は、複製された DNA を二つの娘細胞へ均等に分配する過程である。細胞分裂は染色体分配と細胞質分離から構成され、細胞分裂の後半には並行して進行する。癌細胞では、しばしば細胞質分裂の異常により polyploid 細胞 (>4N) が産生する。polyploid 細胞の分裂は染色体の不均等分配を誘導する危険性を持ち、癌細胞の polyploid 細胞産生が染色体不安定性の原因の一つであると

考えられている。よって、細胞質分裂の異常は polyploid 細胞を介して染色体不安定性を誘導し、細胞の癌化、癌の悪性化に寄与すると考えられる。

Src 型チロシンキナーゼは細胞分裂において重要な役割を担っており、我々もこれまで細胞質分裂の制御に関与することを示してきた。しかしながら、Src キナーゼによる細胞分裂制御の全貌が解明されたわけではない。一方、Src キナーゼにより細胞分裂が制御されているのであれば、そのキナーゼ活

性の異常が細胞分裂の異常を誘導する可能性が考えられた。多くの固形癌において c-Src の活性異常亢進が認められ、アクチン細胞骨格リモデリングが癌の悪性化に関与することが示されている。しかしながら、Src 過剰発現によるチロシンリン酸化シグナルの異常が細胞分裂制御にどのような影響を与え、さらには癌の悪性化と関連しているかは不明であった。

## 2. 研究の目的

Src 型チロシンキナーゼによる細胞分裂制御機構の解明を目指し、Src シグナル経路および紡錘体形成に着目して調べる。さらに、Src 活性の異常亢進が細胞分裂に対し与える影響を調べるため、キナーゼ活性が異常亢進している癌遺伝子産物 v-Src を用い、細胞分裂への影響を解析する。

## 3. 研究の方法

ヒト大腸癌細胞株 HCT116, ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa S3, マウス繊維芽細胞株 NIH3T3 に Tet repressor 遺伝子を導入後、tet オペレーター下流に v-Src 遺伝子をつなげたプラスミド DNA を導入した。これらの細胞ではドキシサイクリンの処理により、v-Src が発現した。

## 4. 研究成果

### (1) Srcによる細胞分裂制御機構の解明：

① Aurora B 阻害剤存在下におけるSrc阻害の効果：

Src型チロシンキナーゼ阻害剤 PP2の単独処理では、分裂期スピンドル形成に対する影響は観察されなかったが、Aurora B阻害剤と併用すると、PP2による単極性スピンドル様の異常なスピンドル形成が観察された。ノコダゾールによりprometaphase に同調し、リリース10分後における分裂期スピンドル形成に対する影響を調べた結果、PP2処理により異常スピンドルの形成が亢進した。PP2によるスピンドル形成異常は、HeLa S3細胞におけるSrcの誘導発現により部分的に解除された。さらにSrc, Fyn, Yesを欠損させたマウス線維芽細胞であるSYF細胞と、この細胞にc-Srcを恒常的に発現させたSYF/c-Src細胞株を用いて、Srcの発現の影響を調べた。Srcの発現は、Aurora B 阻害剤存在下における中心体からのアスター形成を促進させた。以上の結果より、Srcはスピンドル形成を制御することにより分裂期の制御に関与することが明らかにな

った。

### ② 細胞分裂期におけるSrcシグナリング：

分裂期におけるERKキナーゼの活性を調べた結果、Srcキナーゼ活性に依存してERKが活性化されることがわかった。SrcおよびERKの細胞内局在を調べた結果、分裂期スピンドルにERKが局在すること、分裂前中期の前半の時期において、スピンドル付近にSrcが局在することを見出した。c-Src, c-Yes, Fyn ノックアウトマウス繊維芽細胞(SYF細胞)と、この細胞にc-Src遺伝子を導入した細胞で分裂期スピンドルの安定性を比較した。その結果、Srcの発現によりスピンドル安定性が増加した。また、Srcキナーゼ阻害剤およびMEK阻害剤によるERKの阻害はスピンドル安定性を低下させた。以上の結果より、細胞分裂期においてSrcはMEK/ERK 経路を活性化し、スピンドル安定性に関与することを明らかにした。

### (2) Src活性異常亢進が細胞分裂へ与える影響：

#### ① 細胞増殖に対するv-Src発現の影響：

Src活性の異常亢進型であるv-Srcの誘導発現株を樹立した。この細胞は、ドキシサイクリンで処理する事によりv-Srcを誘導発現し、E-カドヘリンの分解などによる細胞の浮遊化を誘導した。さらに、チロシンリン酸化レベルの亢進、ERKの活性亢進を誘導した。細胞増殖に対するv-Src発現の影響を調べた結果、v-Srcの発現レベルに依存した増殖阻害が観察された。同様な細胞増殖阻害効果がヒト子宮頸癌細胞株HeLa S3細胞、マウス繊維芽細胞株NIH3T3細胞においても観察された。また、フローサイトリーを用いた細胞周期解析により、v-Src発現は細胞周期の異常を誘導すること、顕微鏡観察により二核化を誘導することを見出した。HeLa S3細胞、NIH3T3細胞においても同様な二核細胞の増加が観察された。さらに、内在性c-Srcの誘導発現株を樹立して調べた結果、c-Src過剰発現によっても二核細胞の増加が観察された。以上の結果より、Src型チロシンキナーゼの活性異常亢進は、細胞周期や分裂期の進行に影響することが示唆された。

#### ② 細胞分裂制御キナーゼへの影響：

細胞分裂制御に関与するAurora Bキナーゼに着目し、v-Src発現細胞で細胞内局在を調べた結果、分裂後期におけるミッドゾーン局在が消失した。

③ 細胞質分裂への影響：

細胞二核化の原因として細胞質分裂阻害が推定された。よって、v-Src誘導発現株にドキシサイクリンを添加してv-Srcを発現させ、time-lapse 解析を行なった結果、v-Src発現による細胞質分裂阻害が観察された。

④ 中心体数への影響：

細胞周期 S 期および G2 期において複製された中心体は細胞分裂により二つの娘細胞へと分配されるため、細胞質分裂の阻害は中心体数の増加を引き起こす。そこで、v-Src 誘導発現細胞株にドキシサイクリンを添加して培養し、中心体マーカーである γ チューブリンを免疫染色して中心体数を調べた。その結果、v-Src 発現による中心体数の増加が観察された。

⑤ スピンドルチェックポイントへの影響：

二核化した細胞は、中心体数の増加により異常なスピンドルを形成するが、通常はスピンドルチェックポイントの働きにより異常な細胞分裂はおこらない。v-Src 誘導発現細胞株にドキシサイクリンを添加して培養し、微小管重合阻害剤であるノコダゾールを加えてチェックポイントを活性化し、チェックポイントが機能しているか調べた。その結果、v-Src 発現によりチェックポイントが部分的に阻害されていることがわかった。

以上のことから、Src 型チロシンキナーゼは細胞分裂制御に関与し、活性の異常亢進は細胞質分裂異常を誘導することを明らかにした。Src 活性が亢進しているがん細胞においても細胞分裂異常を引き起こす可能性が示唆された。

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 6 件)

- ① Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 that is antagonized by EGFR-activated c-Src. Ishibashi K, Fukumoto Y, Hasegawa H, Abe K, Kubota S, Aoyama K, Kubota S, Nakayama Y, Yamaguchi N. *Journal of Cell Science*, 126: 625-637, 2013. 査読有  
doi: 10.1242/jcs.116277

- ② c-Src but not Fyn promotes proper spindle orientation in early prometaphase.

Nakayama Y, Matsui Y, Takeda Y, Okamoto M, Abe K, Fukumoto Y and Yamaguchi N. *The Journal of Biological Chemistry*, 287: 24905-24915, 2012. 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M112.341578

- ③ Enrichment of cell populations in metaphase, anaphase, and telophase by synchronization using nocodazole and blebbistatin: A novel method suitable for examining dynamic changes in proteins during mitotic progression. Matsui Y, Nakayama Y, Okamoto M, Fukumoto Y and Yamaguchi N. *European Journal of Cell Biology*, 91: 413-419, 2012. 査読有  
doi: 10.1016/j.ejcb.2011.12.008

- ④ Nuclear c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation. Aoyama K, Fukumoto Y, Ishibashi K, Kubota S, Morinaga T, Horiike Y, Yuki R, Takahashi A, Nakayama Y, and Yamaguchi N. *Experimental Cell Research*, 317: 2874-2903, 2011. 査読有  
doi: 10.1016/j.yexcr.2011.09.013

- ⑤ Degradation of filamin induces contraction of vascular smooth muscle cells in Type-I collagen matrix honeycombs. Uchida M, Ishii I, Hirata K, Yamamoto F, Tashiro K, Suzuki T, Nakayama Y, Ariyoshi N, and Kitada M. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27: 669-680, 2011. 査読有  
doi: 10.1159/000330076

- ⑥ The Lyn kinase C-lobe mediates Golgi export of Lyn through conformation-dependent ACSL3 association. Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kuga T, Dohmae N and Yamaguchi N. *Journal of Cell Science*, 123: 2649-2662, 2010. 査読有  
doi: 10.1242/jcs.066266

[学会発表] (計 23 件)

- ① 岡本麻依, 長谷川智津, 中山祐治, 武田祐美, 盛永敬郎, 福本泰典, 山口直人  
Src 型チロシンキナーゼ Fyn の中心体局在と紡錘体形成における機能  
日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月
- ② 武田祐美, 中山祐治, 松井優紀, 岡本麻依, 阿部紘平, 福本泰典, 山口直人  
分裂期スピンドル形成における Src シグナリング  
日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月
- ③ 本田拓也, 中山祐治, 添田修平, 阿部紘平, 森井真理子, 山口千尋, 福本泰典, 山口直人  
v-Src 誘導発現による S 期遅延と cyclin E の分解阻害  
日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013 年 3 月
- ④ 添田修平, 中山祐治, 本田拓也, 山口千尋, 福本泰典, 山口直人  
v-Src 発現による Aurora B 局在異常と分裂期への影響  
第 85 回日本生化学会大会 (福岡) 2012 年 12 月
- ⑤ 武田祐美, 中山祐治, 松井優紀, 岡本麻依, 阿部紘平, 福本泰典, 山口直人  
分裂期におけるスピンドル近傍での Src シグナリング  
第 56 回日本薬学会関東支部大会 (東京) 2012 年 10 月
- ⑥ 山口千尋, 中山祐治, 本田拓也, 添田修平, 福本泰典, 山口直人  
細胞分裂期同調における v-Src 誘導発現の影響  
第 56 回日本薬学会関東支部大会 (東京) 2012 年 10 月
- ⑦ 岡本麻依, 中山祐治, 長谷川智津, 武田祐美, 盛永敬郎, 福本泰典, 山口直人  
分裂期スピンドル動態制御における Src 型チロシンキナーゼ Fyn の機能  
ファーマ・バイオフォーラム (福岡) 2012 年 9 月
- ⑧ 中山祐治, 松井優紀, 武田祐美, 阿部紘平, 岡本麻依, 福本泰典, 山口直人  
細胞分裂期スピンドル形成に関する Src シグナリング  
日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月
- ⑨ 武田祐美, 中山祐治, 阿部紘平, 津田邦彦, 松井優紀, 岡本麻依, 福本泰典, 山口直人  
分裂期特異的な Src シグナリングによるチロシンリン酸化局在  
日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月
- ⑩ 青木杏未, 中山祐治, 添田修平, 本田拓也, 福本泰典, 山口直人  
テトラサイクリン誘導発現システムを用いた v-Src 誘導発現株の作製とその解析  
日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月
- ⑪ 中山祐治, 松井優紀, 阿部紘平, 岡本麻依, 武田祐美, 福本泰典, 山口直人  
MEK/ERK 経路を介した Src による分裂期スピンドル形成制御  
第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月
- ⑫ 岡本麻依, 中山祐治, 盛永敬一郎, 阿部紘平, 福本泰典, 山口直人  
Src 型チロシンキナーゼによる分裂期スピンドルの安定化  
第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月
- ⑬ 添田修平, 中山祐治, 本田拓也, 阿部紘平, 青木杏美, 田村直樹, 福本泰典, 山口直人  
v-Src が誘導する chromosomal passenger complex の局在異常による細胞の多核化  
第 55 回日本薬学会関東支部大会 (千葉) 2011 年 10 月
- ⑭ 岡本麻依, 中山祐治, 盛永敬一郎, 阿部紘平, 福本泰典, 山口直人  
Src 型チロシンキナーゼ Fyn によりリン酸化される分裂期スピンドル結合蛋白質の探索  
第 55 回日本薬学会関東支部大会 (千葉) 2011 年 10 月
- ⑮ 武田祐美, 中山祐治, 阿部紘平, 津田邦彦, 松井優紀, 岡本麻依, 福本泰典, 山口直人  
c-Src 誘導発現による細胞分裂期チロシンリン酸化の解析  
第 55 回日本薬学会関東支部大会 (千葉) 2011 年 10 月
- ⑯ 中山祐治, 松井優紀, 阿部紘平, 岡本麻依, 津田邦彦, 福本泰典, 山口直人  
Src 型チロシンキナーゼによる紡錘体形成制御  
日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月
- ⑰ 岡本麻依, 中山祐治, 津田邦彦, 松井優紀, 福本泰典, 山口直人  
Src 型チロシンキナーゼ Fyn による分裂期スピンドル制御  
日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月
- ⑱ 添田修平, 中山祐治, 青木杏未, 本田拓也, 田村直樹, 松井優紀, 福本泰典, 山口直人  
v-Src 誘導発現による Aurora B キナーゼ局在異常と多核化  
日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月
- ⑲ 本田拓也, 中山祐治, 添田修平, 青木杏未, 松井優紀, 阿部紘平, 森井真理子,

福本泰典, 山口直人  
v-Src と c-Src の誘導発現による細胞周期  
への影響  
日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3  
月

- ⑳ 中山祐治, 岡本麻依, 松井優紀, 津田邦彦,  
福本泰典, 山口直人  
Src 型チロシンキナーゼによる分裂期ス  
ピンドル制御  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日  
本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010 年  
12 月
- ㉑ 添田修平, 中山祐治, 本田拓也, 青木杏  
未, 田村直樹, 松井優紀, 福本泰典, 山  
口直人  
v-Src 発現誘導による分裂期の異常  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日  
本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010 年  
12 月
- ㉒ 青木杏未, 中山祐治, 田村直樹, 添田修  
平, 本田拓也, 松井優紀, 福本泰典, 山  
口直人  
HCT116 細胞における癌遺伝子 v-Src 誘導  
発現による細胞周期への影響  
第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日  
本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010 年  
12 月
- ㉓ 岡本麻依, 中山祐治, 津田邦彦, 松井優  
紀, 福本泰典, 山口直人  
細胞分裂期における中心体でのチロシン  
リン酸化  
第 54 回日本薬学会関東支部大会 (東京)  
2010 年 10 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labo/seika/saito/homu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 祐治 (NAKAYAMA YUJI)  
京都薬科大学・薬学部・教授

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