

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460076

研究課題名(和文) Srcシグナルによる細胞分裂制御機構とその破綻による細胞癌化

研究課題名(英文) Regulation of cell division by Src signaling and its role in the cancer malignancy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Srcシグナルによる細胞分裂制御機構の解明を目指し，Src型チロシンキナーゼによるスピンドル形成制御，Srcの下流シグナル分子による細胞分裂制御を明らかにした。また，細胞分裂後期に細胞周期を同調する方法を確立し，リン酸化プロテオミクスにより，新規のリン酸化ペプチドを多数見出すことに成功した。このように，Srcシグナルによる制御の一端を明らかにすることができた。また，Srcのキナーゼ活性異常亢進型であるv-Srcを用い，活性亢進が細胞分裂異常を引き起こすことを見出した。さらに，染色体分配異常であるchromosome bridge形成を見出し，その原因としてDNA損傷の関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms underlying Src-signaling-mediated regulation of cell division, we demonstrated the involvement of Src tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in cell division including spindle formation and chromosome segregation. Furthermore, we established the novel method to synchronize M-phase cells at the anaphase and telophase, and we identified a lot of novel, phosphorylated peptides at this phase. Additionally, by using v-Src as a model protein of aberrantly activated Src, we found that aberrant activation of Src kinase activity induces defect in cell division. We also found the chromosome bridge formation by v-Src possibly through v-Src-induced DNA damage.

研究分野：細胞生物学，生化学

キーワード：Src 細胞分裂 チロシンリン酸化 紡錘体形成 v-Src

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り、主に Cdk1, Aurora キナーゼ, Polo-like kinase などのセリン/スレオニンキナーゼにより制御されている。細胞分裂は染色体分配と細胞質分離から構成されるが、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 細胞の細胞分裂は染色体を不均等分配する危険性をもつため、癌細胞における染色体不安定性は、癌細胞の polyploid 細胞産生に一部起因する。したがって細胞質分裂の異常は polyploid 細胞産生を介して、細胞の癌化、癌細胞の悪性化に寄与する。

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が細胞分裂期において活性化され (Arch Biochem Biophys 466: 116-124, 2007), 紡錘体形成 (J Biol Chem 287: 24905-24915, 2012) や細胞質分裂 (J Biol Chem 282: 5327-5339, 2007) に関与し、細胞分裂を制御することを報告してきた。Src の下流での ERK/MAPK 経路の関与も示した (J Biol Chem 282: 5327-5339, 2007; Eur J Cell Biol 91: 413-419, 2012) が、Src の直接の基質や、機能する場所やタイミングなど、細胞分裂制御機構の詳細の解明には至っていない。

Src は主に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も独自の役割を担っており、Src の細胞内局在選別は機能制御と強く関連している。細胞分裂期においても正常な局在が Src の正常な機能発現に必要であると考えられるが、癌細胞では Src の局在異常や活性の異常亢進が観察されている。Src の活性亢進が観察されている大腸癌細胞を用い、Src の活性亢進が細胞質分裂異常を介して細胞の二核化 (polyploid 細胞) を誘導することを見出した。従って、癌細胞における Src 活性の異常亢進は細胞分裂異常を介して癌の悪性化に関与することが示唆された。しかし、その詳細な機構については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞分裂制御に関与する Src シグナル経路の解明を目指す。さらには、キナーゼ活性が異常亢進している癌遺伝子産物 v-Src を誘導発現し、分裂異常誘導機構の解明を目指す。これらを Src による細胞癌化、癌悪性化機構の解明につなげる。

3. 研究の方法

(1) Src 型チロシンキナーゼによる細胞分裂制御機構の解明:

Src, Yes, Fyn がノックアウトされた SYF

細胞と、この細胞に Fyn 遺伝子を導入した細胞 (SYF/Fyn), HeLa S3 細胞と、この細胞に Fyn 遺伝子を導入した細胞 (HeLa S3/Fyn) を用いた。スピンドル形成への影響は、免疫染色後に蛍光強度を測定することで評価した。スピンドルの安定性は、氷上で 10 分間インキュベーションし評価した。微小管重合への影響は、細胞を氷上で 4 時間インキュベーションして微小管を完全に脱重合させ、37 で 90 秒間インキュベーションし、最長の微小管の長さを計測した。また、細胞分裂進行への影響は、HeLa S3 細胞と HeLa S3/Fyn 細胞を用い調べた。Cdk1 阻害剤 R0-3306 により G2 期停止後リリースし、ノコダゾールにより前中期に停止させ、再度リリースして 15 分毎に細胞を固定し、細胞分裂中の細胞を中期の前後に分けて割合を調べた。

(2) Src シグナルと分裂期キナーゼとのクロストーク探索:

HeLa S3/Fyn 細胞を氷上で 10 分間インキュベーションし、スピンドルの安定性を評価したが、その際、PI3K 阻害剤 BI2536, Aurora B 阻害剤 ZM447439, Aurora A 阻害剤 MLN8237, Src 阻害剤 PP2 を添加し、微小管を免疫染色して蛍光強度を比較した。

また、HeLa S3 細胞、およびブタ腎臓由来 LLC-PK1 細胞を用い、Src シグナルの下流に位置する ERK の阻害が細胞分裂に対して与える影響を調べた。細胞イメージング装置 (Operetta, パーキンエルマー) を用い、mCherry-tubulin を発現している LLC-PK1 細胞の time-lapse imaging を行った。ERK の上流のキナーゼである MEK の阻害剤 U0126 および GSK1120212 を用いた。

(3) チロシンリン酸化、およびセリン/スレオニンリン酸化のプロテオミクス解析:

すでに報告した方法に従い HeLa S3 細胞を細胞分裂後期に同調しリン酸化プロテオミクス解析を行った。すなわち、HeLa S3 細胞を 4 mM チミジン 存在下で 24 時間培養し、PBS で洗浄した後、薬剤を加えない培地で 9 時間培養した。その後、20 ng/ml ノコダゾール で 4 時間培養し、mitotic shake-off により分裂期細胞を間期の細胞から分離した。分裂期細胞を PBS で洗浄し、薬剤を加えない培地で 20 分培養後に 50 μM blebbistatin 存在下でさらに 20 分培養して細胞分裂後期のサンプルとした。

(4) v-Src 誘導発現による細胞分裂への影響:

HCT116, HeLa S3, NIH3T3 細胞に由来し、ドキシサイクリン (Dox) により v-Src の誘導発現が可能な細胞株を用いた。Dox 添加により v-Src を誘導発現させ、細胞分裂への影響を観察した。

4. 研究成果

(1) Src 型チロシンキナーゼによる細胞分裂制御機構の解明:

SYF 細胞において Fyn を発現させ、チューブリンを免疫染色して蛍光強度を測定した。その結果、Fyn 発現により蛍光強度の増加が観察され、紡錘体形成の促進が示唆された。一方、中心体における チューブリンの蓄積には影響をあたえなかった。したがって、チューブリンの中心体局在の促進とは異なる機構により、紡錘体形成を促進することがわかった。

低温処理後に残存した微小管を染色すると、Fyn の発現による蛍光強度の増加が観察されたことから、紡錘体安定性における Fyn の役割が示唆された。SYF 細胞においては、Fyn のみならず、Src および Lyn においても同様な効果が観察されたので、Src 型チロシンキナーゼはメンバー間で機能的に補完しあうことが示唆された。

HeLa S3/Fyn 細胞およびその親株の細胞を低温処理して微小管を完全に脱重合させた後、37 に戻して 90 秒後に、再重合された微小管の長さを測定した。その結果、Fyn の発現により微小管の長さの増加が観察され、Src 型チロシンキナーゼ阻害剤 PP2 により阻害された。よって、キナーゼ活性に依存して微小管の重合を促進させることが示唆された。

微小管の動態は plus-end tracking proteins (+TIPs) により影響を受ける。EB1 は主要な +TIP であり、微小管重合を促進することが報告されている。Fyn は、短時間の低温処理後に中心体付近に局在する EB1 を増加させた。

Cdk 1 阻害剤 RO-3306 と微小管重合阻害剤ノコダゾールにより同調し、細胞分裂進行にあたる Fyn の影響を調べた結果、Fyn により後期の開始促進が観察された。

これらの結果から、Fyn はキナーゼ活性に依存して細胞分裂進行に関与すること、特に微小管重合の促進を介して紡錘体形成制御に関与することが示唆された。

(2) Src シグナルと分裂期キナーゼとのクロストーク探索:

細胞分裂期に同調した HeLa S3 細胞と HeLa S3/Fyn 細胞を用い、低温処理後にチューブリン染色し、微小管の長さに対するキナーゼ阻害剤の影響を調べた。Fyn の発現により微小管の長さが増加し、Src 型チロシンキナーゼ阻害剤 PP2 により阻害された。Aurora B 阻害剤 ZM447439 によっても同様に阻害され、

PP2 と ZM447439 の併用は、それぞれ単独で使用した場合よりも強く阻害した。この結果は、Fyn シグナルと Aurora B シグナル経路は別々に微小管重合促進に働いていることを示唆している。

Aurora A 阻害剤 MLN8237 が微小管の長さを低下させたのに対し、PIK1 阻害剤である BI2536 は HeLa S3 において微小管の長さを増加させた。興味深いことに、この増加は HeLa S3/Fyn では観察されなかった。この結果は、Fyn による微小管の伸長が、PIK1 阻害による微小管の伸長と同様な機構によることを示唆している。

分裂期において MEK/ERK シグナルが活性化することをすでに報告している。本研究課題では、この ERK シグナルの阻害により細胞分裂にどのような影響が現れるのか調べた。HeLa S3 細胞、および LLC-PK1 細胞を用い、細胞分裂期における ERK の局在を検討した。その結果、細胞分裂開始直後（前期）からスピンドル上に局在していた。細胞分裂開始における ERK の活性化は PP2 により抑制され、Src の過剰発現により促進した。よって、ERK の活性化は部分的には Src 依存であることが示唆された。しかしながら、ERK のスピンドル上の局在は PP2 あるいは MEK 阻害剤である U0126 および GSK1120212 の添加によっては影響されず、Src および ERK の活性には依存しないことが示唆された。

MEK 阻害剤である U0126 を用い、細胞分裂への影響を調べた。非同調の LLC-PK1 細胞、HeLa S3 細胞を U0126 存在下で 24 時間培養すると前期/前中期の細胞の割合が増加する傾向が観察された。同様な影響は、U0126 と 1 時間の培養においても観察された。ERK による種々の遺伝子の転写活性化が知られているが、この 1 時間の処理において効果が得られたことは、ERK 抑制による転写の抑制を介したのではないことを示唆している。さらに詳細に調べるため、mCherry 融合型のチューブリンを発現している LLC-PK1 細胞を U0126 存在下で培養し、time-lapse 観察をおこなった。その結果、6 割以上の細胞において赤道面上に整列しない染色体が観察され、中期から後期への移行が阻害された。

これらの結果から、細胞分裂期において ERK は部分的に Src により活性化されスピンドル上に局在して染色体の整列に関与することが明らかになった。

(3) チロシンリン酸化、およびセリン/スレオニンリン酸化のプロテオミクス解析:

HeLa S3 を、既報に従い細胞分裂前中期、後期/終期に同調し、さらに間期の細胞も用いてリン酸化プロテオミクス解析をおこなった。その結果、多数のセリン/スレオニン

リン酸化ペプチドが観察され、細胞分裂後期/終期に特異的なリン酸化ペプチドも観察された。また、少数ながら後期/終期に特異的なチロシンリン酸化されたペプチドも見いだすことができた。これらについては、現在も解析中である。

(4) v-Src 誘導発現による細胞分裂への影響:

HCT116/v-Src 細胞に Dox を加えて v-Src を誘導発現し、細胞分裂を観察した。その結果、chromosome bridge の形成が観察された。また、H2AX を指標として DNA 損傷を検出すると v-Src 発現により DNA 損傷が増加することが明らかになった。ATM/ATR 経路の関与を調べるため caffeine を添加すると、v-Src 発現による chromosome bridge 形成が阻害された。しかしながら、ATR の基質である Chk1 の Ser345 のリン酸化は低下しなかった。このことから、v-Src 発現による chromosome bridge 形成は v-Src による DNA 損傷の誘導に関連していることが示唆された。また、caffeine は少なくとも ATR/Chk1 経路の阻害をせずに chromosome bridge 形成を抑制することが示唆された。

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9件)

v-Src causes chromosome bridges in a caffeine-sensitive manner by generating DNA damage.

Ikeuchi M, Fukumoto Y, Honda T, Kuga T, Saito Y, Yamaguchi N, Nakayama Y.
Int. J. Mol. Sci., 17: 871, 2016.
査読有 doi: 10.3390/ijms17060871

ERK plays a role in chromosome alignment and participates in M-phase progression.

Iwamoto E, Ueta N, Matsui Y, Kamiyo K, Kuga T, Saito Y, Yamaguchi N, Nakayama Y.
J. Cell. Biochem., 117: 1340-1351, 2016.
査読有 doi: 10.1002/jcb.25424

Fyn accelerates M phase progression by promoting the assembly of mitotic spindle microtubules.

Okamoto M, Nakayama Y, Kakihana A, Yuki R, Yamaguchi N, Yamaguchi N.
J. Cell. Biochem., 117: 894-903, 2016.
査読有 doi: 10.1002/jcb.25373

Genistein induces cytokinesis failure through RhoA delocalization and anaphase chromosome bridging.

Nakayama Y, Saito Y, Soeda S, Iwamoto E,

Ogawa S, Yamagishi N, Kuga T, Yamaguchi N.

J. Cell. Biochem., 115: 763-771, 2014.
査読有 doi: 10.1002/jcb.24720

Activation of Lyn tyrosine kinase through decreased membrane cholesterol levels during a change in its membrane distribution upon cell detachment.

Morinaga T, Abe K, Nakayama Y, Yamaguchi N, Yamaguchi N.
J. Biol. Chem., 289: 26327-26343, 2014.
査読有 doi: 10.1074/jbc.M114.580001

Lyn tyrosine kinase promotes silencing of ATM-dependent checkpoint signaling during recovery from DNA double-strand breaks.

Fukumoto Y, Kuki K, Morii M, Miura T, Honda T, Ishibashi K, Hasegawa H, Kubota S, Ide Y, Yamaguchi N, Nakayama Y, Yamaguchi N.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 452: 542-547, 2014.
査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.113

v-Src inhibits the interaction between Rad17 and Rad9 and induces replication fork collapse.

Fukumoto Y, Miura T, Morii M, Kubota S, Honda T, Kubota S, Morinaga T, Yamaguchi N, Nakayama Y, Yamaguchi N.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 450: 885-890, 2014.
査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.078

Src family kinases promote silencing of ATR-Chk1 signaling in termination of DNA damage checkpoint.

Fukumoto Y, Morii M, Miura T, Kubota S, Ishibashi K, Honda T, Okamoto A, Yamaguchi N, Iwama A, Nakayama Y, Yamaguchi N.
J. Biol. Chem., 289: 12313-12329, 2014.
査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.533752

v-Src causes delocalization of Mklp1, Aurora B, and INCENP from the spindle midzone during cytokinesis failure.

Soeda S, Nakayama Y, Honda T, Aoki A, Tamura N, Abe K, Fukumoto Y, Yamaguchi N.
Exp. Cell Res., 319: 1382-1397, 2013.
査読有 doi: 10.1016/j.yexcr.2013.02.023

[学会発表](計20件)

岡田美咲, 久家貴寿, 齊藤洋平, 足立淳, 朝長毅, 中山祐治
細胞分裂後期特異的なリン酸化タンパク質の探索
日本薬学会第136年会(横浜)2016年3月

居藤亜弥, 久家貴寿, 齊藤洋平, 中山祐治

新規チューブリン免疫染色法による微小管構造制御に関連する分子の探索
日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016 年 3 月

岩本絵里香, 上田菜津美, 松井優紀, 久家貴寿, 齊藤洋平, 山口直人, 中山祐治

ERK による染色体整列の制御
日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016 年 3 月

福本泰典, 池内正剛, 中山祐治, 山口直人

Rad17 における 9-1-1 複合体との相互作用に関わるモチーフの同定と解析
日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016 年 3 月

池内正剛, 本田拓也, 福本泰典, 久家貴寿, 齊藤洋平, 山岸伸行, 山口直人, 中山祐治

v-Src 発現による chromosome bridge 形成機構.
日本薬学会第 135 年会 (神戸), 2015 年 3 月

福本泰典, 三浦崇仁, 森井真理子, 久保田翔, 本田拓也, 久保田将一, 盛永敬郎, 山口憲孝, 中山祐治, 山口直人

v-Src による Rad17-Rad9 相互作用の阻害を介した ATR 依存的 DNA 損傷チェックポイントの不活性化機構
日本薬学会第 135 年会 (神戸), 2015 年 3 月

池内正剛, 岩本絵里香, 抱恵子, 齊藤洋平, 久家貴寿, 山岸伸行, 中山祐治

v-Src 発現による DNA 損傷応答を介した chromosome bridge 形成
2014 年度創薬科学フロンティアシンポジウム (京都) 2014 年 11 月

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, 久保田翔, 青山和正, 山口憲孝, 山口直人

v-Src によるチロシンリン酸化で引き起こされる細胞周期進行異常
第 87 回日本生化学会大会 (京都) 2014 年 10 月

福本泰典, 三浦崇仁, 森井真理子, 久保田翔, 本田拓也, 久保田将一, 盛永敬郎, 山口憲孝, 中山祐治, 山口直人

v-Src による Rad17-Rad9 相互作用の阻害と DNA 複製フォーク崩壊の誘導
第 87 回日本生化学会大会 (京都) 2014 年 10 月

池内正剛, 岩本絵里香, 抱恵子, 本田拓也, 齊藤洋平, 久家貴寿, 山岸伸行, 山口直人, 中山祐治

v-Src 発現による chromosome bridge 形成メカニズムの解明

第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都) 2014 年 10 月

岡田美咲, 岩本絵里香, 久家貴寿, 山岸伸行, 齊藤洋平, 中山祐治

細胞分裂期におけるチロシンリン酸化シグナルの解析

第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都) 2014 年 10 月

岩本絵里香, 岡田美咲, 大槻拓也, 久家貴寿, 齊藤洋平, 山岸伸行, 中山祐治

MEK 阻害剤 U0126 による染色体整列の異常
第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都) 2014 年 10 月

抱恵子, 池内正剛, 岩本絵里香, 植貴俊, 本田拓也, 齊藤洋平, 久家貴寿, 山岸伸行, 山口直人, 中山祐治

v-Src による多核細胞形成の経時的解析
第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都) 2014 年 10 月

植貴俊, 三上大貴, 久家貴寿, 齊藤洋平, 山岸伸行, 中山祐治

Src 活性の異常亢進における細胞分裂異常
第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (京都) 2014 年 10 月

武田祐美, 中山祐治, 岡本麻衣, 長谷川智津, 米谷詩織, 青山和正, 久保田翔, 阿部紘平, 山口憲孝, 久家貴寿, 橋本裕希, 朝長毅, 山口直人

Fyn チロシンキナーゼによる分裂期 spindle の安定化: spindle 精製法を用いた基質探索
日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014 年 3 月

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, 久保田翔, 青山和正, 山口憲孝, 山口直人

v-Src チロシンキナーゼ誘導発現による細胞周期進行異常
日本薬学会第 134 年会 (熊本), 2014 年 3 月

福本泰典, 九鬼和雅, 森井真理子, 三浦崇仁, 本田拓也, 石橋賢一, 長谷川仁美, 久保田翔, 井出雄大, 山口憲孝, 中山祐治, 山口直人

Src 型チロシンキナーゼによる ATM 依存的 DNA 損傷チェックポイントからのリカバリー促進
日本薬学会第 134 年会 (熊本) 2014 年 3 月

武田祐美, 中山祐治, 岡本麻依, 青山和正, 久保田翔, 阿部紘平, 米谷詩織, 山口憲孝, 久家貴寿, 橋本裕希, 朝長毅, 山口直人

細胞分裂期 spindle 形成制御に関与する Fyn チロシンキナーゼ基質タンパク質の探索
第 12 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2013 (東京) 2013 年 9 月

添田修平，門脇志穂子，土橋遼，本田拓也，齊藤洋平，山岸伸行，山口直人，中山祐治
Src キナーゼ活性亢進による細胞二核化機構
第 86 回 日本生化学会大会（横浜）2013 年 9 月

添田修平，門脇志穂子，土橋遼，齊藤洋平，山岸伸行，福本泰典，山口直人，中山祐治
Src キナーゼ活性亢進による細胞質分裂阻害
第 60 回 日本生化学会近畿支部例会（大阪）
2013 年 5 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

齊藤 洋平 (SAITO YOUHEI)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：90411032