

2018年度 課程博士学位論文

受容体型チロシンキナーゼ EphA2 による  
細胞分裂の制御機構

海堀祐一郎

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

Yuichiro Kaibori, Youhei Saito, Yuji Nakayama. EphA2 phosphorylation at Ser897 by the Cdk1/MEK/ERK/RSK pathway regulates M-phase progression via maintenance of cortical rigidity. *FASEB J.* **2019**, in press. [第 1-3 章]

# 目次

序論.....	1
本論.....	7
<b>第1章 受容体型チロシンキナーゼ EphA2 の阻害による細胞分裂の遅延.....</b>	<b>7</b>
1-1 緒言.....	7
1-2 実験方法.....	8
1-2-1 材料.....	8
1-2-2 Cdk1 阻害剤 RO-3306 を用いた細胞分裂期への同調と阻害剤の処理.....	8
1-2-3 siRNA の導入.....	9
1-2-4 ウェスタンブロット.....	9
1-2-5 細胞分裂の進行とその割合の評価.....	10
1-2-6 免疫蛍光染色法.....	10
1-2-7 多極紡錘体 (multipolar spindle) 形成率の評価.....	10
1-2-8 中心体局在の評価.....	11
1-3 実験結果.....	12
1-3-1 Eph ファミリー阻害剤が細胞分裂進行に及ぼす影響.....	12
1-3-2 細胞分裂への EphA2 の関与.....	13
1-4 考察.....	18
1-5 小括.....	18
<b>第2章 Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路依存的な EphA2 Ser897 のリン酸化による細胞分裂制御.....</b>	<b>19</b>
2-1 緒言.....	19
2-2 実験方法.....	20
2-2-1 材料.....	20
2-2-2 チミジン、RO-3306、MG-132 を用いた細胞分裂期への同調方法.....	21
2-2-3 プラスミド DNA の導入.....	21
2-2-4 免疫蛍光染色法による Cdk1 活性化の評価.....	21
2-3-5 フローサイトメトリー解析による細胞周期の評価.....	22
2-2-6 EphA2 Ser897Ala、Ser897Asp 変異体の作製.....	22
2-2-7 Gateway テクノロジーを用いた発現ベクターへの組み換え.....	23
2-2-8 レンチウイルスを用いた安定発現株の樹立.....	23
2-2-9 免疫沈降法.....	24
2-2-10 ドキシサイクリン (Dox) による誘導発現と siRNA の導入による 細胞分裂の進行の解析.....	25

2-3	実験結果.....	26
2-3-1	間期と細胞分裂期での EphA2 のリン酸化部位の変化.....	26
2-3-2	細胞分裂期において EphA2 Ser897 は RSK によりリン酸化される.....	29
2-3-3	EphA2 Ser897 のリン酸化は Cdk1 の活性化に起因する.....	30
2-3-4	EphA2 Ser897 リン酸化は細胞分裂進行に必要である.....	34
2-4	考察.....	40
2-5	小括.....	41
<b>第3章</b>	<b>EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路による cortical rigidity の制御.....</b>	<b>42</b>
3-1	緒言.....	42
3-2	実験方法.....	43
3-2-1	材料.....	43
3-2-2	免疫沈降法.....	43
3-2-3	免疫染色法.....	44
3-2-4	RhoG の cortex 局在率の評価.....	44
3-2-5	FLAG-RhoG WT と FLAG-RhoG Gly12Val 変異体の作製.....	44
3-2-6	Time-lapse imaging による blebbing 形成細胞の評価.....	45
3-3	実験結果.....	46
3-3-1	細胞分裂における Ephexin4 の役割.....	46
3-3-2	EphA2 p-Ser897/Ephexin4 経路依存的な RhoG の cortex 局在.....	48
3-3-3	RhoG のノックダウンによる細胞分裂進行の遅延.....	50
3-3-4	活性型 RhoG は EphA2 のノックダウンによる細胞分裂進行の遅延を回復する.....	51
3-3-5	EphA2 p-Ser897/RhoG 経路の抑制による cortical rigidity の低下.....	52
3-4	考察.....	57
3-5	小括.....	58
	総括.....	59
	引用文献.....	61
	謝辞.....	67
	補足データ.....	68

## 略語表

3' UTR :	3' untranslated region
A/T/C :	anaphase/telophase/cytokinesis
Ala :	alanine
BSA :	bovine serum albumin
Cdk1 :	cyclin-dependent kinase 1
DIC :	differential interference contrast
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO :	dimethyl sulfoxide
Dox :	doxycycline
FL :	full length
GEF :	guanine nucleotide exchange factor
GFP :	green fluorescent protein
Gly :	glycine
HRP :	horseradish peroxidase
IF :	immunofluorescence
IP :	immunoprecipitation
MTs :	microtubules
M 期 :	Mitotic phase
P/PM/M :	prophase/prometaphase/metaphase
PBS :	phosphate buffered salt
Plk1 :	polo-like kinase 1
PVDF :	polyvinylidene difluoride membrane
RTK :	receptor-type tyrosine kinase
SA :	Serine to Alanine substitution
SAC :	spindle assembly checkpoint
SD :	Serine to Aspartic acid substitution
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser :	Serine
siRNA :	small interfering RNA
STLC :	S-trityl-L-cysteine
Thr :	Threonine
Tyr :	Tyrosine
Val :	Valine
WT :	wild type

## 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程： 薬学専攻博士課程

氏名（英字名）： 海堀祐一郎（Yuichiro Kaibori）

学位論文題目： 受容体型チロシンキナーゼ EphA2 による細胞分裂の制御機構

### 序章

細胞は、S 期で染色体を複製し、G2 期を経て細胞分裂期に入ると、複製した染色体を均等に分配して2つの娘細胞へと分裂する。このDNA複製と細胞分裂のサイクル（細胞周期）を繰り返し、細胞は増殖する。細胞周期の中でも細胞分裂は特にダイナミックな形態変化を伴うが、緻密に制御され、この制御機構の破綻は染色体不安定性を介した細胞のがん化を引き起こす。これまで、細胞分裂に関する研究が精力的に進められ、Cdk1、Aurora A、Aurora B、Plk1 などのセリン/スレオニンキナーゼの重要性が示されてきたが、未だその全貌解明には至っていない。Epidermal growth factor receptor (EGFR)、vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)、c-MET などに代表される受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、そのリガンドである増殖因子との結合により活性化され、下流にシグナルを伝達する。RTK には、細胞の生存や増殖、分化の制御など多くの役割が存在するが、上述したセリン/スレオニンキナーゼと異なり、細胞分裂制御における RTK の機能はほとんど全く知られていない。

RTK である EphA2 は、細胞間接着において GPI アンカー型のリガンドである ephrin-A1 と結合すると、Tyr588 のリン酸化 (EphA2 p-Tyr588) とともに活性化し、EphA2 と ephrin-A1 を発現するそれぞれの細胞にシグナルが伝達し、細胞間に反発作用が生じる。発生過程では、隣接する異なる組織の細胞の混入を防ぐことで組織の領域形成に寄与し、がん細胞では増殖抑制にも寄与する。一方、リガンド非結合時には、増殖因子の刺激は他の RTK の活性化を介し、EphA2 Ser897 のリン酸化 (EphA2 p-Ser897) を亢進し、EphA2 はがん細胞の遊走促進など悪性化に寄与する。

新規の細胞分裂制御分子を見出すため、種々の阻害剤を細胞に処理し、細胞分裂に影響する阻害剤を探索した結果、EphA2 を阻害する NVP-BHG712 が細胞分裂の進行を阻害することを見出した。そこで本研究では、細胞分裂期における EphA2 の機能解析を行った。

### 第1章 受容体型チロシンキナーゼ EphA2 の阻害による細胞分裂の遅延

阻害剤のスクリーニングにより見出した NVP-BHG712 を細胞分裂期特異的に処理すると、ヒト子宮頸がん由来 HeLa S3 細胞の細胞分裂進行が遅延した。NVP-BHG712 の標的タンパク質の一つである EphA2 をノックダウンし分裂期細胞を観察したところ、HeLa S3 細胞に加え、ヒト乳がん由来 MDA-MB-231 細胞の細胞分裂の遅延が観察されたほか、多極紡錘体を形成している細胞や、紡錘体が細胞の中央ではなく細胞膜付近に偏っている細胞が多く観察された。また、正常細胞であるヒト網膜上皮由来 RPE-1 細胞においても EphA2 のノックダウンによる細胞分裂の遅延が観察された。これらの結果から、EphA2 による細胞分裂の制御機構が存在すること、さらに、EphA2 による細胞分裂制御機構はがん細胞のみならず、正常細胞においても保存されていることが示唆された。

### 第2章 Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路依存的な EphA2 Ser897 のリン酸化による細胞分裂制御

EphA2 は、p-Tyr588 を伴うリガンド依存的なシグナルに加えて p-Ser897 に起因するリガンド非依存的なシグナル経路を活性化する。チミジンによる S 期同調から進行させた分裂期細胞や、可逆的 Cdk1 阻害剤である RO-3306 による G2/M 期停止から進行させた分裂期細胞において、興味深いこと

に、EphA2 p-Tyr588 がほぼ完全に消失するとともに、明らかな EphA2 p-Ser897 の亢進が観察された。細胞分裂期における EphA2 Ser897 のキナーゼを MEK、RSK、Akt および PKA の阻害剤を用い探索したところ、MEK/ERK/RSK 経路によって Ser897 がリン酸化されることを見出した。さらに、非分解型 cyclin B1 と活性抑制を受けない Cdk1 の共発現により Cdk1 を活性化すると、MEK/ERK/RSK 経路の活性化とともに、EphA2 p-Ser897 が亢進し、MEK あるいは RSK の阻害剤処理により p-Ser897 が阻害された。これらに加え、内在性 EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延が野生型 EphA2 の再発現により回復した一方で、Ser897 がリン酸化されない EphA2 Ser897Ala 変異体の再発現では回復しなかった。以上のことから、細胞分裂期において、Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路による EphA2 p-Ser897 の亢進が細胞分裂進行を制御していることが明らかとなった。

### **第3章 EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路による cortical rigidity の制御**

間期では、EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG/Rac1 経路を介したアクチン骨格のリモデリングを伴うラメリポディアの形成促進が報告されているが、細胞分裂期における Ephexin4 および RhoG の機能は全く知られていない。Ephexin4、RhoG のいずれのノックダウンにおいても細胞分裂進行が遅延し、間期と同様、細胞分裂期においても p-Ser897 依存的に EphA2 が Ephexin4 と相互作用した。さらに、U0126 (MEK 阻害剤) 処理による細胞分裂期特異的な EphA2 p-Ser897 の抑制や Ephexin4 のノックダウンのいずれにおいても、分裂期細胞における RhoG の細胞膜局在が減少した。よって、Ephexin4 は EphA2 p-Ser897 の下流で、さらに RhoG は EphA2 p-Ser897/Ephexin4 の下流分子として機能していることが示唆された。そこで、EphA2 のノックダウンと同時に活性型 RhoG を誘導発現したところ、EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延が活性型 RhoG の発現により回復した。

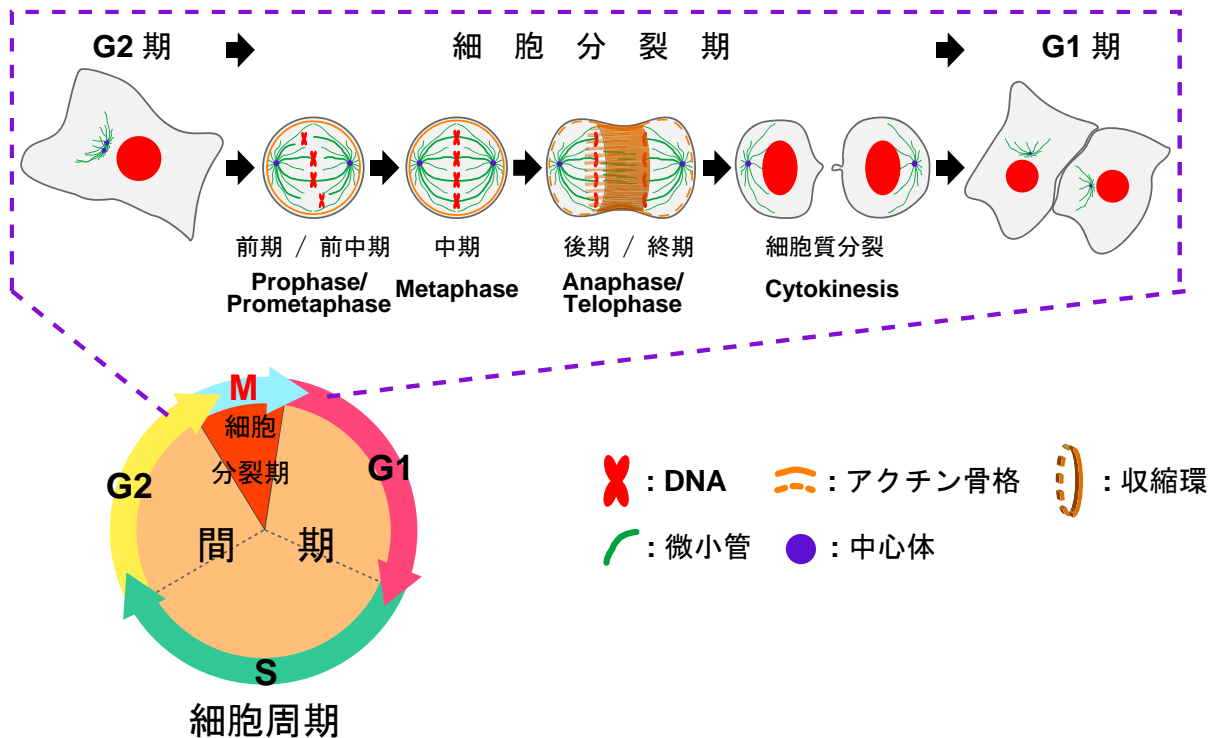
細胞分裂期における EphA2/Ephexin4/RhoG 経路の役割を調べるため、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B の低濃度存在下、U0126 処理により EphA2 p-Ser897 を抑制する、あるいは EphA2、RhoG をノックダウンすると、細胞膜の突出 (blebbing) を形成する細胞の割合が増加した。さらに、内在性 EphA2 ノックダウンによる blebbing 形成率の増加が野生型 EphA2 の誘導発現により回復したのに対し、Ser897Ala 変異体の誘導発現では回復しなかった。細胞膜やアクチン骨格の強度 (cortical rigidity) の低下により blebbing が惹起されることが知られている。よって、細胞分裂期に入ると EphA2 を足場として EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路が活性化され、細胞膜直下のアクチン骨格の強度 (cortical rigidity) を維持していることが示唆された。

### **総括**

Eph 受容体は RTK の最大のファミリーであり、Eph 受容体メンバーである EphA2 はリガンドや増殖因子の刺激により下流へとシグナルを伝達する。本研究では、細胞周期依存的に Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路が活性化し、リガンドや増殖因子に依存せず EphA2 Ser897 がリン酸化されることを明らかにした。さらにその下流では Ephexin4/RhoG 経路が活性化され、細胞分裂期における cortical rigidity の維持に寄与していることを見出した。つまり、EphA2 のノックダウンによる EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路の抑制は cortical rigidity の低下を介して多極紡錘体の形成や紡錘体の位置の偏りを引き起こし、細胞分裂を遅延させたと考えられる。一般的に、EphA2 p-Ser897 の抑制ががんの抑制に貢献すると考えられている。しかし、上記の結果から、EphA2 p-Ser897 の抑制は、細胞分裂の異常による染色体不安定性を引き起こし、細胞をがん化、あるいは、がんを悪性化させることが推測される。それ故、EphA2 をターゲットとした抗がん治療の開発はこの点も踏まえて検討するべきであろう。

## 序論

細胞はS期で染色体を複製し、G2期を経て細胞分裂期（M期）に入ると、複製した染色体を均等に分配し、2つの娘細胞へと分裂する。そしてG1期を経て再びS期へと進行する、このサイクル（細胞周期）を繰り返すことで細胞は増殖する（図I）。



(図I) 細胞周期と細胞分裂の進行の様子

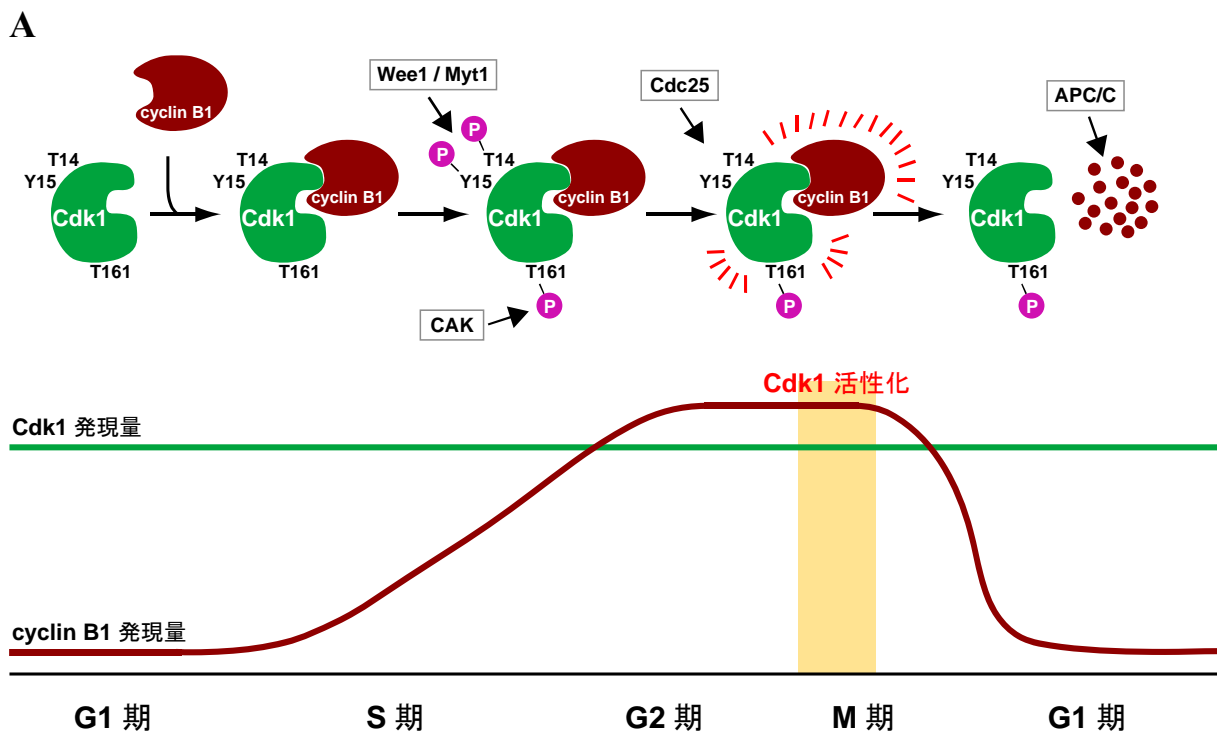
細胞はG1→S→G2→M（細胞分裂）期のサイクルを繰り返して増殖する。特にM（細胞分裂）期はダイナミックな形態変化を伴い、2つの娘細胞へと分裂する。

細胞周期は種々の cyclin と Cdk (cyclin dependent kinase) の複合体により調節されている。例えば、G1期からS期への移行は、cyclin D と Cdk4/6、cyclin E と Cdk2 がそれぞれ複合体を形成して Cdk を活性化することで遂行される。<sup>12</sup> 一方、G2期から細胞分裂期への移行は、Cdk1 の活性化を必要とする。S期に入り、転写因子である E2F1 の活性化と APC/C (ユビキチンリガーゼ) の不活性化により蓄積した cyclin B1 が G2期の終わりに核内に移行し、cyclin-box を介し Cdk1 と複合体を形成する（図II-A、B）。その後、Cdk1 は CAK により Thr161 がリン酸化され活性化し得るが、Myt1 や Wee1 により Thr14 と Tyr15 が抑制性のリン酸化を受けるため活性化されない。<sup>3-8</sup> その後、脱リン酸化酵素である Cdc25 により Thr14 と Tyr15 が脱リン酸化されると、Cdk1-cyclin B1 複合体が活性化状態となり、<sup>9-13</sup> 核膜の裏打ちタンパク質である Lamin<sup>14</sup> や、染色体凝縮において中心的な役割を果たすコンデンシン<sup>15</sup> など、種々のタンパク質をリン酸化して細胞分裂を開始する（図II-A）。さらに、細胞分裂中期 (metaphase) から後期 (anaphase) に進行する際には、APC/C が活性化されて cyclin B1 の

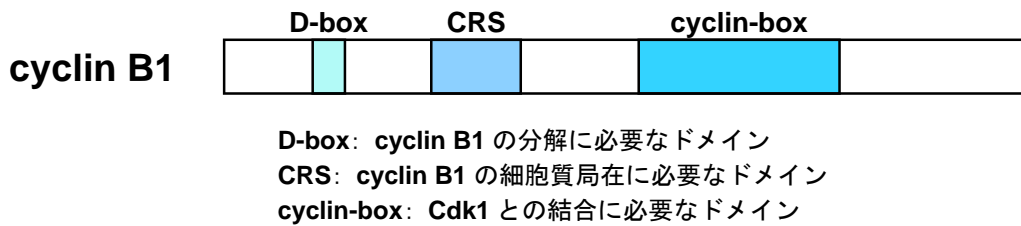


D-box 領域がポリユビキチン化され (図 II-A、B)、cyclin B1 が分解されることで Cdk1 の活性が低下する。これにより、細胞分裂開始の際にリン酸化されたタンパク質が脱リン酸化され細胞分裂が終了し、再び G1/S 期へと進行する (図 II)。<sup>16-18</sup>

細胞分裂期の細胞は非常にダイナミックに形態変化するため (図 I)、緻密に制御されている。Cdk1 が活性化し細胞分裂期になると、中心体から伸長した微小管上をモータータンパク質であるキネシン (微小管プラス端指向性モーター) が移動することで二つの中心体が分離し、二極性を持つ。<sup>19</sup> その後、両極の中心体から伸長した微小管からなる紡錘糸が染色体を捕獲し、染色体を細胞の赤道面上に整列する。細胞分裂期の紡錘糸は動原体微小管 (kinetochore MTs)、極間微小管 (interpolar MTs)、星状体微小管 (astral MTs) の 3 種類の微小管に分類される。動原体微小管は中心体と染色体上の動原体を結び、微小管と動原体が正しく結合すると紡錘体チェックポイント (SAC) による細胞周期の停止が解除され、染色体が微小管により両極に引っ張られることで細胞分裂後期が開始する。両側の中心体から伸長してきた極間微小管同士は細胞の赤道面付近で結束し、細胞分裂後期から終期にかけて中心体間の距離を伸長させる他、分裂面の位置決定にも寄与している。<sup>20</sup> 星状体微小管は中心体から染色体とは反対方向に放射状に伸長し、細胞膜直下のアクチン骨格に繋ぎ止められている。このように微小管は細胞分裂進行において重要な役割を担っており、微小管の機能が破綻すると、染色体の不均衡分配が起きた結果、染色体数の異なる娘細胞が産生し、染色体不安定性を介して細胞のがん化、がん悪性化を引き起こしてしまう。



## B

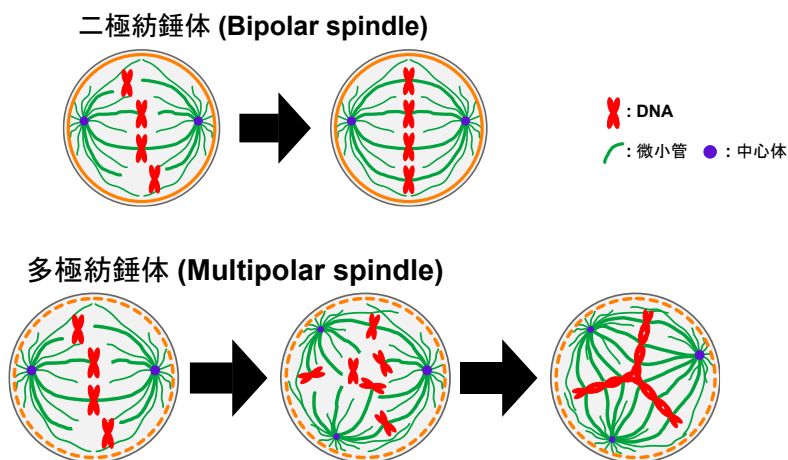


### (図II) 細胞周期と Cdk1 活性化の制御

(A) 細胞周期の進行と Cdk1 の活性化の制御。Cdk1 は S 期に入り蓄積した cyclin B1 と複合体を形成し、Myt1/Wee1 によって抑制性 (Thr14/Tyr15)、CAK により活性化 (Thr161) のリン酸化を受ける。その後、Cdc25 により抑制性のリン酸化部位が脱リン酸化されると Cdk1 は活性化状態になり、細胞分裂を開始する。細胞分裂後期では APC/C により cyclin B1 がユビキチン化されて分解し、再び Cdk1 は不活性化状態となる。

(B) cyclin B1 のドメイン構造。cyclin B1 は主に D-box (cyclin B1 の分解に必要)、CRS (cyclin B1 の細胞質局在に必要)、cyclin-box (Cdk1 との結合に必要) といったドメインにより構成されている。

細胞分裂期を通して、細胞の形態は微小管のみならず、アクチン骨格によっても制御されている。細胞分裂期に入ると同時に、多くの細胞では RhoA の活性化により細胞表面のアクチン骨格が収縮し、丸く浮き上がった形態をとる。<sup>21</sup> さらに、アクチン骨格は両極から染色体とは反対の細胞膜側に伸びた微小管 (星状体微小管; astral MTs) を介して中心体を繋ぎ止めている。これにより、両極の中心体や紡錘糸が細胞内で左右対称に保持され、両極から伸びた微小管が染色体の動原体に結合して染色体の赤道面上への整列と両極方向への分配が行われる。<sup>22</sup> しかし、細胞膜直下のアクチン骨格が脆弱化すると、星状体微小管をアクチン骨格に繋ぎ止めることが出来ず、微小管に生じていた張力が崩壊し、染色体整列の失敗、多極紡錘体 (multipolar spindle) の形成などの異常が現れる (図III)。<sup>23</sup> その後、多極紡錘体を形成した細胞が後期以降へと進行してしまうと、3 つ以上の細胞への分裂や小核の形成などが起こり、染色体不安定性の原因となる。<sup>23</sup>

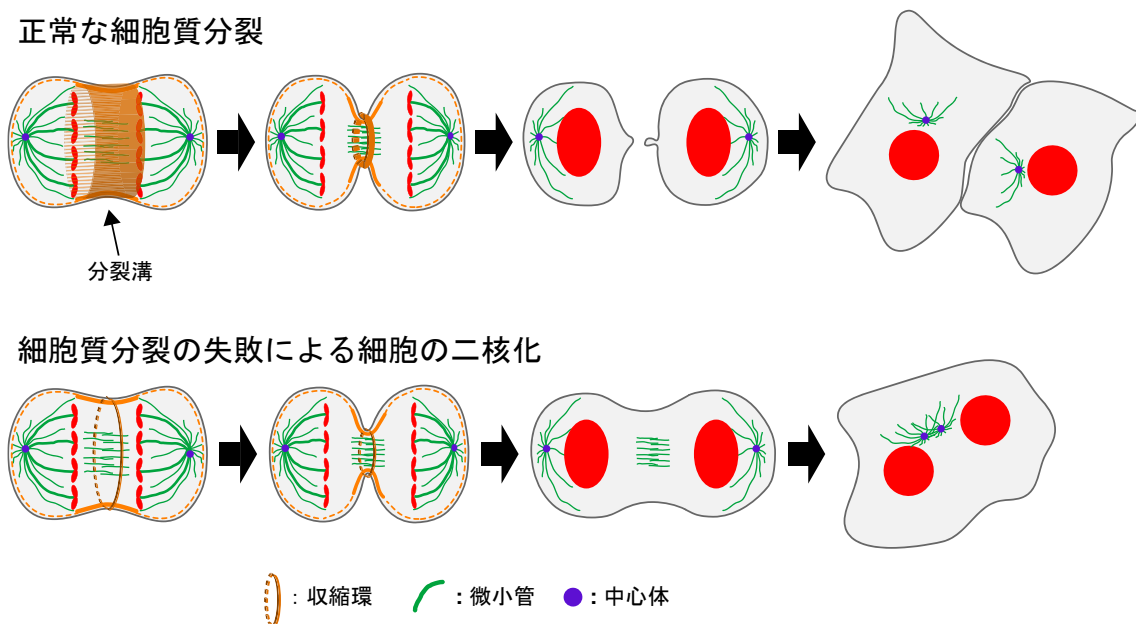


### (図III) 細胞分裂期における多極紡錘体 (multipolar spindle) の形成

通常、両極の中心体から伸長した微小管が動原体に結合して赤道面上に染色体が整列する (上段、二極紡錘体)。微小管に生じた張力のバランスが崩壊すると極が過剰 (3 つ以上) に形成され、それぞれの極から微小管が伸長し、染色体不安定性の原因となる (下段、多極紡錘体)。

細胞分裂後期以降においてもアクチンの寄与は大きく、後期から終期にかけてアクチンで構成された収縮環を形成し、分裂溝を形成して細胞質を2つに分配する(図IV)。しかし、アクチン骨格が正常に収縮せず、細胞質分裂(cytokinesis)が未完了のまま細胞分裂が終了すると二核細胞を形成し、染色体不安定性の要因となる(図IV)。

細胞分裂は主に前述したCdk1に加え、Aurora A/B キナーゼ、Plk1 によって制御されている。Aurora A はG2 期に中心体へと集積し、細胞分裂期に移行すると中心体の分離や、染色体の分配を制御する。<sup>24</sup> Aurora B はSAC を制御することで染色体の不均等分配を防ぎ、<sup>25</sup> 細胞分裂期後半では中央紡錘体(central spindle)を形成し、分裂の完了に関与する。<sup>26</sup> Plk1 はG2 期で中心体に局在し、中心体の成熟に寄与する他、細胞分裂期が進行するにつれPlk1 は染色体や中央紡錘体に局在することで細胞質分裂の完遂に寄与している。<sup>27</sup> これらは全てSer/Thr キナーゼであり、Tyr キナーゼによる細胞分裂の制御機構についての報告はあまり多くなく、特に受容体型チロシンキナーゼ(RTK)に関する報告はほとんどない。このように、細胞分裂の制御機構について多くの研究が行われてきたが、細胞分裂制御に関わる全ての分子が明らかになったわけではなく、未だその全貌を解明するには至っていない。



(図IV) 収縮環の形成不全による細胞の二核化

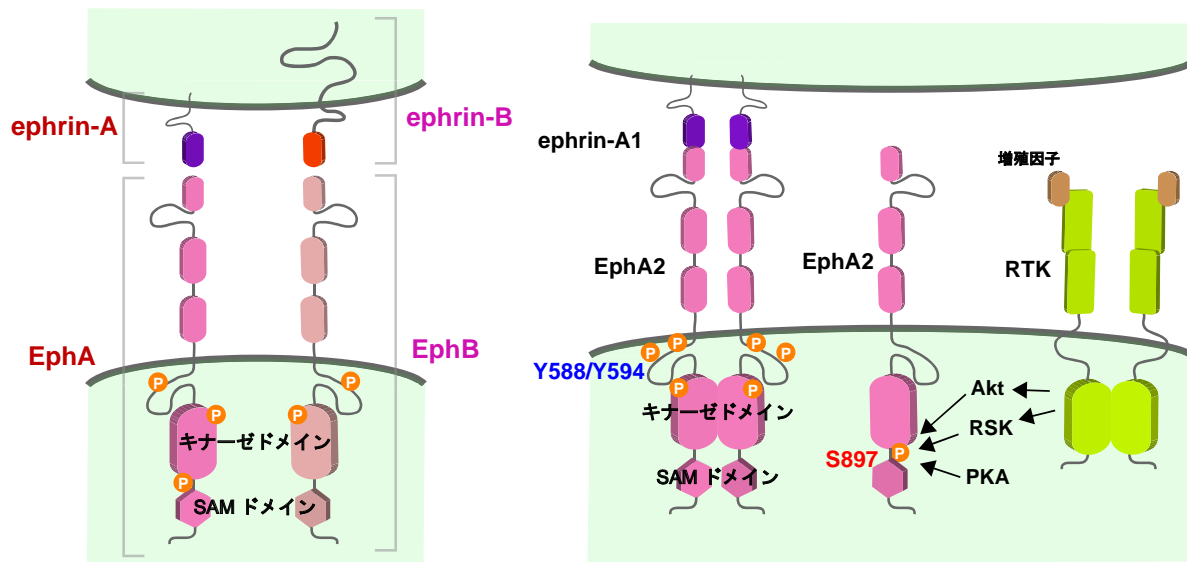
収縮環を構成するアクチン骨格が正常に収縮し、細胞質分裂が完了すると、均等に娘細胞に分裂する(上段)。アクチン骨格の収縮が不完全な場合、細胞質分裂が不完全なまま細胞分裂が完了し、二核細胞を産生する(下段)。

Epidermal growth factor receptor (EGFR)、vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)、c-MET などに代表される RTK は、一般的に、そのリガンドとなる EGF、VEGF、HGF などの増殖因子と結合することで活性化し、下流へとシグナルを伝達し、細胞の生存や増殖、分化の制御に関与している。

通常、RTK が過剰に活性化するとネガティブフィードバック機構により、RTK の活性が抑制される。

<sup>28</sup> 近年では RTK を標的にした抗がん剤が使用されているが、RTK あるいはその下流分子である Ras への変異導入が抗がん剤耐性獲得の原因として問題視されている。<sup>28-30</sup> そのため、変異導入の原因究明が、がん治療の一助になると考えられている。変異導入の要因の一つとして、前述したような、細胞分裂の失敗に起因する染色体不安定性が挙げられる。よって、細胞分裂メカニズムの更なる解明は、生命の神秘を解き明かすだけでなく、このような抗がん剤耐性獲得を防ぐ手段の開発に繋がる可能性を持っている。また、細胞分裂の制御機構の一端を明らかにできれば、新たな抗がん剤の開発も期待できる。そこで、所属研究室では新規の細胞分裂制御分子を探索するため、標的が明確にされている種々の阻害剤を細胞に処理し、阻害剤が細胞分裂に及ぼす影響を観察した。スクリーニングの結果、いくつかの阻害剤が候補として挙げられたが、驚くべきことに、複数の RTK 阻害剤が細胞分裂の異常を引き起こした。このことは、細胞分裂制御への RTK の関与の可能性を示唆する。

RTK において最大のファミリーである Eph 受容体はアミノ酸配列の違いやリガンドである ephrin との親和性から、サブクラス A (EphA) と B (EphB) に分類される。ほ乳類ではそれぞれ、9 種類のサブクラス A (EphA1-8,10) と 5 種類のサブクラス B (EphB1-4,6) の合計 14 種類の Eph 受容体が存在する。<sup>31</sup> リガンドである ephrin も構造的な違いからサブクラス A と B に分けられ、5 種類のサブクラス A (ephrin-A1-5) と 3 種類のサブクラス B (ephrin-B1-3) により構成される。<sup>32</sup> ephrin-A は GPI アンカー型、ephrin-B は膜貫通型の、どちらも膜結合型のリガンドであり、リガンドと Eph 受容体の両者が膜に局在するため、細胞同士が接着してはじめて Eph 受容体が活性化されシグナル伝達が起こる (図 V)。EphA2 は膀胱や大腸などに発現する EphA ファミリーメンバーであり、リガンドである ephrin-A1 と結合するとキナーゼ活性が亢進し、細胞膜直下にある EphA2 の 588/594 番目の Tyr 残基 (Y588/594) がリン酸化される。<sup>33,34</sup> さらに、ephrin-A1 と EphA2 の結合により、ephrin-A1 と EphA2 を発現するそれぞれの細胞にシグナルが入り、細胞間に反発作用が起こるという特徴も持つ。このシグナルは、発生過程において、隣接する異なる組織の細胞の混入を防ぐことで組織の領域形成に寄与している。<sup>35-37</sup> また、EphA2 が ephrin-A1 との結合により活性化すると、他の Eph 受容体同様、RasGAP を細胞膜にリクルートすることで MEK/ERK 経路を抑制して細胞増殖を抑制し、がん抑制に寄与することが知られている。<sup>38</sup> 一方、リガンド非結合時には、EGF、HGF などの増殖因子や TNF- $\alpha$  の刺激により、MEK/ERK/RSK 経路、<sup>39,40</sup> PI3K/Akt 経路、<sup>41</sup> あるいは PKA<sup>42</sup> により EphA2 の C 末端領域に存在する 897 番目の Ser 残基がリン酸化される。EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進すると、Ephexin4/RhoG/Rac1 経路が活性化され、アクチン骨格の形態変化を伴うラメリポディアの形成が促進する。これにより、細胞の遊走や浸潤が促進し、がん細胞の悪性化を引き起こす。<sup>43</sup> そのため、一般的に、リガンド依存的な経路ではがんを抑制し、EphA2 Ser897 のリン酸化を伴うリガンド非依存的な経路ではがん細胞の悪性化を促進すると考えられている。



(図V) Eph 受容体の構造と EphA2 のリン酸化の仕組み

EphA/B 受容体とそれらのリガンドである ephrin-A/B の構造 (左)。EphA は GPI アンカー型のリガンドである ephrin-A、EphB は膜貫通型の ephrin-B と結合して活性化する。EphA2 は ephrin-A1 と結合すると膜直下の Tyr588/594 がリン酸化されるとともに、活性化する (右)。ephrin-A1 と非結合時には増殖因子からのシグナルにより Akt あるいは RSK を介して Ser897 がリン酸化する。

前述したように、RTK は増殖、生存、分化など細胞のあらゆる機能に関与することが報告されており、現在も多くの研究が行われているにもかかわらず、細胞分裂期における役割についてはほとんど知られていない。これまでに、EphA2 の細胞分裂への関与として、間期と比べ、細胞分裂期での EphA2 の発現量が増加することや、<sup>44</sup> EphA2 の複数の Ser/Thr 残基のリン酸化亢進<sup>45</sup> がプロテオーム解析において報告されている。所属研究室で行った阻害剤を用いた予備的な検討結果と併せ、EphA2 が細胞分裂期において機能を持っている可能性が考えられた。そこで本研究では、スクリーニングの結果から新規の細胞分裂制御分子の候補として挙げられた RTK のうち、RTK において最大のファミリーを構成する Eph 受容体に着目し、その中でも特に研究が盛んな EphA2 の細胞分裂期における機能解析を行った。

# 第1章 受容体型チロシンキナーゼ EphA2 の阻害による細胞分裂の遅延

## 1-1 緒言

これまで、細胞分裂のメカニズムについての多くの研究が行われてきたが、細胞分裂を制御する全ての分子が明らかになったわけではない。そこでターゲット分子が明確にされている種々の阻害剤を細胞に処理し、分裂期細胞への影響を解析する事で新規の細胞分裂制御分子の探索を行った。阻害剤は短時間の処理でも効果を発揮するため、分裂期細胞に阻害剤を処理することで、細胞分裂への直接的な影響を解析することができる。つまり、阻害剤を用いた解析には、阻害剤標的分子の細胞分裂期特異的な機能を評価できるという利点がある。しかし、阻害剤は標的分子とは異なる分子にも影響を及ぼす、オフターゲット効果を示すことがある。このようなオフターゲット効果の問題は、阻害剤より特異性の高い siRNA を用いて阻害剤の標的分子の機能解析をすることで、克服することができる。よって、阻害剤と siRNA による機能解析を組み合わせることで、オフターゲット効果を除外した上で、標的分子が細胞分裂期に特異的な機能を有していることを示す必要がある。

本研究では、細胞分裂への関与を解析する際に、主に可逆的 Cdk1 阻害剤である RO-3306 を用いた。RO-3306 を細胞に処理すると、Cdk1 を阻害するため、細胞は G2 期と細胞分裂期の境界に同調される。RO-3306 の Cdk1 阻害効果は可逆的であるため、RO-3306 を除去すると細胞周期を再開し、G2 期から細胞分裂期へと移行する。このように、細胞分裂期の進行をおおよそ揃えることができるため、この手法は細胞分裂進行を含めた分裂期細胞の解析を行うのに有用である。

本章では Eph 受容体ファミリーの阻害剤が細胞分裂に与える影響と、その標的である受容体型チロシンキナーゼ EphA2 による細胞分裂への関与を評価した。

## 1-2 実験方法

### 1-2-1 材料

HeLa S3 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources (大阪)、hTERT RPE-1 細胞は American Type Culture Collection (#CRL-4000、Manassas、VA、USA) より購入した。HeLa S3 細胞は 2 mM L-グルタミン、20 mM HEPES (pH 7.4)、5% FBS を含む DMEM (日水製薬株式会社、東京) 培地中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。hTERT RPE-1 細胞は 10% FBS、0.01 mg/mL hygromycin B (nacalai tesque、京都) を含む DMEM/Ham's F12 (08460-95、nacalai tesque) 培地中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。hTERT RPE-1 細胞はヒトテロメア逆転写酵素 (hTERT) 遺伝子を RPE-1 細胞に導入して作製されており、正常 2 倍体の染色体数を持ったまま、初代培養細胞に近い状態を保持している。そのため、正常細胞のモデルとして用いることが可能となる。

本章で使用した抗体の情報とその使用時の希釈倍率を以下に示す。

- ・抗ラビット EphA2 抗体 : ×1000、#6997S、Cell Signaling Technology (Danvers、MA、USA)
- ・抗ラビット phospho-EphA2 Tyr<sup>588</sup> 抗体 : ×1000、#12677 S、Cell Signaling Technology
- ・抗ラビット phospho-EphA2 Ser<sup>897</sup> 抗体 : ×1000、#6347S、Cell Signaling Technology
- ・抗ラビット phospho-p90RSK Ser<sup>380</sup> 抗体 : ×1000、#11989S、Cell Signaling Technology
- ・抗ラビット phospho-Aurora A Thr<sup>288</sup>/Aurora B Thr<sup>232</sup>/Aurora C Thr<sup>198</sup> 抗体 : ×1000、#6997S、Cell Signaling Technology
- ・抗マウス IAK1 (Aurora A) 抗体 : ×1000、610938、BD Biosciences (San Jose、CA、USA)
- ・抗ラット  $\alpha$ -tubulin 抗体 : ×2000 (WB)、×800 (IF)、MCA78G、Bio-Rad (Hercules、CA、USA)
- ・抗マウス  $\gamma$ -tubulin 抗体 : ×400 (IF)、GTU-88、Sigma-Aldrich (St. Louis、MO、USA)
- ・HRP 標識抗マウス抗体 : ×4000、#7076S、Cell Signaling Technology または ×8000、115-035-174、Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove、Pennsylvania、USA)
- ・HRP 標識抗ラビット抗体 : ×4000、sc-2077、Santa Cruz Biotechnologies (Dallas、TX、USA) または ×8000、211-032-171、Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
- ・HRP 標識抗ラット抗体 : ×4000、sc-2964、Santa Cruz Biotechnologies または ×8000、712-035-153、Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
- ・Alexa Fluor 488 標識抗マウス抗体 : ×1000、Invitrogen (Carlsbad、CA、USA)
- ・Alexa Fluor 555 標識抗ラット抗体 : ×1000、Invitrogen

### 1-2-2 Cdk1 阻害剤 RO-3306 を用いた細胞分裂期への同調と阻害剤の処理

HeLa S3 細胞を 24 穴プレートに播種し一晩培養した後、可逆的 Cdk1 阻害剤である RO-3306 (Selleck Chemicals、Houston、TX、USA) を 6-9  $\mu$ M の濃度で 20 時間処理し、細胞を G2 期と M 期の境界に停止させた。細胞分裂期に入っている細胞が約 5% 以下であることを顕微鏡で確認した後、予め 37°C に温

めておいたPBS (-) にCaCl<sub>2</sub>とMgCl<sub>2</sub>を加え [PBS (+)], これを用いて37°Cの温浴上で細胞を4回洗った [1 mL/穴×4]。37°Cに温めておいたDMEMを添加し、2時間培養した後、分裂期の細胞を観察した。RO-3306を用いて同調を行う際は温度管理が重要であるため、可能な限り37°Cを維持するようにした。siRNAを用いた解析を行う際は、1-2-3で記載する手順でsiRNAを添加して28時間後にRO-3306を処理し、以降は上記と同様の手順で細胞分裂期へと進行させた。阻害剤を細胞分裂期特異的に作用させるため、RO-3306によるG2/M期の停止から細胞周期を再開する際に、HeLa S3細胞にEphファミリー阻害剤である1 μM NVP-BHG712 (AdooQ BioScience, Irvine, CA, USA) を処理し、2時間後、分裂期の細胞を観察した。あるいはRO-3306による細胞周期の停止から細胞周期を再開して30分後に、1 μM NVP-BHG712と10 μM MG-132 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) を含むDMEMに交換し、1時間後、mitotic shake-offにより分裂期細胞を回収し、ウエスタンブロットにより解析した (1-2-4参照)。RO-3306の力価はロット間において差があるため、その都度、濃度検討を行った。

### 1-2-3 siRNA の導入

HeLa S3 または hTERT RPE-1 細胞を 24 穴プレートに播種し一晩培養した。以下、1 穴当たりの手順を記載する。Opti-MEM (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) 20 μL に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 1 μL、Opti-MEM 20 μL に 20 pmol siRNA を加え、これら 2 液を混合し、室温で 20-30 分静置した。その間に 24 穴プレートの培養液を除去し、予め 37°C に温めておいた DMEM 400 μL に交換した。混合した液を培地に添加し、48 時間後にウエスタンブロットや免疫染色による解析を行った。全ての siRNA は Sigma-Aldrich 社から購入し、用いた siRNA の製品番号や配列を以下に示す。

siEphA2 #1: Hs01\_00026514

siEphA2 #2: Hs01\_00026515

siEphA2 #3: 5'-CGGACAGACAUAUAGGAUAUU-3'; 3'-UTR

### 1-2-4 ウエスタンブロット

培養液を除去し、細胞を PBS (-) で 1 回洗った。2 μg/mL アプロチニン (Seikagaku Kogyo, 東京)、0.8 μg/mL ペプスタチン A (WAKO, 大阪)、2 μg/mL ロイペプチン (nacalai tesque)、2 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (nacalai tesque)、20 mM β-グリセロリン酸 (Sigma-Aldrich)、50 mM フッ化ナトリウム (WAKO)、10 mM オルトバナジン (V) 酸ナトリウム (WAKO) を含む SDS サンプルバッファーに細胞を溶解し、100°C で 5 分間煮沸した。特に分裂期の細胞を回収する際には、文鎮でディッシュを叩いて分裂期の細胞をディッシュから剥がし (mitotic shake-off)、培養液ごと回収した。室温で 5 分間 800 rpm で遠心した後、上清を除去して 1 mL の PBS (-) で細胞を洗い込み、1.5 mL チューブに移し、swing man (アズワン、大阪) で 1-2 分間遠心した。その後、上清の PBS (-) を除去し、上記同様、種々のプロテアーゼ阻害剤やホスファターゼ阻害剤を含む SDS サンプルバッファーに溶解し、100°C で 5 分間煮沸した。SDS-PAGE (7.5%ゲル、5-10 μL/lane) によりタンパク質を分離し、



タンク式トランスファー装置を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレン (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) に転写した。そのメンブレンを Blocking One (nacalai tesque) に浸して室温で1時間振盪した後、5% Blocking One、0.1%  $\text{NaN}_3$  を含む TTBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、137 mM NaCl、0.1% Tween 20] で希釈した一次抗体を室温で1-3時間あるいは4°Cで一晩反応させた。TTBS を数回交換してメンブレンを合計20分間振盪させて洗い、5% Blocking One を含む TTBS で希釈した HRP 標識二次抗体と室温で1-3時間反応させた。再度メンブレンを TTBS で洗った後、Chemi Lumi-One L (nacalai tesque) または Clarity (Bio-Rad) 化学発光基質に浸し、ChemiDoc XRSplus イメージアナライザー (Bio-Rad) によりバンドシグナルを検出した。

### 1-2-5 細胞分裂の進行とその割合の評価

RO-3306 処理による G2/M 期の停止から細胞周期を再開させて2時間後に細胞を免疫染色し、分裂期の細胞を観察した。分裂期の細胞を前期/前中期 (prophase/prometaphase; P/PM)、中期 (metaphase; M)、後期/終期 (anaphase/telophase; A/T)、細胞質分裂 (cytokinesis; C) に分類した後、さらにこれらを後期 (anaphase) 以前 (P/PM/M) と以降 (A/T/C) の2つに分類した。分裂期細胞の各期は微小管と DNA の形態により判断した。また、細胞分裂期と間期の細胞を計測し、分裂期細胞の割合を mitotic index として示した。

### 1-2-6 免疫蛍光染色法

カバーガラスに播種した細胞を、37°Cに温めておいた、4% HCHO を含む PBS (-) により室温で20分間固定した。特に $\gamma$ -tubulin を染色する際には、4% HCHO、20% MeOH を含む PBS (-) により室温で20分間固定した後 PBS (-) で3回洗い、冷100% MeOH を加え-30°Cで5分間処理した。固定後はいずれも PBS (-) で3回洗い、0.1% サポニン/3% BSA/PBS (-) により室温で30分間静置してブロッキングと透過処理を行った。0.1% サポニン/3% BSA/PBS (-) で希釈した一次抗体に室温で1時間反応させた後、0.1% サポニン/PBS (-) で細胞を3回洗い、0.1% サポニン/3% BSA/PBS (-) で希釈した二次抗体を室温で1時間反応させた。1  $\mu\text{M}$  Hoechst 33342 を二次抗体の希釈液に混ぜて DNA の染色も同時に行った。画像取得や蛍光観察は IX-83 蛍光顕微鏡 (Olympus、東京) を用いた。画像は 60 $\times$  1.42 NA 油浸対物レンズ (Olympus) を用い、Hoechst 33342、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555 の蛍光をそれぞれ U-FUNAcube (360–370 nm excitation、420–460 nm emission)、U-FBNAcube (470–495 nm excitation、510–550 nm emission)、U-FRFPcube (535–555 nm excitation、570–625 nm emission) を用いて検出した。取得した画像は ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health、Bethesda、MD、USA)、Photoshop Elements 12、Illustrator CS2 ソフトウェア (Adobe、San Jose、CA、USA) を用いて編集した。

### 1-2-7 多極紡錘体 (multipolar spindle) 形成率の評価

$\alpha$ -tubulin および  $\gamma$ -tubulin を免疫染色した細胞を蛍光顕微鏡により観察し、染色体が整列している分裂期細胞のうち multipolar spindle を形成している細胞の割合を算出した。multipolar spindle は微小管の形態あるいは  $\gamma$ -tubulin の局在をもとに判断した。

### 1-2-8 中心体局在の評価

$\alpha$ -tubulin および  $\gamma$ -tubulin を免疫染色し、染色体が整列し、かつ bipolar spindle を形成している細胞を蛍光顕微鏡により無作為に画像取得し、それぞれの中心体 ( $\gamma$ -tubulin) から最も近い細胞膜との距離を計測し、それらの差を算出し、絶対値で示した (図 1-5; asymmetry)。また、同時に中心体間 ( $\gamma$ -tubulin 間) の距離も計測した (図 1-5; spindle length)。これらの距離の計測は Cell Sense Dimension (Olympus) ソフトウェアを用いて行った。

### 1-3 実験結果

#### 1-3-1 Eph ファミリー阻害剤が細胞分裂進行に及ぼす影響

阻害剤のスクリーニングの結果、新規の細胞分裂制御分子の候補として NVP-BHG712 を見出した。NVP-BHG712 は受容体型チロシンキナーゼ Eph ファミリーの阻害剤であり、その細胞分裂に及ぼす影響を評価した。

可逆的 Cdk1 阻害剤である RO-3306 を HeLa S3 細胞に 20 時間処理して G2 期と細胞分裂期の境界に停止させ、その後、RO-3306 を除去すると細胞周期が再開し、細胞分裂期へと進行する。RO-3306 による G2/M 期での停止から細胞周期を再開して 30 分、60 分、90 分後に、おおよそ中期 (metaphase)、後期/終期 (anaphase/telophase)、細胞質分裂 (cytokinesis) の細胞を、それぞれ観察することができる。そのため、RO-3306 を除去する際に阻害剤を処理すれば、細胞分裂期特異的な阻害剤の影響を観察することが可能となる。そこで、HeLa S3 細胞を RO-3306 により G2/M 期に停止させ、RO-3306 による G2/M 期での停止から細胞周期の再開と同時に NVP-BHG712 を処理した。その結果、溶媒コントロール (DMSO) では 65% の細胞が後期 (anaphase) 以降 (A/T/C) に進行しているのに対して、NVP-BHG712 処理により 65% の細胞が anaphase 以前 (P/PM/M) に留まっていた (図 1-1-a) ため、NVP-BHG712 が細胞分裂の遅延を引き起こすことが示唆された。また、DMSO 処理群と NVP-BHG712 処理群で分裂期細胞の割合に差がなかったこと (図 1-1-b) から、G2 期から細胞分裂期への移行の阻害によるものではなく、細胞分裂進行の遅延であることが考えられる。

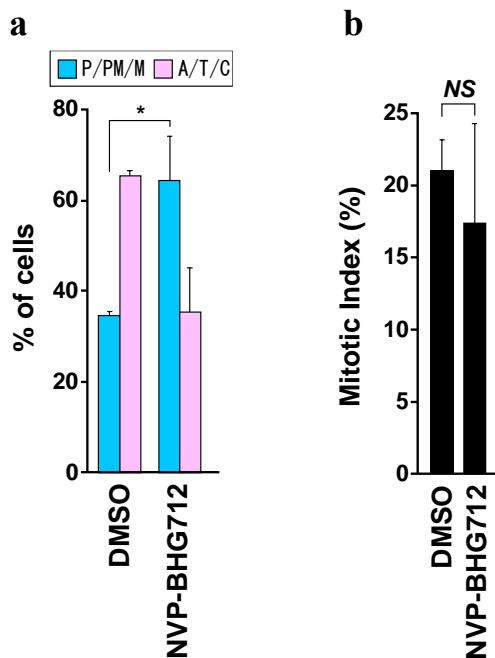
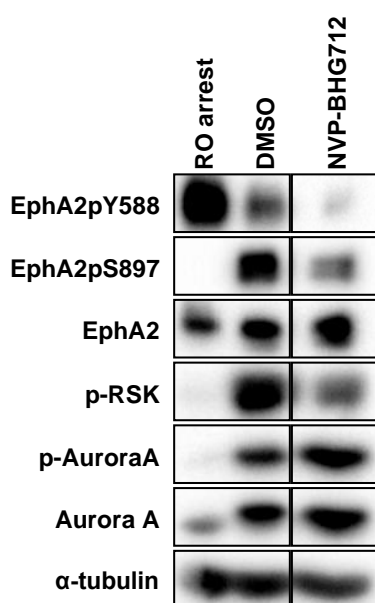


図 1-1 NVP-BHG712 による細胞分裂の進行の遅延

HeLa S3 細胞に 9  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理した後、PBS (+) で細胞を洗い RO-3306 を除去し、DMSO (溶媒コントロール) あるいは 1  $\mu$ M NVP-BHG712 存在下で 2 時間培養した。細胞を固定し、免疫染色を行い、微小管と DNA の形態をもとに分裂期の細胞を anaphase 以前 [Prophase/Prometaphase/Metaphase (P/PM/M)] と以降 [Anaphase/Telophase/Cytokinesis (A/T/C)] に分類し、それぞれの割合を算出した (a)。間期と分裂期の細胞をカウントし、分裂期細胞の割合を算出した (b)。各実験で 184 個以上の細胞を解析した。データは平均  $\pm$  S.D. で表し、検定は Student's t-test により行った ( $n=3$ , \* $p < 0.05$ , NS, not significant)。

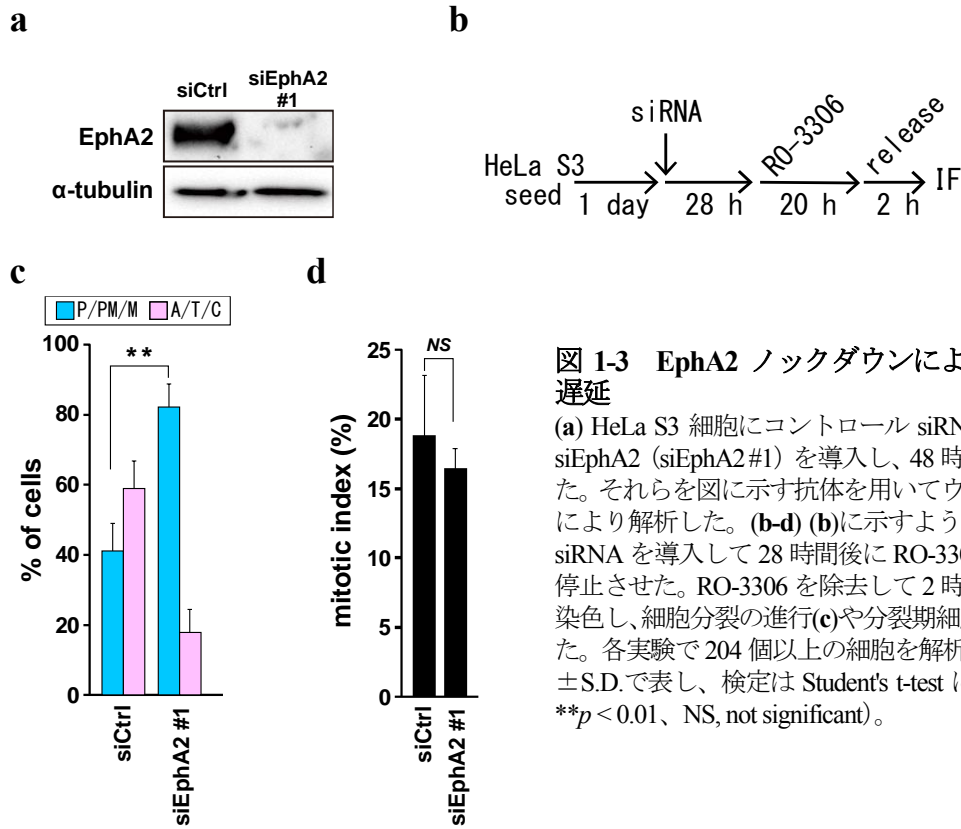
NVP-BHG712 は EphB4 の Tyr キナーゼ活性を抑制することが報告されているが、EphB4 以外にも EphB2、EphA2、EphB3、EphA3 などの他の Eph 受容体も低濃度で阻害することが知られている。<sup>46</sup> 細胞分裂期特異的に NVP-BHG712 を処理したところ、EphA2 の Tyr キナーゼ活性の指標である 588 番目の Tyr 残基のリン酸化レベル (EphA2pY588) が低下した (図 1-2)。図 1-2 において、間期 (RO arrest) と比べ、細胞分裂期 (DMSO、NVP-BHG712) 特異的に観察された Aurora A や RSK のリン酸化の亢進は、これらのサンプルが分裂期細胞であることを示している。以上の結果より、NVP-BHG712 は Eph 受容体の Tyr キナーゼ活性を阻害することで細胞分裂の進行を遅延する可能性が考えられた。そこで本研究では、NVP-BHG712 の標的分子である Eph 受容体のうち、その機能解析が最も盛んな EphA2 に着目して解析を進めた。



**図 1-2 NVP-BHG712 による EphA2 のリン酸化抑制**  
 HeLa S3 細胞に 9  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理した後、30 分間培養し、10  $\mu$ M MG-132 存在下で DMSO または 1  $\mu$ M NVP-BHG712 を処理した。mitotic shake-off により分裂期の細胞を回収し、対照群として RO-3306 を 20 時間処理した間期の細胞を用いた (RO arrest)。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

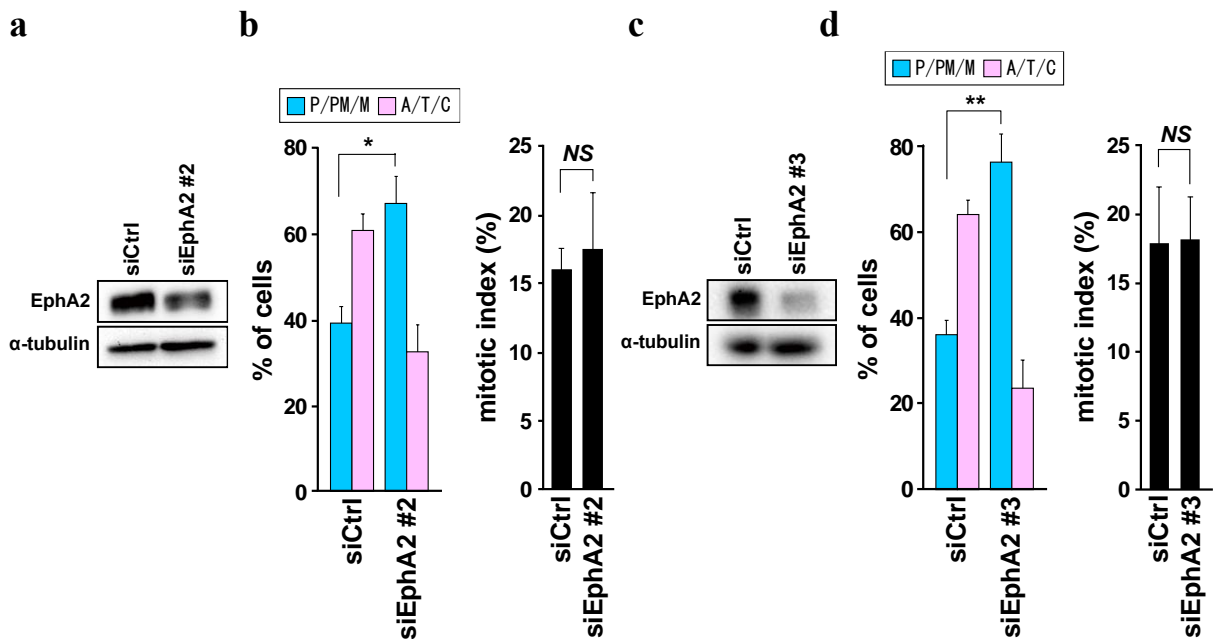
### 1-3-2 細胞分裂への EphA2 の関与

NVP-BHG712 の標的分子の 1 つである EphA2 が細胞分裂に関与するかを調べるため、siRNA により EphA2 をノックダウンし (図 1-3-a)、細胞分裂の進行および紡錘体の形態を解析した (図 1-3-b)。その結果、コントロール siRNA 処理群では 59% の細胞が後期以降 (A/T/C) に進行しているのに対し、siEphA2 処理群では 82% の細胞が後期以前 (P/PM/M) に留まっていた (図 1-3-c)。これは、NVP-BHG712 処理時と同様、EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延を示している。また、コントロール siRNA 処理群と siEphA2 処理群では分裂期細胞の割合に差は見られなかった (図 1-3-d)。よって、EphA2 のノックダウンによる細胞分裂進行の遅延は、G2 期から細胞分裂期への移行を阻害したためではないと考えられる。他の 2 種類の siRNA を用いた解析においても同様の結果が得られており、siRNA の標的配列依存的なオフターゲット効果ではない事も確認した (図 1-4)。以上の結果より、EphA2 による細胞分裂の制御機構の存在が明らかになった。



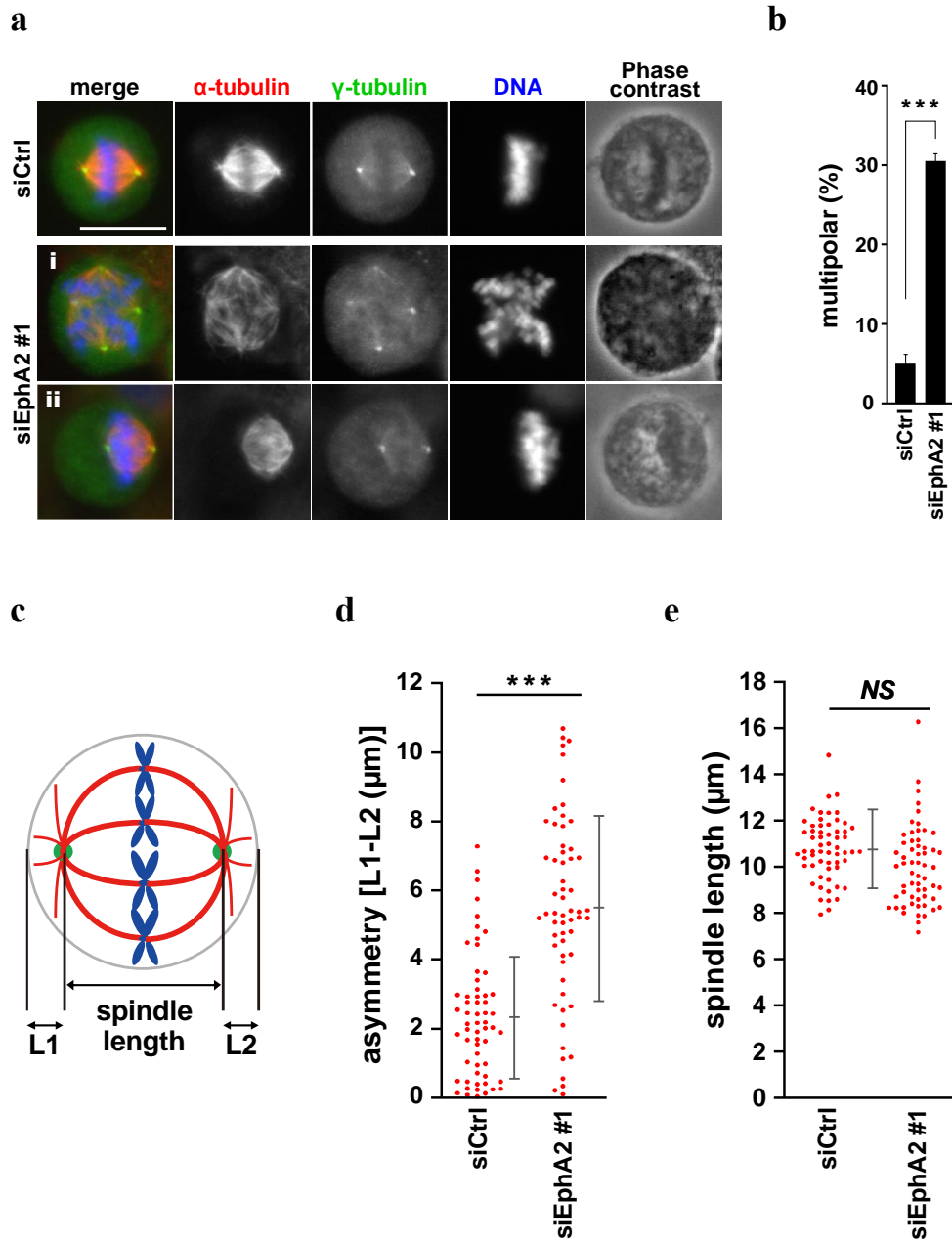
**図 1-3 EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延**

(a) HeLa S3 細胞にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (siEphA2 #1) を導入し、48 時間後の細胞を回収した。それらを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。(b-d) (b)に示すように、HeLa S3 細胞に siRNA を導入して 28 時間後に RO-3306 により G2/M 期に停止させた。RO-3306 を除去して 2 時間後に固定して免疫染色し、細胞分裂の進行(c)や分裂期細胞の割合(d)を評価した。各実験で 204 個以上の細胞を解析した。データは平均 ± S.D. で表し、検定は Student's t-test により行った ( $n=3$ ,  $**p < 0.01$ , NS, not significant)。



**図 1-4 標的配列の異なる EphA2 siRNA による細胞分裂進行の遅延**

HeLa S3 細胞にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (a, b; siEphA2 #2, c, d; siEphA2 #3) を導入し、48 時間後に回収した。それらを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した (a, c)。図 1-3-b と同様に siRNA を導入し、RO-3306 による G2/M 期の停止から細胞周期を再開させて 1.5 時間後の細胞分裂の進行や分裂期細胞の割合を評価した (b, d)。各実験で 202 個以上の細胞を解析した。データは平均 ± S.D. で表し、検定は Student's t-test により行った ( $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , NS, not significant)。



**図 1-5 EphA2 ノックダウンによる微小管形態異常の誘導**

siRNA により HeLa S3 細胞の EphA2 をノックダウンし (siEphA2 #1)、 $\alpha$ -tubulin、 $\gamma$ -tubulin と DNA を染色し、分裂期の細胞を観察した (a)。染色体が整列している分裂期細胞のうち、多極紡錘体 (multipolar spindle) を形成している細胞の割合を算出した (b)。染色体が整列している分裂期細胞において、微小管の形態を評価した (c-e)。簡単な計測方法を (c) に示した。それぞれの中心体から最短に位置する細胞膜までの距離の差の絶対値と (d)、中心体間の距離を測定して微小管の長さ (e) をコントロール siRNA と siEphA2 #1 で比較した。各実験で 73 個以上の細胞を解析した。データは平均 $\pm$ S.D.で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3, \*\*\* $p$ <0.001, NS, not significant)。Scale bar: 20  $\mu$ m

また、EphA2 をノックダウンすると図 1-3 の分裂進行の遅延以外にも、通常の二極紡錘体ではなく、多極紡錘体 (multipolar spindle) が観察された (図 1-5-a-i)。そこでその細胞の割合を定量したところ、コントロール siRNA 処理群と比べて siEphA2 処理群では有意に多極紡錘体の形成率が増加して

いた (図 1-5-b)。その他にも、染色体が整列した時に微小管が細胞の中央ではなく、細胞膜の付近に偏っている、微小管の位置が非対称な細胞も観察された (図 1-5-a-ii)。実験方法 1-2-8 で記述した方法でそれぞれの中心体から細胞膜までの距離の差を定量した結果、コントロール siRNA と比べて siEphA2 処理により増加した (図 1-5-c, d)。一方、微小管の長さ (spindle length; 中心体間の距離) には差が見られなかった (図 1-5-c, e)。よって、EphA2 のノックダウンにより、微小管の長さには影響を及ぼさないものの、染色体が整列した際の微小管の位置の非対称性が上昇していた。多極紡錘体を形成している細胞や、微小管の位置が非対称な細胞では細胞分裂の進行が遅延することが知られている。<sup>47,48</sup> そのため、EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延は、多極紡錘体や微小管の非対称性により引き起こされたと考えられる。これらのことから、EphA2 は正常な二極紡錘体を形成することで細胞分裂を正常に進行させていると考えられる。

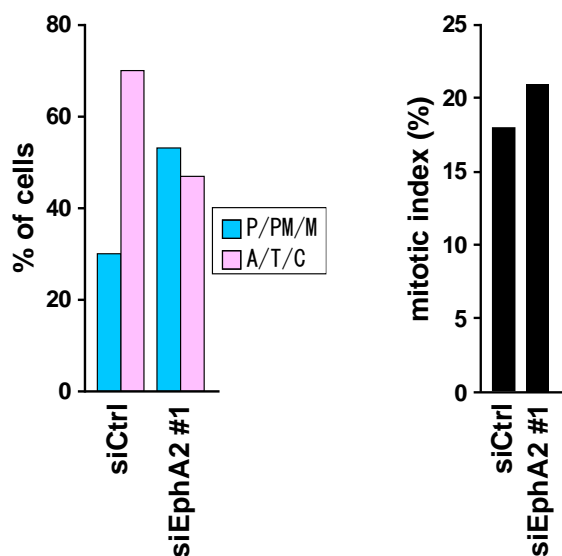


図 1-6 MDA-MB-231 細胞の EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延

MDA-MB-231 細胞にコントロール siRNA あるいは siEphA2 (siEphA2 #1) を導入した。28 時間後、8  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理し、PBS (+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。微小管や DNA の形態をもとに分裂期細胞を分類し、細胞分裂の進行や分裂期細胞の割合を評価した。それぞれ 211 個の細胞を解析した。

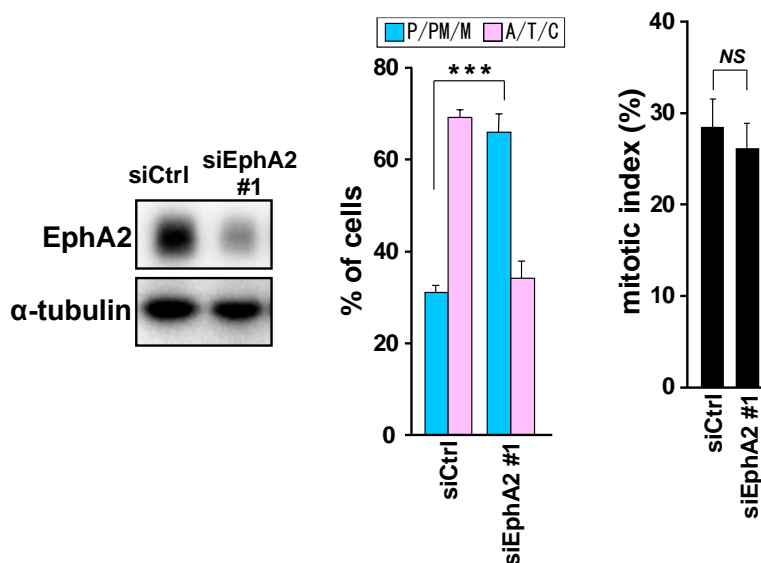


図 1-7 hTERT RPE-1 細胞での EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延

hTERT RPE-1 細胞に図 1-6 と同様に siRNA を導入し (siEphA2 #1、a)、RO-3306 による G2/M 期の停止から解放して 1 時間後の細胞分裂の進行や分裂期細胞の割合を評価した (b)。HeLa S3 細胞と比べ、hTERT RPE-1 細胞は細胞分裂に要する時間が短いいため、RO-3306 からの解放時間を 1 時間に短縮して解析した。各実験で 205 個以上の細胞を解析した。データは平均  $\pm$  S.D. で表し、検定は Student's t-test により行った ( $n=3$ ,  $***p < 0.001$ , NS, not significant)。

ここまでヒト子宮頸がん細胞である HeLa S3 細胞を用いて解析を行ったが、この EphA2 による細胞分裂の制御が HeLa S3 細胞に限定されたものであるか検討するため、ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞を用い、siRNA により EphA2 をノックダウンし、細胞分裂の進行を評価した。その結果、HeLa S3 細胞同様、細胞分裂進行の遅延が観察された (図 1-6)。さらに、EphA2 の機能ががん細胞に限定されたものであるかを検討するため、正常細胞であるヒト網膜上皮由来 hTERT RPE-1 細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、HeLa S3 細胞や MDA-MB-231 細胞と同様、hTERT RPE-1 細胞においても EphA2 のノックダウンにより細胞分裂の進行が遅延した (図 1-7)。これらのことから、少なくとも EphA2 が発現している細胞であれば、EphA2 の細胞分裂期における機能は、がん細胞のみならず、正常細胞においても保存されていることが示唆された。



## 1-4 考察

Eph 受容体の阻害剤である NVP-BHG712 を細胞分裂期特異的に処理することで細胞分裂の進行が遅延したことから (図 1-1)、Eph 受容体が細胞分裂期特異的な機能を有している可能性が示唆された。しかし、阻害剤が非特異的な分子に影響を与えた可能性は排除しきれない。そこで、NVP-BHG712 の標的分子の一つである EphA2 に焦点を当て、より特異性の高い siRNA を用いて解析した。その結果、NVP-BHG712 処理時と同様、細胞分裂進行が遅延した (図 1-3)。また、他の 2 種類の配列を標的にした siRNA を用いても同様の結果が得られた (図 1-4)。以上のことを統合すると、EphA2 が細胞分裂期特異的な機能を有していることが考えられる。ここでは、NVP-BHG712 の標的分子として EphA2 のみに着目して解析を行ったが、標的分子である他の Eph 受容体も細胞分裂に寄与している可能性は依然と残る。さらに、正常細胞である hTERT RPE-1 細胞 (ヒト網膜上皮由来) においてもがん細胞である HeLa S3 細胞 (ヒト子宮頸がん由来) や MDA-MB-231 細胞 (ヒト乳がん由来) と同様の結果が得られたことから、少なくとも EphA2 が発現している細胞であれば、EphA2 の細胞分裂期における機能は、がん細胞のみならず、正常細胞においても保存されていることが示唆された。

多極紡錘体を形成している細胞や、微小管の位置が非対称な細胞では細胞分裂の進行が遅延することが知られている。<sup>47,48</sup> そのため、EphA2 のノックダウンによる細胞分裂進行の遅延は、多極紡錘体や微小管の非対称性により引き起こされたと考えられる。これらのことから、EphA2 は二極紡錘体を形成することで細胞分裂を正常に進行させていると考えられる。

## 1-5 小括

本章では以下の事を明らかにした。阻害剤、siRNA を用いた検討から、EphA2 が、おそらく細胞分裂期特異的な機能として、二極紡錘体の形成維持に寄与することで正常な細胞分裂の進行を制御することを見出した。さらに HeLa S3 細胞や MDA-MB-231 細胞といったがん細胞のみならず、hTERT RPE-1 細胞のように EphA2 が発現している正常細胞でも EphA2 の細胞分裂期での機能は保存されていることを明らかにした。

## 第2章 Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路依存的な EphA2 Ser897 のリン酸化による細胞分裂制御

### 2-1 緒言

第1章では、EphA2 が細胞分裂を制御していることを明らかにした。EphA2 受容体は他の受容体と同様、リガンドと結合すると活性化され下流へとシグナルを伝達するが、その際に EphA2 の膜直下に位置する 588 番目の Tyr 残基 (Tyr588) がリン酸化される。<sup>33</sup> 一方、リガンドと結合していない時は増殖因子 (EGF、HGF など) の刺激により EphA2 の C 末端領域に存在する 897 番目の Ser 残基 (Ser897) がリン酸化される。<sup>39-42</sup> それでは細胞分裂期ではどちらのシグナル伝達が関与しているのだろうか。これを明らかにすることが出来れば、EphA2 の細胞分裂期での機能を紐解く手掛かりになると考えた。

序論でも述べたように、EphA2 とそのリガンドである ephrin-A1 は共に細胞膜に発現しているため、細胞間接着を生じる間期では EphA2 と ephrin-A1 が結合し、それぞれを発現する細胞にシグナルが伝達する。しかし、細胞分裂期に入ると RhoA が活性化し、アクチン骨格が収縮することで細胞は丸い形態をとり、<sup>21</sup> 周りの細胞との接着が著しく減少する。そのため、細胞分裂期では EphA2 と ephrin-A1 の結合も減少し、EphA2 の Tyr キナーゼ活性が減少することが予想される。そこで本章では、EphA2 Tyr588 のリン酸化を EphA2 の Tyr キナーゼ活性の指標として、細胞分裂期においてリガンド依存的な経路の関与を解析した。また、リガンド非依存的な経路でリン酸化される EphA2 Ser897 についても同様に関与を調べた。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 材料

Lenti-X 293T 細胞は Clontech Lab 社 (Mountain View, CA, USA) から購入し、2 mM L-グルタミン、20 mM HEPES (pH 7.4)、5% FBS を含む DMEM 培地中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。

本章で新たに用いた抗体の情報と使用時の希釈倍率を以下に示す。

- 抗マウス V5 抗体 : ×1000、M215-3、Medical and Biological Laboratories (名古屋)
- 抗マウス HA 抗体 : ×1000、M180-3、Medical and Biological Laboratories
- 抗マウス RSK2 抗体 : ×1000、sc-9986、Santa Cruz Biotechnologies
- 抗マウス phospho-p44/42 MAPK Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> (pERK1/2) 抗体 : ×1000、#9106S、Cell Signaling Technology
- 抗ラビット ERK2 抗体 : ×1000、sc-154、Santa Cruz Biotechnologies
- 抗ラビット cyclin B1 抗体 : ×1000、sc-752、Santa Cruz Biotechnologies
- 抗ラビット phospho-Filamin A 抗体 : ×1000、#4761S、Cell Signaling Technology
- 抗ラビット phospho-Akt Ser<sup>473</sup> 抗体 : ×1000、#4060S、Cell Signaling Technology
- 抗ラビット phospho-CREB Ser<sup>133</sup> 抗体 : ×1000、#9198S、Cell Signaling Technology
- 抗マウス Akt (pan) 抗体 : ×1000、#2920S、Cell Signaling Technology
- 抗マウス Aurora B 抗体 : ×1000、611082、BD Biosciences
- 抗マウス Filamin 1 抗体 : ×2000、sc-58764、Santa Cruz Biotechnologies
- 抗マウス CREB 抗体 : ×1000、#9104S、Cell Signaling Technology
- 抗マウス cdc2 (Cdk1) 抗体 : ×1000、sc-54、Santa Cruz Biotechnologies

本章で使用した阻害剤は全て DMSO に溶解し、購入先や保存条件に関する情報は以下に示した。

- U0126 : LC Laboratory (Woburn, MA, USA)、-30°C 保存
- BI-D1870 : Enzo Life Sciences (NY, USA)、-80°C 保存
- H 89 : AdooQ BioScience (Irvine, CA, USA)、-30°C 保存
- API-2 : Sigma-Aldrich、-80°C 保存

本章で使用したプラスミド DNA の情報は下記の通りである。

- GFP が融合した非分解型 cyclin B1 [(R42A) cyclin B1-MmGFP] や cyclin B1 の cyclin-box を欠損させたもの [(R42A) cyclin B1ΔC-MmGFP] は J. Pines から譲渡して頂いた。<sup>49</sup>
- 抑制性のリン酸化を受けない pcDNA3-cdc2-AF(#39872、Addgene plasmid) は J. Pines から譲渡して頂いた。<sup>50</sup>
- pDONR223-EphA2 (#23926、Addgene plasmid) は William Hahn、David Root に譲渡して頂いた。<sup>51</sup>
- ウイルスベクターである pLX302 (#25896、Addgene plasmid)、pLIX\_402 (#41394、Addgene plasmid) は David Root に譲渡して頂いた。<sup>52</sup>
- レンチウイルスを作製する際に使用したパッケージングプラスミド DNA (pCAG-HIVgp、pCMV-

VSV-G-RSV-Rev) は RIKEN BioResource Center (茨城) から譲渡して頂いた。

### 2-2-2 チミジン、RO-3306、MG-132 を用いた細胞分裂期への同調方法

チミジン処理による同調は以下のように行った。HeLa S3 細胞を 35 mm ディッシュに播種し一晩培養した後、4 mM チミジン (Sigma-Aldrich) を 24 時間処理した。予め 37°C に温めておいた PBS (-) で 4 回洗い、37°C に温めた培地を添加した。1 時間おきに顕微鏡で撮影した位相差像をもとに、細胞の形態から分裂期細胞の割合を算出した。

チミジンと RO-3306 を併用して細胞分裂期に同調する際には、HeLa S3 細胞を 35 mm ディッシュに播種し一晩培養した後、4 mM チミジンを 20 時間処理した。予め 37°C に温めておいた PBS (-) で 4 回洗い、37°C に温めた培地を添加して 8 時間培養した。その後、9  $\mu$ M RO-3306 を 8.5 時間処理し、以降は 1-2-2 で記述した手順により細胞分裂期へと進行させ、RO-3306 による G2/M 期での停止から細胞周期を再開させて 30 分後に文鎮でディッシュを叩いてディッシュから剥がした (mitotic shake-off) 分裂期細胞を 1.5 mL チューブに移した。細胞周期再開 30 分後のものはそのまま SDS サンプルバッファーに溶解し、細胞周期再開 60 あるいは 90 分後のものは mitotic shake-off したものを 1.5 mL チューブに移し、さらに 30、60 分間、37°C の水浴中で培養した後、SDS サンプルバッファーに溶解した。

MG-132 を用いて細胞分裂中期 (metaphase) に同調する際には、HeLa S3 細胞を 35 mm ディッシュに播種し一晩培養し、1-2-2 で記述した手順により RO-3306 による G2/M 期の停止から細胞周期を再開した。再開して 30 分後に 10  $\mu$ M MG-132 を 1 時間処理し、細胞を細胞分裂中期に停止させた。分裂期細胞を mitotic shake-off により回収した。

### 2-2-3 プラスミド DNA の導入

24 穴プレートに HeLa S3 細胞を播種し、一晩培養した。以下、1 穴当たりの手順を記載する。Opti-MEM 20  $\mu$ L に Lipofectamine 2000 を 1  $\mu$ L、Opti-MEM 20  $\mu$ L に 0.25–0.5  $\mu$ g 相当のプラスミド DNA を加え、これら 2 液を混合し、室温で 20–30 分静置した。その間に 24 穴プレートの培地を除去し、予め 37°C に温めておいた DMEM 400  $\mu$ L に交換した。混合した液を 24 穴プレートに添加し、24 時間後にウェスタンブロットや免疫蛍光染色、フローサイトメトリーによる解析を行った。

### 2-2-4 免疫蛍光染色法による Cdk1 活性化の評価

24 穴プレートに HeLa S3 細胞を播種し、2-2-3 に記述した手順で GFP が融合した変異型 cyclin B1 や cdc2 (Cdk1) を導入した。細胞を PBS (-) で 1 回洗い、2%ホルムアルデヒドにより室温で 10 分間固定した。GFP の蛍光強度が低下するのを防ぐため、通常より弱い条件で固定した。細胞を PBS (-) で 3 回洗った後、DNA を 1  $\mu$ M Hoechst 33342/PBS (-) で 15 分間染色した。画像は 20 倍対物レンズを用い、Hoechst 33342、GFP の蛍光をそれぞれ 400–460 nm、510–550 nm の蛍光フィルターを用いて検出した。

### 2-3-5 フローサイトメトリー解析による細胞周期の評価

HeLa S3 細胞を 35 mm ディッシュに播種し、2-2-3 に記述した手順で 0.5 µg 相当の GFP が融合した変異型 cyclin B1 や cdc2 (Cdk1) を導入した。24 時間後、PBS (-) 1 mL で細胞を洗い、トリプシン 0.3 mL を加えて細胞をディッシュから剥がした後、低吸着 1.5 mL チューブに移し swing man で遠心した。沈殿した細胞を PBS (-) 0.8 mL で洗い込み、再び swing man で遠心した後、上清を除き、PBS (-) 50 µL を加え懸濁した。1 mL の冷 70% EtOH を加えすぐにボルテックスし 4°C で 1 時間固定した。Staining medium [3% FBS と 0.1% Triton X-100 を含む PBS (-)] で細胞を 2 回洗い、50 µg/mL ヨウ化プロピジウム (PI) と 200 µg/mL RNaseA を含む Staining medium により DNA を 37°C で 30 分間染色した。その後、BD Accuri™ C6 Plus フローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて解析した。

### 2-2-6 EphA2 Ser897Ala、Ser897Asp 変異体の作製

EphA2 Ser897Ala、EphA2 Ser897Asp 変異体を作製するにあたり、pDONR223-EphA2 を鋳型とし、DNA ポリメラーゼに KOD-plus-Neo (Toyobo Co. Ltd.、東京) を用いた。プライマーはそれぞれ下記のものを用いて行い、前熱変性を 94°C で 2 分、熱変性を 98°C で 10 秒、伸長反応を 68°C で 3.5 分の条件で 30 サイクル行った。赤字が Ser 残基を Ala または Asp に置換した部位であり、下線部青字のようにサイレント変異となるよう、制限酵素サイト (BamH I) を導入した。作製した変異体は変異が導入されていること、さらに、変異導入の過程で意図しない変異が導入されていないことをシーケンス解析により確認した。使用したプライマーは全て Eurofins Genomics 社 (東京) から購入し、それぞれの配列を下記の Table 2-1、-2 に示した。

**Table 2-1 pDONR223-EphA2 S897A、S897D 作製に使用したプライマー**

Name	
EphA2 S897A Sense Primer:	5'-CTCCCCG <b>CC</b> ACGAGCGG <b>ATCC</b> GAGGGGGTGCCCTTCCGC-3'
Antisense Primer:	5'-CCCCTCGGATCCGCTCGTGGCGGGGAGCCGGATAGACAC-3'
EphA2 S897D Sense Primer:	5'-CTCCCCG <b>AC</b> ACGAGCGG <b>ATCC</b> GAGGGGGTGCCCTTCCGC-3'
Antisense Primer:	5'-CCCCTCGGATCCGCTCGTGTGGGGGAGCCGGATAGACAC-3'

**Table 2-2 pDONR223-EphA2 S897A, S897D のシーケンス解析に使用したプライマー**

Name		Forward Primer	Reverse Primer
pDONR223	1	5'-GTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGC-3'	
pDONR223	2	5'-TCACACACCCGTATGGCAA-3'	
pDONR223	3	5'-CCATTGCGCCCGATGAGAT-3'	
pDONR223	4	5'-GTATGCACTGTGCAGTGGATGG-3'	
pDONR223	5	5'-AAGGTGGAGCTGCGCTGGA-3'	
pDONR223	6	5'-TGGAGGGCCGCAGCACCA-3'	
pDONR223	7	5'-GTGTGGTCCTGCTTCTGGTG-3'	
pDONR223	8	5'-CCATCAAGACGCTGAAAGCC-3'	
pDONR223	9	5'-ACATCCTCGTCAACAGCAACC-3'	
pDONR223	10	5'-CCGCCATCTACCAGCTCATG-3'	
pDONR223	11		5'-CATTAAAGCAGCGTATCCA-3'

### 2-2-7 Gateway テクノロジーを用いた発現ベクターへの組み換え

EphA2 を安定的に発現する細胞株を作製するため、Gateway テクノロジー (Invitrogen) を用いて pDONR223-EphA2 をウイルスベクターである pLX302 と pLIX\_402 に LR 反応により組み換えた。まず、それぞれ 40 fmol 相当の DNA 量と 5×LR clonase buffer 2 μL、LR clonase enzyme 2 μL を混合し、TE バッファーを加え、合計 10 μL とした。混合液を 25°C で 12–16 時間反応させた後、プロテイナーゼ K 0.5 μL を加え 37°C で 10 分間反応させ、酵素を失活させた。これを -80°C から氷上で融解した大腸菌 JM109 または DH5α 株 100 μL に添加し、氷水中に 30 分間静置した。その後、42°C の水浴で 45 秒間ヒートショックを与え、直ちに氷水中に戻し、2 分後、予め 37°C に温めておいた SOC 培地 1 mL を添加し、37°C で穏やかに振盪培養した。1 時間後、培養液を 100 μg/mL アンピシリン含有 LB プレートに塗り広げ、37°C で 12–14 時間程度培養した。組み換えたプラスミド DNA を制限酵素の処理後、電気泳動にて確認した。変異体はそれぞれ pDONR223-EphA2 を鋳型にして作製し、変異を導入した pDONR223-EphA2 を Gateway テクノロジーによりその都度ウイルスベクターに組み換えた。

### 2-2-8 レンチウイルスを用いた安定発現株の樹立

35 mm ディッシュに 80–90%コンフルエントになるように Lenti-X 293T 細胞を均一に播種し、一晩培養した。Lipofectamine 2000 を用いた際には、Opti-MEM 100 μL に組み換えたプラスミド DNA を 1.2 μg、pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev をそれぞれ 0.8 μg 加えたものと、Opti-MEM 100 μL に Lipofectamine 2000 を 5.6 μL 加えたものを混合した。Lenti-X 293T 細胞の培地を交換し、2 液を混合したものを添加した。48 時間後、ウイルスを含有した Lenti-X 293T 細胞培養液を 0.45 μm のフィルターで濾過したものに 8 μg/mL polybrene (Sigma-Aldrich) を加えた。その後、予め 35 mm ディッシュに播

種しておいた HeLa S3 細胞の培地と交換し、ウイルス感染させた。48 時間後、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromycin (StressMarq Biosciences Inc., Victoria, BC, Canada) により 1 週間セクションした。PEI Max (Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, USA) を用いた際には、Opti-MEM 300  $\mu\text{L}$  に組み換えたプラスミド DNA を 1.7  $\mu\text{g}$ 、pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev をそれぞれ 1  $\mu\text{g}$  加えたものと、Opti-MEM 300  $\mu\text{L}$  に PEI Max を 7.4  $\mu\text{g}$  加えたものを混合し、静置した。30 分後、混合した液を Lenti-X 293T 細胞の培地と交換し 8-16 時間培養した。予め 35 mm ディッシュに播種しておいた HeLa S3 細胞または MDA-MB-231 細胞を PBS (-) で 2 回洗い血清を除去した。ウイルス含有上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過したものに 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  polybrene を加えた後、PBS (-) で洗った HeLa S3 細胞または MDA-MB-231 細胞に添加した。これ以降は上記の Lipofectamine 2000 を用いた時と同様の手順でセクションを行った。

### 2-2-9 免疫沈降法

免疫沈降を行うにあたり、各サンプル当たり、予めプロテイン G セファロースビーズ (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) 10  $\mu\text{L}$  と抗 V5 または抗 HA 抗体 1  $\mu\text{g}$  を混ぜ、室温で 3 時間反応させた。HeLa S3 細胞に野生型 EphA2 または Ser897Ala 変異体を恒常的に発現させた細胞 (HeLa S3/WT-V5、HeLa S3/SA-V5) を 10 cm ディッシュに播種し、一晚培養した。5  $\mu\text{M}$  S-trityl-L-cysteine (STLC, Sigma-Aldrich) を 16 時間処理し、分裂期細胞 (前中期) を文鎮でディッシュを叩いてディッシュから剥がし、培養液ごと回収した (mitotic shake-off)。室温で 5 分間遠心 (800 rpm) した後、PBS (-) で細胞を洗い、swing man で 1-2 分間遠心した。PBS (-) を除去した後、細胞を 25 mM HEPES-NaOH、2 mM EDTA-NaOH、5% グリセロール、50 mM フッ化ナトリウム、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アプロチニン、0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペプスタチン A、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ロイペプチン、2 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム、1% Triton X-100 を含む Triton Lysis Buffer を用い 10 分間水中で溶解した。4°C で 10 分間遠心 (15000 rpm) した後、抗 V5 抗体と結合させたプロテイン G セファロースビーズに加え 4°C で 3 時間反応させた。その後、swing man で 1-2 分間遠心し、免疫沈降物を SDS サンプルバッファーに溶解し、100°C で 3 分間煮沸した。

野生型 EphA2 または Ser897Ala 変異体がドキシサイクリン (Dox) により誘導発現する HeLa S3 細胞 (HeLa S3/WT-HA、HeLa S3/SA-HA) を 10 cm ディッシュに播種し、一晚培養した。発現レベルを揃えるため、それぞれ Dox を HeLa S3/WT-HA 細胞は 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、HeLa S3/SA-HA 細胞は 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理して 32 時間後、5  $\mu\text{M}$  STLC を 16 時間処理して細胞分裂期 (前中期) に同調した。分裂期細胞を mitotic shake-off により回収し、上記と同様の手順で抗 HA 抗体を用いて免疫沈降した。

## 2-2-10 ドキシサイクリン (Dox) による誘導発現と siRNA の導入による細胞分裂進行の解析

HeLa S3/EphA2 wild-type-HA、HeLa S3/EphA2 S897A-HA、HeLa S3/EphA2 S897D-HA 細胞または MDA-MB-231/EphA2 wild-type-HA、MDA-MB-231/EphA2 S897A-HA 細胞を 24 穴プレートに播種し、一晩培養した。1-2-3 で記述した手順で siRNA (コントロール siRNA、siEphA2#3; 3' UTR) を導入すると同時に、HeLa S3/EphA2 S897A-HA は 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、それ以外の細胞株は 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ドキシサイクリン (Dox) を 28 時間処理した。その後、Dox と共に 6–8  $\mu\text{M}$  RO-3306 を 20 時間処理して細胞を G2/M 期に同調し、分裂期細胞を解析した (1-2-2 参照)。



## 2-3 実験結果

### 2-3-1 間期と細胞分裂期での EphA2 のリン酸化部位の変化

EphA2 のリン酸化パターンを間期と細胞分裂期で比較するため、HeLa S3 細胞にチミジンを処理して S 期に停止した後、チミジンを除去することで細胞周期を再開させ、G2 期や細胞分裂期へと進行させた。チミジン処理による S 期の停止から細胞周期を再開して 8 時間後までは分裂期細胞の割合 (mitotic index) に変化は見られず、再開して 8 時間後を超えたところから分裂期細胞の割合が徐々に増加した (図 2-1)。

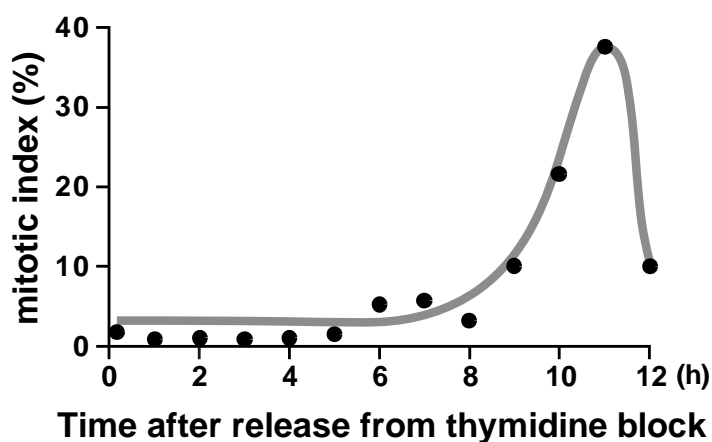


図 2-1 チミジン処理から細胞周期を再開後の分裂期細胞の割合  
HeLa S3 細胞に 4 mM チミジンを 24 時間処理した後、PBS (-) で細胞を洗いチミジンを除去した。1 時間ごとに観察し、分裂期細胞の割合を算出した。

この結果をもとに、G2 期と細胞分裂期の境界と考えられるチミジン処理による S 期の停止から細胞周期を再開させて 8 時間後 (G2 期) と再開して 10 時間後 (細胞分裂期) の細胞で EphA2 のリン酸化パターンを比較した。その結果、G2 期の細胞と比較して、分裂期の細胞ではリガンド依存的にリン酸化される EphA2 Tyr588 のリン酸化が抑制されている一方、リガンド非依存的な経路でリン酸化される EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進していた (図 2-2)。分裂期で亢進することが知られている Aurora A/B や ERK/RSK のリン酸化が再開して 10 時間後の細胞において観察されたことは (図 2-2)、再開して 10 時間後の細胞が分裂期細胞であることを示している。

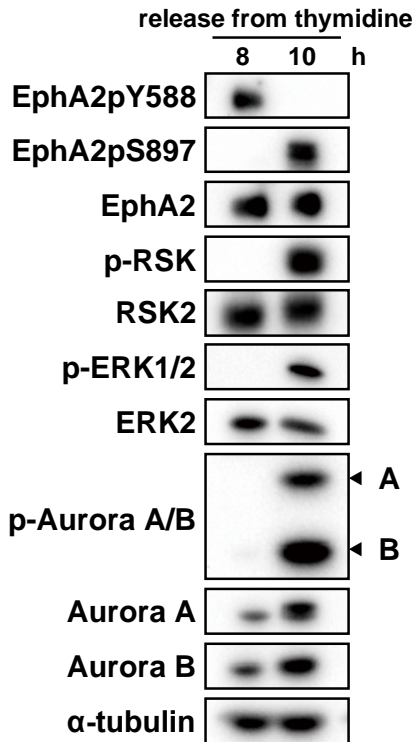
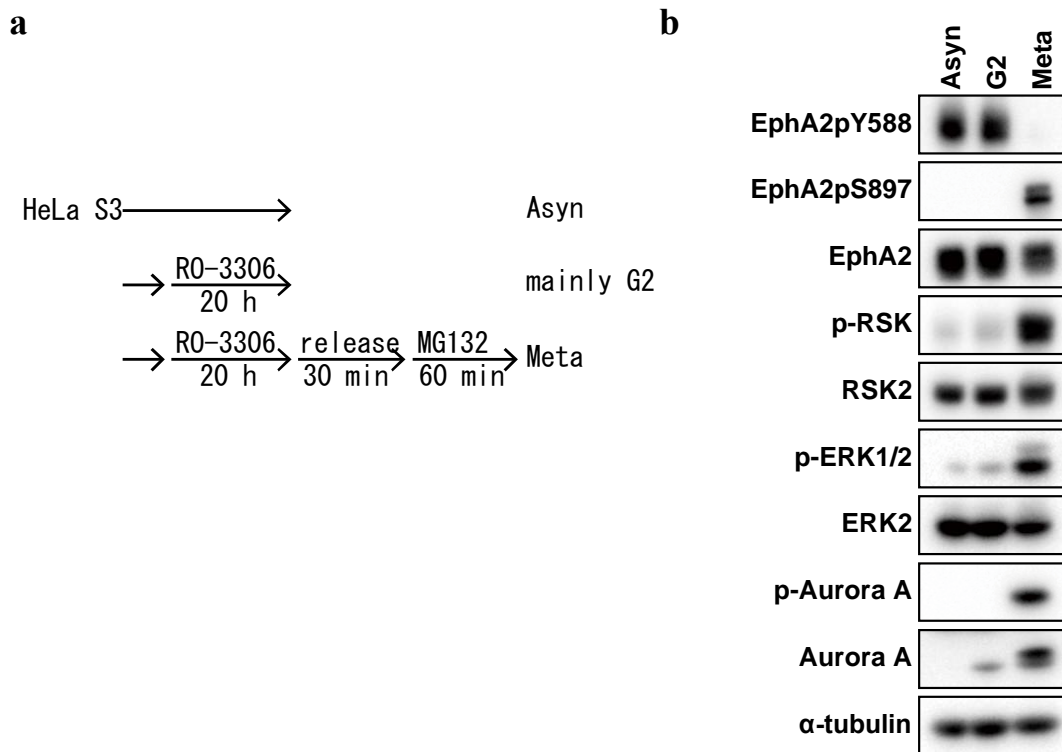


図 2-2 間期と細胞分裂期でのリン酸化部位の変化

HeLa S3 細胞に 4 mM チミジン を 24 時間処理した後、PBS (-) で細胞を洗った。10 時間後 (細胞分裂期)、mitotic shake-off により分裂期の細胞を回収した。対照群として、チミジンを除去してから 8 時間後 (間期) の細胞を用いた。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

チミジン同調で観察された、細胞分裂期における EphA2 Tyr588 のリン酸化抑制と EphA2 Ser897 のリン酸化亢進を確かめるため、異なる手順で分裂期に同調した細胞を解析した。可逆的 Cdk1 阻害剤である RO-3306 で G2/M 期に停止させた後、MG-132 を処理して分裂期中期 (metaphase; Meta) に同調した細胞では、非同調 (Asynchronous; Asyn) あるいは可逆的 Cdk1 阻害剤である RO-3306 で G2/M 期に停止させたもの (mainly G2; G2) と比べて、図 2-2 と同様、Tyr588 のリン酸化が抑制されるとともに Ser897 のリン酸化が亢進していた (図 2-3)。これらのことから、細胞分裂期に入ることによって EphA2 Tyr588 から EphA2 Ser897 へとリン酸化部位が変化すること、つまり、リガンドや増殖因子の刺激によらない細胞周期依存的なスイッチの切り替えが起こることが示唆された。



**図 2-3 間期と細胞分裂期でのリン酸化部位の変化**

(a) で示すように、HeLa S3 細胞に 9  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理した後、PBS (+) で細胞を洗った。30 分間培養した後、10  $\mu$ M MG-132 を 1 時間処理して細胞分裂中期 (metaphase; Meta) に同調し、mitotic shake-off により分裂期の細胞を回収した。対照群として、RO-3306 を処理していないもの (非同調; Asyn) と 9  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理したものをを用いた。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した (b)。

次に、細胞分裂期になると亢進する EphA2 Ser897 のリン酸化が細胞分裂期を通じて維持されるのか解析するため、RO-3306 による G2/M 期での停止からの細胞周期再開後、30 分ごとの EphA2 Ser897 のリン酸化レベルを調べた。その結果、RO-3306 からの細胞周期再開 30 分後ではこれまでの結果同様、EphA2 Ser897 のリン酸化亢進が見られたが、60 分後以降では 30 分後と比べて Ser897 のリン酸化レベルが低下した。一方、Tyr588 のリン酸化は抑制されたままだった (図 2-4)。細胞周期の再開 30 分後、60 分後、90 分後はそれぞれ中期 (metaphase)、後期・終期 (anaphase/telophase)、細胞質分裂 (cytokinesis) の細胞が多いことを免疫染色により確認した。細胞分裂後期・終期 (anaphase/telophase) では cyclin B1 の発現レベルの低下が知られており、<sup>17,53</sup> 図 2-4 において細胞周期の停止から再開して 60 分後で観察された cyclin B1 の発現量の減少は、60 分後では細胞はおおよそ後期・終期 (anaphase/telophase) の段階にあることを支持している。

以上のことから、細胞分裂期では EphA2 Tyr588 のリン酸化が抑制されるとともに Ser897 のリン酸化が亢進し、細胞分裂後期・終期 (anaphase/telophase) に進むと Ser897 のリン酸化レベルが低下していくことが明らかになった。

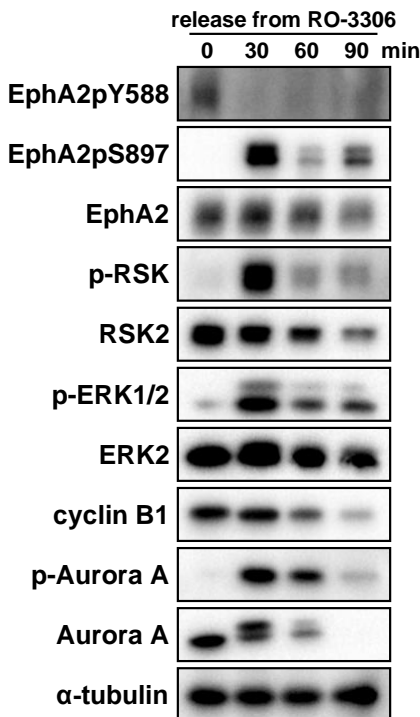


図 2-4 細胞分裂の進行と EphA2 のリン酸化の関係

HeLa S3 細胞に 4 mM チミジンで 24 時間処理した後、PBS (-) で細胞を洗った。8 時間後、9 μM RO-3306 を 8.5 時間処理し、G2/M 期に停止させた。PBS (+) で細胞を洗い、RO-3306 を除去後、30 分ごとに mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

### 2-3-2 細胞分裂期において EphA2 Ser897 は RSK によりリン酸化される

2-3-1 で述べたように、細胞分裂期に入ることによって EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進したことから、次に細胞分裂期における Ser897 のキナーゼの探索を行った。これまでに、間期における EphA2 Ser897 のキナーゼとして、Akt、RSK、あるいは PKA の 3 種のキナーゼが報告されている。<sup>39-42</sup> そこで、細胞分裂期特異的にこれらのキナーゼの阻害剤を処理し、細胞分裂期における EphA2 Ser897 のキナーゼの探索を行った。API-2 (Akt 阻害剤)、BI-D1870 (RSK 阻害剤)、H 89 (PKA 阻害剤) をそれぞれ分裂期細胞に処理したところ、BI-D1870 処理により EphA2 Ser897 のリン酸化がほぼ完全に抑制された (図 2-5-a)。さらに RSK の上流である MEK を U0126 により阻害したところ、BI-D1870 処理時と同様、EphA2 Ser897 のリン酸化がほぼ完全に抑制された (図 2-5-a)。BI-D1870 処理により、活性化された RSK で認められる Ser380 のリン酸化レベルが増大している。同様の現象は過去にも報告があるが、その機序は不明である。<sup>39</sup> しかしながら、BI-D1870 処理により RSK の基質である Filamin A Ser2152<sup>54</sup> のリン酸化を抑制したことから、BI-D1870 は RSK の活性を抑制していると考えられる。また、U0126 処理で MEK の基質である ERK<sup>55,56</sup> やその下流の RSK<sup>57</sup> のリン酸化が抑制されていることも確認した (図 2-5-a)。対照群として用いた RO-3306 を 20 時間処理したもの (RO arrest) に比べ、種々の阻害剤を処理したものでは Aurora A/B や ERK/RSK の活性が亢進していることから、分裂期細胞を解析していることを確認した (図 2-5-a)。一方、H 89 処理でも EphA2 Ser897 のリン酸化がわずかに抑制されていたため (図 2-5-a)、再度 PKA の関与を検討した。その結果、H 89 処理で PKA の基質である CREB Ser133<sup>58</sup> のリン酸化が抑制される条件下において、EphA2 Ser897 のリン酸化をわずかに抑制した。よって、一部 PKA が EphA2 Ser897 をリン酸化しているのかもしれないが、MEK や RSK

の阻害時と比べて劇的ではないことから、細胞分裂期では EphA2 Ser897 は主に MEK/ERK/RSK 経路によりリン酸化されることが示唆された。

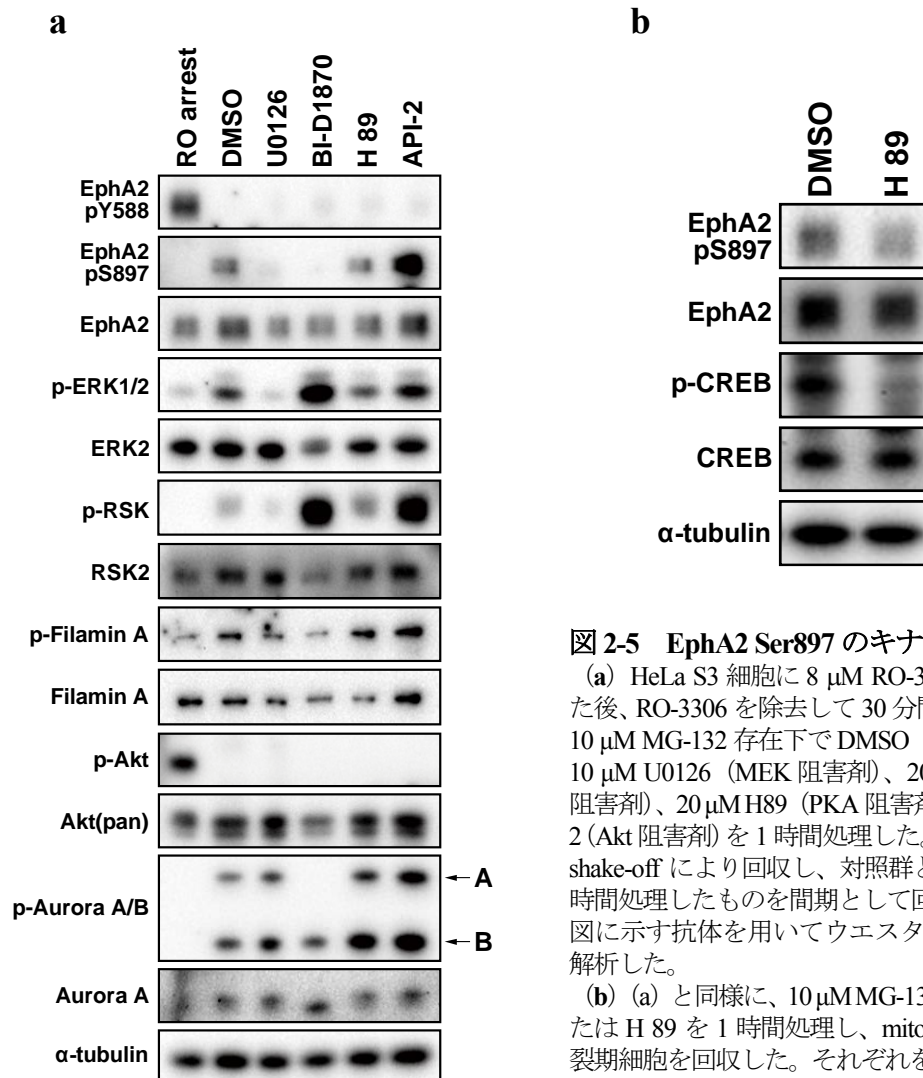


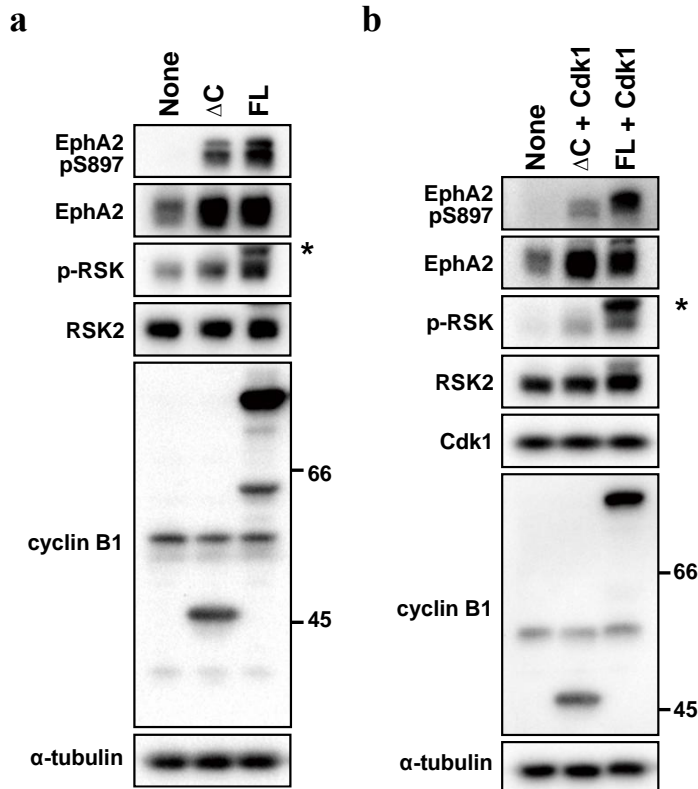
図 2-5 EphA2 Ser897 のキナーゼの探索

(a) HeLa S3 細胞に 8 μM RO-3306 を 20 時間処理した後、RO-3306 を除去して 30 分間培養した。その後、10 μM MG-132 存在下で DMSO (溶媒コントロール)、10 μM U0126 (MEK 阻害剤)、20 μM BI-D1870 (RSK 阻害剤)、20 μM H89 (PKA 阻害剤) または 10 μM API-2 (Akt 阻害剤) を 1 時間処理した。分裂期細胞を mitotic shake-off により回収し、対照群として RO-3306 を 20 時間処理したものを間期として回収した。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

(b) (a) と同様に、10 μM MG-132 存在下で DMSO または H 89 を 1 時間処理し、mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

### 2-3-3 EphA2 Ser897 のリン酸化は Cdk1 の活性化に起因する

細胞分裂期では、Cdk1 は cyclin B1 と複合体を形成して活性化され、細胞分裂中期 (metaphase) において全ての染色体の動原体に両極から伸長した微小管が結合すると cyclin B1 が分解され、細胞分裂後期 (anaphase) 以降へと進行する。<sup>17,53</sup> つまり、cyclin B1 が分解される中期 (metaphase) までは Cdk1 は活性化状態であるが、後期 (anaphase) 以降では Cdk1 の活性が低下する。また、図 2-4 では cyclin B1 の発現レベルの低下と相関して EphA2 Ser897 のリン酸化レベルの低下が観察された。そのため、MEK/ERK/RSK/EphA2 Ser897 経路の上流には Cdk1 が存在するのではないかと予想した。



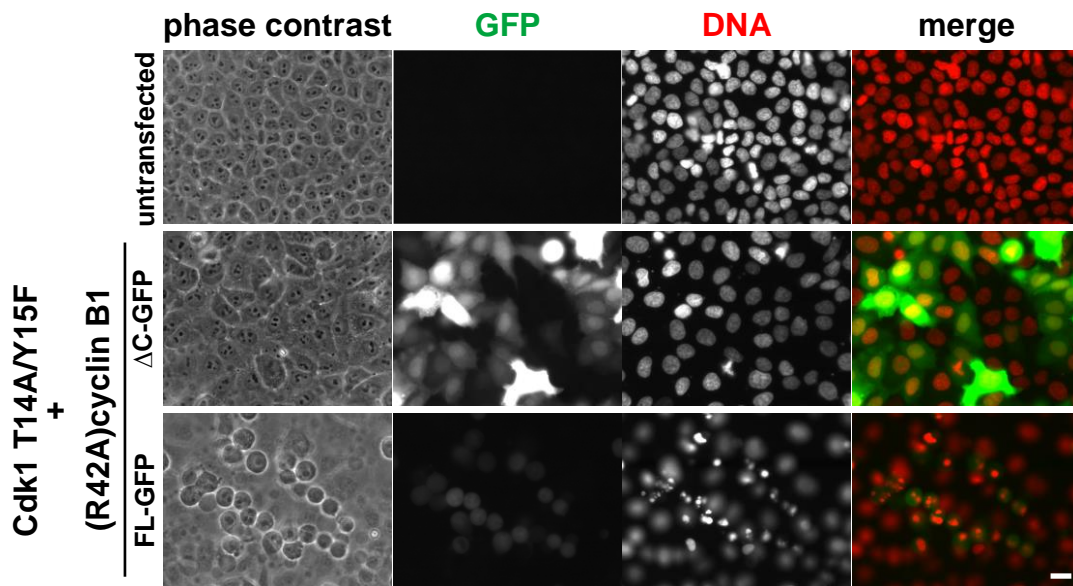
**図 2-6 Cdk1 の活性依存的な EphA2 Ser897 のリン酸化亢進**

(a) HeLa S3 細胞に GFP が融合した分解されない cyclin B1 [(R42A)cyclin B1-GFP: FL] あるいは C 末端側が欠損した分解されない cyclin B1 [(R42A)cyclin B1ΔC-GFP: ΔC] を導入した。24 時間後、それぞれの細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。(b) HeLa S3 細胞に恒常的の活性型 Cdk1 (Cdk1 T14A/Y15F) と (R42A)cyclin B1-GFP あるいは (R42A)cyclin B1ΔC-GFP を導入した。

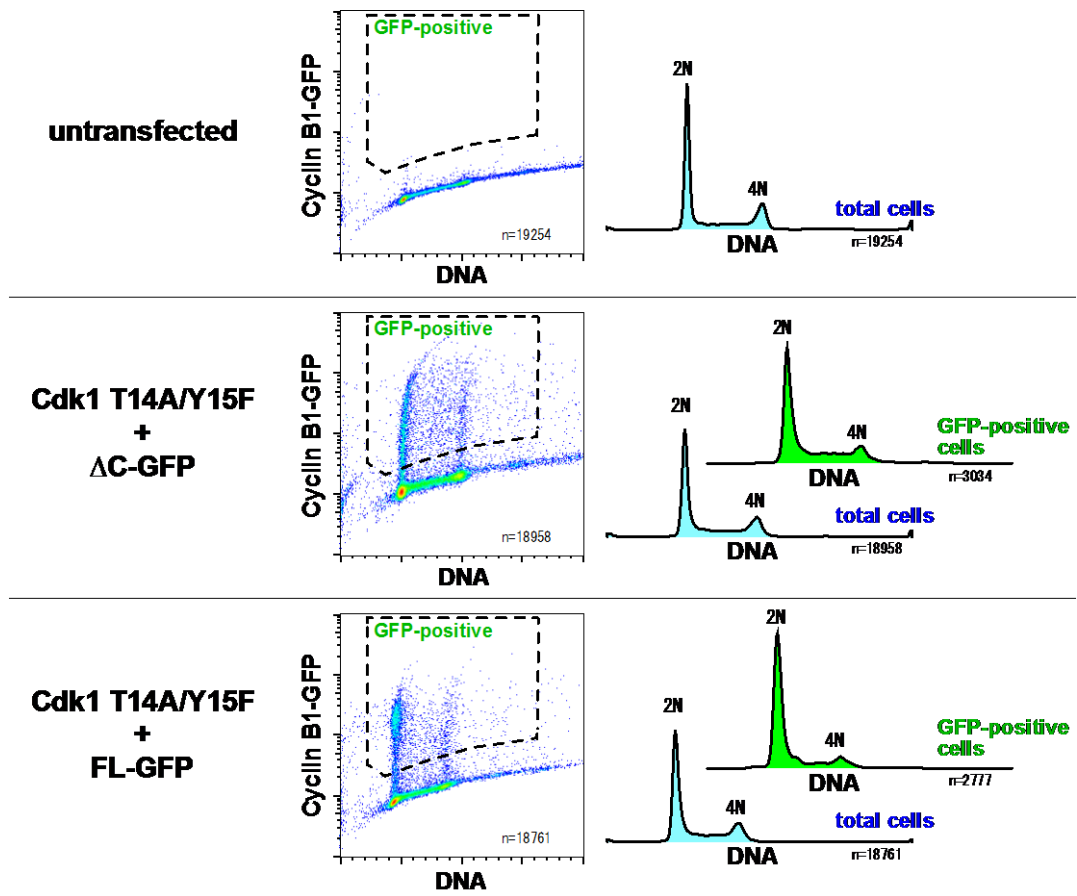
(a) 同様、24 時間後に回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。\*は非特異的なバンドを示している。

EphA2 Ser897 のリン酸化への Cdk1 の関与を解析するため、点変異を導入することで APC/C により分解されなくした GFP 融合 cyclin B1 [(R42A)cyclin B1-GFP; FL] を用いた。この変異体の発現により、Cdk1 は (R42A)cyclin B1-GFP と複合体を形成し、間期ではあるが Cdk1 は活性化される。対照として、Cdk1 との結合部位である (R42A)cyclin B1-GFP の C 末端側の cyclin box を欠損させた変異体を用いた [(R42A)cyclin B1-GFP ΔC; ΔC]。この変異体は (R42A)cyclin B1-GFP 同様、細胞分裂期を終了して G1 期に入っても分解されないが、Cdk1 とは結合できないため、Cdk1 は活性化されない。両変異体を HeLa S3 細胞に導入したところ、(R42A)cyclin B1-GFP を発現して Cdk1 を活性化したものでは、(R42A)cyclin B1-GFP ΔC と比べて、EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進した (図 2-6-a)。さらに、(R42A)cyclin B1-GFP に加えて抑制性のリン酸化を受けない Cdk1 (Cdk1 T14A/Y15F) も同時に導入したところ、(R42A)cyclin B1-GFP ΔC と比べ、(R42A)cyclin B1-GFP を発現させたものでは顕著に EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進した (図 2-6-b)。また、(R42A)cyclin B1-GFP と活性型 Cdk1 (Cdk1 T14A/Y15F) を導入したときに、DNA が凝縮している細胞や、分裂期様に丸い形態をした細胞が観察された (図 2-7-a)。これは、間期の細胞ではあるものの、分裂期を模倣していること、即ち、Cdk1 が活性化状態にあることを示していると考えられる。また、これらを導入後、ヨウ化プロピジウムにより DNA を染色したところ、DNA のヒストグラムに変化は観察されなかった (図 2-7-a)。これは、これらの導入により細胞周期が細胞分裂期に停止したため、EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進した可能性を否定する。以上のことから、EphA2 Ser897 のリン酸化は Cdk1 の活性に依存していることが示唆された。

a



b



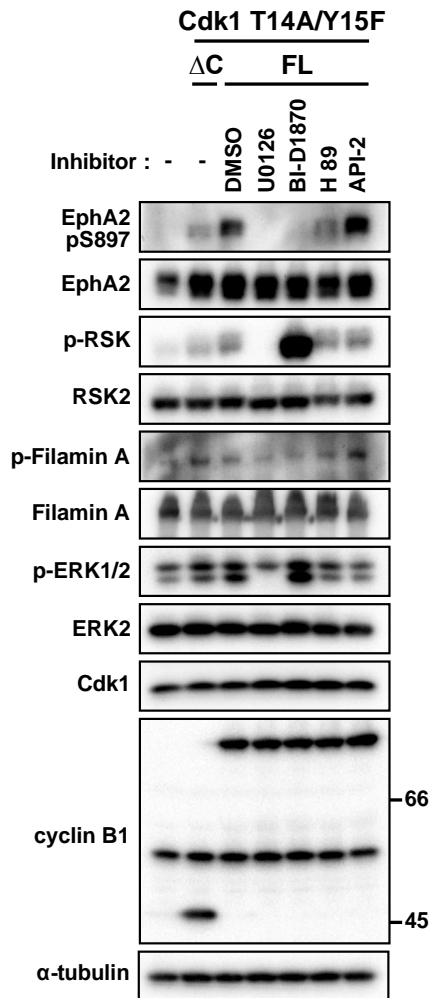
## 図 2-7 活性型 Cdk1 と非分解型 cyclin B1 の導入による細胞分裂の模倣と細胞周期に及ぼす影響

(a) HeLa S3 細胞に Cdk1 (Cdk1 T14A/Y15F) と (R42A)cyclin B1-GFP あるいは (R42A)cyclin B1 $\Delta$ C-GFP を導入した。24 時間後、これらの細胞を 2%ホルムアルデヒドにより室温で 10 分間固定した。その後、DNA を 1  $\mu$ M Hoechst 33342 により室温で 15 分間染色した。Scale bar: 20  $\mu$ m

(b) (a) と同様に導入して 24 時間後、トリプシン処理により細胞を剥がし、70%エタノールで固定後、DNA をヨウ化プロピジウムにより 37°Cで 30 分間染色した。それぞれをフローサイトメーターで DNA 含有量と GFP (cyclin B1) の蛍光を検出した。2次元プロットしたものの横軸は DNA 量、縦軸は GFP の蛍光強度を示している。点線で囲った場所は GFP (cyclin B1) が発現した細胞を表し、GFP 発現細胞のみの DNA ヒストグラムを右に示した (GFP-positive cells)。それぞれ、18761 個以上の細胞を解析した。

Cdk1 が活性化状態となると、EphA2 Ser897 のリン酸化の亢進だけでなく、リン酸化の亢進から RSK の活性亢進が示唆された (図 2-6-a, b; p-RSK)。このことは、Cdk1 が MEK/ERK/RSK 経路を活性化することで、EphA2 Ser897 のリン酸化を亢進することを示唆する。そこで、活性型 Cdk1 により EphA2 Ser897 のリン酸化を亢進させ、MEK、RSK の阻害剤の他に Akt、PKA の阻害剤を処理した。その結果、Cdk1 依存的な EphA2 Ser897 のリン酸化亢進が U0126 (MEK 阻害剤) や BI-D1870 (RSK 阻害剤) 処理によりほぼ完全に抑制された。一方で、API-2 (Akt 阻害剤) 処理では抑制されず、H89 (PKA 阻害剤) 処理では軽度に抑制された (図 2-8)。よって、細胞分裂期に入り活性化された Cdk1 が MEK/ERK/RSK 経路を活性化することで、細胞分裂期において Ser897 のリン酸化が引き起こされることが明らかになった。





**図 2-8 Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路による EphA2 Ser897 のリン酸化亢進**

HeLa S3細胞に恒常的活性型Cdk1 (Cdk1 T14A/Y15F) と (R42A)cyclin B1-GFPあるいは (R42A)cyclin B1ΔC-GFPを導入した。24時間後、DMSO (溶媒コントロール)、10 μM U0126 (MEK阻害剤)、10 μM BI-D1870 (RSK阻害剤)、20 μM H89 (PKA阻害剤) または10 μM API-2 (Akt阻害剤) を1時間処理した。それぞれを回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。ΔC; (R42A)cyclin B1ΔC-GFP、FL; (R42A)cyclin B1-GFP

### 2-3-4 EphA2 Ser897 リン酸化は細胞分裂進行に必要である

前述したように、細胞分裂期において Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路により EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進することを見出したが、それでは細胞分裂期における EphA2 Ser897 のリン酸化にはどのような意義が存在するのだろうか。これを解明するため、Ser897 を Ala に置換した変異体 (Ser897Ala; SA) を作製して解析を進めた。

HeLa S3 細胞に V5 タグを付加した野生型の EphA2 (HeLa S3/WT-V5)、あるいは Ser897Ala 変異体 (HeLa S3/SA-V5) を恒常的に発現する安定発現株を樹立し、抗 V5 抗体を用いてこれらの細胞株の発現確認を行った (図 2-9-a)。導入した EphA2 (WT-V5 または SA-V5) の発現レベルが内在性 EphA2 と比べて高く、レスキュー実験を行うには十分な発現量であることも確認した (図 2-9-a)。さらに、抗 V5 抗体を用いて WT-V5 または SA-V5 を免疫沈降したところ、野生型では Ser897 のリン酸化が観察されたのに対し、Ser897Ala 変異体では観察されないことを確認した (図 2-9-b)。

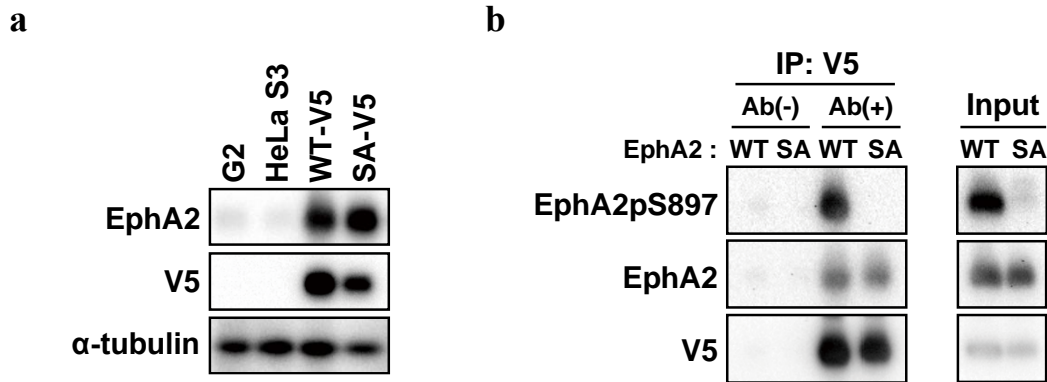
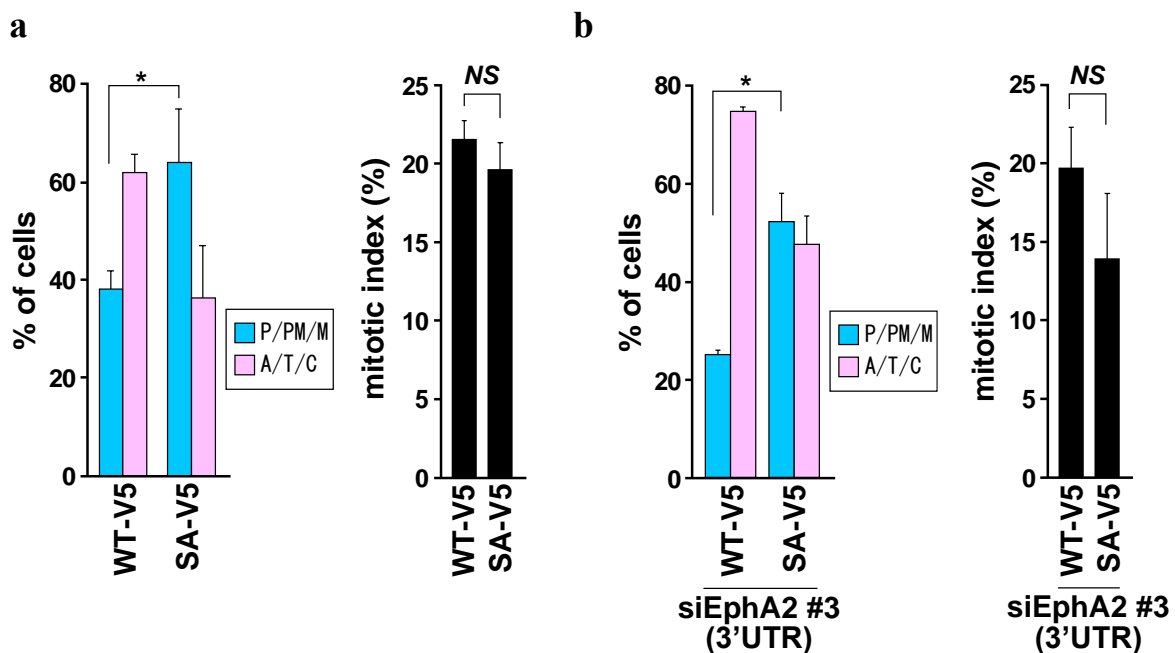


図 2-9 V5 タグを付加した野生型あるいは Ser897Ala 変異体 EphA2 発現株の樹立

(a) V5 タグを付加した野生型あるいは Ser897Ala 変異体を発現した HeLa S3 細胞株 (HeLa S3/WT-V5 または HeLa S3/SA-V5) および HeLa S3 細胞に 8  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理した後、RO-3306 を除去して 30 分間培養した。10  $\mu$ M MG-132 を 1 時間処理した後、mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。対照群として RO-3306 を 20 時間処理したものを用いた (G2)。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

(b) HeLa S3/WT-V5 または HeLa S3/SA-V5 株に 5  $\mu$ M STLC を 16 時間処理した後、mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。抗 V5 抗体を用いて WT-V5 または SA-V5 を免疫沈降し、それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。コントロールとして、抗体を結合させていないプロテイン G セファロースを用いた。

作製した安定発現株 (HeLa S3/WT-V5 または HeLa S3/SA-V5) を用いて、Ser897 のリン酸化が細胞分裂の進行に及ぼす影響を解析した。その結果、野生型発現株と比べ、Ser897Ala 変異体発現株では細胞分裂の進行が遅延した (図 2-10-a)。さらに、HeLa S3/WT-V5 または HeLa S3/SA-V5 株に 3' UTR を標的とした siRNA を用いて内在性の EphA2 のみをノックダウンしたところ、図 2-10-a と同様、Ser897Ala 変異体発現株において細胞分裂の進行の遅延が観察された (図 2-10-b)。また、内在性 EphA2 の有無に関わらず、HeLa S3/WT-V5 と HeLa S3/SA-V5 株間で分裂期細胞の割合に変化がなかった (図 2-10-a、b; mitotic index)。HeLa S3/SA-V5 株において内在性 EphA2 をノックダウンしなくても細胞分裂の進行の遅延が観察されたのは、Ser897Ala 変異体によるドミナントネガティブ効果であると考えられる。これらのことから、細胞分裂期において、EphA2 Ser897 のリン酸化は正しく細胞分裂が進行するために必要であることが示唆された。

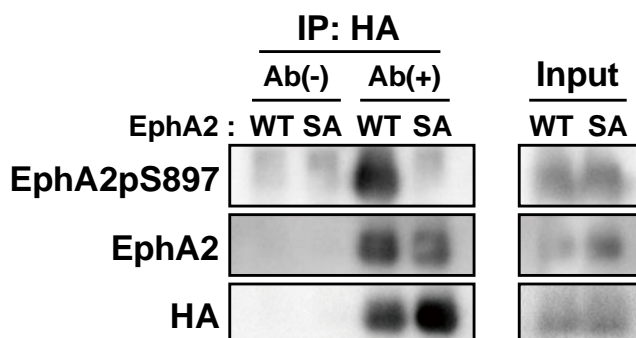


**図 2-10 Ser897Ala 変異体発現による細胞分裂進行の遅延**

(a) HeLa S3/EphA2 WT-V5 または HeLa S3/SA-V5 に 8 μM RO-3306 を 20 時間処理した後、PBS (+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。それぞれの細胞を固定して免疫染色し、細胞分裂の進行や分裂期細胞の割合を評価した。各実験で 222 個以上の細胞を解析した。データは平均±S.D.で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3、\*p < 0.05、NS, not significant)。

(b) HeLa S3/EphA2 WT-V5 または HeLa S3/SA-V5 に siEphA2 (#3, 3'UTR) を導入した。28 時間後、8 μM RO-3306 を 20 時間処理し、PBS (+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。細胞分裂の進行や分裂期細胞の割合を評価し、各実験で 204 個以上の細胞を解析した。データは平均±S.D.で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3、\*p < 0.05、NS, not significant)。

HeLa S3/WT-V5 または HeLa S3/SA-V5 株を用いて EphA2 Ser897 のリン酸化が細胞分裂の進行において機能を有することを示したが、HeLa S3/SA-V5 株で観察された細胞分裂の進行の遅延は樹立した株に特異的な表現型、即ち、クローナルバリエーションの可能性は否定できない。そこで、新たにドキシサイクリン (Dox) の添加により野生型 EphA2 (WT-HA) または Ser897Ala 変異体 (SA-HA) を誘導発現する細胞株 (HeLa S3/WT-HA または HeLa S3/SA-HA) を樹立した。これらの細胞株から、抗 HA 抗体により WT-HA または SA-HA を免疫沈降したところ、野生型では Ser897 のリン酸化が観察されたのに対し、Ser897Ala 変異体では観察されないことを確認した (図 2-11)。



**図 2-11 HA タグを付加した野生型、S897A 変異体 EphA2 発現株の樹立**

HeLa S3/WT-HA または HeLa S3/SA-HA に Dox (WT: 5 μg/mL, SA: 0.5 μg/mL) を 32 時間処理した。5 μM STLC と Dox を 16 時間処理した後、mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。抗 HA 抗体を用いて WT-HA または SA-HA を免疫沈降し、それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。コントロールとして、抗体を結合させていないプロテイン G セファロースを用いた。

作製したこれらの細胞株を用い、図 2-10 と同様に Ser897 のリン酸化の意義を解析した。HeLa S3/EphA2 WT-HA と HeLa S3/SA-HA 株にコントロール siRNA を導入しても細胞分裂の進行に変化がなかった一方、siEphA2 (#3、3'UTR) を導入し、内在性 EphA2 をノックダウンすると図 1-4 と同様、どちらの細胞株においても細胞分裂の進行が遅延した (図 2-12)。しかし、siEphA2 (#3、3'UTR) の導入とともに、Dox により野生型あるいは Ser897Ala 変異体を誘導発現したところ、野生型 (WT-HA) を誘導発現したものでは細胞分裂の遅延が回復した。一方、Dox 添加による EphA2 WT-HA と比べ、EphA2 SA-HA の発現レベルの方が明らかに高いにもかかわらず (図 2-13)、Ser897Ala 変異体 (SA-HA) を誘導発現しても回復しなかった (図 2-12)。さらに、リン酸化を模倣した変異体である Ser897Asp が Dox の添加により誘導発現される細胞株 (HeLa S3/SD-HA) を樹立し、図 2-12 と同様に解析した。その結果、内在性 EphA2 のノックダウンにより遅延する細胞分裂の進行が Ser897Asp の誘導発現により回復した (図 2-14)。

以上のことから、EphA2 Ser897 のリン酸化が細胞分裂の進行には必要であることが明らかとなった。また、第 1 章で記述した、siEphA2 の導入により引き起こされた細胞分裂進行の遅延は、EphA2 のノックダウンにより Ser897 がリン酸化された EphA2 が消失したことが原因であることが分かった。

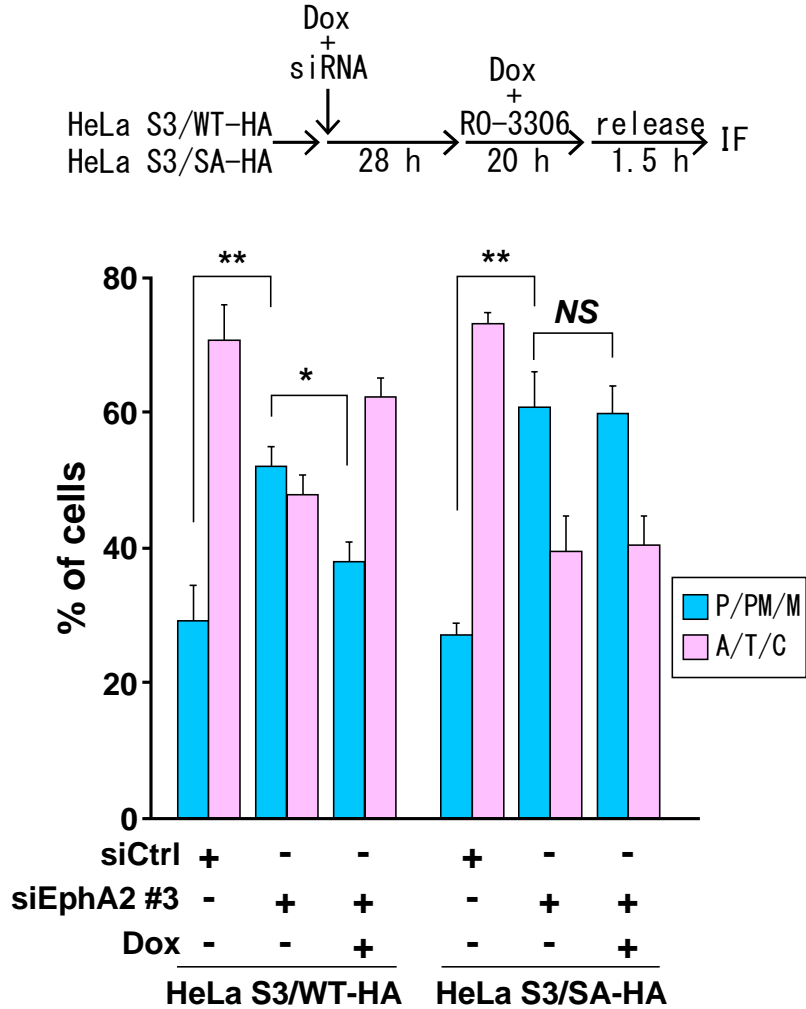


図 2-12 HeLa S3/EphA2 WT-HA、HeLa S3/SA-HA 株を用いた細胞分裂の進行の評価

HeLa S3/EphA2 WT-HA または HeLa S3/SA-HA にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (#3, 3' UTR) を導入し、同時に Dox (WT: 5 µg/mL, SA: 0.5 µg/mL) を添加した。28 時間後、8 µM R0-3306 と Dox を添加し、20 時間後、PBS (+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。簡単なスキームを棒グラフの上に示した。細胞を固定後、免疫染色を行い、細胞分裂の進行を評価し、各実験で 199 個以上の細胞を解析した。データは平均±S.D.で表し、検定は Tukey-Kramer test により行った (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, NS, not significant)。

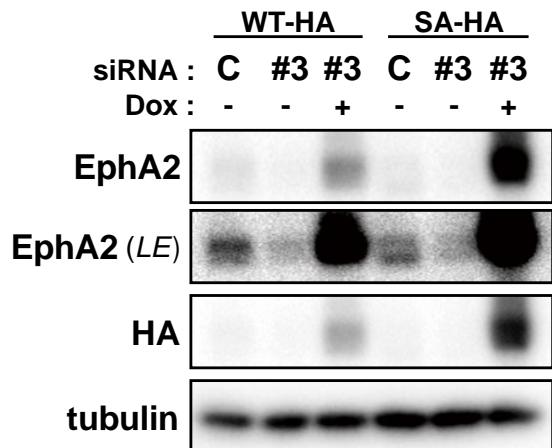


図 2-13 HeLa S3/EphA2 WT-HA または HeLa S3/SA-HA 株の発現確認

HeLa S3/EphA2 WT-HA または HeLa S3/SA-HA にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (#3, 3' UTR) を導入し、同時に Dox (WT: 5 µg/mL, SA: 0.5 µg/mL) を添加した。48 時間後、それぞれの細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

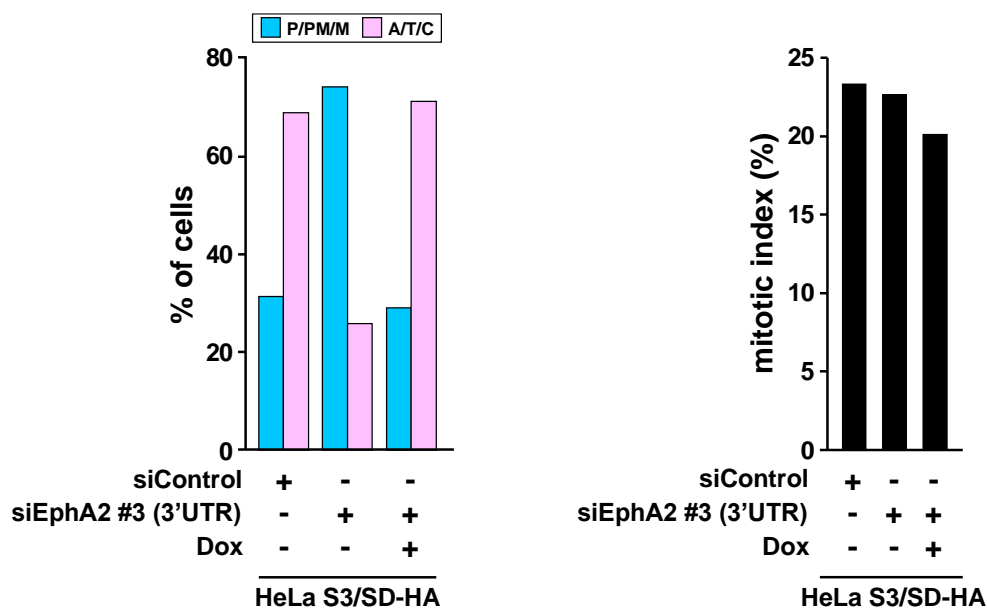


図 2-14 HeLa S3/EphA2 SD-HA 株を用いた細胞分裂の進行の評価

HeLa S3/EphA2 SD-HA にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (#3, 3' UTR) を導入し、同時に Dox (5 µg/mL) を添加した。28 時間後、8 µMRO-3306 と Dox を 20 時間処理し、PBS(+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。細胞を固定後、免疫染色を行い、細胞分裂の進行や分裂期細胞の割合を評価した。それぞれ、207 個以上の細胞を解析した。

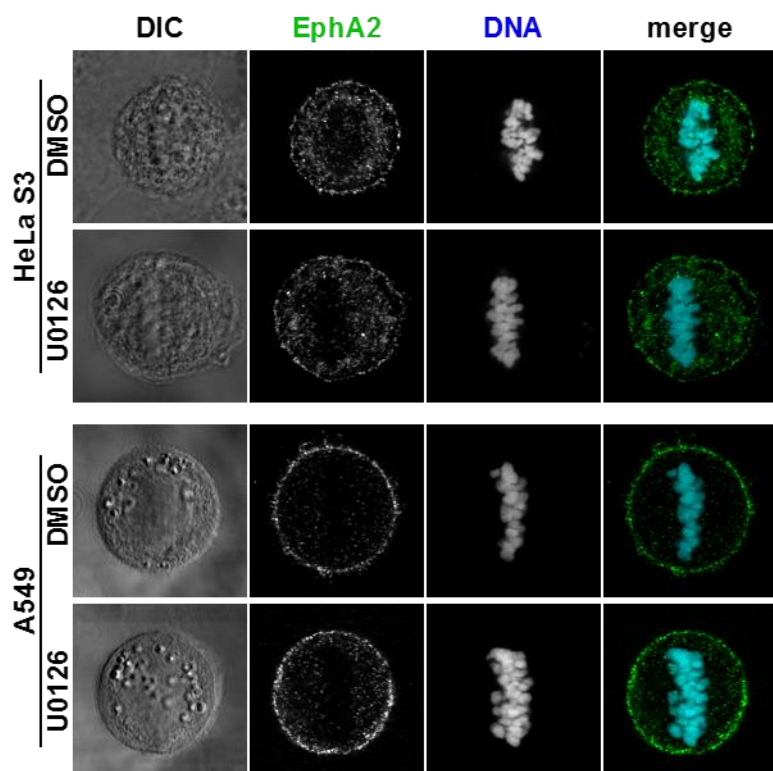


図 2-15 U0126 処理が EphA2 局在に及ぼす影響

HeLa S3 細胞 (top) あるいは A549 細胞 (bottom) に 6 µMRO-3306 を 20 時間処理した。PBS(+) で細胞を洗い、30 分間培養した後、10 µM MG-132 を 1 時間処理した。HeLa S3 細胞はメタノール、A549 細胞は 4% HCHO を含む PTEM バッファーにより固定し、EphA2 (green) と DNA (cyan) を染色した。

## 2-4 考察

第2章では間期から細胞分裂期に移行すると、増殖因子やリガンドの刺激とは無関係に、EphA2 Tyr588 から Ser897 へとリン酸化部位が切り替ることを明らかにした (図 2-2~4)。EphA2 と ephrin-A1 は共に細胞膜に発現しているため、EphA2 がリガンドにより活性化されるためには細胞間接着が必要となる。細胞分裂期に入ると丸い形態をとるため、周りの細胞との細胞間接着が消失する。これに伴い、細胞分裂期に入ると ephrin-A1-EphA2 間の結合も解消することが予想される。それ故、細胞分裂期に入ると ephrin-A1 の刺激による EphA2 Tyr588 のリン酸化が消失し、さらに Cdk1 が活性化することで MEK/ERK/RSK 経路が活性化し、EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進したと考えられる。

細胞分裂期に入ると、中心体で活性化された Cdk1/cyclin B1 複合体は、<sup>59</sup> 微小管上の B-Raf を活性化することが報告されている。<sup>60</sup> さらに、Raf の下流分子である ERK/RSK も細胞分裂期では活性化されることも報告されていることから、<sup>61-63</sup> 細胞分裂期では Cdk1/B-Raf/MEK/ERK/RSK 経路が機能している可能性が考えられる。よって、本研究で得られた、EphA2 Ser897 が Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路によりリン酸化されることはこれらの報告と矛盾しない。細胞分裂期において、Cdk1 は中心体上、ERK や RSK は微小管上に局在することから、<sup>61-63</sup> Cdk1/ERK/RSK 経路の活性化は中心体から微小管上にかけて起きていると推測される。抗 EphA2 p-Ser897 抗体を用いて細胞分裂期における EphA2 Ser897 がリン酸化された際の局在を観察したところ、中心体において EphA2 Ser897 のリン酸化シグナルが観察された。しかし、U0126 (MEK 阻害剤) 処理による EphA2 Ser897 のリン酸化抑制や、siRNA を用いた EphA2 のノックダウンのいずれにおいても中心体のシグナルが消失しなかった。よって、抗 EphA2 p-Ser897 抗体により観察された EphA2 p-Ser897 の中心体局在は、おそらく非特異的なシグナルであると考えられる。また、HeLa S3 細胞または A549 細胞に U0126 を処理しても細胞膜からの EphA2 の局在の変化は観察されなかった (図 2-15)。さらに、野生型 EphA2、EphA2 Ser897Ala (Ser897 非リン酸化状態)、EphA2 Ser897Asp (Ser897 リン酸化の模倣) 変異体の全てが細胞膜に局在していた。よってこれらの結果から、EphA2 Ser897 のリン酸化の有無に関わらず、EphA2 は細胞膜に局在すると考えられる。

第1章では、HeLa S3 細胞に Eph 受容体の Tyr キナーゼ活性の阻害剤である NVP-BHG712 を処理すると細胞分裂進行の遅延が観察されたが (図 1-1)、これは当初、NVP-BHG712 が EphA2 のキナーゼ活性を抑制することで細胞分裂進行の遅延を引き起こしたと考えていた。しかし、図 2-2、3 などの結果から、細胞分裂期では EphA2 Tyr588 のリン酸化レベルが低下していたことから、EphA2 のチロシンキナーゼ活性が低下していることが分かった。これまでに、NVP-BHG712 を低濃度で処理した際でも MEK/ERK の上流分子である c-Raf を阻害することが報告されている。<sup>46</sup> 実際、NVP-BHG712 を処理すると、EphA2 Tyr588 だけでなく、EphA2 Ser897 のリン酸化も抑制された (図 1-2)。これらのことから、NVP-BHG712 処理で観察された細胞分裂進行の遅延は、NVP-BHG712 が EphA2 Ser897 の上流である c-Raf/MEK/ERK の阻害したことで引き起こされたと考えられる。

## 2-5 小括

本章では以下の事を明らかにした。間期から細胞分裂期に移行すると、EphA2 Tyr588 のリン酸化が消失し、EphA2 Ser897 のリン酸化が顕著に亢進した。また、この EphA2 Ser897 のリン酸化は細胞分裂期で活性化された Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路によって引き起こされたことを明らかにした。さらに、細胞分裂期での Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路による EphA2 Ser897 のリン酸化は、正常な細胞分裂進行に必要であることを見出した。



## 第3章 EphA2 Ser897/Ephexin4/RhoG 経路による cortical rigidity の制御

### 3-1 緒言

第2章までに、Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路によりリン酸化された EphA2 Ser897 が正常な細胞分裂進行に必要であることを明らかにした。これまでに、間期において、EphA2 は RhoG GEF [GDP 結合型 (不活性型) から GTP 結合型 (活性型) に変換する酵素] である Ephexin4 と EphA2 Ser897 のリン酸化依存的に相互作用することが報告されている。<sup>33</sup> EphA2 が Ephexin4 と相互作用することで RhoG が細胞膜付近で活性化され、さらにその下流の Rac1 が活性化される。これにより、アクチンダイナミクスを伴うラメリポディアの形成が促進し、細胞の浸潤や遊走が亢進することが報告されている。<sup>43</sup> 細胞分裂期において、アクチン骨格は両極から染色体とは反対の細胞膜側に伸びた微小管 (星状体微小管 ; astral MTs) を介して紡錘体や中心体を繋ぎ止めている。しかし、アクチン骨格の機能が破綻すると、星状体微小管をアクチン骨格に繋ぎ止めることが出来ず、染色体整列の失敗、多極紡錘体 (multipolar spindle) の形成などの異常が現れる。<sup>23</sup> 間期ではあるものの、EphA2 Ser897 の下流分子である Ephexin4/RhoG がアクチン骨格を制御していることから、細胞分裂期でも EphA2 Ser897 が Ephexin4/RhoG 経路を介してアクチン骨格に影響している可能性が考えられた。第1章で EphA2 のノックダウンにより、多極紡錘体 (multipolar spindle) の形成や染色体が整列せず分裂期の前半に留まっている細胞が多く観察されたが、EphA2 Ser897 のリン酸化がアクチン骨格の制御を介し、紡錘体形成に関与する可能性が考えられた。

以上のことから、EphA2 Ser897 の下流分子として Ephexin4 や RhoG の関与が考えられたが、これらの細胞分裂期における機能は全く知られていない。そこで本章では Ephexin4/RhoG 経路の細胞分裂進行やアクチン骨格への関与について解析した。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 材料

MDA-MB-231 細胞は European Collection of Cell Cultures 社 (#92020424、Salisbury、UK) から購入し、2mM L-グルタミン、10% FBS を含む L-15 培地 (Merck、Darmstadt、Germany) で 37°C、非 CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。A549 細胞は Japanese Cancer Research Resources Bank (東京) から購入し、2mM L-グルタミン、20mM HEPES (pH 7.4)、5% FBS を含む DMEM 培地中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した。

本章で用いた抗体情報と使用方法に関する情報を以下に示した。

- ・抗ラビット ARHGEF16 (Ephexin4) 抗体 : ×1000、A301-961A (Bethyl Laboratories、Montgomery、TX、USA)
- ・抗ゴート HSC70 抗体 : ×2000、sc-1059、Santa Cruz Biotechnologies
- ・抗ラビット EphA2 抗体 : ×200 (IF)、Cell Signaling Technology
- ・抗マウス RhoG 抗体 : ×200 (IF)、×1000 (WB)、sc-80015、Santa Cruz Biotechnologies
- ・抗マウス FLAG 抗体 : ×1000、M2、F1804、Sigma-Aldrich
- ・抗ラビット phospho-Myosin Light Chain Ser<sup>19</sup> 抗体 : ×500、#3671S、Cell Signaling Technology

本章で新たに使用した阻害剤は全て DMSO に溶解し、購入先や保存条件に関する情報は以下に示した。

- ・サイトカラシン B : WAKO、-30°C 保存
- ・S-trityl-L-cysteine (STLC) : Sigma-Aldrich、-30°C 保存

本章で新たに使用したプラスミド DNA の情報は下記の通りである。

- ・pENTR4-FLAG (w210-2; #17423、Addgene plasmid) は Eric Campeau、Paul Kaufman から譲渡して頂いた。<sup>65</sup>
- ・pcDNA3.1-Myc-RhoG : GenScript、東京

### 3-2-2 免疫沈降法

2-2-9 で記載したように予め、プロテイン G セファロースビーズと各実験で用いる抗体を混ぜ、室温で 3 時間反応させた。

MDA-MB-231 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、一晚培養した。間期の細胞は PBS (-) で細胞を洗った後、3.42 mM EDTA/PBS (-) により 37°C で 10–20 分間培養して剥がした。分裂期細胞 (Prometaphase) は 5 μM STLC (Sigma-Aldrich) を 16 時間処理した後、文鎮でディッシュを叩いて (mitotic shake-off) 培地ごと回収した。それぞれ、室温で 5 分間遠心 (800 rpm) した後、PBS (-) で

細胞を洗い、swing man で 1-2 分間遠心した。PBS (-) を除去した後、25 mM HEPES-NaOH、2 mM EDTA-NaOH、5% グリセロール、50 mM フッ化ナトリウム、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アプロチニン、0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペプスタチン A、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ロイペプチン、2 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム、1% Triton X-100 を含む Triton Lysis Buffer を用い、10 分間水中で細胞を溶解した。4°C で 10 分間、遠心 (15000 rpm) した後、抗 Ephexin4 抗体あるいはラビット由来アイソタイプコントロール IgG 抗体と結合させたプロテイン G セファロースビーズに加え 4°C で 3 時間反応させた。swing man で 1-2 分間遠心し、免疫沈降物を SDS サンプルバッファーに溶解した。

MDA-MB-231/EphA2 wild-type-HA、MDA-MB-231/EphA2 S897A-HA 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、一晚培養した。いずれも 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox を 32 時間処理した後、Dox とともに 5  $\mu\text{M}$  STLC を 16 時間処理して細胞分裂期 (prometaphase) に同調した。以降は上記の方法に則り、抗 HA 抗体またはマウス由来アイソタイプコントロール IgG 抗体を用いて免疫沈降を行った。

### 3-2-3 免疫染色法

RhoG を染色する際は、カバーガラスに播種した細胞を 37°C に温めておいた 4% HCHO を含む PBS (-) により室温で 20 分間固定した。HeLa S3 細胞の内在性 EphA2 の染色は、冷 100% MeOH を加え、-30°C で 5 分間固定した。また、A549 細胞の内在性 EphA2 の染色は、4% HCHO を含む PTEM バッファー [2 mM PIPES (pH 6.8)、0.2% Triton X-100、10 mM EGTA、1 mM  $\text{MgCl}_2$ ] により室温で 20 分間固定した。以降のブロッキング、一次・二次抗体との反応は 1-2-6 と同様の手順で行った。画像取得や蛍光観察は共焦点顕微鏡 (LSM800; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いた。画像は 60  $\times$  1.42 NA 油浸対物レンズを用い、Hoechst 33342、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555 の蛍光をそれぞれ 400–460 nm、510–550 nm、570–620 nm の蛍光フィルターを用いて検出した。

### 3-2-4 RhoG の cortex 局在率の評価

RhoG を免疫染色し、共焦点顕微鏡により各サンプルにつきそれぞれ分裂期細胞 (metaphase) が 30 個程度含まれる画像を取得した。ImageJ ソフトウェアを用いて細胞全体の蛍光強度、細胞膜より約 0.5  $\mu\text{m}$  内側の蛍光強度を計測した。それぞれの蛍光強度からバックグラウンドを引き、細胞全体の蛍光強度と細胞膜より内側の蛍光強度の差を cortex に局在する RhoG の蛍光強度とした。算出した cortex に局在する RhoG の蛍光強度と細胞全体の蛍光強度から RhoG の cortex 局在率 (%) を評価した。

### 3-2-5 FLAG-RhoG WT と FLAG-RhoG Gly12Val 変異体の作製

野生型 FLAG-RhoG を作製するにあたり、ベクターとして pENTR4-FLAG を Kpn I と Xho I で消化した。インサートとして pcDNA3.1-Myc-RhoG も同様に Kpn I と Xho I で消化し、これらを Ligation Mix (Takara) を用いて 16°C で 8 時間ライゲーションした。作製した pENTR4-FLAG-RhoG を 2-2-7 で

記述した Gateway テクノロジーにより pLIX\_402 ウイルスベクターと組み換えた。FLAG-RhoG Gly12Val 変異体の作製は、pENTR4-FLAG-RhoG を鋳型として DNA ポリメラーゼに KOD-plus-Neo を用い、2-2-6 で記述した手順で行った。作製した変異体に目的の変異が導入されていることをシーケンス解析で確認した。使用したプライマーは全て Eurofins Genomics 社から購入し、それぞれの配列を下記の Table 3-1、-2 に示した。

**Table 3-1 pENTR4-FLAG-RhoG G12V 作製に使用したプライマー**

Name	Primer
RhoG G12V	Sense Primer: 5'-GGTGATGTTGCTGTGGGCAAGACGTGC-3' Antisense Primer: 5'-CACAGCAACATCACCCACCACCACGCA-3'

**Table 3-2 pENTR4-FLAG-RhoG G12V のシーケンス解析に使用したプライマー**

Name	Primer
pENTR Fseq	Forward Primer: 5'-CTACAAACTCTTCCTGTTAGTTAG-3'
pENTR Rseq	Reverse Primer: 5'-ATGGCTCATAACACCCCTTG-3'

### 3-2-6 Time-lapse imaging による blebbing 形成細胞の評価

siRNA を処理した HeLa S3 細胞を 8  $\mu$ M RO-3306 により G2/M 期に停止させた後、PBS (+) で細胞を洗い、30 分間培養した後に 10  $\mu$ M MG-132 を処理して細胞分裂中期 (metaphase) に停止させた。0.25  $\mu$ g/mL または 2  $\mu$ g/mL サイトカラシン B を 10  $\mu$ M MG-132 と共に 10 分間処理し、Time-lapse imaging (Operetta; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を 5 分間隔で行い、15 分間で blebbing を形成した細胞の割合を算出した。

### 3-3 実験結果

#### 3-3-1 細胞分裂における Ephexin4 の役割

第2章までに、EphA2 Ser897 のリン酸化が細胞分裂の進行に関与していることを明らかにしてきたが、それでは EphA2 Ser897 がどのようにして細胞分裂を制御しているのだろうか。これまでに、間期において、トリプルネガティブ乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞では EphA2 が RhoG GEF である Ephexin4 と相互作用すること、<sup>43</sup> さらにその結合には Ser897 のリン酸化が必要であることが報告されている。<sup>64</sup> そこで、MDA-MB-231 細胞を用いて細胞分裂期における EphA2 と Ephexin4 の関与について解析した。

第1章で示したように、MDA-MB-231 細胞の内在性 EphA2 をノックダウンすると、HeLa S3 細胞や hTERT RPE-1 細胞と同様に細胞分裂進行が遅延した (図 1-6)。よって、EphA2 と Ephexin4 の相互作用を解析するにあたり、MDA-MB-231 細胞を用いることは妥当であると考えられる。STLC 未処理群 (間期) と処理群 (細胞分裂期; prometaphase) の MDA-MB-231 細胞から抗 Ephexin4 抗体を用いて免疫沈降を行い、EphA2 と Ephexin4 の相互作用を解析した。その結果、これまでに報告されている間期 [STLC(-)] における相互作用に加え、細胞分裂期 [STLC(+)] においても相互作用が観察された (図 3-1)。また、図 3-1 から、EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進する細胞分裂期では、間期と比べ、EphA2 と Ephexin4 がより強く相互作用していることが読み取れる。つまり、過去の報告にある EphA2 と Ephexin4 の相互作用が Ser897 のリン酸化依存的であることをサポートし、さらに、細胞分裂期ではより EphA2 p-Ser897/Ephexin4 経路の持つ役割が大きいことが推測される。

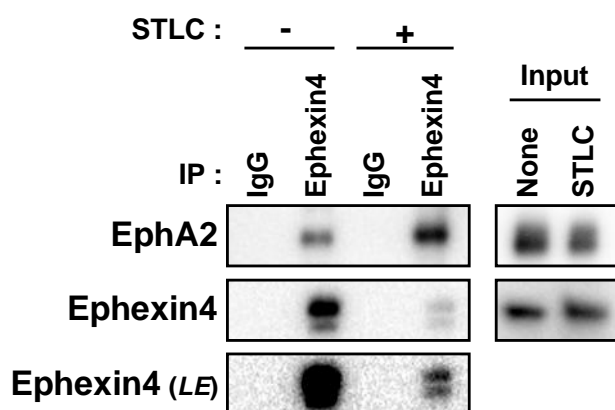


図 3-1 間期と細胞分裂期での EphA2 と Ephexin4 との相互作用

MDA-MB-231 細胞に 5  $\mu$ M STLC を 16 時間処理した後、mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。間期の細胞は EDTA/PBS (-) で剥がし、それぞれ抗 Ephexin4 抗体で免疫沈降した。免疫沈降物をそれぞれ図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。ネガティブコントロールとしてラビットアイソタイプコントロール IgG 抗体を用いた。LE, long exposure

細胞分裂期における EphA2 と Ephexin4 の相互作用が EphA2 Ser897 のリン酸化に依存しているか評価するため、MDA-MB-231 細胞に Dox 添加により野生型 EphA2 または Ser897Ala 変異体を誘導発現する安定発現株 (MDA-MB-231/WT-HA, MDA-MB-231/SA-HA) を作製した。これらの細胞株を用いて相互作用を解析したところ、細胞分裂期において野生型 (WT-HA) は Ephexin4 との相互作用が観察されたが、Ser897Ala 変異体 (SA-HA) では Ephexin4 との相互作用が減弱した (図 3-2)。

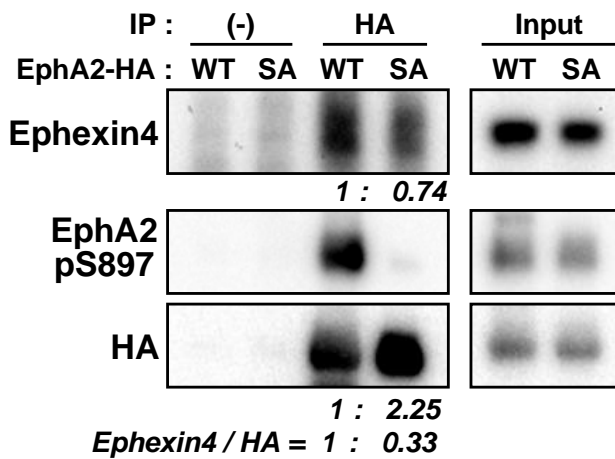


図 3-2 MDA-MB-231 細胞における p-Ser897 依存的な EphA2 と Ephexin4 との相互作用

MDA-MB-231/WT-HA または MDA-MB-231/SA-HA 株に Dox (WT: 5  $\mu$ g/mL, SA: 5  $\mu$ g/mL) を 32 時間処理した。5  $\mu$ M STLC と Dox を 16 時間処理した後、mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。抗 HA 抗体を用いて WT-HA または SA-HA を免疫沈降し、それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。コントロールとして、抗体を結合させていないプロテイン G セファロースを用いた。数値は定量値を表す。

次に、EphA2 と相互作用する Ephexin4 が細胞分裂期において機能を有するか、siRNA を用いて HeLa S3 細胞の内在性 Ephexin4 をノックダウンし、細胞分裂の進行に及ぼす影響を解析した。その結果、EphA2 のノックダウンと同様、Ephexin4 のノックダウンにより細胞分裂進行が遅延した (図 3-3-a, b)。さらに、HeLa S3/WT-V5 または HeLa S3/SA-V5 株を用いて EphA2 と Ephexin4 の相互作用を解析したところ、MDA-MB-231 細胞と同様に、野生型 (WT-V5) は Ephexin4 と共沈したが、Ser897Ala 変異体 (SA-V5) と Ephexin4 の相互作用は野生型と比べて低下した (図 3-4)。

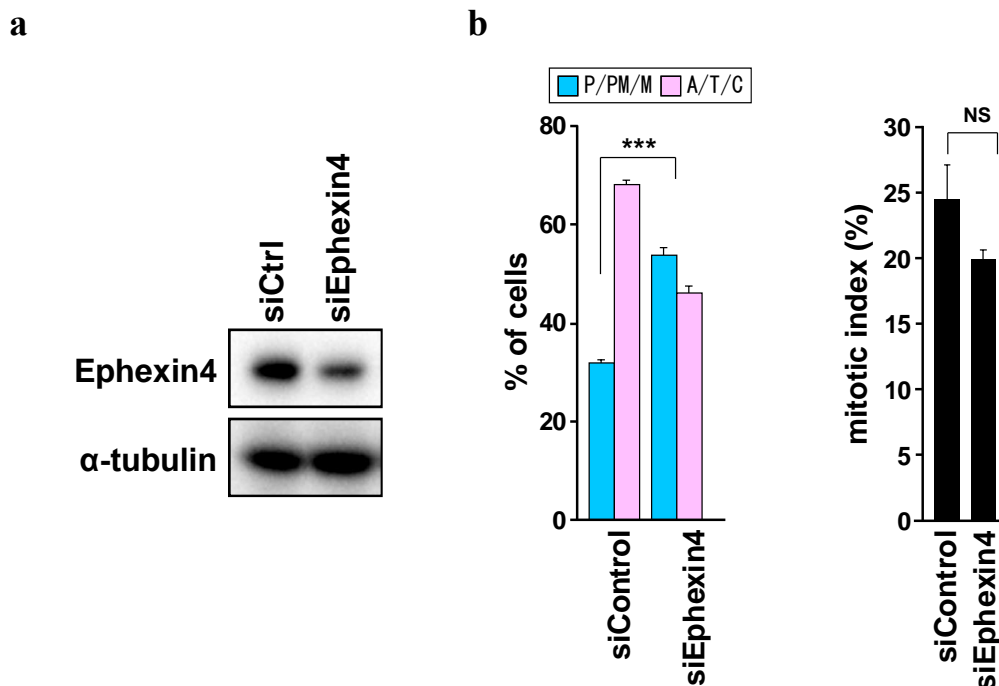


図 3-3 Ephexin4 のノックダウンによる細胞分裂の遅延

(a) HeLa S3 細胞にコントロール siRNA あるいは siEphexin4 を導入し、48 時間後に回収した。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

(b) HeLa S3 細胞にコントロール siRNA あるいは siEphexin4 を導入し、28 時間後に 8  $\mu$ M RO-3306 を処理した。20 時間後、PBS (+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。図 1-2 と同様に細胞分裂の進行や分裂期細胞を評価した。各実験で 209 個以上の細胞を解析した。データは平均  $\pm$  S.D. で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3, \*\*\* $p$  < 0.001, NS, not significant)。

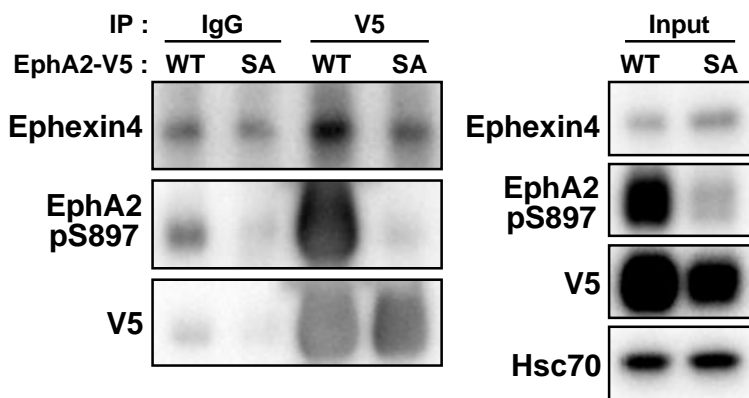


図 3-4 HeLa S3 細胞における p-Ser897 依存的な EphA2 と Ephexin4 との相互作用

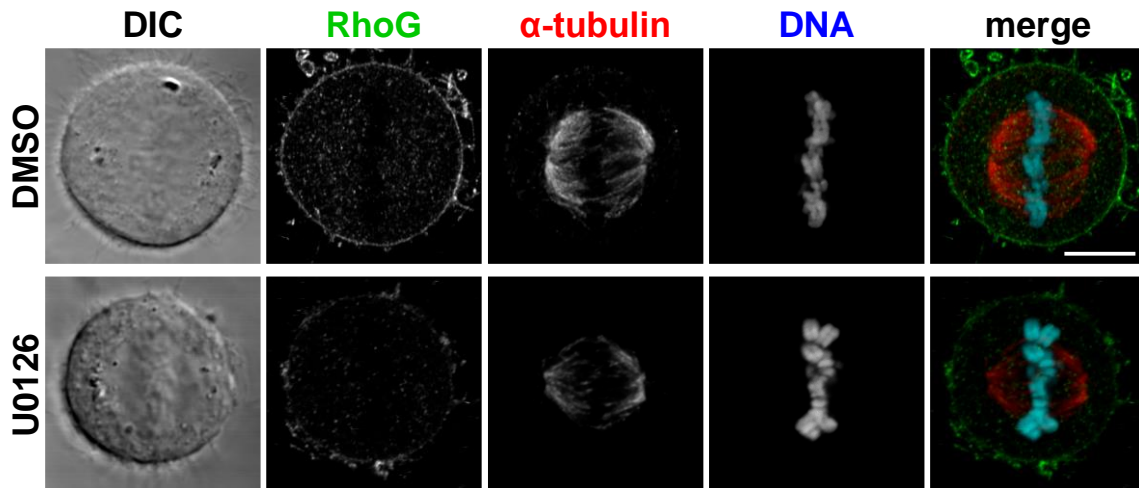
HeLa S3/WT-V5 または HeLa S3/SA-V5 に 5  $\mu$ M STLC を 16 時間処理した後、mitotic shake-off により分裂期細胞を回収した。抗 V5 抗体を用いて WT-V5 または SA-V5 を免疫沈降し、それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。コントロールとしてマウス由来アイソタイプコントロール IgG 抗体を用いた。

以上のことから、間期同様、細胞分裂期においても、Ser897 のリン酸化依存的に EphA2 と Ephexin4 が相互作用し、EphA2 の下流で Ephexin4 が細胞分裂の進行を制御していることが示唆された。

### 3-3-2 EphA2 p-Ser897/Ephexin4 経路依存的な RhoG の cortex 局在

間期では、増殖因子の刺激により EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進した結果、EphA2 と Ephexin4 (RhoG GEF ; GDP が結合した不活性型から GTP が結合した活性型に置換) が結合する。これに伴い、細胞膜に局在する Ephexin4 により RhoG が活性化し、RhoG が細胞膜へとリクルートされることが報告されている。<sup>43</sup> そこで、細胞分裂期における EphA2 Ser897 のリン酸化の亢進が RhoG の細胞膜へのリクルートに影響を及ぼすか解析した。EphA2 Ser897 の上流である MEK の阻害剤 (U0126) を細胞分裂期特異的に作用させたところ、溶媒コントロール (DMSO) 処理群と比べ RhoG の cortex 局在が減少した (図 3-5)。また、EphA2 の下流である Ephexin4 を siRNA によりノックダウンしたところ、コントロール siRNA (siCtrl) 処理群と比べ RhoG の cortex 局在が減少した (図 3-6)。一方、A549 および HeLa S3 細胞に U0126 を処理しても、EphA2 の局在の変化は観察されなかった (図 2-15)。これらのことから、細胞分裂期において、MEK/ERK/RSK/EphA2 Ser897/Ephexin4 経路は EphA2 の局在に影響することなく、RhoG の cortex への局在を制御することが示唆された。

a



b

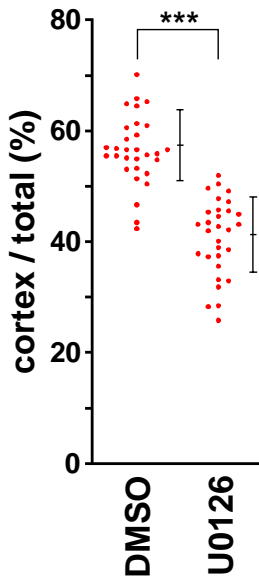
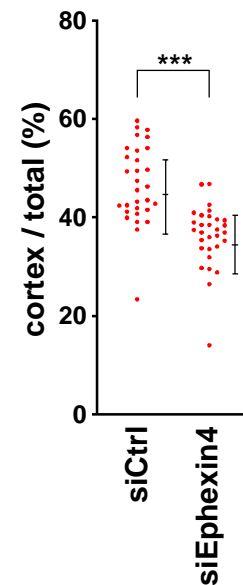
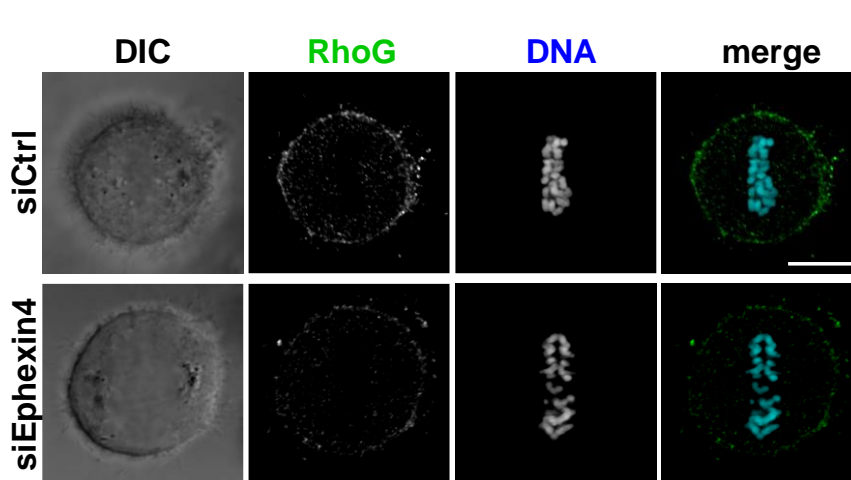


図 3-5 U0126 処理による RhoG の cortex 局在の低下

(a) HeLa S3 細胞に 8  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理し、PBS (+) で細胞を洗った後、溶媒コントロール (DMSO) または 10  $\mu$ M U0126 を 30 分間処理した。10  $\mu$ M MG-132 と共に DMSO または 10  $\mu$ M U0126 を 30 分間処理し、細胞を固定した。RhoG (green)、 $\alpha$ -tubulin (red)、DNA (cyan) を染色した。Scale bar: 10  $\mu$ m

(b) (a) で染色した細胞のうち、細胞分裂中期 (metaphase) の細胞を共焦点顕微鏡により画像取得し、3-2-4 に示した方法で RhoG の cortex 局在率を算出した。各実験で 30 個の細胞を解析した。データは平均  $\pm$  S.D. で表し、検定は Student's t-test により行った ( $n=3$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。



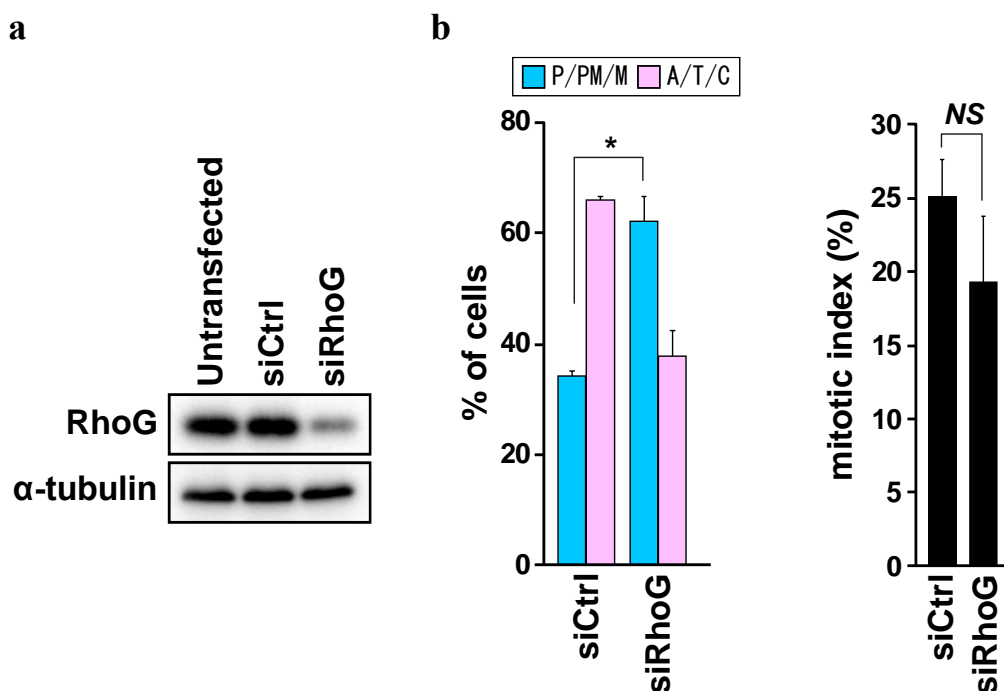


### 図 3-6 Ephexin4 のノックダウンによる RhoG の cortex 局在の低下

HeLa S3 細胞にコントロール siRNA あるいは siEphexin4 を導入し、28 時間後に 6  $\mu$ M RO-3306 を処理した。20 時間後、PBS (+) で細胞を洗い、30 分間培養した後、10  $\mu$ M MG-132 を 1 時間処理した。細胞を固定し、RhoG (green) と DNA (cyan) を染色した。図 3-6 と同様に cortex に局在する RhoG の蛍光強度を定量した。各実験で 30 個の細胞を解析した。データは平均 $\pm$ S.D.で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3, \*\*\* $p$ <0.001)。Scale bar: 10  $\mu$ m

### 3-3-3 RhoG のノックダウンによる細胞分裂進行の遅延

3-3-2 で記述したように、細胞分裂期において、MEK/ERK/RSK/EphA2 Ser897/Ephexin4 経路依存的に RhoG が cortex に局在するが、これまでに RhoG の細胞分裂期における機能は全く知られていない。そこで RhoG の細胞分裂への関与を解析するため、siRNA を用いて RhoG をノックダウンし、細胞分裂の進行を評価したところ、EphA2 や Ephexin4 のノックダウンと同様、進行が遅延した (図 3-7)。このことから、RhoG は EphA2 Ser897/Ephexin4 経路の下流で細胞分裂の進行を制御していることが示唆された。



### 図 3-7 RhoG ノックダウンによる細胞分裂の進行の遅延

(a) HeLa S3 細胞にコントロール siRNA あるいは siRhoG を導入し、48 時間後に回収した。それぞれを図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

(b) HeLa S3 細胞にコントロール siRNA あるいは siRhoG を導入し、28 時間後に 6  $\mu$ M RO-3306 を処理した。20 時間後、PBS (+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した後、細胞を固定し、 $\alpha$ -tubulin 及び DNA を免疫染色した。図 1-2 と同様に細胞分裂の進行や分裂期細胞を評価した。各実験で 218 個以上の細胞を解析した。データは平均 $\pm$ S.D.で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3, \* $p$ <0.05, NS, not significant)。

### 3-3-4 活性型 RhoG は EphA2 のノックダウンによる細胞分裂進行の遅延を回復する

EphA2 p-Ser897/Ephexin4 経路の阻害で RhoG が cortex から非局在化すること、EphA2、Ephexin4、あるいは RhoG のいずれのノックダウンにおいても細胞分裂の進行が遅延することから、RhoG が EphA2 p-Ser897/Ephexin4 経路の下流で細胞分裂の進行を制御すると仮説を立てた。RhoG は活性型である GTP 結合型と不活性型である GDP 結合型を往復することで様々な分子を制御している。<sup>43,66</sup> もし、間期同様、細胞分裂期においても RhoG が EphA2 の下流分子として機能しているならば、活性型 RhoG は EphA2 の阻害による細胞分裂進行の遅延を回復することが可能だと考えた。RhoG の 12 番目の Gly を Val に置換することで恒常的活性型となることが知られている。<sup>67</sup> そこで、活性型変異体 (FLAG-RhoG-G12V) を作製した。

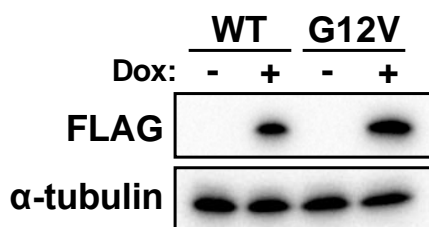


図 3-8 野生型と活性型 RhoG の発現量の比較

HeLa S3/FLAG-RhoG-WT または HeLa S3/FLAG-RhoG-G12V 株に Dox を 48 時間処理した (WT: 1 μg/mL、G12V: 4 μg/mL)。それぞれの細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

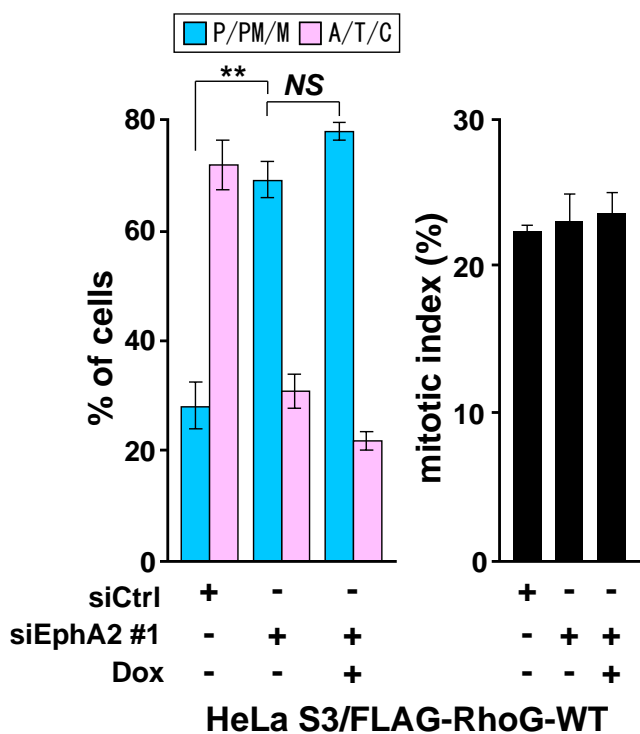


図 3-9 EphA2 ノックダウンに起因する細胞分裂進行の遅延は野生型 RhoG では回復しない

HeLa S3/FLAG-RhoG-WT 株にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (#1) を導入し、同時に 1 μg/mL Dox を添加した。28 時間後、6 μM RO-3306 と Dox を 20 時間処理し、PBS (+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。細胞を固定後、免疫染色を行い、細胞分裂の進行や分裂期細胞を評価した。各実験で 215 個以上の細胞を解析した。データは平均±S.D.で表し、検定は Tukey-Kramer test により行った (n=3, \*\*p < 0.01、NS, not significant)。

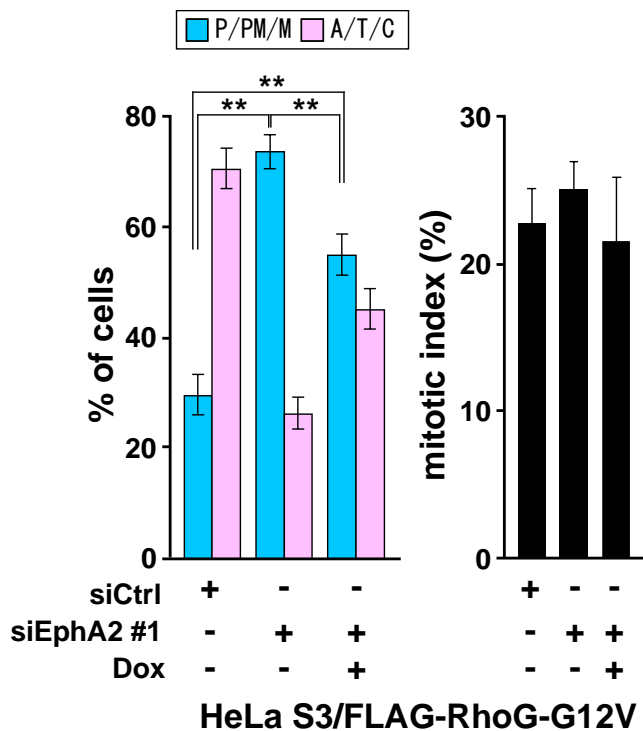


図 3-10 EphA2 ノックダウンに起因する細胞分裂進行の遅延は活性型 RhoG で回復する

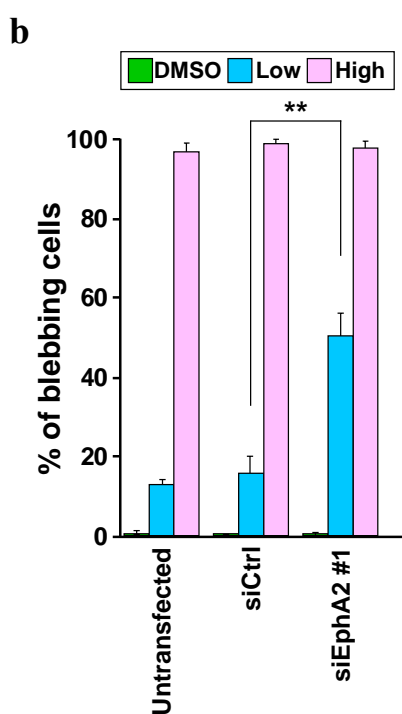
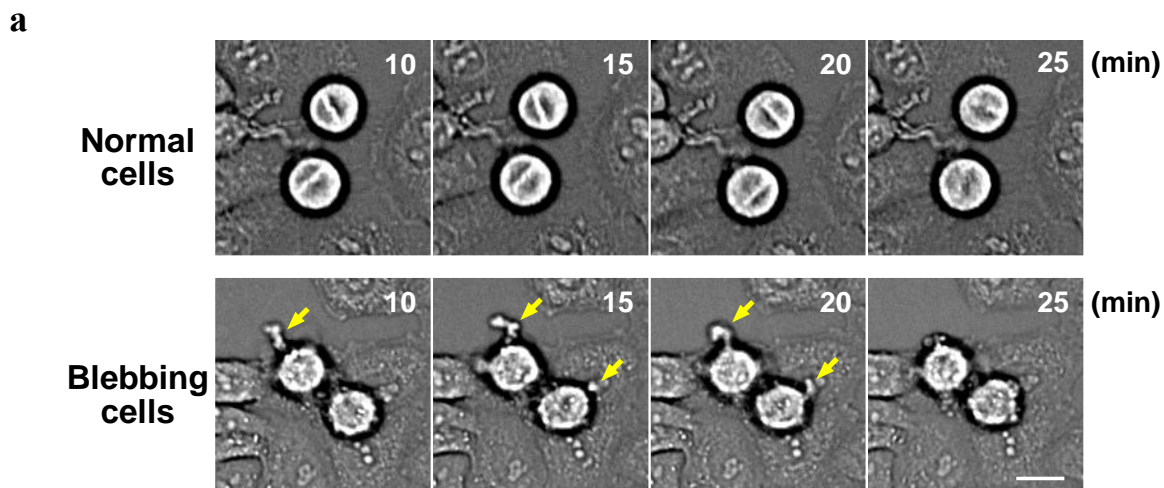
HeLa S3/FLAG-RhoG-G12V 株にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (#1) を導入し、同時に 4  $\mu$ g/mL Dox を添加した。28 時間後、6  $\mu$ M RO-3306 と Dox を 20 時間処理し、PBS(+) で細胞を洗い、1.5 時間培養した。細胞を固定後、免疫染色を行い、細胞分裂の進行や分裂期細胞を評価した。各実験で 196 個以上の細胞を解析した。データは平均 $\pm$ S.D.で表し、検定は Tukey-Kramer test により行った (n=3、\*\*p < 0.01)。

そこで、HeLa S3 細胞を用いて、Dox 添加により野生型 RhoG あるいは活性型 RhoG を誘導発現する安定発現株 (HeLa S3/FLAG-RhoG-WT、HeLa S3/FLAG-RhoG-G12V) を作製した。Dox の処理濃度を調整することで FLAG-RhoG-WT と RhoG-G12V の発現レベルを同程度にした (図 3-8)。これらの細胞株を用いて上記のレスキュー実験を行った結果、野生型 RhoG の誘導発現では EphA2 のノックダウンにより引き起こされる細胞分裂進行の遅延を回復できなかったが (図 3-9)、活性型 RhoG の誘導発現により回復した (図 3-10)。しかし、図 3-10 においてコントロール siRNA 処理群と siEphA2+Dox (活性型 RhoG) 処理群の間にも差があり、活性型 RhoG によっても EphA2 のノックダウンによる細胞分裂進行の遅延が完全には回復しなかった。これは、EphA2 のノックダウン時に、野生型のみならず活性型 RhoG を誘導発現しても、明確な RhoG の細胞膜局在が観察出来なかったことと矛盾しない。つまり、足場となるはずの EphA2 がノックダウンにより消失するため、RhoG が細胞膜に局在できないのかもしれない。しかし、活性型 RhoG の誘導発現により、EphA2 のノックダウンが引き起こす細胞分裂進行の遅延を、部分的ではあるが、回復したことから、細胞分裂期において、RhoG は EphA2 Ser897/Ephexin4 経路の下流で活性化され、細胞分裂の進行を制御していることが示唆された。

### 3-2-5 EphA2 p-Ser897/RhoG 経路の抑制による cortical rigidity の低下

前述したように、Cdk1/MEK/ERK/RSK/EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路により細胞分裂が制御されていることが明らかとなったが、では何故この経路を阻害すると細胞分裂進行が遅延するのだろうか。これまでに間期において、EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路が Rac1 を活性化することでアクチン骨格の形態変化を伴うラメリポディアを形成し、細胞の遊走・浸潤を促進することが報告されている。<sup>43,64,68</sup> 細胞分裂期において、アクチン骨格を含めた細胞表面の強度 (cortical rigidity) は細胞の形態のみならず、星状体微小管 (astral MTs) を介して微小管の形態や中心体の分配に寄与している。そのため、細胞分裂期において cortical rigidity が低下すると多極紡錘体や微小管の位置が非対称になることが知られている。<sup>69,70</sup> しかし、RhoA とは異なり、RhoG の細胞分裂期における機能は全く知られておらず、本研究では Cdk1/MEK/ERK/RSK/EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路が、細胞分裂期における cortical rigidity にどのように関与しているか解析した。

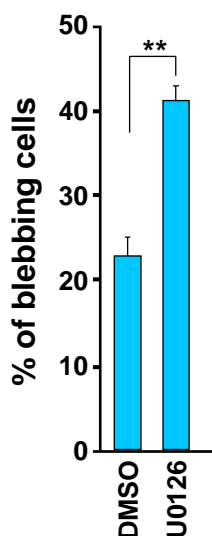
ミオシンの移動に起因するアクチン骨格の収縮力の低下や、アクチンと細胞膜間の結合の低下により cortical rigidity が低下すると、blebbing (図 3-11-a 参照) が形成することが知られている。<sup>71</sup> EphA2 p-Ser897/RhoG 経路のアクチン骨格への寄与を評価するため、細胞分裂中期 (metaphase) の細胞の blebbing 形成率を調べた (図 3-11-a)。ポジティブコントロールとして用いたアクチン重合阻害剤のサイトカラシン B を高濃度 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で処理すると、ほとんどの細胞で blebbing を形成したが、サイトカラシン B の低濃度処理 (0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) では blebbing 形成細胞の割合が 20%程度であり (図 3-11-b; Untransfected, siCtrl)、低濃度のサイトカラシン B 処理で分裂期細胞のアクチン骨格の強度が部分的に脆弱化した。このサイトカラシン低濃度処理に加え、EphA2 ノックダウンすると blebbing を形成する細胞の割合が約半数に増加した (図 3-11-b, siEphA2 #1)。これらのことから、EphA2 は細胞分裂期において、cortical rigidity の維持に寄与していることが示唆された。



**図 3-11 EphA2 ノックダウンによる blebbing の形成**

HeLa S3 細胞にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (#1) を導入し、28 時間後に 8  $\mu$ M RO-3306 を処理した。20 時間後、PBS (+) で細胞を洗い、30 分間培養した後、10  $\mu$ M MG-132 を 50 分間処理して細胞分裂中期 (metaphase) に停止させた。その後、MG-132 と共にサイトカラシン B (溶媒コントロール; DMSO, 0.25  $\mu$ g/mL; Low, 2  $\mu$ g/mL; High) を 10 分間処理し、15 分間の Time-lapse imaging により blebbing を形成している細胞を計測した。正常な細胞と、blebbing を形成している細胞の代表的な写真を (a) に示した。矢印は blebbing を示し、数字は DMSO またはサイトカラシン B の処理後の時間を示している。

(b) blebbing を形成している細胞の割合を算出した。各実験で 156 個以上の細胞を解析した。データは平均 $\pm$ S.D.で表し、検定は Tukey-Kramer test により行った (n=3, \*\*p<0.01)。



**図 3-12 U0126 処理による blebbing の形成細胞の増加**

HeLa S3 細胞に 8  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理し、PBS (+) で細胞を洗った後、30 分間培養した。10  $\mu$ M MG-132 と共に DMSO または 10  $\mu$ M U0126 を 1 時間処理した。最後の 10 分間、0.25  $\mu$ g/mL サイトカラシン B 存在下で培養した後、15 分間の Time-lapse imaging により blebbing を形成している細胞を解析し、blebbing を形成している細胞の割合を算出した。各実験で 200 個以上の細胞を解析した。データは平均 $\pm$ S.D.で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3, \*\*p<0.01, NS, not significant)。

次に、cortical rigidity の維持に対する EphA2 Ser897 のリン酸化の寄与を解析するため、EphA2 Ser897 の上流である MEK の阻害剤 (U0126) を細胞分裂期特異的に作用させ、blebbing の形成率を評価した。その結果、溶媒コントロール (DMSO) 処理群と比較して、U0126 処理群では blebbing を形成する細胞の割合が増加した (図 3-12)。さらにこのリン酸化の寄与を解析するため、Dox により野生型 EphA2 または Ser897Ala 変異体を誘導発現する細胞株 (HeLa S3/WT-HA、HeLa S3/SA-HA) を用いた。3' UTR をターゲットとした siEphA2 を処理して HeLa S3 細胞の内在性 EphA2 をノックダウンすると、siEphA2 #1 処理時と同様に blebbing を形成する細胞の割合が増加した (図 3-13)。内在性の EphA2 ノックダウンと同時に野生型 EphA2 を誘導発現すると、EphA2 ノックダウンにより増加した blebbing を形成する細胞の割合が減少した。一方で、EphA2 Ser897Ala 変異体を誘導発現しても blebbing の形成率に変化は観察されなかった (図 3-13)。これらのことから、EphA2 Ser897 のリン酸化が細胞分裂期において cortical rigidity の維持に寄与していることが示唆された。

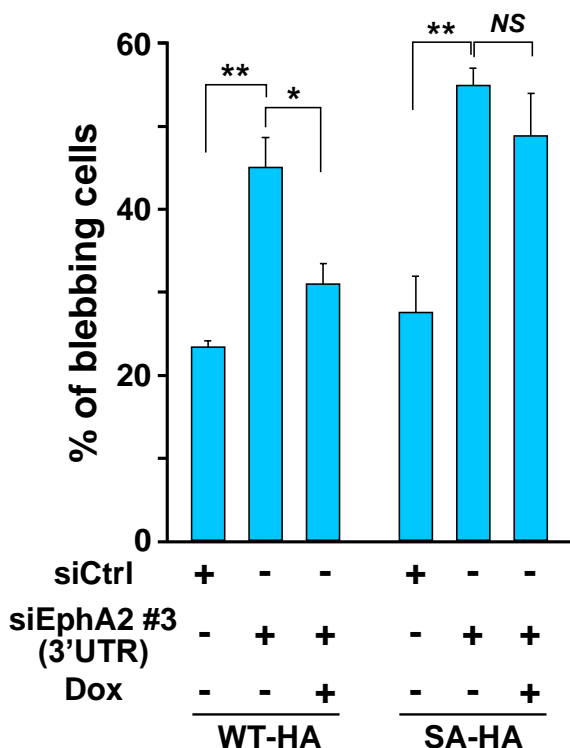
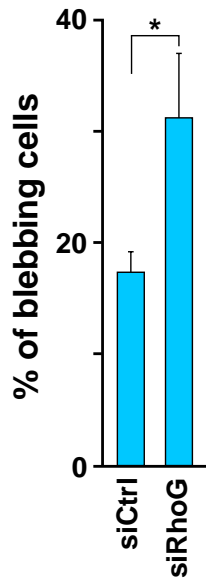


図 3-13 野生型 EphA2 と Ser897Ala 変異体を用いた、Ser897 リン酸化の blebbing 形成に及ぼす影響

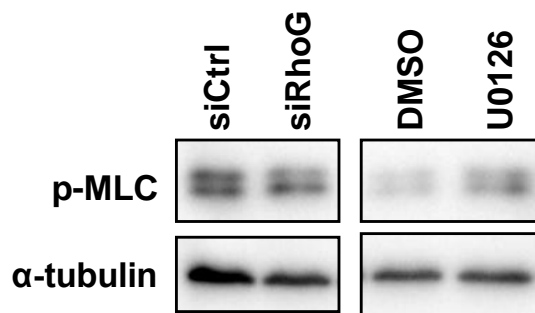
HeLa S3/EphA2 WT-HA または HeLa S3/SA-HA にコントロール siRNA (siCtrl) あるいは siEphA2 (#3、3' UTR) を導入し、同時に Dox (WT: 5 µg/mL、SA: 0.5 µg/mL) を添加した。28 時間後、8 µM RO-3306 と Dox を 20 時間処理し、PBS (+) で細胞を洗い、30 分間培養した。その後、10 µM MG-132 を 1 時間処理した。最後の 10 分間に 0.25 µg/mL サイトカラシン B 存在下で培養した後、15 分間の Time-lapse imaging により blebbing を形成している細胞を計測した。各実験で 182 個以上の細胞を解析した。データは平均±S.D. で表し、検定は Tukey-Kramer test により行った (n=3、\*p < 0.05、\*\*p < 0.01、NS, not significant)。

さらに、EphA2 Ser897 の下流分子である RhoG を siRNA によりノックダウンすると、EphA2 ノックダウンあるいは U0126 処理時と同様に、blebbing を形成する細胞の割合が増加した (図 3-14)。以上のことから、細胞分裂期では EphA2 Ser897/RhoG 経路により、cortical rigidity が維持されていることが示唆された。



**図 3-14 RhoG ノックダウンによる blebbing 形成細胞の増加**

HeLa S3 細胞にコントロール siRNA あるいは siRhoG を導入し、28 時間後に 8  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理した。PBS(+) で細胞を洗い、30 分間培養した後、10  $\mu$ M MG-132 を 1 時間処理した。最後の 10 分間に 0.25  $\mu$ g/mL サイトカラシン B 存在下で培養した後、15 分間の Time-lapse imaging により blebbing を形成している細胞を解析した。各実験で 172 個以上の細胞を解析し、blebbing を形成している細胞の割合を算出した。データは平均 $\pm$ S.D.で表し、検定は Student's t-test により行った (n=3、\*p<0.05)。



**図 3-15 RhoG ノックダウンや EphA2 Ser897 のリン酸化の抑制は Myosin Light Chain のリン酸化に影響しない**

HeLa S3 細胞にコントロール siRNA または siRhoG を導入し、それぞれを 48 時間後に回収した (左)。HeLa S3 細胞に 8  $\mu$ M RO-3306 を 20 時間処理した後、PBS(+) で細胞を洗い、30 分間培養した。10  $\mu$ M MG-132 と共に DMSO または 10  $\mu$ M U0126 を 1 時間処理し、それぞれから mitotic shake-off により分裂期細胞を回収し (右)、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

### 3-4 考察

図 3-1、2、4 で示したように、間期と同様、細胞分裂期においても EphA2 と Ephexin4 が EphA2 Ser897 のリン酸化依存的に相互作用することを明らかにした。図 3-1 をより詳細に観察すると、間期と比べて細胞分裂期の方が免疫沈降した Ephexin4 の量が少ないにもかかわらず、EphA2 の結合量は細胞分裂期の方が多い。これは、細胞分裂期では EphA2 Ser897 のリン酸化が亢進するため、EphA2 Ser897 のリン酸化依存的である Ephexin4 と EphA2 の相互作用がより強化されたためと考えられる。このことは、EphA2 p-Ser897/Ephexin4/RhoG 経路はこれまで報告されてきた間期におけるがん悪性化への寄与に加え、細胞分裂期制御にも寄与することを示している。よって、本研究で明らかにした細胞分裂期での EphA2 Ser897/Ephexin4/RhoG 経路による cortical rigidity の制御は細胞にとって大きな意義を持っていることが考えられる。あるいは、EphA2 Ser897/Ephexin4/RhoG 経路には更なる細胞分裂の制御機構が存在するのかもしれない。

EphA2 Ser897 の上流である MEK の阻害剤 (U0126) の処理や Ephexin4 ノックダウンにおいて、RhoG の細胞膜局在が減少した (図 3-5、6)。また、内在性 EphA2 ノックダウン時に活性型 RhoG を誘導発現したところ、EphA2 ノックダウンによる細胞分裂進行の遅延が部分的に回復したことは (図 3-10)、活性型 RhoG の細胞膜への明確な局在が観察出来なかったためだと考えている。これらのことから、EphA2 は Ephexin4/RhoG 経路の足場タンパク質として機能している可能性が考えられる。

細胞分裂期における cortical rigidity は紡錘体の位置や二極紡錘体の形成、染色体の赤道面上での整列に必須であることが知られている。<sup>69,72</sup> 本章では、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンの低濃度存在下において、EphA2 Ser897/Ephexin4/RhoG 経路が抑制されると blebbing を形成する細胞の割合が増加した (図 3-13、14)。cortical rigidity の低下により blebbing が惹起されるが、<sup>73</sup> その原因として、アクチン骨格の収縮力の低下あるいはアクチンと細胞膜間の結合の低下が報告されている。<sup>71</sup> 図 3-15 に示したように、U0126 処理あるいは RhoG をノックダウンしても、アクチン骨格の収縮力の指標となるミオシン軽鎖のリン酸化 (p-MLC Ser19) に変化がなかった。そのため、Cdk1/MEK/ERK/RSK/EphA2 Ser897/Ephexin4/RhoG 経路はアクチン骨格の収縮力には関与せず、アクチンと細胞膜間の結合に関与していることが示唆された。実際、線虫の RhoG のホモログである MIG-2 が細胞膜の縁に anillin をリクルートすることが報告されている。<sup>74</sup> anillin は細胞分裂後期 (anaphase) から終期 (telophase) にかけて、細胞膜とアクチン骨格を構成するタンパク質と結合して分裂溝の位置の維持に寄与することが報告されている。<sup>75</sup> さらに、RhoG はアクチンと細胞膜を繋ぎ止めるタンパク質である ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) と相互作用することも報告されている。<sup>76</sup> anillin<sup>77</sup> や ERM<sup>69</sup> のノックダウンにより、blebbing を形成する細胞が増加することが報告されているため、EphA2 Ser897/Ephexin4/RhoG 経路の下流ではこれらのアクチン関連タンパク質が機能しているのかもしれない。

これらの報告に加え、間期では EphA2/Ephexin4/RhoG 経路が Rac1 を活性化してアクチン骨格のリモデリングを伴うラメリポディアの形成を促進することが知られている。<sup>43</sup> Rac1 は細胞分裂期に入ると徐々に活性が低下し、細胞分裂終期 (anaphase) になると Rac1 の活性化レベルが最も低くなる。その一方で、細胞分裂期の前半 (前中期から中期にかけて) では Rac1 の活性が残存している。<sup>78</sup> ま



た、過剰な Rac1 の活性により細胞分裂期を通じて細胞が丸くなることが出来ないことも報告されている。<sup>79</sup> つまり、適切な細胞分裂の進行には適度な Rac1 の活性レベルが求められるのではないだろうか。これらのことから、EphA2/Ephexin4/RhoG 経路の阻害による blebbing 形成細胞の増加は anillin、ERM、Rac1 などの分子の機能を抑制することで引き起こされた可能性が考えられる。

### 3-5 小括

本章では以下の事を明らかにした。EphA2 は間期と同様、EphA2 Ser897 のリン酸化依存的に RhoG GEF (RhoG を活性型に置換) である Ephexin4 と相互作用することを見出した。また、EphA2 Ser897/Ephexin4 経路依存的に RhoG が細胞膜に局在することを明らかにした。これらのことから、Ephexin4 や RhoG は EphA2 Ser897 の下流分子として正常な細胞分裂進行に寄与していることが示唆される。さらに、細胞分裂期において、EphA2 Ser897/RhoG 経路は細胞膜や細胞膜直下のアクチン骨格の強度 (cortical rigidity) の維持に寄与していることを見出した。

## 総括

本研究では、新規の細胞分裂制御分子を見出し、その機能解析により細胞分裂の制御機構の一端を解明することを目的として実験を行い、以下のことを明らかにした。

第1章では、受容体型チロシンキナーゼ EphA2 が、細胞分裂期において、二極紡錘体の形成維持に寄与することで正常な細胞分裂の進行を制御することを見出した。さらに、HeLa S3 細胞や MDA-MB-231 細胞といったがん細胞や、hTERT RPE-1 細胞のような正常細胞で EphA2 の細胞分裂期での機能が保存されていることを示唆した。

第2章では、間期から細胞分裂期に移行すると、EphA2 Tyr588 のリン酸化が消失した一方、EphA2 Ser897 のリン酸化が Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路によって顕著に亢進することを見出した。さらに、細胞分裂期での EphA2 Ser897 のリン酸化は、正常な細胞分裂進行に必要であることを見出した。

第3章では、EphA2 は間期と同様、RhoG を活性型に置換する RhoG GEF である Ephexin4 と EphA2 Ser897 のリン酸化依存的に相互作用し、EphA2 Ser897/Ephexin4 経路に依存して RhoG が細胞膜に局在することを明らかにした。さらに、細胞分裂期において、EphA2 Ser897/Ephexin4/RhoG 経路は細胞膜や細胞膜直下のアクチン骨格の強度 (cortical rigidity) の維持に寄与していることを見出した。

以上のことから、細胞分裂期において、受容体型チロシンキナーゼ EphA2 は Cdk1/MEK/ERK/RSK 経路によって Ser897 がリン酸化されることで Ephexin4/RhoG 経路を活性化し、cortical rigidity の維持に寄与していることを明らかにした。よって、EphA2 Ser897 のリン酸化による cortical rigidity の維持が二極紡錘体の形成に関与し、正常な細胞分裂進行に寄与すると考えられる。

EphA2 はヒトの発生過程では発現量が高く、ヒトの成長と共にその発現量が低下することが知られている。<sup>35</sup> そのため、より発現量が高く、尚且つ細胞分裂が盛んな発生過程では細胞分裂期での EphA2 の寄与はより高いのかもしれない。

本研究から、EphA2 Ser897 のリン酸化による細胞分裂の制御機構が明らかになったが、EphA2 Ser897 のリン酸化抑制が細胞分裂異常を引き起こした結果、細胞がどのような運命をたどるかは未解明であり、非常に興味深い。EphA2 のノックダウンは多極紡錘体や紡錘体の非対称性を引き起こした。一般的にこのような細胞はがん化すると考えられている。そのため、EphA2 のノックダウンあるいは Ser897 のリン酸化抑制は、細胞のがん化に寄与することが推察される。EphA2 はリガンドである ephrin-A1 との結合により MAPK 経路の抑制を介して細胞増殖を抑制すること<sup>80</sup>から、EphA2 はがん抑制に寄与すると考えられている。実際、腫瘍モデルマウスの EphA2 をノックアウトすると腫瘍形成が促進することが報告されている。<sup>81</sup> EphA2 は1番染色体に存在しており、1番染色体が欠損しているがん細胞においては、EphA2 のがん抑制の消失ががん化に寄与していることが考えられる。<sup>32,82,83</sup> これらの報告は、本研究で得られた結果と矛盾せず、EphA2 の発現消失による細胞分裂異常が染色体不安定性を引き起こした結果、細胞のがん化を促進するのかもしれない。

上記の報告がある一方、乳がん、前立腺がん、肺がんなど、種々のがんにおいて EphA2 は高発現しており、それと予後不良との間に正の相関関係があることが知られている。<sup>84-86</sup> 特に EphA2 の研究が盛んなトリプルネガティブ乳がんにおける検討でも、EphA2 の発現抑制が G1/S 期への移行の阻害を介して細胞増殖を抑制したとの報告もある。<sup>85</sup> さらに、EphA2 Ser897 のリン酸化が細胞の遊走

や浸潤を亢進し、がん悪性を促進することが報告されている。<sup>41,43,64</sup> 最近、エルロチニブ、トラスツズマブ、オキサリプラチン等への抗がん剤耐性を獲得した細胞株では、EphA2 の発現亢進や、<sup>86,87</sup> それに伴う EphA2 Ser897 のリン酸化の亢進が報告されており、<sup>88</sup> これらの細胞株の EphA2 を阻害すると細胞増殖が抑制し、抗がん効果を示す。これらの報告から、EphA2 Ser897 を標的とした抗がん治療の開発が望まれている。EphA2 Ser897 のリン酸化の抑制による細胞分裂進行の遅延は、細胞周期が停止したと捉えることもできる。つまり、EphA2 Ser897 のリン酸化の抑制が細胞周期を停止し、細胞増殖を抑制するのかもしれない。しかし、先述したように、EphA2 Ser897 のリン酸化抑制は、細胞分裂異常に起因する染色体不安定性を引き起こすことも考えられる。よって、EphA2 をターゲットとした抗がん治療の開発はこの点も踏まえて検討するべきであろう。

## 引用文献

- (1) Sherr, C. J. Mammalian G1 Cyclins. *Cell* **1993**, 73, 1059–1065.
- (2) Sherr, C. J. Cancer Cell Cycles. *Science* **1996**, 274, 1672–1677.
- (3) Russo, A. A. Jeffrey, P. D. Pavletich, N. P. Structural Basis of Cyclin-Dependent Kinase Activation by Phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 696–700.
- (4) Gautier, J. Solomon, M. J. Booher, R. N. Bazan, J. F. Kirschner, M. W. cdc25 Is a Specific Tyrosine Phosphatase That Directly Activates p34Cdc2. *Cell* **1991**, 67, 197–211.
- (5) Draetta, G. Beach, D. Activation of cdc2 Protein Kinase during Mitosis in Human Cells: Cell Cycle-Dependent Phosphorylation and Subunit Rearrangement. *Cell* **1988**, 54, 17–26.
- (6) Parker, L. L. Atherton-fessler, S. U. E. Piwnica-worms, H. Weel Is a Dual-Specificity Kinase That Phosphorylates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 2917–2921.
- (7) Booher, R. N. Holman, P. S. Fattaey, A. Human Myt1 Is a Cell Cycle-Regulated Kinase That Inhibits Cdc2 but Not Cdk2 Activity. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22300–22306.
- (8) Liu, F. Stanton, J. J. Wu, Z. Piwnica-Worms, H. The Human Myt1 Kinase Preferentially Phosphorylates Cdc2 on Threonine 14 and Localizes to the Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 571–583.
- (9) Angela M. Ferguson, Lynn S. White, Peter J. Donovan, H. P.-W. Normal Cell Cycle and Checkpoint Responses in Mice and Cells Lacking Cdc25B and Cdc25C Protein Phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25, 2853–2860.
- (10) Sebastian, B. Kakizukat, A. Hunter, T. Cdc25M2 Activation of Cyclin-Dependent Kinases by Dephosphorylation of Threonine-14 and Tyrosine-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90, 3521–3524.
- (11) Nilsson, I. Hoffmann, I. Cell Cycle Regulation by the Cdc25 Phosphatase Family. *Prog. Cell Cycle Res.* **2000**, 4, 107–114.
- (12) Picard, A. Sadhut, K. Russellt, P. Doree, M. Dephosphorylation and Activation of a p34cdc2/Cyclin B Complex in Vitro by Human CDC25 Protein. *Nature* **1991**, 351, 242–245.
- (13) Dunphy, W. G. Kumagai, A. The Cdc25 Protein Contains an Intrinsic Phosphatase Activity. *Cell* **1991**, 67, 189–196.
- (14) M. Peter, J. Nakagawa, M. Doree, J. C. Labb, E. A. N. In Vitro Disassembly of the Nuclear Lamina and M Phase-Specific Phosphorylation of Lamins by Cdc2 Kinase. *Cell* **1990**, 61, 591–602.
- (15) Abe, S. Nagasaka, K. Hirayama, Y. Kozuka-Hata, H. Oyama, M. Aoyagi, Y. Obuse, C. Hirota, T. The Initial Phase of Chromosome Condensation Requires Cdk1-Mediated Phosphorylation of the CAP-D3 Subunit of Condensin II. *Genes Dev.* **2011**, 25, 863–874.
- (16) Glotzer, M. Murray, A. W. Kirschner, M. W. Cyclin Is Degraded by the Ubiquitin Pathway. *Nature* **1991**, 349, 132–138.
- (17) King, R. W. Glotzer, M. Kirschner, M. W. Mutagenic Analysis of the Destruction Signal of Mitotic

- Cyclins and Structural Characterization of Ubiquitinated Intermediates. *Mol. Biol. Cell* **1996**, *7*, 1343–1357.
- (18) Pines, J. Hunter, T. Isolation of a Human Cyclin cDNA: Evidence for Cyclin mRNA and Protein Regulation in the Cell Cycle and for Interaction with p34cdc2. *Cell* **1989**, *58*, 833–846.
  - (19) Tanenbaum, M. E. Medema, R. H. Mechanisms of Centrosome Separation and Bipolar Spindle Assembly. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 797–806.
  - (20) Goshima, G. Scholey, J. M. Control of Mitotic Spindle Length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 21–57.
  - (21) Zuo, Y. Oh, W. Frost, J. A. Controlling the Switches : Rho GTPase Regulation during Animal Cell Mitosis. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 2998–3006.
  - (22) Gadde, S. Heald, R. Mechanisms and Molecules of the Mitotic Spindle. *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 797–805.
  - (23) Maiato, H. Logarinho, E. Mitotic Spindle Multipolarity without Centrosome Amplification. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 386–394.
  - (24) Marumoto, T. Honda, S. Hara, T. Nitta, M. Hirota, T. Kohmura, E. Saya, H. Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51786–51795.
  - (25) Carmena, M. Wheelock, M. Funabiki, H. Earnshaw, W. C. The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 789–803.
  - (26) Terada, Y. Tatsuka, M. Suzuki, F. Yasuda, Y. Fujita, S. Otsu, M. AIM-1: A Mammalian Midbody-Associated Protein Required for Cytokinesis. *EMBO J.* **1998**, *17*, 667–676.
  - (27) Archambault, V. Glover, D. M. Polo-like Kinases: Conservation and Divergence in Their Functions and Regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 265–275.
  - (28) Lemmon, M. A. Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **2010**, *141*, 1117–1134.
  - (29) Lièvre, A. Bachet, J. B. Boige, V. Cayre, A. Le Corre, D. Buc, E. Ychou, M. Bouché, O. Landi, B. Louvet, C. André, T. Bibeau, F. Diebold, M.D. Rougier, P. Ducreux, M. Tomasic, G. Emile, J.F. Penault-Llorca, F. Laurent-Puig, P. KRAS Mutations as an Independent Prognostic Factor in Patients with Advanced Colorectal Cancer Treated with Cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 374–379.
  - (30) Karapetis, C.S. Khambata-Ford, S. Jonker, D.J. O'Callaghan, C.J. Tu, D. Tebbutt, N.C. Simes, R.J. Chalchal, H. Shapiro, J.D. Robitaille, S. Price, T.J. Shepherd, L. Au, H.J. Langer, C. Moore, M.J. Zalberg, J.R. K-Ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1757–1765.
  - (31) Keith K. Murai, E. B. P. `Eph`ective Signaling: Forward, Reverse and Crosstalk. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2823–2832.
  - (32) Pasquale, E. B. Eph Receptor Signalling Casts a Wide Net on Cell Behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 462–476.
  - (33) Fang, W. Bin. Brantley-Sieders, D. M. Hwang, Y. Ham, A.-J. L. Chen, J. Identification and Functional Analysis of Phosphorylated Tyrosine Residues within EphA2 Receptor Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.*

- 2008**, 283, 16017–16026.
- (34) Pasquale, E. B. Eph Receptors and Ephrins in Cancer: Bidirectional Signalling and Beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, 10, 165–180.
- (35) Pasquale, E. B. Eph-Ephrin Bidirectional Signaling in Physiology and Disease. *Cell* **2008**, 133, 33–52.
- (36) Lin, K. T. Sloniowski, S. Ethell, D. W. Ethell, I. M. Ephrin-B2-Induced Cleavage of EphB2 Receptor Is Mediated by Matrix Metalloproteinases to Trigger Cell Repulsion. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 28969–28979.
- (37) Poliakov, A. Cotrina, M. L. Pasini, A. Wilkinson, D. G. Regulation of EphB2 Activation and Cell Repulsion by Feedback Control of the MAPK Pathway. *J. Cell Biol.* **2008**, 183, 933–947.
- (38) Dail, M., Melanie Richter, Pierre Godement, E. B. P. Eph Receptors Inactivate R-Ras through Different Mechanisms to Achieve Cell Repulsion. *J. Cell Sci.* **2006**, 119, 1244–1254.
- (39) Zhou, Y. Yamada, N. Tanaka, T. Hori, T. Yokoyama, S. Hayakawa, Y. Yano, S. Fukuoka, J. Koizumi, K. Saiki, I. Sakurai, H. Crucial Roles of RSK in Cell Motility by Catalysing Serine Phosphorylation of EphA2. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 7679.
- (40) Hamaoka, Y. Negishi, M. Katoh, H. EphA2 Is a Key Effector of the MEK/ERK/RSK Pathway Regulating Glioblastoma Cell Proliferation. *Cell. Signal.* **2016**, 28, 937–945.
- (41) Miao, H. Li, DQ. Mukherjee, A. Guo, H. Petty, A. Cutter, J. Basilion, J.P. Sedor, J. Wu, J. Danielpour, D. Sloan, A.E. Cohen, M.L. Wang, B. EphA2 Mediates Ligand-Dependent Inhibition and Ligand-Independent Promotion of Cell Migration and Invasion via a Reciprocal Regulatory Loop with Akt. *Cancer Cell* **2009**, 16, 9–20.
- (42) Barquilla, A. Lamberto, I. Nuberini, R. Heynen-genel, S. Lidke, D. Protein Kinase A Can Block EphA2 Receptor – Mediated Cell Repulsion by Increasing EphA2 S897 Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **2016**, 27, 2757–2770.
- (43) Hiramoto-Yamaki, N. Takeuchi, S. Ueda, S. Harada, K. Fujimoto, S. Negishi, M. Katoh, H. Ephexin4 and EphA2 Mediate Cell Migration through a RhoG-Dependent Mechanism. *J. Cell Biol.* **2010**, 190, 461–477.
- (44) Dephoure, N. Zhou, C. Villen, J. Beausoleil, S. A. Bakalarski, C. E. Elledge, S. J. Gygi, S. P. A Quantitative Atlas of Mitotic Phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 10762–10767.
- (45) Daub, H. Olsen, J. V. Bairlein, M. Gnäd, F. Oppermann, F. S. Körner, R. Greff, Z. Kéri, G. Stemmann, O. Mann, M. Kinase-Selective Enrichment Enables Quantitative Phosphoproteomics of the Kinome across the Cell Cycle. *Mol. Cell* **2008**, 31, 438–448.
- (46) Martiny-Baron, G. Holzer, P. Billy, E. Schnell, C. Brueggen, J. Ferretti, M. Schmiedeberg, N. Wood, J. M. Furet, P. Imbach, P. The Small Molecule Specific EphB4 Kinase Inhibitor NVP-BHG712 Inhibits VEGF Driven Angiogenesis. *Angiogenesis* **2010**, 13, 259–267.
- (47) O’Connell, C. B. Wang, Y. Mammalian Spindle Orientation and Position Respond to Changes in Cell Shape in a Dynein-Dependent Fashion. *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, 1765–1774.
- (48) Jones, L. A. Villemant, C. Starborg, T. Salter, A. Goddard, G. Ruane, P. Woodman, P. G. Papalopulu, N.

- Woolner, S. Allan, V. J. Dynein Light Intermediate Chains Maintain Spindle Bipolarity by Functioning in Centriole Cohesion. *J. Cell Biol.* **2014**, 207, 499–516.
- (49) Clute, P. Pines, J. Temporal and Spatial Control of Cyclin B1 Destruction in Metaphase. *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1, 82–87.
- (50) Hagting, A. Karlsson, C. Clute, P. Jackman, M. Pines, J. MPF Localization Is Controlled by Nuclear Export. *EMBO J.* **1998**, 17, 4127–4138.
- (51) Johannessen, C.M. Boehm, J.S. Kim, S.Y. Thomas, S.R. Wardwell, L. Johnson, L.A. Emery, C.M. Stransky, N. Cogdill, A.P. Barretina, J. Caponigro, G. Hieronymus, H. Murray, R.R. Salehi-Ashtiani, K. Hill, D.E. Vidal, M. Zhao, J.J. Yang, X. Alkan, O. Kim, S. Harris, J.L. Wilson, C.J. Myer, V.E. Finan, P.M. Root, D.E. Roberts, T.M. Golub, T. Flaherty, K.T. Dummer, R. Weber, B.L. Sellers, W.R. Schlegel, R. Wargo, J.A. Hahn, W.C. Garraway, L.A. COT Drives Resistance to RAF Inhibition through MAP Kinase Pathway Reactivation. *Nature* **2010**, 468, 968–972.
- (52) Yang, X. Boehm, J.S. Yang, X. Salehi-Ashtiani, K. Hao, T. Shen, Y. Lubonja, R. Thomas, S.R. Alkan, O. Bhimdi, T. Green, T.M. Johannessen, C.M. Silver, S.J. Nguyen, C. Murray, R.R. Hieronymus, H. Balcha, D. Fan, C. Lin, C. Ghamsari, L. Vidal, M. Hahn, W.C. Hill, D.E. Root, D.E. A Public Genome-Scale Lentiviral Expression Library of Human ORFs. *Nat. Methods* **2011**, 8, 659–661.
- (53) Irniger, S. Piatti, S. Michaelis, C. Nasmyth, K. Genes Involved in Sister Chromatid Separation Are Needed for B-Type Cyclin Proteolysis in Budding Yeast [Published Erratum Appears in Cell 1998 May 1;93(3):487]. *Cell* **1995**, 81, 269–278.
- (54) Woo, M. S. Ohta, Y. Rabinovitz, I. Stossel, T. P. Blenis, J. Ribosomal S6 Kinase (RSK) Regulates Phosphorylation of Filamin A on an Important Regulatory Site. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, 24, 3025–3035.
- (55) And, M. H. C. Goldsmith, E. J. How MAP Kinases Are Regulated. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14843–14846.
- (56) Lin, A. Minden, A. Martinetto, H. Claret, F. Lange-carter, C. Mercurio, F. Johnson, G. L. Karin, M. Identification of a Dual Specificity Kinase That Activates the Jun Kinases and p38-Mpk2. *Science* **1995**, 268, 286–290.
- (57) Dalby, K. N. Morrice, N. Caudwell, F. B. Avruch, J. Cohen, P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 1496–1505.
- (58) Fimia, G. M. Sasspne-Corsi, P. Cyclic AMP Signalling. *J. Cell Sci.* **2001**, 114, 1971–1972.
- (59) Jackman, M. Lindon, C. Nigg, E. A. Pines, J. Active Cyclin B1-Cdk1 First Appears on Centrosomes in Prophase. *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, 143–148.
- (60) Borysova, M. K. Cui, Y. Snyder, M. Guadagno, T. M. Knockdown of B-Raf Impairs Spindle Formation and the Mitotic Checkpoint in Human Somatic Cells. *Cell Cycle* **2008**, 7, 2894–2901.
- (61) Willard, F. S. Crouch, M. F. MEK, ERK, and p90RSK Are Present on Mitotic Tubulin in Swiss 3T3 Cells: A Role for the MAP Kinase Pathway in Regulating Mitotic Exit. *Cell. Signal.* **2001**, 13, 653–664.
- (62) Nam, H. J. Lee, I. J. Jang, S. Bae, C. D. Kwak, S. J. Lee, J. H. p90 Ribosomal S6 Kinase 1 (RSK1)

- Isoenzyme Specifically Regulates Cytokinesis Progression. *Cell. Signal.* **2014**, 26, 208–219.
- (63) Iwamoto, E. Ueta, N. Matsui, Y. Kamijo, K. Kuga, T. Saito, Y. Yamaguchi, N.; Nakayama, Y. ERK Plays a Role in Chromosome Alignment and Participates in M-Phase Progression. *J. Cell. Biochem.* **2016**, 117, 1340–1351.
- (64) Kawai, H. Kobayashi, M. Hiramoto-Yamaki, N. Harada, K. Negishi, M. Katoh, H. Ephexin4-Mediated Promotion of Cell Migration and Anoikis Resistance Is Regulated by Serine 897 Phosphorylation of EphA2. *FEBS Open Bio.* **2013**, 3, 78–82.
- (65) Campeau, Eric Ruhl, Victoria E. Rodier, Francis Smith, Corey L. Rahmberg, Brittany L. Fuss, Jill O. Campisi, J. Yaswen, Paul Cooper, Priscilla K. Kaufman, P. D. A Versatile Viral System for Expression and Depletion of Proteins in Mammalian Cells. *PLoS One* **2004**, 4, e6529.
- (66) Kwiatkowska, A. Didier, S. Fortin, S. Chuang, Y. White, T. Berens, M.E. Rushing, E. Eschbacher, J. Tran, N.L. Chan, A. Symons, M. The Small GTPase RhoG Mediates Glioblastoma Cell Invasion. *Mol. Cancer* **2012**, 11, 1–11.
- (67) Katoh, H. Negishi, M. RhoG Activates Rac1 by Direct Interaction with the Dock180-Binding Protein Elmo. *Nature* **2003**, 424, 461–464.
- (68) Katoh, H. Hiramoto, K. Negishi, M. Activation of Rac1 by RhoG Regulates Cell Migration. *J. Cell Sci.* **2006**, 119, 56–65.
- (69) Kunda, P. Pelling, A. E. Liu, T. Baum, B. Moesin Controls Cortical Rigidity, Cell Rounding, and Spindle Morphogenesis during Mitosis. *Curr. Biol.* **2008**, 18, 91–101.
- (70) Carreno, S. Kouranti, I. Glusman, E. S. Fuller, M. T. Echard, A. Payre, F. Moesin and Its Activating Kinase Slik Are Required for Cortical Stability and Microtubule Organization in Mitotic Cells. *J. Cell Biol.* **2008**, 180, 739–746.
- (71) Fackler, O. T. Grosse, R. Cell Motility through Plasma Membrane Blebbing. *J. Cell Biol.* **2008**, 181, 879–884.
- (72) Kunda, P. Baum, B. The Actin Cytoskeleton in Spindle Assembly and Positioning. *Trends Cell Biol.* **2009**, 19, 174–179.
- (73) Charras, G. T. Hu, C. K. Coughlin, M. Mitchison, T. J. Reassembly of Contractile Actin Cortex in Cell Blebs. *J. Cell Biol.* **2006**, 175, 477–490.
- (74) Tian, D. Diao, M. Jiang, Y. Sun, L. Zhang, Y. Chen, Z. Huang, S. Ou, G. Anillin Regulates Neuronal Migration and Neurite Growth by Linking RhoG to the Actin Cytoskeleton. *Curr. Biol.* **2015**, 25, 1135–1145.
- (75) Piekny, A. J. Glotzer, M. Anillin Is a Scaffold Protein That Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis. *Curr. Biol.* **2008**, 18, 30–36.
- (76) Grimsley, C. M. Lu, M. Haney, L. B. Kinchen, J. M. Ravichandran, K. S. Characterization of a Novel Interaction between ELMO1 and ERM Proteins. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 5928–5937.
- (77) Kiyomitsu, T. Cheeseman, I. M. Cortical Dynein and Asymmetric Membrane Elongation Coordinately Position the Spindle in Anaphase. *Cell* **2013**, 154, 391–402.



- (78) Yoshizaki, H. Ohba, Y. Kurokawa, K. Itoh, R. E. Nakamura, T. Mochizuki, N. Nagashima, K. Matsuda, M. Activity of Rho-Family GTPases during Cell Division as Visualized with FRET-Based Probes. *J. Cell Biol.* **2003**, 162, 223–232.
- (79) Bastos, R. N. Penate, X. Bates, M. Hammond, D. Barr, F. A. CYK4 Inhibits Rac1-Dependent PAK1 and ARHGEF7 Effector Pathways during Cytokinesis. *J. Cell Biol.* **2012**, 198, 865–880.
- (80) Miao, H. Wei, B.R. Peehl, D.M. Li, Q. Alexandrou, T. Schelling, J.R. Rhim, J.S. Sedor, J.R. Burnett, E. Wang, B. Activation of EphA Receptor Tyrosine Kinase Inhibits the Ras / MAPK Pathway. *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 527–530.
- (81) Yeddula, N. Xia, Y. Ke, E. Beumer, J. Verma, I. M. Screening for Tumor Suppressors: Loss of Ephrin Receptor A2 Cooperates with Oncogenic KRas in Promoting Lung Adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112, E6476-85.
- (82) Guo, H. Miao, H. Gerber, L. Singh, J. Denning, M. F. Gilliam, A. C. Wang, B. Disruption of EphA2 Receptor Tyrosine Kinase Leads to Increased Susceptibility to Carcinogenesis in Mouse Skin. *Cancer Res.* **2006**, 66, 7050–7058.
- (83) Miozzo, M. Dalprà, L. Riva, P. Volontà, M. Macciardi, F. Pericotti, S. Tibiletti, M.G. Cerati, M. Rohde, K. Larizza, L. Fuhrman, C.A.M. A Tumor Suppressor Locus in Familial and Sporadic Chordoma Maps to 1p36. *Int. J. Cancer* **2000**, 87, 68–72.
- (84) Miyazaki T, Kato H, Fukuchi M, Nakajima M, K. H. EphA2 Overexpression Correlates with Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Cancer* **2003**, 103, 657–663.
- (85) Song, W. Hwang, Y. Youngblood, V. M. Cook, R. S. Balko, J. M. Chen, J. Brantley-Sieders, D. M. Targeting EphA2 Impairs Cell Cycle Progression and Growth of Basal-like/Triple-Negative Breast Cancers. *Oncogene* **2017**, 36, 5620–5630.
- (86) Zhuang, G. Brantley-sieders, D. M. Vaught, D. Yu, J. Xie, L. Wells, S. Jackson, D. Muraoka-cook, R. Arteaga, C. Chen, J. Elevation of Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy. *Cancer Res.* **2010**, 70, 299–309.
- (87) Wen, Q. Chen, Z. Chen, Z. Chen, J. Wang, R. Huang, C. Yuan, W. EphA2 Affects the Sensitivity of Oxaliplatin by Inducing EMT in Oxaliplatin-Resistant Gastric Cancer Cells. *Oncotarget* **2017**, 8, 47998–48011.
- (88) Amato, K.R. Wang, S. Tan, L. Hastings, A.K. Song, W. Lovely, C.M. Meador, C.B. Ye, F. Lu, P. Balko, J.M. Colvin, D.C. Cates, J.M. Pao, W. Gray, N.S. Chen, J. EPHA2 Blockade Overcomes Acquired Resistance to EGFR Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Res.* **2016**, 76, 305–318.

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に際し、研究の基礎から論文作成に至るまで終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 生化学分野 中山祐治 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

副査として本論文の査読ならびにご助言を賜りました京都薬科大学 病態生理学分野 芦原英司 教授、薬理学分野 田中智之 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究の御指導、御助言を賜りました京都薬科大学生化学分野 齊藤洋平 助教に深甚なる謝意を表します。

また、研究の御指導のみならず、種々の貴重な御助言を賜りました京都薬科大学 久家貴寿 助教(現摂南大学薬学部 助教) に深く御礼申し上げます。

そして、大学院生活を共に過ごし、切磋琢磨してきた生化学分野の皆様に深く感謝の意を表すると共に、益々の御活躍を祈念いたします。

最後に、常に私を支え、見守り、研究に専念できる環境を築いて下さった、両親に心から感謝致します。

## 補足データ

・ウエスタンブロット法により解析したメンブレンと、切り抜いたバンド箇所(赤枠)を以下に示す。

図 1-2

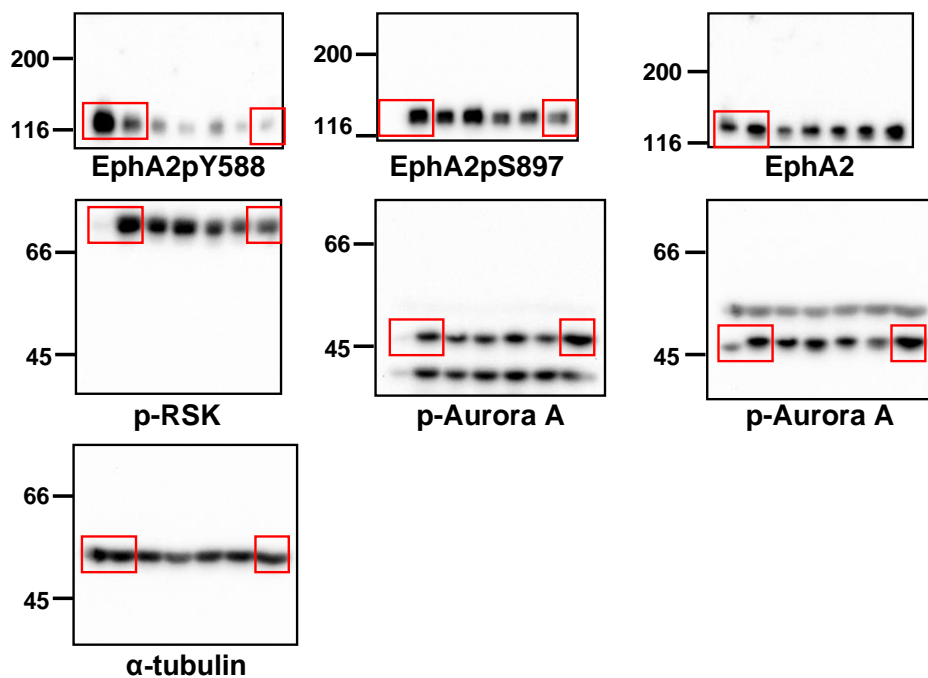


図 1-3

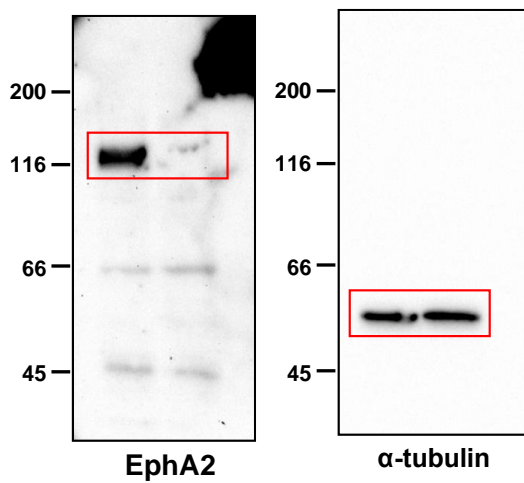
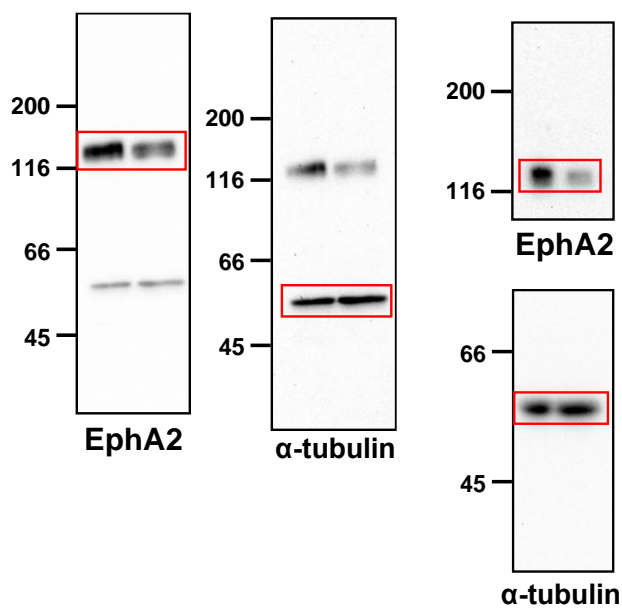
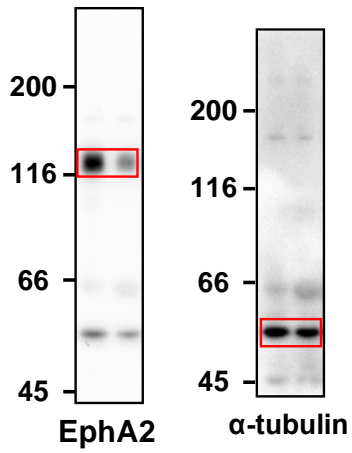


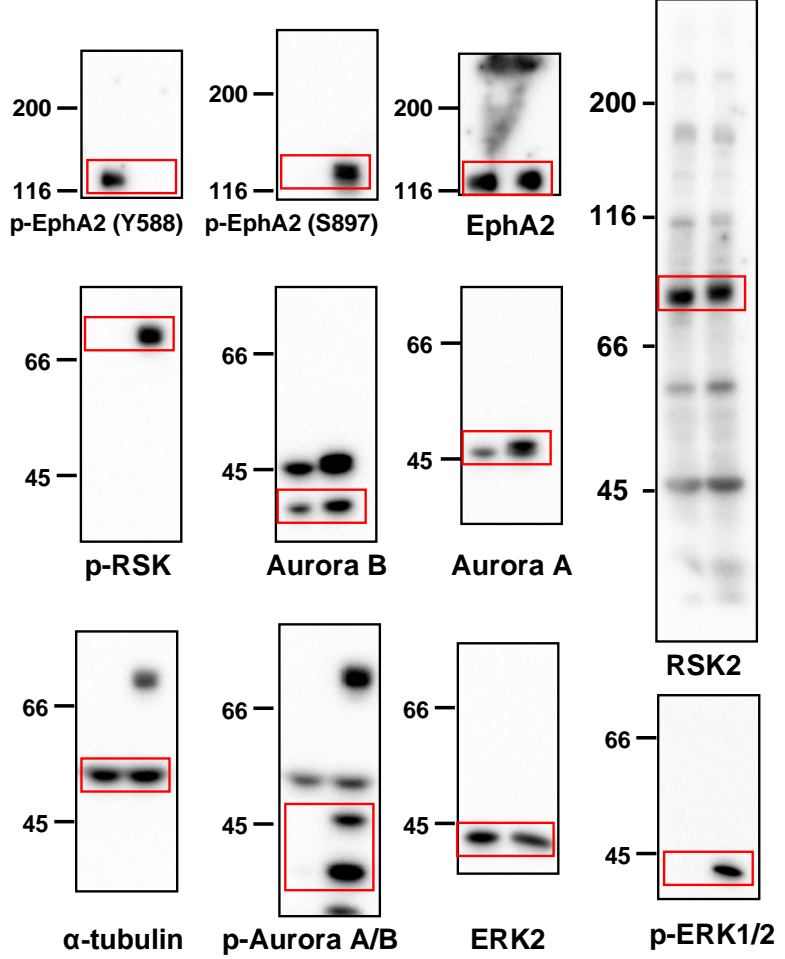
図 1-4



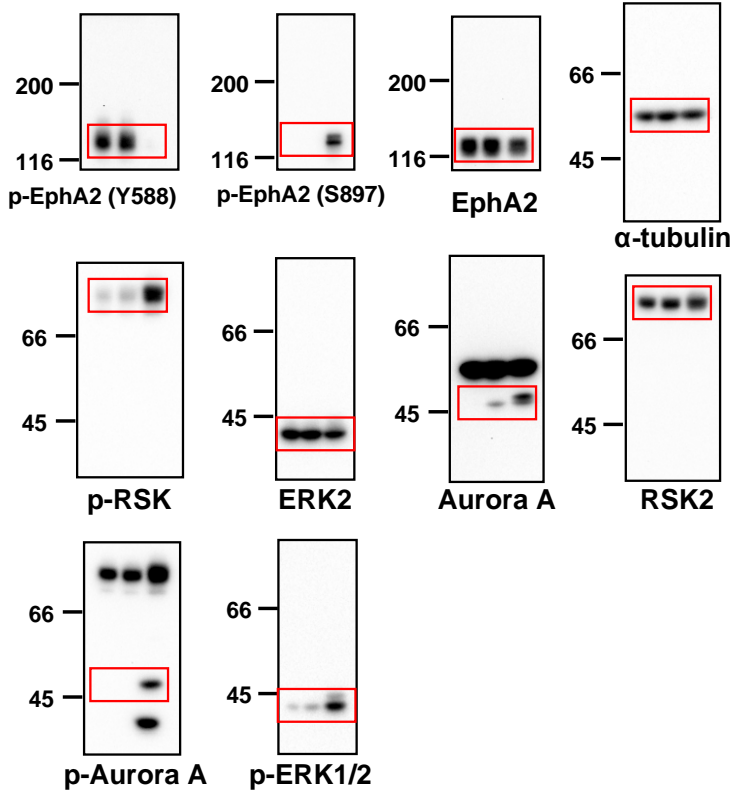
☒ 1-7



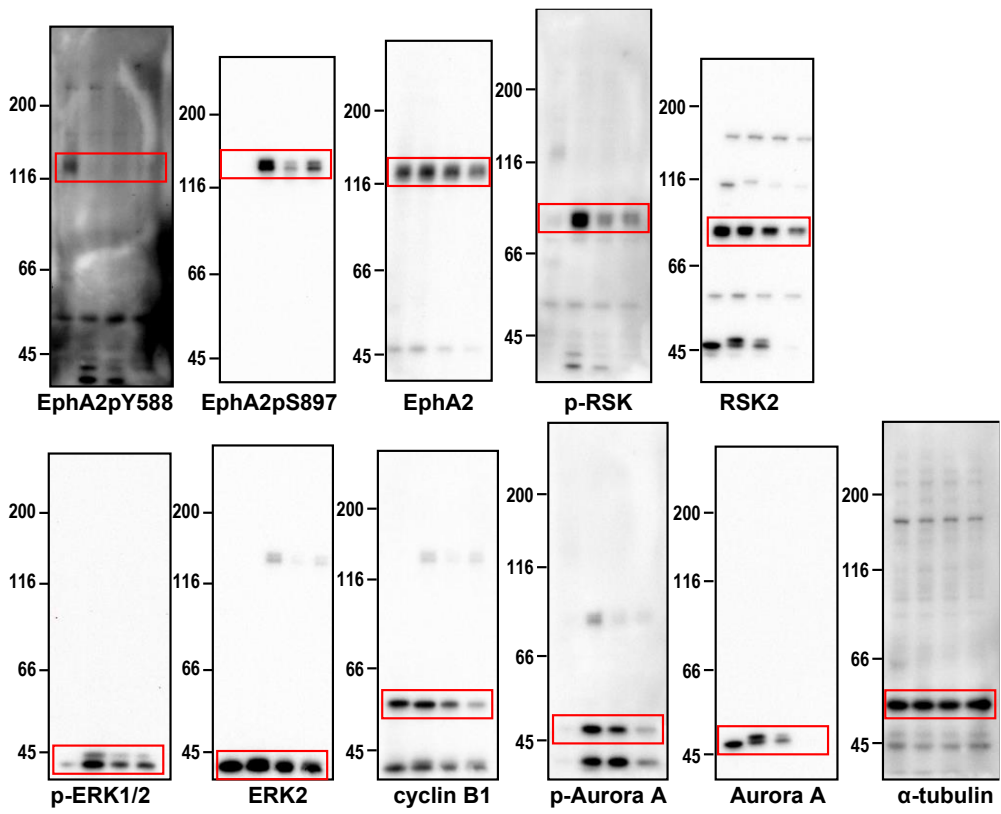
☒ 2-2



☒ 2-3



☒ 2-4



☒ 2-5

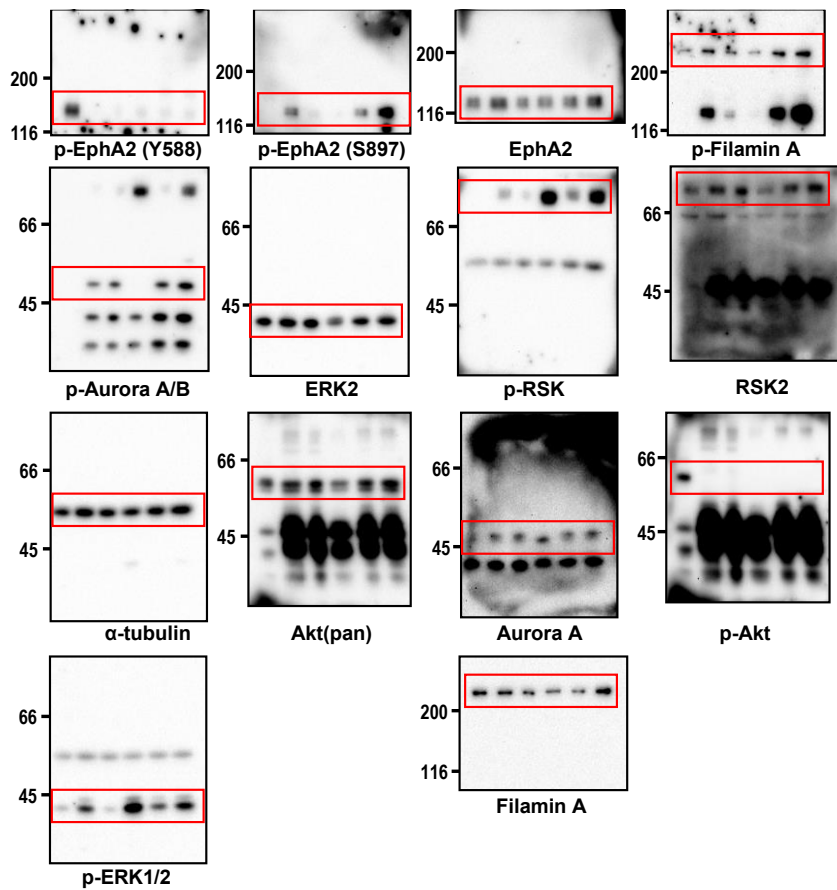


図 2-5 (続き)

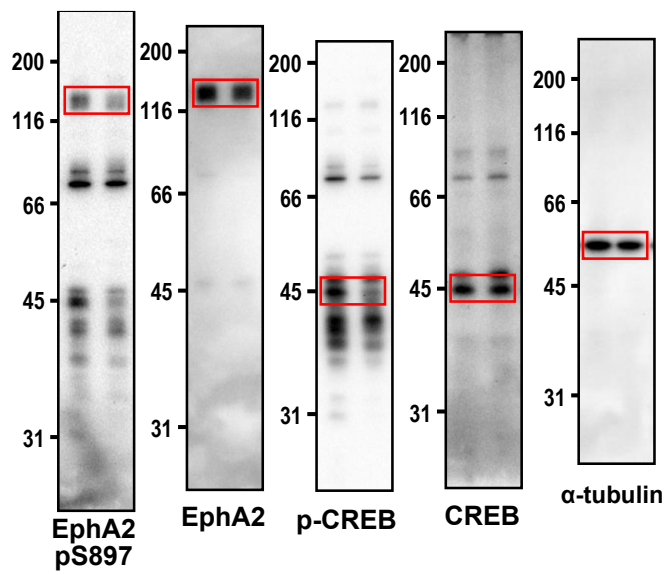
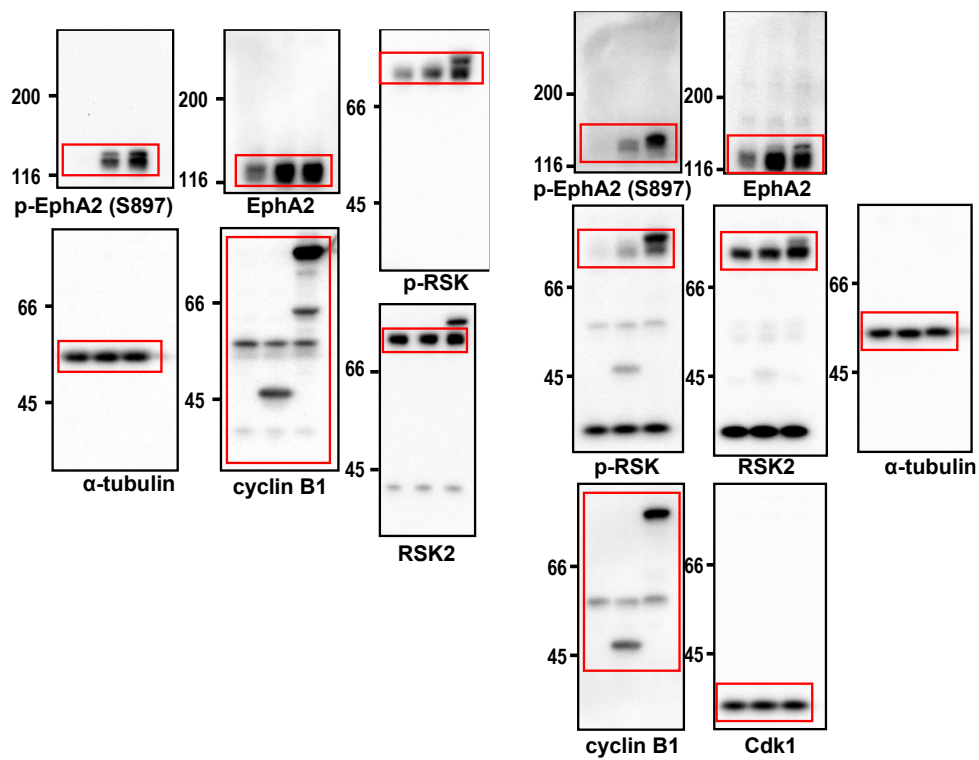
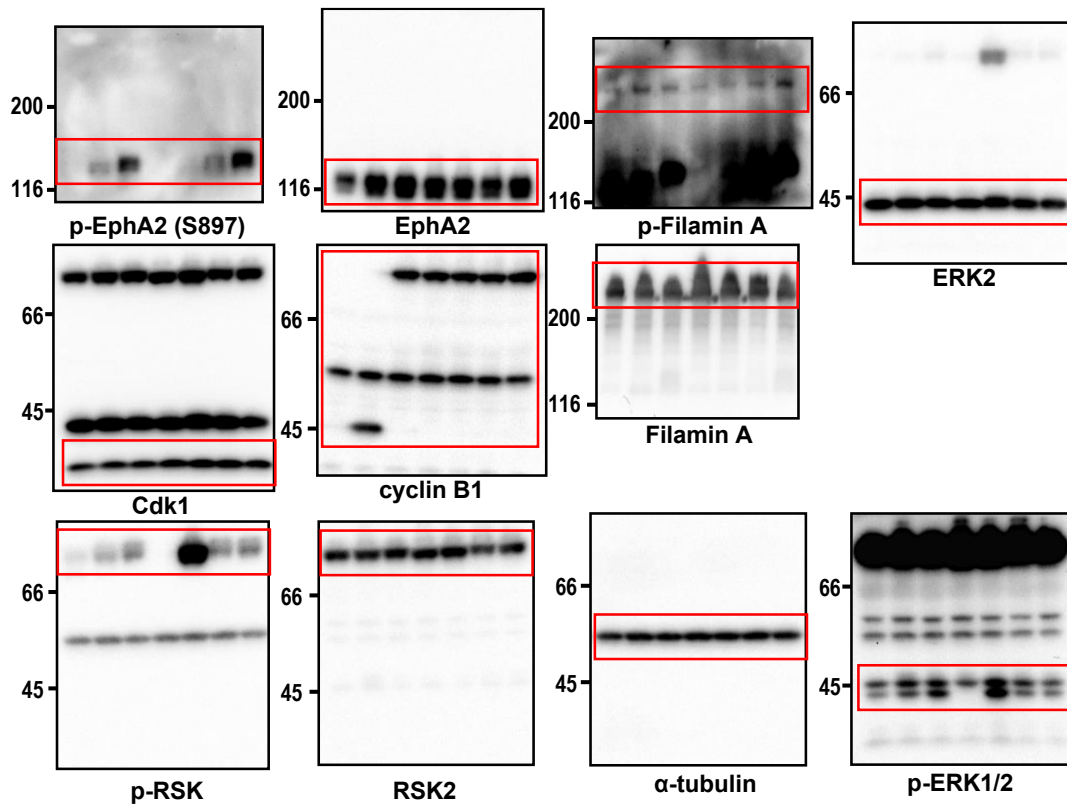


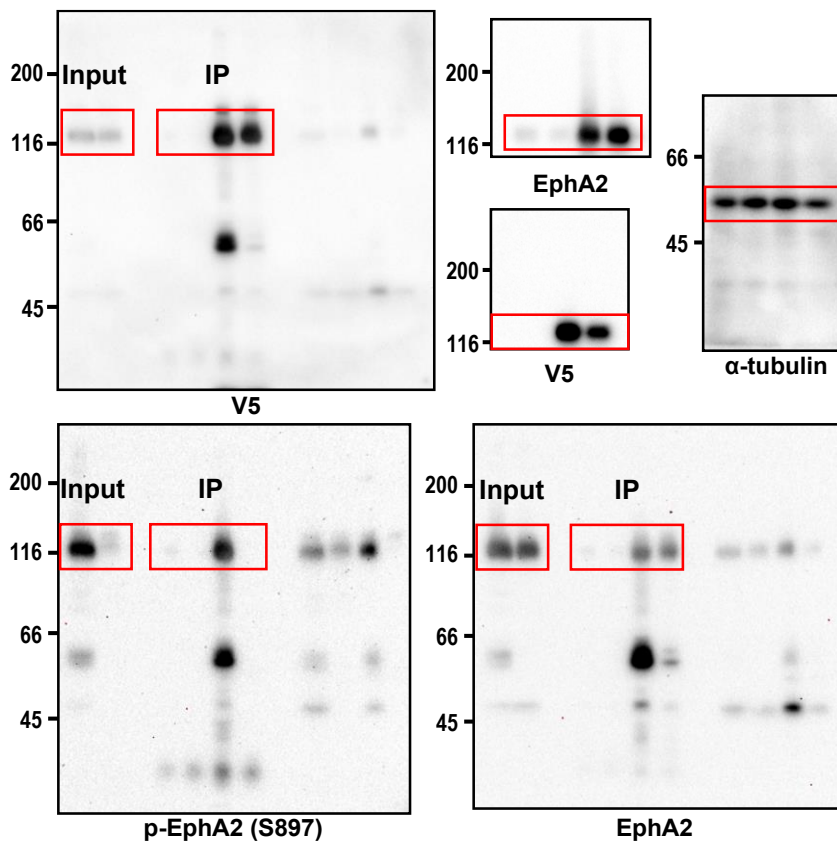
図 2-6



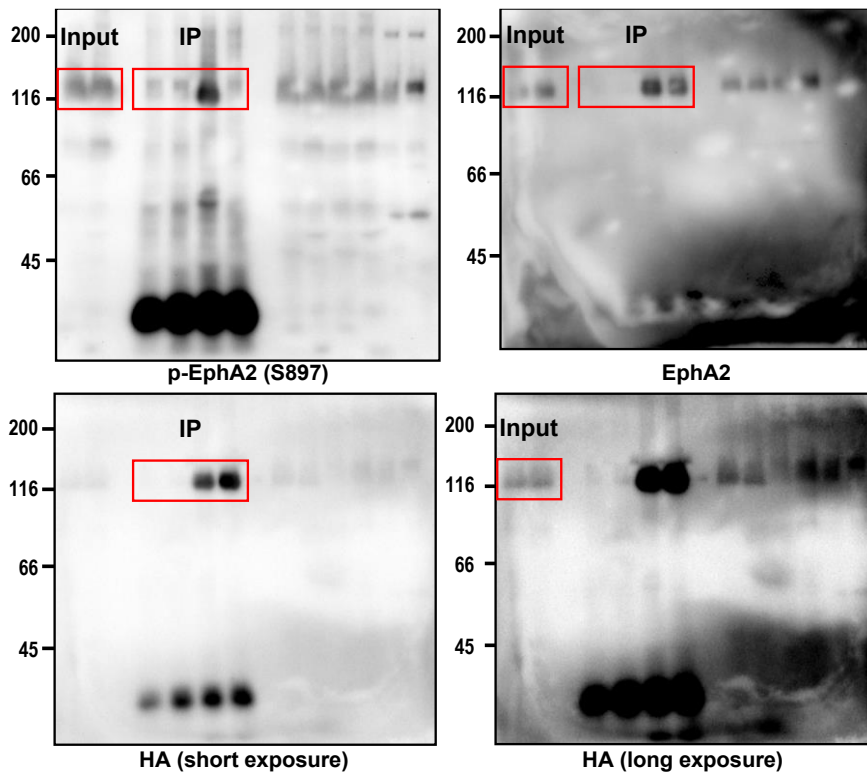
☒ 2-8



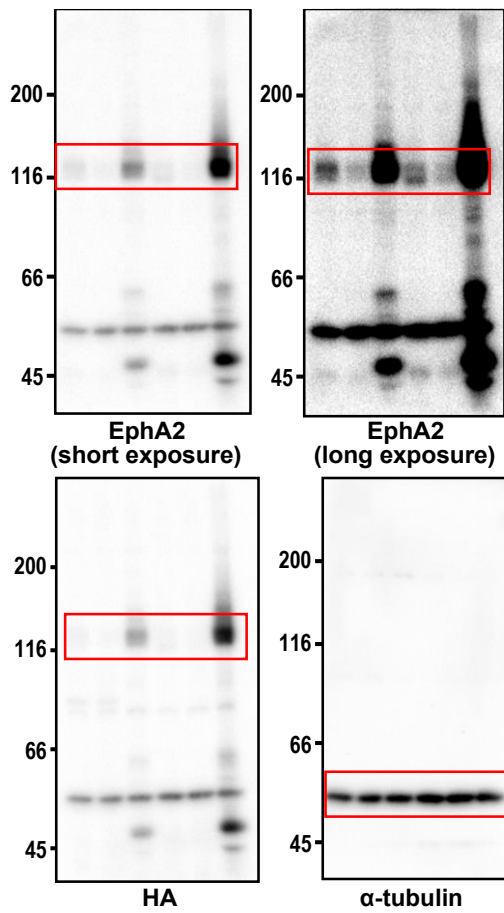
☒ 2-9



2-11

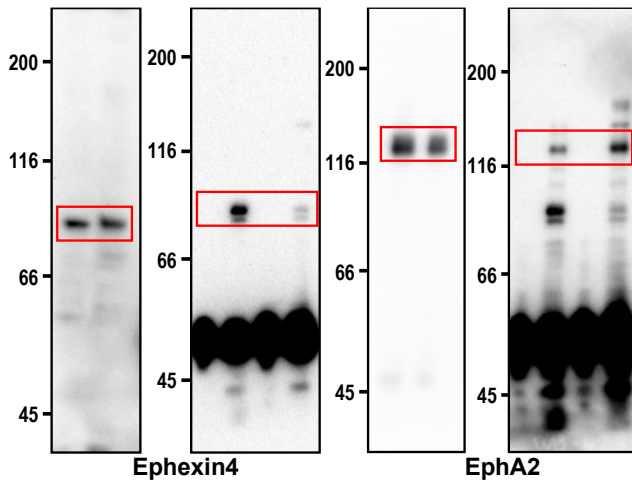


2-13

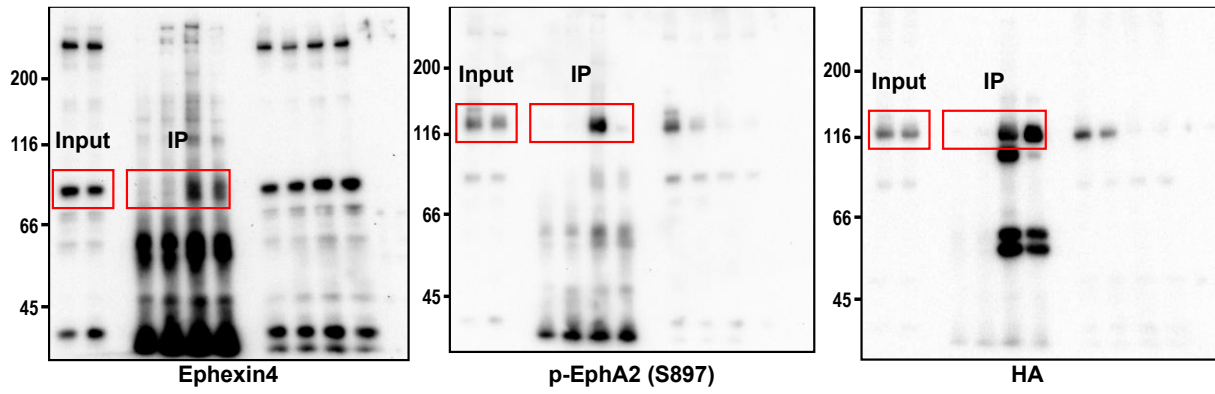




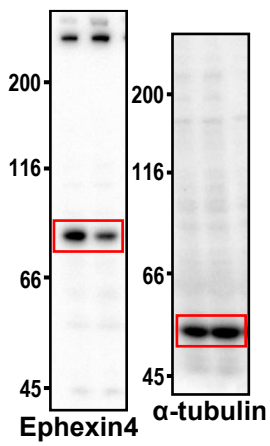
☒ 3-1



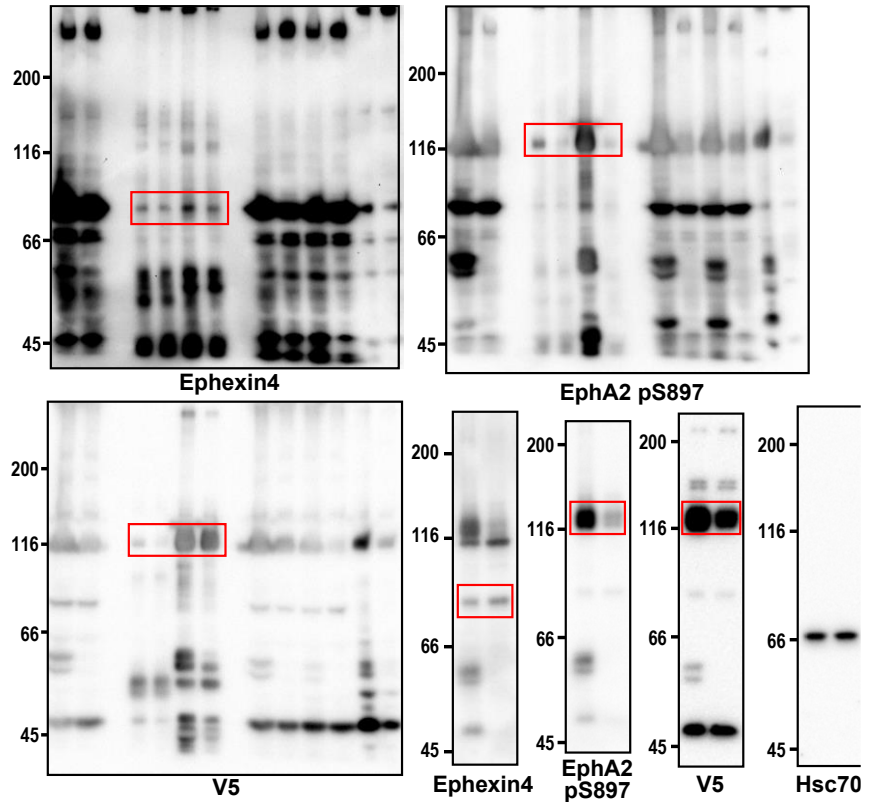
☒ 3-2



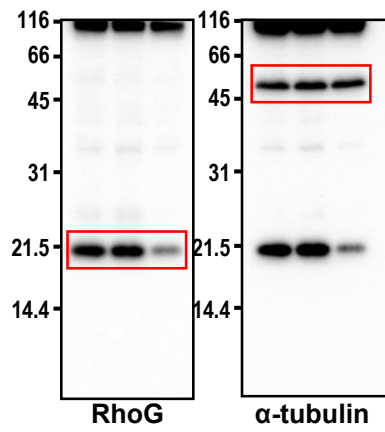
☒ 3-3



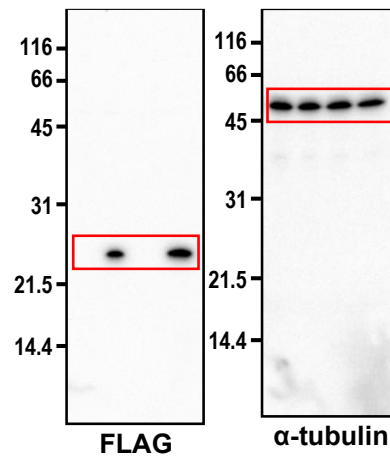
☒ 3-4



☒ 3-7



☒ 3-8



☒ 3-15

