

平成 30 年 4 月 18 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08324

研究課題名(和文) 分裂期キナーゼを介したシグナル伝達異常と疾患

研究課題名(英文) Abnormalities of mitotic-kinase-mediated signal transduction and diseases

研究代表者

後藤 英仁 (Goto, Hidemasa)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・室長

研究者番号：20393126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Aurora-A、Plk1は分裂期で活性化するタンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)として位置づけられてきたが、近年、分裂間期において一次線毛形成の抑制に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。癌や一次線毛(シリア)病に分裂間期のこれらキナーゼの異常が関与しているのではないかと考えられているが、その詳細はわかっていない。本研究において、我々は、分裂間期におけるAurora-Aの活性化にNdel1が重要な役割を担っていることを明らかにした。Ndel1が機能低下したマウスでは、シリア病と似た病態を示すことから、この発見はシリア病の理解に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aurora-A and Plk1 are known to be activated in mitosis. Recently, it was reported that these mitotic kinases also function in interphase. Abnormalities of these interphase functions are considered to be related to several diseases, such as cancer or ciliopathy, but the precise mechanisms remain unknown. In this research project, we found that Ndel1 functions upstream of Aurora-A in interphase. Since Ndel1-hypomorphic mice exhibit ciliopathy-related disorders, these findings shed light on the pathogenesis of ciliopathy.

研究分野：生化学、細胞生物学、病態医化学

キーワード：分裂期キナーゼ Aurora-A Plk1 Ndel1

1. 研究開始当初の背景

Aurora-A、Plk1 は、分裂期に中心体で活性化される分裂期キナーゼとして位置づけられており、これまでに G2 期から分裂期への (G2/M) 移行、中心体の成熟、分裂期紡錘体の形成、染色体の分配などの分裂期における種々の細胞現象を制御していることが知られている。これら 2 つの分裂期キナーゼは、G2/M 移行期において Aurora-A が Plk1 の活性化因子であること、互いの基質のリン酸化反応が時空間的に同期して引き起こされることが上記の分裂期現象の制御に重要であることなどから、機能的に互いに協調しながら働いていると考えられている。Aurora-A および Plk1 は、分裂期のみで機能すると以前は考えられてきたが、最近の研究により、分裂期以外の間期においても重要な役割を担っていることが知られるようになってきた。

Aurora-A は、細胞の休止期 (G0 期) から増殖周期 (G1 期) に入る際に、一次線毛 (primary cilia) の退縮に重要な役割を担っていることが明らかにされた。最近、我々の研究グループは、Aurora-A が増殖細胞における一次線毛の再形成を抑制することで G1 期から S 期への細胞周期進行を正に制御していることを報告した。このような制御機構は (一次線毛を生やす能力が欠如している) 癌細胞では機能していない。そのため、Aurora-A の機能を抑制すると、正常細胞では G1/S 移行期で細胞増殖を停止する (細胞死には至らない) が、癌細胞においては、G1/S 移行期に停止せず、分裂期まで進行し、(分裂期の Aurora-A の機能抑制のため) mitotic catastrophe と呼ばれる分裂期細胞死を引き起こす。このことは、Aurora-A が、抗癌治療における良好な分子標的となりうることを示唆している。

これまでの研究で、研究対象の 2 つのキナーゼは、癌を中心とする種々の疾患にも深く関与していることが報告されている。Aurora-A に関しては、大腸癌や膀胱癌などで遺伝子の増幅があり、種々の癌組織で過剰に発現していることが知られており、マウスを用いた遺伝学的な解析においても過剰発現と癌化の間の相関が示されている。また、一次線毛の形成異常によって引き起こされると考えられる疾患 (シリア病) のうち、多嚢胞性腎の発症に Aurora-A の異常活性化が重要な役割を担っている可能性が最近示された。Plk1 に関しては、種々の癌組織において過剰発現していること、その過剰発現は生命予後とも深く関連していることが報告されている。つまり、これら 2 つのキナーゼの制御異常は、癌を中心とした疾患の病態にも深く関与しているといえる。

2. 研究の目的

研究背景で述べたように、Aurora-A、Plk1

の分裂期における機能はこれまで十分に研究されてきたが、間期における Aurora-A ならびに Plk1 を介したシグナル伝達機構の全容がほとんど解明されてこなかった。本研究は、間期における Aurora-A、Plk1 のシグナル伝達機構を解明することを通じて、間期における Aurora-A、Plk1 の制御異常が癌やシリア病の疾患病態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 一次線毛形成抑制における Aurora-A 活性化シグナル伝達経路の解明

我々は、これまで、分裂間期における Aurora-A の活性化にはトリコプレインというタンパク質が重要な役割を担っていることを報告してきた。しかし、この活性化経路の上流または下流に位置する分子の同定はこれまでできていなかった。トリコプレインというタンパク質は、タンパク質同士の相互作用に参与すると考えられる TPHPD (Trichoplein and Plectin Homology Domain) というドメイン構造を保持していたため、この TPHPD をもつタンパク質群をデータベース検索で割り出し、そのタンパク質のノックダウンを網羅的に行った。その中で、トリコプレインや Aurora-A のノックダウンと同じような表現型を示すものをピックアップし、さらなる機能解析を行った。

2) 迅速かつ特異的な Aurora-A または Plk1 の機能抑制系の確立

分裂期の機能に変化を与えず、分裂間期のこれらキナーゼの機能を解析するためには、キナーゼの機能を迅速かつ特異的に抑制する実験系が必要となる。このような機能抑制を行なうため、本研究の申請時には、キナーゼの触媒ドメインに変異を加えて、特定の ATP アナログの添加によってキナーゼ活性を失う細胞株の樹立を目指した。しかし、このような ATP アナログ感受性の変異をキナーゼに加えるとキナーゼ活性が低下することが多いせいか、このようなキナーゼ変異をもった内在性キナーゼにもった細胞株はヘテロの状態のものは確立できても、(アッセイに使う) ホモの状態のものは確立できなかった。そのため、機能抑制株の樹立方法を変更した。具体的には、国立遺伝学研究所の鐘巻博士らが開発した方法、つまり、タンパク質に minimum Auxin-Inducible Degron (mAID) を添加するとオーキシン依存性にタンパク質が迅速かつ特異的に分解できることを応用し、内在キナーゼの最終エクソンの終止コドンの前にこの mAID を付加した細胞株の樹立を目指した。

4. 研究成果

1) 一次線毛形成抑制における Aurora-A 活性化シグナル伝達経路の解明

データベース検索により、TPHPD をもったタ

ンパク質が77個存在することが判明した。siRNA ライブラリーを用いて、それぞれの候補タンパク質を網羅的にノックダウンしたところ、トリコプレインや Aurora-A のノックダウンと同じような（細胞増殖条件において、正常2倍体細胞である RPE 細胞が一次線毛を形成し、増殖を停止するという）表現型を示すものを4つピックアップした。

そのうち、dynein 結合タンパク質である Ndel1 に着目し、その後の研究を行った。トリコプレインは KCTD17 という E3 リガーゼによってユビキチン化されることによって分解をうけているが、Ndel1 はこのトリコプレインのユビキチン化（分解）過程を抑制することでトリコプレインを安定化し、Aurora-A の活性化経路を細胞増殖中に維持していることが判明した。Ndel1 が機能抑制されたマウス（Ndel1 hypomorphic mouse）を用いて機能解析をしたところ、一次線毛（シリア）病で認められる肥満が認められることが判明した。また、培養細胞で用いた解析と同様に、Ndel1 の機能低下により、新生児の腎臓の近位尿細管での一次線毛が長くなり、それとともに同部位で増殖している細胞の割合が減少していることが判明した。

以上の結果は、Ndel1 が分裂間期の Aurora-A の活性化経路の上流で機能し、細胞増殖に促進的に作用していること、Ndel1 の機能不全は生体内においても一次線毛の動態に深く関与し、シリア病と類似の症状を示すことが判明した。

2) 迅速かつ特異的な Aurora-A または Plk1 の機能抑制系の確立

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法を用いて、AURKA (Aurora-A のヒト遺伝子座)、PLK1 の終止コドンが含まれるエクソンに DNA 2 重鎖切断を加えるとともに、相同領域と mAID を含む DNA を導入することで、内在性遺伝子の C 末端に mAID の配列をホモに挿入した細胞株の確立を目指した。ヒト大腸癌細胞株である HCT116 では、このような細胞を確立することができた。この細胞株では、内在性のそれぞれのキナーゼの分解がオーキシン依存的に誘導できた。しかし、この細胞は一次線毛を形成しにくい細胞であるため、一次線毛を形成しやすい RPE1 (正常2倍体) 細胞でも同様の手法を試みた。残念ながら、現時点では RPE1 細胞では成功に至っていない。現在、様々な工夫をこらして、このような細胞株を樹立するために努力している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

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 doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.016 (査読有)

Goto H., Inaba H., Inagaki M.: Mechanisms of ciliogenesis suppression in dividing cells. *Cell. Mol. life Sci.* 74: 881-890, 2017 doi: 10.1007/s00018-016-2369-9 (査読有)

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: 1323-1329, 2016 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.122 (査読有)

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: 409-423, 2016 doi: 10.1083/jcb.201507046 (査読有)

[学会発表](計 7件)

後藤英仁、鐘巻将人、稲垣昌樹: 外的 DNA 損傷非存在下における Chk1 の機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (横浜), 2016 年 11 月 30 日

Goto H., Kanemaki M., Kiyono T., and Inagaki M.: Rapid inducible degradation of Chk1 in a colorectal carcinoma cell line. 第 75 回日本癌学会総会, パシフィコ横浜 (横浜), 2016 年 10 月 8 日

Inaba H., Goto H., Kasahara K., Kumamoto K., Yonemura S., Inoko A., He D., Goshima N., Yamano S., Wanibuchi H., Kiyono T., Hirotsune S., and Inagaki M.: Ndel1 suppresses ciliogenesis in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora-A pathway. 第 75 回日本癌学会総会, パシフィコ横浜 (横浜), 2016 年 10 月 8 日

Makihara H., Tanaka H., Goto H., Inoko A., Enomoto A., and Inagaki M.: Aneuploidy and premature aging in Vimentin phospho-deficient mice. 第 75 回日本癌学会総会, パシフィコ横浜 (横浜), 2016 年 10 月 7 日

Goto H. and Inagaki M.: Defect of Mitotic Vimentin Phosphorylation Causes Microphthalmia and Cataract via

Aneuploidy and Senescence in Lens Epithelial Cells. XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER). 京王プラザホテル(東京), 2016年9月28日

牧原弘幸、稲葉弘哲、田中宏樹、榎本篤、友野靖子、後藤満雄、栗田賢一、後藤英仁、稲垣昌樹: デスミンの分裂期特異的リン酸化部位の同定と機能解析. 第68回日本細胞生物学会大会, 京都テレサ(京都), 2016年6月17日

稲葉弘哲、後藤英仁、笠原広介、猪子誠人、熊本香奈子、米村重信、何東偉、五島直樹、山野荘太郎、鰐淵英機、広常真治、清野透、稲垣昌樹: Ndel1は増殖細胞において一次線毛形成を抑制する. 第68回日本細胞生物学会大会, 京都テレサ(京都), 2016年6月16日

〔図書〕(計 1件)

Goto H., Tanaka H., Kasahara K., Inagaki M. Phospho-specific antibody probes of intermediate filament (IF) proteins. Intermediate Filament Proteins, eds. Omary M.B. and Liem R.K.H. *Methods in Enzymology*, Vol. 568, UK: Academic Press, 2016, pp85-111.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 英仁 (GOTO, Hidemasa)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・室長

研究者番号: 20393126