

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790067

研究課題名(和文) Src型チロシンキナーゼによるG2期DNA損傷チェックポイントリカバリー制御機構

研究課題名(英文) The regulation of G2 DNA damage checkpoint recovery by Src family kinases

研究代表者

福本 泰典 (Fukamoto, Yasunori)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10447310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：Src型キナーゼによるDNA損傷チェックポイントリカバリーの制御にはATR依存性Rad17リン酸化の制御が重要であること、またその分子機構としてRad17-Rad9相互作用を阻害することを見出した。またSrc型キナーゼがATM-Chk2経路およびDNA複製チェックポイントリカバリーへ関与することを見出した。さらにKap1およびCdc5Lのチロシンリン酸化による制御とイマチニブによるチェックポイントリカバリー制御について新規の知見を得た。以上の解析によりDNA損傷チェックポイント終結制御におけるSrc型キナーゼの役割の一端が明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：We showed that the regulation of DNA damage checkpoint recovery by Src family kinases involves the regulation of ATR-dependent Rad17 phosphorylation as a key event, and that the underlying molecular mechanism involves the inhibition of the interaction between Rad17 and Rad9. Src family kinases are also involved in ATM-Chk2 checkpoint pathway and replication checkpoint recovery. We also showed the regulation of Kap1 and Cdc5L by tyrosine phosphorylation and the regulation of checkpoint recovery by imatinib. These data shed light on the role of Src family kinases in the termination of DNA damage checkpoint signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・細胞生物学

キーワード：DNA損傷 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担うゲノム DNA は絶えず損傷を受けており、細胞は遺伝情報を安定に保つために DNA 損傷応答機構を備えている。この DNA 損傷応答機構は、癌の放射線治療・化学療法に対する耐性の獲得と癌の治療効果に重要な機構であり、DNA 損傷応答関連タンパク質は分子標的型抗癌剤の新規標的タンパク質として期待されている。DNA 損傷応答の活性化機構はよく解析されているが、その終結反応(チェックポイントリカバリー)については殆ど解明されていない。これまでに申請者は Src 型チロシンキナーゼ(SFK)が G2 期 DNA 損傷チェックポイントリカバリーを制御することを見出している。本研究はこれまでの成果を発展させ SFK によるチェックポイントリカバリー制御の分子機構を明らかにすることを目的とする。本研究を通じてがんの治療効果に関わる DNA 損傷チェックポイントリカバリー機構の SFK による制御が分子標的型抗癌剤による新規の治療戦略となることを期待している。

2. 研究の目的

(1-4) SFK と DNA 損傷応答機構との関連を明らかにすることを目的とする。そのために G2 期 DNA 損傷チェックポイントリカバリーにおける SFK の機能を明らかにする。また DNA 損傷応答因子の SFK 依存的制御が DNA 損傷応答機構へ及ぼす影響について検討する。

(5) SFK 関連因子の DNA 損傷応答機構への関与について検討する。

(6,7) SFK によってチロシンリン酸化を受けるタンパク質について、チロシンリン酸化による機能制御を明らかとする。

3. 研究の方法

(1-5) 培養細胞において SFK の機能阻害および機能亢進が DNA 損傷応答因子に与える影響について検討した。さらに、その SFK の効果に DNA 損傷応答因子の機能阻害が与える影響について検討した。またイマチニブが DNA 損傷応答因子に与える影響について検討した。

(6,7) SFK の基質として同定したタンパク質について、チロシンリン酸化がその機能に与える影響について検討した。

4. 研究成果

(1) チェックポイントリカバリーにおける SFK による ATR-Chk1 経路の制御について解析を行った。SFK による制御には Rad17 の ATR 依存的リン酸化が関与していることを見出した。チェックポイントキナーゼ阻害剤を用

いた解析から、SFK による G2 期 DNA 損傷チェックポイントリカバリーの制御は ATR-Chk1 経路を介することを見出した(Fukumoto, J. Biol. Chem. 2014)。

(2) SFK による Chk1 の制御の解析のために、v-Src による ATR-Chk1 経路制御について解析を行った。v-Src が ATR 依存的 Rad17 および Chk1 のリン酸化を抑制することを見出した。またこの分子機構として、v-Src が Rad17 複合体と Rad9 複合体の相互作用を阻害することを見出した。

(3) チェックポイントリカバリーにおける SFK による ATM-Chk2 経路制御について解析を行った。G2 期 DNA 損傷チェックポイントリカバリーの過程で、ATM 依存的 Chk2 および Kap1 のリン酸化が SFK 阻害によって亢進した。SFK 阻害による ATM-Chk2 活性亢進は、G2 期 DNA 損傷チェックポイント活性化の際にも観察された。また G2 期に加えて非同調培養時においても観察された。

(4) SFK による DNA 複製チェックポイントリカバリー制御について検討を行った。SFK 阻害に加えて、SFK の活性亢進によってもやはり DNA 複製チェックポイントリカバリーが遅延することを見出した。さらに SFK 活性亢進による遅延の際にもやはり ATR-Chk1 経路の制御が関わっていることを見出した。

(5) イマチニブによる G2 期 DNA 損傷チェックポイントリカバリー制御について検討を行った。その結果イマチニブは SFK とは異なる機構で DNA 損傷チェックポイントリカバリーを制御すること、またイマチニブによる DNA 損傷チェックポイントリカバリーの制御には PDGFR/c-Kit 様キナーゼを介することを見出した。

(6) SFK による Kap1 制御について解析を行った。Kap1 が SFK によってチロシンリン酸化を受けることを見出した。またこのチロシンリン酸化は Kap1 の Y449, Y458, Y517 において誘導されることを見出した。さらにこのチロシンリン酸化によって DNA 損傷応答後の ATM 依存的 KAP のリン酸化が促進されることを見出した(Kubota, J. Biol. Chem. 2014)。

(7) チェックポイントリカバリーにおける SFK による Cdc5L チロシンリン酸化について解析を行った。SFK による Cdc5L チロシンリン酸化部位のリン酸化ミミック変異体は ATR とのタンパク質-タンパク質相互作用が減弱していることを見出した。また SFK による DNA 損傷チェックポイント抑制の過程で Cdc5L がチロシンリン酸化を受けることを見出した。

以上の解析によって、DNA 損傷チェックポイ

ントリカバリーの SFK による制御機構の一端が明らかにされた。

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)

Yasunori Fukumoto, Mariko Morii, Takahito Miura, Sho Kubota, Kenichi Ishibashi, Takuya Honda, Aya Okamoto, Noritaka Yamaguchi, Atsushi Iwama, Yuji Nakayama, and Naoto Yamaguchi. Src family kinases promote silencing of ATR-Chk1 signaling in termination of DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* 査読有, *in press*. DOI: 10.1074/jbc.M113.533752.

Shoichi Kubota, Yasunori Fukumoto, Kenichi Ishibashi, Shuhei Soeda, Sho Kubota, Ryuzaburo Yuki, Yuji Nakayama, Kazumasa Aoyama, Noritaka Yamaguchi, and Naoto Yamaguchi. Activation of the pre-replication complex is blocked by mimosine through reactive oxygen species-activated ATM without DNA damage. *J. Biol. Chem.* 査読有, 289 (2014) 5730-5746. DOI: 10.1074/jbc.M113.546655.

Sho Kubota, Yasunori Fukumoto, Kazumasa Aoyama, Kenichi Ishibashi, Ryuzaburo Yuki, Takao Morinaga, Takuya Honda, Noritaka Yamaguchi, Takahisa Kuga, Takeshi Tomonaga, and Naoto Yamaguchi. Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and heterochromatin protein 1 (HP1) with heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 査読有, 288 (2013) 17871-17883. DOI: 10.1074/jbc.M112.437756.

Shuhei Soeda, Yuji Nakayama, Takuya Honda, Azumi Aoki, Naoki Tamura, Kohei Abe, Yasunori Fukumoto, and Naoto Yamaguchi. v-Src causes delocalization of Mklp1, Aurora B, and INCENP from the spindle midzone during cytokinesis failure. *Exp. Cell Res.* 査読有, 319 (2013) 1382-1397. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.02.023.

Kenichi Ishibashi, Yasunori Fukumoto, Hitomi Hasegawa, Kohei Abe, Shoichi Kubota, Kazumasa Aoyama, Sho Kubota, Yuji Nakayama, and Naoto Yamaguchi. Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 is antagonized by EGFR-activated c-Src. *J. Cell Sci.* 査読有,

126 (2012) 625-637. DOI: 10.1242/jcs.116277.

Yuji Nakayama, Yuki Matsui, Yumi Takeda, Mai Okamoto, Kohei Abe, Yasunori Fukumoto, and Naoto Yamaguchi. c-Src but not Fyn promotes proper spindle orientation in early prometaphase. *J. Biol. Chem.* 査読有, 287 (2012) 24905-24915. DOI: 10.1074/jbc.M112.341578.

[学会発表](計52件)

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. 2014 年 03 月 27 日 ~ 2014 年 03 月 30 日. 熊本.

久保田 翔, 福本 泰典, 青山 和正, 石橋 賢一, 幸 龍三郎, 盛永 敬郎, 本田拓也, 森井 真理子, 山口 憲孝, 久家 貴寿, 朝長 毅, 山口 直人. KAP1 のチロシンリン酸化による HP1 のヘテロクロマチン領域への結合阻害. 日本薬学会 第 134 年会. 2014 年 3 月 27 日 ~ 2014 年 3 月 30 日. 熊本.

久保田 将一, 福本 泰典, 石橋 賢一, 添田修平, 久保田 翔, 幸 龍三郎, 青山 和正, 山口 憲孝, 山口 直人. Mimosine による ATM 活性化を介した G1-S 期境界への細胞周期停止. 日本薬学会 第 134 年会. 2014 年 3 月 27 日 ~ 2014 年 3 月 30 日. 熊本.

九鬼 和雅, 福本 泰典, 森井 真理子, 長谷川 仁美, 石橋 賢一, 久保田 翔, 三浦 崇仁, 井出 雄大, 山口 憲孝, 山口 直人. Src 型チロシンキナーゼによる ATM 及び下流分子の活性制御. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日 ~ 2013 年 12 月 6 日. 兵庫.

久保田 将一, 福本 泰典, 石橋 賢一, 添田修平, 久保田 翔, 幸 龍三郎, 山口 憲孝, 山口 直人. mimosine によるチェックポイントを介した G1-S 期移行阻害の解析. 2013 年 10 月 26 日 ~ 2013 年 10 月 26 日. 東京.

久保田 翔, 福本 泰典, 青山 和正, 石橋 賢一, 幸 龍三郎, 盛永 敬郎, 本田拓也, 山口 憲孝, 久家 貴寿, 朝長 毅, 山口 直人. KAP1 のチロシンリン酸化によるクロマチン構造変化と転写制御. 第 86 回日本生化学会大会. 2013 年 9 月 11 日 ~ 2013 年 9 月 13 日. 大阪

九鬼 和雅, 福本 泰典, 森井 真理子, 長谷川 仁美, 石橋 賢一, 久保田 翔, 三浦 崇仁, 山口 直人. G1 期 DNA 損傷応答における

Src型チロシンキナーゼを介したATM-Chk2経路の制御. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27日~2013年3月30日. 神奈川.

久保田 翔, 福本 泰典, 青山 和正, 石橋 賢一, 盛永 敬郎, 本田 拓也, 久家 貴寿, 朝長 毅, 山口直人. SrcによるKAP1のチロシンリン酸化を介したヘテロクロマチン構造変換. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27日~2013年3月30日. 神奈川.

森井 真理子, 福本 泰典, 久保田 翔, 青山和正, 三浦 崇仁, 本田 拓也, 中山 祐治, 山口 直人. イマチニブによるDNA損傷チェックポイントの増強とG2期停止の延長. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27日~2013年3月30日. 神奈川.

久保田 将一, 福本 泰典, 石橋 賢一, 三浦崇仁, 山口 直人. Mimosineを用いたG1-S期境界への細胞周期同調. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27日~2013年3月30日. 神奈川.

石橋 賢一, 福本 泰典, 長谷川 仁美, 久保田 将一, 阿部 紘平, 幸 龍三郎, 青山 和正, 久保田 翔, 山口 直人. ErbB4によるヒストン修飾の誘導とチロシンリン酸化を介した制御. 日本薬学会第133年会. 2013年3月27日~2013年3月30日. 神奈川.

石橋 賢一, 福本 泰典, 長谷川 仁美, 阿部 紘平, 久保田 将一, 青山 和正, 久保田 翔, 中山 祐治, 山口 直人. 核内ErbB4チロシンリン酸化によるH3K9me3の誘導. 第85回日本生化学会大会. 2012年12月14日~2012年12月16日. 福岡.

三浦 崇仁, 福本 泰典, 久保田 将一, 森井 真理子, 本田 拓也, 中山 祐治, 山口 直人. DNA複製チェックポイントリカバリーにおけるSrc型チロシンキナーゼによるChk1制御. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月11日~2012年12月14日. 福岡.

九鬼 和雅, 福本 泰典, 森井 真理子, 長谷川 仁美, 三浦 崇仁, 山口 直人. DNA損傷応答におけるATM-Chk2経路へのSrc型チロシンキナーゼの関与. 第56回日本薬学会関東支部大会. 2012年10月13日. 東京.

井出 雄大, 福本 泰典, 久保田 翔, 長谷川 仁美, 久保田 将一, 長谷川 智津, 森井 真理子, 三浦 崇仁, 中山 祐治, 山口 直人. Src型チロシンキナーゼBrkの局在について. 第56回日本薬学会関東支部大会. 2012年10月13日. 東京.

久保田 将一, 福本 泰典, 石橋 賢一, 三浦 崇仁, 中山 祐治, 山口 直人. G1/S細胞

周期同調におけるmimosineとthymidineの比較検討. 第56回日本薬学会関東支部大会. 2012年10月13日. 東京.

森井 真理子, 福本 泰典, 久保田 翔, 青山 和正, 三浦 崇仁, 本田 拓也, 中山 祐治, 山口 直人. イマチニブによるKAP1制御を介したG2期細胞周期停止の延長. 第56回日本薬学会関東支部大会. 2012年10月13日. 東京.

久保田 翔, 福本 泰典, 青山 和正, 石橋 賢一, 久家 貴寿, 朝長 毅, 山口 直人. Src型チロシンキナーゼによるKAP1のチロシンリン酸化. 第11回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィोरラム. 2012年9月15日~2012年9月16日. 福岡.

他34件

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 泰典 (FUKUMOTO, Yasunori)
千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 10447310