

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17012012
 研究課題名（和文） シグナルのカスケードと細胞周期
 研究課題名（英文） Signal cascades regulating cell cycle

研究代表者
 西田 栄介（NISHIDA EISUKE）
 京都大学・大学院生命科学研究科・教授
 研究者番号：60143369

研究成果の概要（和文）：M 期タンパク質キナーゼである Plk1 の基質として、BubR1 と Myt1 の 2 つのタンパク質キナーゼを同定した。Plk1 による BubR1 のリン酸化は、M 期前中期における染色体の整列を促進する機能があることを示した。Myt1 については、M 期後期から終期におけるゴルジ体と小胞体の再構築に必要であることを示した。増殖刺激により活性化した ERK1/2 MAP キナーゼが、細胞周期の進行を抑制する遺伝子の発現を低下させることによって S 期への移行を促進することを示した。

研究成果の概要（英文）：We have identified two protein kinases, BubR1 and Myt1, as substrates of the M-phase protein kinase Plk1. Plk1 phosphorylation of BubR1 facilitated chromosome alignment during prometaphase while Myt1 was essential for Golgi and ER assembly during mitotic exit. We have also demonstrated that continuous ERK activation in response to growth factor stimulation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell cycle progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	12,300,000	0	12,300,000
2006 年度	12,300,000	0	12,300,000
2007 年度	12,300,000	0	12,300,000
2008 年度	12,300,000	0	12,300,000
2009 年度	12,300,000	0	12,300,000
総計	61,500,000	0	61,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：MAP キナーゼ、ERK1/2、G0/G1 期、M 期キナーゼ、Plk1、Myt1、細胞分裂期、転写ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

細胞周期の進行やチェックポイントならびに細胞分裂の制御は、細胞癌化や細胞増殖・分化の制御機構と密接に関連している。我々はこれまで細胞周期の進行に関与する現象、特に細胞周期制御因子の細胞内動態および

タンパク質キナーゼによるリン酸化を介した細胞周期制御機構の解明を目的として研究を進めてきた。また、我々は十数年前より MAP キナーゼを中心とするキナーゼカスケード反応の同定と機能解明において、先駆的役割を果たしてきた。MAP キナーゼカ

スケードは、様々な外界刺激（特に細胞増殖因子や発癌プロモーター）で活性化し、シグナルを核内へ伝える重要な細胞内シグナル伝達経路である。MAP キナーゼカスケードの細胞周期進行における役割を解明することは、細胞増殖や癌化メカニズム解明の観点からも重要である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞周期を制御するカスケード反応のうち、M 期の進行とチェックポイントを制御する M 期キナーゼネットワークと G0/G1 期から S 期への進行を制御する MAP キナーゼカスケードに焦点を絞り、両反応経路が細胞周期の進行および種々の細胞内事象を制御する分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

細胞周期において機能するタンパク質キナーゼ群の複雑かつ精妙なカスケード反応の生化学的解明を進める。また、従来の方法ではわからなかった生命現象とその分子的基盤を明らかにすべく、マイクロアレイを用いた網羅的な解析によるバイオインフォマティクスの手法と細胞生物学的手法を同時に取り入れる。

4. 研究成果

細胞周期の M 期の進行を制御するカスケード反応として M 期タンパク質キナーゼネットワークの解析を行った。進化的に高度に保存された M 期タンパク質キナーゼである Polo-like kinase1 (Plk1) に、まず着目し、その基質となりうる M 期のタンパク質キナーゼとして、M 期チェックポイントで機能する BubR1 と cdc2 (cdk1) の抑制機能をもつ Myt1 の 2 つのタンパク質キナーゼを同定した。BubR1 については Plk1 によるリン酸化部位を同定し、Plk1 による BubR1 のリン酸化が M 期前中期における染色体の整列を促進する機能があることを示した。Myt1 については、siRNA を用いたノックダウンによる解析から、Myt1 が cdc2 (cdk1) のネガティブな制御キナーゼであるにもかかわらず、G2 期から M 期への進入のタイミングの制御にはほとんど影響を及ぼさない、という驚くべき結果を得た。さらに Myt1 が細胞内膜系のゴルジ体と小胞体の M 期後期から終期における再構築に重要な役割を果たすことを示した。また、サイクリン B1 とサイクリン B2 のノックダウンの実験から、この Myt1 の機能は、サイクリン B1/Cdk1 とサイクリン B2/Cdk1 の双方のキナーゼ活性を M 期後期から終期にかけて抑制することを介していることが示された。細胞周期の M 期における染色体分配の分子機構を HeLa 細胞を用

いて解析し、低分子量 GTP 結合タンパク質 Cdc42 の作用機構を明らかにし、アクチン細胞骨格を介する経路と PI3 キナーゼを介する経路が存在することを示した。

細胞周期の進行を制御するシグナルのカスケード反応として MAP キナーゼカスケードに着目し、細胞増殖因子による増殖刺激において ERK1/2 MAP キナーゼ依存的に発現が上昇あるいは低下する遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定した。そのうち顕著な低下と高い ERK1/2 MAP キナーゼ依存性を示す 29 の遺伝子について解析を進め、7 遺伝子が G0/G1 期から S 期への進行を抑制する遺伝子として機能することを見出した。これらの遺伝子について、siRNA の手法でその発現を抑制すると、G0/G1 期から S 期への移行が促進されることも明らかとなった。これらの結果により、ERK1/2 MAP キナーゼが、細胞周期の進行を抑制する遺伝子の発現を低下させることによって、S 期への移行を促進するという新しい機構が明らかとなった。さらに、ERK1/2 MAP キナーゼによって発現が上昇する遺伝子群の一部が細胞周期の進行を促進することを示した。

細胞増殖因子の刺激によって Ras、ERK1/2 MAP キナーゼの活性が振動することを見出し、その振動の分子的基盤として ERK1/2 MAP キナーゼによる Sos のリン酸化が重要であることを示した。また、ERK1/2 MAP キナーゼ活性化と PI3 キナーゼ/Akt 経路との間に新たな相互作用様式があることを見出した。ERK1/2 MAP キナーゼの増殖因子刺激依存的な活性化調節において重要な役割を果たす因子である Sprouty の解析を進め、Sprouty の新しいターゲットを発見した。すなわち、Crk-L というアダプター分子が、Sprouty のチロシンリン酸化依存的に結合することを示した。その際の、Sprouty との結合には、Crk-L の SH2 ドメインと SH3 ドメインの双方が必須であることも明らかにした。さらにタイリングアレイ解析により、ERK1/2 MAP キナーゼの活性化が転写の波及効果を引き起こすことを明らかにした。すなわち、SRF による早期応答遺伝子の発現誘導の際、近傍の遺伝子の発現も誘導されるということが明らかとなった。

また我々は、MAP キナーゼファミリー分子の 1 つであり、増殖因子や酸化ストレス、高浸透圧刺激といった様々な細胞外からの刺激によって活性化される ERK5 の機能および細胞内動態の解析を行ない、ERK5 の細胞内局在が C 末端領域にある核内移行シグナル (NLS) と CRM1 依存的な核外移行シグナル (NES) という双方向の輸送シグナルによって能動的に制御されていることを見出した。ERK5 の N 末端領域あるいは C 末端領域単独では NES 活性を持たなかったこ

とから、ERK5 はリン酸化依存的な立体構造の変化で自身の NES の働きを調節し、その細胞内局在を制御していると示唆される。

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 4 2 件、全て査読あり)

1) Satoh, T., Torii, S., Nakayama, K., and Nishida, E. (2010). CrkL is a novel target of Sprouty2 in fibroblast growth factor signaling. *Genes Cells*. 15, 161-168.

2) Kosako, H., Yamaguchi, N., Aranami, C., Ushiyama, M., Kose, S., Imamoto, N., Taniguchi, H., Nishida, E., and Hattori, S. (2009). Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 1026-1035.

3) Tsuchiya, Y., Akashi, M., Matsuda, M., Goto, K., Miyata, Y., Node, K., and Nishida, E. (2009). Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Science Signaling* 2, ra26.

4) Mitsushima, M., Toyoshima, F., and Nishida, E. (2009). Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells. *Mol. Cell Biol.* 29, 2816-2827.

5) Hayashi, H., Tsuchiya, Y., Nakayama, K., Satoh, T., and Nishida, E. (2008). Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling. *Genes Cells* 13, 941-947.

6) Ebisuya, M., Yamamoto, T., Nakajima, M., and Nishida, E. (2008). Ripples from neighbouring transcription. *Nature Cell Biol.* 10, 1106-1113.

7) Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R., and Nishida, E. (2008). FGF induces oscillations of Hes1 expression and Ras/ERK activation. *Curr. Biol.* 18, 332-334.

8) Nakajima, H., Yonemura, S., Murata, M., Nakamura, N., Piwnica-Worms, H., and Nishida, E. (2008). Myt1 protein kinase is essential for Golgi and ER assembly during mitotic exit. *J. Cell Biol.* 181, 89-103.

9) Morimoto, H., Kondoh, K., Nishimoto, S., Terasawa, K., and Nishida, E. (2007). Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 35449-35456.

10) Toyoshima, F., Matsumura, S., Morimoto, H., Mitsushima, M., and Nishida, E. (2007). PtdIns(3,4,5)P3 Regulates Spindle Orientation in Adherent Cells. *Dev. Cell* 1, 796-811.

11) Matsumura, S., Toyoshima, F., and Nishida, E. (2007). Plk1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J. Biol. Chem.* 282, 15217-15227.

12) Toyoshima, F., and Nishida, E. (2007). Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J.* 26, 1487-1498.

13) Machida, M., Kosako, H., Shirakabe, K., Kobayashi, M., Ushiyama, M., Inagawa, J., Hirano, J., Nakano, T., Bando, Y., Nishida, E., and Hattori, S. (2007). Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *FEBS J.* 274, 1576-1587.

14) Kondoh, K., Sunadome, K., and Nishida, E. (2007). Notch signaling suppresses p38 MAPK activity via induction of MKP-1 in myogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 3058-3065.

15) Nishimoto, S., and Nishida, E. (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep.* 7, 782-786.

16) Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., and Nishida, E. (2006). Continuous ERK Activation Downregulates Antiproliferative Genes throughout G1 Phase to Allow Cell-Cycle Progression. *Curr. Biol.* 16, 1171-1182.

17) Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H., and Nishida, E. (2006). Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol. Cell Biol.* 26, 1679-1690.

18) Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R.E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., Matsuda, M. (2006). Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by

fluorescent probes. J. Biol. Chem. 281, 8917-8926.

19) Hayashi, H., Matsuzaki, O., Muramatsu, S., Tsuchiya, Y., Harada, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Matsuda, A., and Nishida, E. (2006). Centaurin-alpha is a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activator of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases. J. Biol. Chem. 281, 1332-1337.

20) Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. J. Cell Sci. 118, 2997-3002.

他 2 2 件

[学会発表](計 9 7 件)

1) Nishida, E. "MAP kinase signaling: Regulatory mechanisms and functions." International Conference on Radiation and Cancer Biology, Nagasaki University, Nagasaki, Japan, February 17-20, 2010

2) Nishida, E. "ERK MAP kinase signaling: Regulatory mechanisms and function." International Symposium on Frontiers of Protein Science, Senri Hankyu Hotel, Osaka, Japan, November 14, 2009

3) Nishida, E. "ERK MAP kinase signaling: Regulatory mechanisms and function." 8th International Conference on Protein Phosphatases, Maebashi TERRSA, Gunma, Japan, November 12-14, 2008

4) Ebisuya, M., Yamamoto, T., Nakajima, M., and Nishida, E. "Ripples from neighboring transcription" The 6th International Student Seminar, Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto, Japan, March 5-6, 2008

5) Mitsushima, M., Toyoshima, F., and Nishida, E. "Cdc42 and PAK2 Control the Mitotic Spindle Orientation in Mammalian Cells." The 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington Convention Center, Washington DC, USA, December 1-5, 2007

6) Imajo, M., Kondoh, K., Yamamoto, T., Nakayama, K., and Nishida, E. "Antagonistic Interactions between the Retinoic Acid Receptor and Ras/ERK Signaling Pathways in Colorectal

Cancer Cells." The 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington Convention Center, Washington DC, USA, December 1-5, 2007

7) Ebisuya, M., Yamamoto, T., and Nishida, E. "Ripples from neighboring transcription." The 7th International Workshop on Advanced Genomics, Tokyo International Forum, Tokyo, Japan, November 27-28, 2007

8) Kondoh, K., Terasawa, K., Morimoto, H., and Nishida, E. "Regulation of nuclear translocation of ERK5" Kyoto University 21st Century COE program "COE Formation in Frontier Life Science by Unifying Interactions" The 4th International Student Seminar, Kyoudai-Kaikan, Kyoto, Japan, March 6-9, 2006

9) Nishida, E. "Signal transduction by the ERK family of MAP kinases." International Symposium of Kobe University 21st COE Program on Signal Transduction, Kobe, Japan, February 9-11, 2006

10) Nishida, E. "M phase protein kinases and their function." International Symposium on Ran and Cell Cycle, Awaji, Japan, October 2-4, 2005

11) Nakayama, K., Kondoh, K., Kageyama, R. and Nishida, E. "FGF signaling regulates the oscillatory expression of Hes1 in cultured cells" The 15th International Society of Developmental Biologists Congress, Sydney, Australia, September 3-7, 2005

他 8 6 件

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 栄介 (NISHIDA EISUKE)

京都大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：60143369