

## 研究成果報告

研究課題 細胞周期制御機構に関する研究

研究期間 平成 26 年 10 月 1 日 ～ 平成 31 年 9 月 30 日

### 1)研究目的

細胞は、DNA 複製と細胞分裂すなわち細胞周期を繰り返し増殖する。単細胞では細胞周期が個体の増加につながり、多細胞生物では受精卵が個体を形成する段階において必須であるとともに日々失われる細胞を補充する生理的意義もある。細胞周期の異常が細胞の癌化に関連していることから、細胞周期の理解は癌化や癌治療を考えるうえで重要である。しかしながら全ての細胞周期制御が解明されたわけではなく、機構解明を目指した。

### 2)実施内容

当該共同研究は細胞周期を制御する機構の解明を目指し、以下の4つの項目により構成された。① 細胞分裂期特異的にチロシンリン酸化されるタンパク質の同定と細胞周期・細胞分裂制御への関与、② 細胞分裂期特異的な v-Src 基質の探索、③ DNA 損傷による細胞周期停止からの回復におけるリン酸化シグナルの解析、④ Hsp105 によるスピンドル形成チェックポイント制御機構の解明。

### 3)研究成果

本共同研究により以下の結果を得た。①細胞分裂後期/終期に同調する方法を用いて細胞のライセートを調製し、質量解析により細胞分裂期においてチロシンリン酸化されるペプチドを 362 個見出した。また、EphA2、Fyn、ERK などによる細胞分裂制御を解明した。②v-Src が CDK1 をリン酸化することにより細胞分裂異常を引き起こすことを明らかにした。また、v-Src による細胞分裂異常の誘導機構と染色体不安定性の関連を解明した。③DNA 損傷応答に関与する 9-1-1 複合体と Rad17 の相互作用のリン酸化による制御を見出した。④熱ショックタンパク質 Hsp105 が紡錘体形成チェックポイントに関与することを明らかにした。以上より、新たな細胞周期制御機構の解明に成功した。

### 4)研究組織

#### <本学>

研究代表者 中山 祐治（京都薬科大学・教授）

上記の研究成果のうち、主に①、②、④を担当した。

#### <共同研究先>

研究代表者 山口 直人（千葉大学大学院薬学研究院・教授）

上記の研究成果のうち、主に②、③を担当した。

## 成果発表

### 1)原著論文

1. Mai Okamoto, Yuji Nakayama, Ayana Kakihana, Ryuzaburo Yuki, Noritaka Yamaguchi, Naoto Yamaguchi.  
Fyn accelerates M phase progression by promoting the assembly of mitotic spindle microtubules.  
*J. Cell. Biochem.*, 117, 894-903 (2016).
2. Takuya Honda, Shuhei Soeda, Kunihiro Tsuda, Chihiro Yamaguchi, Kazumasa Aoyama, Takao Morinaga, Ryuzaburo Yuki, Yuji Nakayama, Noritaka Yamaguchi, Naoto Yamaguchi.  
Protective role for lipid modifications of Src-family kinases against chromosome missegregation.  
*Sci. Rep.*, 6, 38751 (2016).
3. Erika Iwamoto, Natsumi Ueta, Yuki Matsui, Keiju Kamijo, Takahisa Kuga, Youhei Saito, Naoto Yamaguchi, Yuji Nakayama.  
ERK plays a role in chromosome alignment and participates in M-phase progression.  
*J. Cell. Biochem.*, 117, 1340-1351 (2016).
4. Masayoshi Ikeuchi, Yasunori Fukumoto, Takuya Honda, Takahisa Kuga, Youhei Saito, Naoto Yamaguchi, Yuji Nakayama.  
v-Src causes chromosome bridges in a caffeine-sensitive manner by generating DNA damage.  
*Int. J. Mol. Sci.*, 17, 71 (2016).
5. Yasunori Fukumoto, Masayoshi Ikeuchi, Yuji Nakayama, Naoto Yamaguchi.  
The KYxxL motif in Rad17 protein is essential for the interaction with the 9e1e1 complex.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 477, 982-987 (2016).
6. Keiko Kakaue, Masayoshi Ikeuchi, Takahisa Kuga, Youhei Saito, Naoto Yamaguchi, Yuji Nakayama.  
v-Src-induced nuclear localization of YAP is involved in multipolar spindle formation in tetraploid cells.  
*Cell. Signal.*, 30, 19-29 (2017).
7. Yuji Nakayama, Shuhei Soeda, Masayoshi Ikeuchi, Keiko Kakaue, Naoto Yamaguchi.  
Cytokinesis failure leading to chromosome instability in v-Src-induced oncogenesis.  
*Int. J. Mol. Sci.*, 18, 811, (2017).
8. Yasunori Fukumoto, Yuji Nakayama, Naoto Yamaguchi.  
The polyanionic C-terminal tail of human Rad17 regulates interaction with the 9-1-1 complex.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 490, 1147-1153 (2017).

9. Maria Horiuchi, Takahisa Kuga, Youhei Saito, Maiko Nagano, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Naoto Yamaguchi, Yuji Nakayama.  
The tyrosine kinase v-Src causes mitotic slippage by phosphorylating an inhibitory tyrosine residue of Cdk1.  
*J. Biol. Chem.*, 293, 15524-15537 (2018).
10. Takuya Honda, Mariko Morii, Yuji Nakayama, Ko Suzuki, Noritaka Yamaguchi, Naoto Yamaguchi.  
v-Src-driven transformation is due to chromosome abnormalities but not Src-mediated growth signaling.  
*Sci. Rep.*, 8, 1063 (2018).
11. Yasunori Fukumoto, Kazuaki Takahashi, Noriyuki Suzuki, Yasumitsu Ogra, Yuji Nakayama, Naoto Yamaguchi.  
Casein kinase 2 promotes interaction between Rad17 and the 9-1-1 complex through constitutive phosphorylation of the C-terminal tail of human Rad17.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 504, 380-386 (2018).
12. Ayana Kakihana, Yui Oto, Youhei Saito, Yuji Nakayama.  
Heat shock-induced mitotic arrest requires heat shock protein 105 for the activation of spindle assembly checkpoint.  
*FASEB J*, 33, 3936-3953 (2019).
13. 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*, 33, 5334-5349 (2019).
14. Yasunori Fukumoto, Yuji Nakayama, Naoto Yamaguchi.  
Human Rad17 C-terminal tail is phosphorylated by concerted action of CK1  $\delta / \epsilon$  and CK2 to promote interaction with the 9-1-1 complex.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 517, 310-316 (2019).

2)産業財産権      該当なし

3)招待講演      該当なし

4)学会発表

1. 池内正剛、齊藤洋平、本田拓也、山口直人、中山祐治  
v-Src 発現細胞の LATS ノックダウンによるブレブ形成の亢進  
第 42 回 日本分子生物学会年会（博多）2019 年 12 月 3～6 日
2. 池内正剛、本田拓也、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
v-Src は、がん抑制遺伝子 LATS2 の発現量を増加させる  
第 69 回 日本薬学会関西支部総会・大会（神戸）2019 年 10 月 12
3. 黒崎楓夏、池内正剛、抱恵子、本田拓也、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
v-Src 発現による浸潤能促進と染色体異常  
第 69 回 日本薬学会関西支部総会・大会（神戸）2019 年 10 月 12
4. 鏡畑直也、堀内麻利安、久家貴寿、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
v-Src によるサイクリン依存性キナーゼのリン酸化  
第 69 回 日本薬学会関西支部総会・大会（神戸）2019 年 10 月 12
5. 海堀祐一郎、片山桐子、田中優佳、小川実香、齊藤洋平、中山祐治  
受容体型チロシンキナーゼ EphA2 によるキナーゼ活性に依存しない細胞分裂制御機構  
第 92 回 日本生化学会大会（横浜）2019 年 9 月 18～20 日
6. 池内正剛、抱恵子、本田拓也、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
Src による LATS2 キナーゼ活性の低下は YAP 核局在化を介して多極紡錘体形成を促す  
第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（神戸）2019 年 6 月 24～26 日
7. 萩野真理、堀内麻利安、久家貴寿、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
v-Src により誘導される mitotic slippage は抗がん剤感受性を低下させる  
日本薬学会第 139 年会（千葉）2019 年 3 月 20～23 日
8. 池内正剛、抱恵子、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
v-Src による多核化した細胞への LATS2 の影響  
第 41 回 日本分子生物学会年会（横浜）2018 年 11 月 28 日～30 日
9. 海堀祐一郎、齊藤洋平、中山祐治  
受容体型チロシンキナーゼ EphA2 Ser897 のリン酸化による細胞分裂の制御機構  
第 68 回 日本薬学会近畿支部総会・大会（姫路）2018 年 10 月 13 日
10. 池内正剛、抱恵子、齊藤洋平、山口直人、中山祐治

v-Src による tetraploidy checkpoint の破綻を介した細胞のがん化・悪性化  
第 68 回 日本薬学会近畿支部総会・大会（姫路）2018 年 10 月 13 日

11. 萩野真理、堀内麻利安、久家貴寿、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
v-Src は Cdk1 リン酸化を介して抗がん剤感受性を低下させる  
第 68 回 日本薬学会近畿支部総会・大会（姫路）2018 年 10 月 13 日
12. 堀内麻利安、久家貴寿、齊藤洋平、長野麻衣子、足立淳、朝長毅、山口直人、中山祐治  
Cdk1 のリン酸化を介した、v-Src による mitotic slippage の誘導  
第 91 回 日本生化学会大会（京都）2018 年 9 月 24～26 日
13. 海堀祐一郎、齊藤洋平、中山祐治  
受容体型チロシンキナーゼのセリンリン酸化による細胞分裂制御  
日本薬学会第 138 年会（金沢）2018 年 3 月 25～28 日
14. 上拾石佐和、久家貴寿、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
Rab35 が制御する輸送に対する v-Src の影響  
日本薬学会第 138 年会（金沢）2018 年 3 月 25～28 日
15. 福本泰典、中山祐治、山口直人  
ヒト Rad17 タンパク質酸性 C 末端テールのカゼインキナーゼ 2 依存的リン酸化による 9-1-1 複合体との相互作用の促進  
日本薬学会第 138 年会（金沢）2018 年 3 月 25～28 日
16. 本田拓也、森井真理子、中山祐治、鈴木亘、山口憲孝、山口直人  
がん遺伝子 v-Src はストカスティックな形質転換機構を引き起こす  
日本薬学会第 138 年会（金沢）2018 年 3 月 25～28 日
17. 本田拓也、森井真理子、中山祐治、鈴木亘、山口憲孝、山口直人  
がん遺伝子 v-Src による染色体不安定性を介した形質転換  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会（神戸）2017 年 12 月 6 日～9 日
18. 福本泰典、中山祐治、山口直人  
ヒト Rad17 タンパク質の酸性 C 末端テールによる 9-1-1 複合体との相互作用の制御  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会（神戸）2017 年 12 月 6 日～9 日
19. 海堀祐一郎、久家貴寿、齊藤洋平、中山祐治  
受容体型チロシンキナーゼによる細胞分裂制御機構の解析

日本薬学会第137年会（仙台）2017年3月25～27日

20. 堀内麻利安、久家貴寿、齊藤洋平、朝長毅、中山祐治  
Srcの異常な活性化が細胞分裂異常を誘導する新規機構の解明  
日本薬学会第137年会（仙台）2017年3月25～27日.
21. 本田拓也、鈴木亘、森井真理子、添田修平、阿部紘平、山口千尋、久保田翔、青山和正、中山祐治、山口憲孝、山口直人  
がん遺伝子v-Srcによる細胞周期進行抑制の分子機構  
日本薬学会第137年会（仙台）2017年3月25～27日
22. 山口憲孝、中山祐治、山口直人  
エストロゲン依存性乳癌細胞のタモキシフェン耐性獲得におけるNF- $\kappa$ B経路の役割  
日本薬学会第137年会（仙台）2017年3月25～27日
23. 抱恵子、池内正剛、本田拓也、久家貴寿、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
v-Srcによる多極紡錘体の形成  
第39回日本分子生物学会年会（横浜）2016年11月30日～12月2日
24. 上田菜津美、岩本絵里香、奥村大喜、久家貴寿、齊藤洋平、中山祐治  
分裂期微小管の動態を指標とした、新規細胞分裂関連タンパク質の探索  
日本薬学会第136年会（横浜）2016年3月26～29日
25. 岡田美咲、久家貴寿、齊藤洋平、足立淳、朝長毅、中山祐治  
細胞分裂後期特異的なリン酸化タンパク質の探索  
日本薬学会第136年会（横浜）2016年3月26～29日
26. 岩本絵里香、上田菜津美、松井優紀、久家貴寿、齊藤洋平、山口直人、中山祐治  
ERKによる染色体整列の制御  
日本薬学会第136年会（横浜）2016年3月26～29日
27. 福本泰典、池内正剛、中山祐治、山口直人  
Rad17における9-1-1複合体との相互作用に関わるモチーフの同定と解析  
日本薬学会第136年会（横浜）2016年3月26～29日
28. 池内正剛、本田拓也、福本泰典、久家貴寿、齊藤洋平、山岸伸行、山口直人、中山祐治  
v-Src発現によるchromosome bridge形成機構  
日本薬学会第135年会（神戸）2015年3月25～28日