

平成 30 年 4 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24113005

研究課題名(和文)中心体・一次シリアと細胞周期

研究課題名(英文)Primary cilia and cell cycle

研究代表者

稲垣 昌樹(Inagaki, Masaki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30183007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 155,200,000円

研究成果の概要(和文)：増殖休止細胞において形成される一次シリアと呼ばれる細胞内小器官の形成メカニズム及び、一次シリアによる細胞周期制御機構の解明を進めてきた。本研究により、タンパク質分解の主要経路であるユビキチン・プロテアソーム系が一次シリアの形成に必要不可欠であることを示した。さらに、上皮成長因子受容体EGFRによるシグナル伝達経路が、一次シリアの抑制因子のタンパク質分解を制御することを明らかにした。本研究成果により、一次シリアの形成と細胞周期が連関する分子メカニズムが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that ubiquitin-proteasome system controls the assembly and disassembly of primary cilia: CRL3-KCTD17 ubiquitin E3 ligase leads to poly-ubiquitination and degradation of trichoplein, a suppressor of ciliogenesis, thereby inducing ciliogenesis in response to serum starvation. In proliferating cells, trichoplein is destabilized by USP8 deubiquitinase. Importantly, we reveal that epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase directly phosphorylates and activates USP8. These data indicate that the ubiquitin-proteasome-mediated control of trichoplein level is critical for ciliogenesis.

研究分野：分子生理学

キーワード：一次シリア 中心体 細胞周期 ユビキチン プロテアソーム 成長因子受容体

1. 研究開始当初の背景

中心体は、細胞分裂期において染色体の分離・分配を制御し、静止期においては一次シリアを構成する基底小体として働くことが知られている。多細胞生物において、細胞は、内部環境（中心体など）から発生する情報と一次シリアや細胞間接着装置などを介して得た外部環境からの情報を統合して、その細胞周期チェックポイントを制御し、秩序だった増殖と分化を行い、巧みに組織や器官を形成・維持していると考えられる。特に、組織幹細胞において、このシリア・中心体系を経由した細胞内外からの情報のフローが、細胞周期チェックポイントをどのように制御しているのかは、細胞生物学・発生生物学における根本的命題であるが、研究開始当初においてその詳細は不明であった。

我々は本研究の開始時点において、一次シリアの形成を抑制する因子としてトリコプレイン *trichoplein* を同定することに成功した。さらに、トリコプレインが中心小体においてオーロラ A キナーゼを直接活性化することで、G1 期に一次シリアが形成されないようにしていることを明らかにした (Inoko et al, J Cell Biol, 2012)。また、これらの研究と並行して、トリコプレインが持つ TPHD ドメインと相同性の高い領域を含む蛋白質群 (TPHD 蛋白質群) 97 種類の同定に成功し、これら蛋白質の一部が一次シリア・中心体の制御に関与していることを見出した。

2. 研究の目的

これらの学術的背景・研究成果をふまえて、本研究課題で我々は、トリコプレイン-オーロラ A 系を中心とした一次シリアの制御機構を詳らかにし、中心体・一次シリアと細胞周期のダイナミックな制御連関を明らかにすることを目的として研究を進めてきた。また、TPHD 蛋白質群による一次シリアの制御機構についても解析を進め、トリコプレイン-オーロラ A 系シグナルとのクロストークについても解明を進めた。

3. 研究の方法

(1) E3 リガーゼプロテインマイクロアレイによるトリコプレイン結合蛋白質の探索

我々は、本研究課題を申請時点において、トリコプレインがユビキチン・プロテアソーム依存的に蛋白質分解されることが一次シリアの形成には必要不可欠であることを発見した。そこで、トリコプレインをポリユビキチン化する酵素 (E3 リガーゼ) を同定するため、研究分担者である五島博士が作製した E3 リガーゼを約 1000 種類搭載した E3 リガーゼプロテインマイクロアレイ及びピアコア A100 を用いた SPR 法によって、トリコプレインに対する E3 リガーゼの結合特異性を測定した。これらのスクリーニングを経てトリコプレインと結合する E3 リガーゼとして同定された分子について、細胞内で過剰発現もし

くは siRNA によるノックダウンし、トリコプレインの細胞内蓄積を調べ、*in vivo* における分解系としての検証を行った。

(2) TPDH 蛋白質群の網羅的解析

我々は五島との共同研究で TPDH 様の構造を有する 97 個の蛋白質群を同定し、TPHD 蛋白質群と名付けた。そこで本研究課題では、まずこれら 97 個の蛋白質群を一つずつ培養細胞に強制発現させ、それらの細胞内局在を解析し、中心体及び一次シリアに局在する蛋白質を絞り込んだ。これらの候補蛋白質群について、強制発現や siRNA によるノックダウンを行い、一次シリアの形成と G0/G1 移行に及ぼす影響を詳細に解析した。

(3) 一次シリアを制御する脱ユビキチン化酵素の網羅的解析

一次シリアの制御におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割を明らかにするため、脱ユビキチン化酵素の siRNA ライブラリーを用いて、ノックダウンにより一次シリアの形成を誘導する脱ユビキチン化酵素を同定した。同定した脱ユビキチン化酵素とトリコプレイン-オーロラ A 系の関係を調べるため、脱ユビキチン化酵素の過剰発現もしくはノックダウン細胞におけるトリコプレインの蛋白質レベルの変動を解析した。また、精製蛋白質を用いた試験管実験による検証も進めた。

(4) 一次シリア関連因子の遺伝子改変動物の表現型解析

トリコプレイン及び、上記の研究で同定した一次シリア制御因子について遺伝子改変マウスを作成して生理学的な機能を検証している。また、一次シリア解析におけるモデル動物であるゼブラフィッシュのノックアウト個体の表現型解析も行った。

4. 研究成果

(1) トリコプレインの蛋白分解による一次シリア形成機構

我々は、E3 リガーゼプロテインマイクロアレイ及び siRNA を組み合わせたスクリーニングにより、トリコプレインのポリユビキチン化に関与する蛋白質として KCTD17 を同定した。さらに、培養細胞を用いた実験系及び、試験管内再構成実験系により KCTD17 は Cu13 及び Rbx1 と蛋白質複合体 (CRL3-KCTD17 蛋白質複合体) を形成し、トリコプレインの E3 リガーゼとして働くことを明らかにした。血清飢餓などによる一次シリア形成に CRL3-KCTD17 によるトリコプレインの分解誘導が必要不可欠であることを示した (Kasahara et al, Nat Commun, 2014; Izawa et al, Cilia, 2015)。

(2) Ndel1 による一次シリア制御機構

97 個の TPDH 蛋白質群の網羅的解析により、

Ndel1 が中心小体に局在し、一次シリアの形成を抑制していることを発見した。分子メカニズムを検証したところ、Ndel1 は CRL3-KCTD17 によるトリコプレインの蛋白質分解を阻害することを示した。また Ndel1 の遺伝子改変マウスは、腎管の一次シリアの長さに異常を生じ、シリア病の一つである嚢胞腎様の症状を呈することも明らかにし、Ndel1 による一次シリア制御が生理学的にも重要であることがわかった (Inaba et al, J Cell Biol, 2016)。

(3) 脱ユビキチン化酵素 USP8 による一次シリア制御機構

脱ユビキチン化酵素の siRNA ライブラリーを用いて、ノックダウンにより一次シリアの形成を誘導する 6 つの脱ユビキチン化酵素 (USP8, USP38, USP43, USP52, USP54, UCHL3) を同定した。培養細胞を用いた解析の結果、これら 6 つの脱ユビキチン化酵素はいずれも一次シリアの形成を抑制する因子であることを証明した。さらなる解析の結果、USP8 は、上皮成長因子受容体 EGFR により直接リン酸化/活性化され、トリコプレインを脱ユビキチン化することで一次シリアの形成を抑制していることが判明した。

さらに、USP8 をノックアウトしたゼブラフィッシュでは、線毛の長さの異常や線毛病と思われる症状が観察された。(Kasahara et al, Nat Commun, 2018)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 25 件)

査読有り (25 件)

1. Inaba H, Yamakawa D, Tomono Y, Enomoto A, Mii S, Kasahara K, Goto H, Inagaki M. Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 498:544-550. 2018
2. Kasahara K, Aoki H, Kiyono T, Wang S, Kagiwada H, Yuge M, Tanaka T, Nishimura Y, Mizoguchi A, Goshima N, Inagaki M. EGF receptor kinase suppresses ciliogenesis through activation of USP8 deubiquitinase. *Nat Commun*. 9:758. 2018
3. Chen M, Puschmann TB, Marasek P, Inagaki M, Pekna M, Wilhelmsson U, Pekny M. Increased Neuronal Differentiation of Neural Progenitor Cells Derived from Phosphovimentin-Deficient Mice. *Mol Neurobiol*. In press
4. Andrieu G, Ledoux A, Branka S, Bocquet M, Gilhodes J, Walzer T, Kasahara K, Inagaki M, Sabbadini RA, Cuvillier O, Hatzoglou A. Sphingosine 1-phosphate signaling through its receptor S1P₅ promotes chromosome segregation and mitotic progression. *Sci Signal*. 10(472) 2017
5. Goto H, Inaba H, Inagaki M. Mechanisms of ciliogenesis suppression in dividing cells. *Cell Mol Life Sci*. 74:881-890. 2017
6. Makihara H, Inaba H, Enomoto A, Tanaka H, Tomono Y, Ushida K, Goto M, Kurita K, Nishida Y, Kasahara K, Goto H, Inagaki M. Desmin phosphorylation by Cdk1 is required for efficient separation of desmin intermediate filaments in mitosis and detected in murine embryonic/newborn muscle and human rhabdomyosarcoma tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 478:1323-9. 2016
7. Inaba H, Goto H, Kasahara K, Kumamoto K, Yonemura S, Inoko A, Yamano S, Wanibuchi H, He D, Goshima N, Kiyono T, Hirotsune S, Inagaki M. Ndel1 suppresses ciliogenesis in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora A pathway. *J Cell Biol*. 212:409-23. 2016
8. Goto H, Tanaka H, Kasahara K, Inagaki M. Phospho-Specific Antibody Probes of Intermediate Filament Proteins. *Methods Enzymol*. 568:85-111. 2016
9. Izawa I, Goto H, Kasahara K, Inagaki M. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia*. 4:12. 2015
10. Bargagna-Mohan P, Lei L, Thompson A, Shaw C, Kasahara K, Inagaki M, Mohan R. Vimentin Phosphorylation Underlies Myofibroblast Sensitivity to Withaferin A In Vitro and during Corneal Fibrosis. *PLoS One*. 10:e0133399. 2015
11. Hyder CL, Kemppainen K, Isoniemi KO, Imanishi SY, Goto H, Inagaki M, Fazeli E, Eriksson JE, Törnquist K. Sphingolipids inhibit vimentin-dependent cell migration. *J Cell Sci*. 128:2057-69. 2015
12. Tanaka H, Goto H, Inoko A, Makihara H, Enomoto A, Horimoto K, Matsuyama M, Kurita K, Izawa I, Inagaki M. Cytokinetic Failure-induced Tetraploidy Develops into Aneuploidy, Triggering Skin Aging in Phosphovimentin-deficient Mice. *J Biol Chem*. 290:12984-98. 2015

13. Goto H, Kasahara K, Inagaki M. Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation. *Cell Struct Funct.* 40:43-50. 2015
 14. Oakes V, Wang W, Harrington B, Lee WJ, Beamish H, Chia KM, Pinder A, Goto H, Inagaki M, Pavey S, Gabrielli B. Cyclin A/Cdk2 regulates Cdh1 and claspin during late S/G2 phase of the cell cycle. *Cell Cycle.* 13:3302-11. 2014
 15. Ohta M, Ashikawa T, Nozaki Y, Kozuka-Hata H, Goto H, Inagaki M, Oyama M, Kitagawa D. Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nat Commun.* 5:5267. 2014
 16. Kasahara K, Kawakami Y, Kiyono T, Yonemura S, Kawamura Y, Era S, Matsuzaki F, Goshima N, Inagaki M. Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension. *Nat Commun.* 5:5081. 2014
 17. Goto H, Inagaki M. New insights into roles of intermediate filament phosphorylation and progeria pathogenesis. 66:195-200. *IUBMB Life.* 2014
 18. Kitagawa M, Fung SY, Hameed UF, Goto H, Inagaki M, Lee SH. Cdk1 coordinates timely activation of MKlp2 kinesin with relocation of the chromosome passenger complex for cytokinesis. *Cell Rep.* 7:166-79. 2014
 19. Goto H, Inagaki M. Method for the generation of antibodies specific for site and posttranslational modifications. *Methods Mol Biol.* 1131:21-31. 2014
 20. Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Akita H, Sugiyama I, Ishidate F, Nakano A, Takashima S, Goto H, Inagaki M, Kaibuchi K, Watanabe T. Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. *Cell Struct Funct.* 39:45-59. 2014
 21. Ikawa K, Satou A, Fukuhara M, Matsumura S, Sugiyama N, Goto H, Fukuda M, Inagaki M, Ishihama Y, Toyoshima F. Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle.* 13:126-37. 2014
 22. Matsuyama M, Tanaka H, Inoko A, Goto H, Yonemura S, Kobori K, Hayashi Y, Kondo E, Itohara S, Izawa I, Inagaki M. Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. *J Biol Chem.* 288:35626-35. 2013
 23. Odaka C, Loranger A, Takizawa K, Ouellet M, Tremblay MJ, Murata S, Inoko A, Inagaki M, Marceau N. Keratin 8 is required for the maintenance of architectural structure in thymus epithelium. *PLoS One.* 8:e75101. 2013.
 24. Kasahara K, Goto H, Izawa I, Kiyono T, Watanabe N, Elowe S, Nigg EA, Inagaki M. PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3 γ and is required for metaphase-anaphase transition. *Nat Commun.* 4:1882. 2013
 25. Goto H, Inoko A, Inagaki M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cell Mol Life Sci.* 70:3893-905. 2013
- [学会発表] (計 3 件)
1. Inagaki M, Kasahara K : Primary cilia and cell cycle、第 40 回日本分子生物学会学術総会、パシフィコ横浜 (横浜市) 2016 年 12 月 2 日
 2. 稲垣昌樹 : 一次シリアと細胞周期、第 28 回 CDB ミーティング「Cilia and Centrosomes」理化学研究所 (神戸市) 2016 年 11 月 27 日
 3. Inagaki M, Izawa I : Cell cycle and cancer、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 (名古屋市) 2015 年 10 月 5 日
- [図書] (計 1 件)
1. Goto H, Inagaki M. DNA damage checkpoint and cancer--pros and cons of Chk1 inhibitors. *Seikagaku.* 85:145-51. 2013
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)
- 名称 : スクリーニング方法
 発明者 : 稲垣昌樹、笠原広介
 権利者 : 同上
 種類 : 特許
 番号 : 特願 2017-210896
 出願年月日 : 2017 年 10 月 31 日
 国内外の別 : 国内
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
 ホームページ等
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organizati>

on/course/physiology/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 昌樹 (INAGAKI, Masaki)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30183007

(2) 研究分担者

五島 直樹 (GOSHIMA, Naoki)

独立行政法人産業技術総合研究所・生命工
学領域・研究チーム長

研究者番号：70215482

(3) 連携研究者

井澤 一郎 (IZAWA, Ichiro)

名古屋学芸大学・管理栄養学部・教授

研究者番号：20311441

(4) 研究協力者

なし