

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08269

研究課題名(和文) 一次繊毛の形成を制御するユビキチン・プロテアソームシステム

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of ubiquitin-proteasome system-mediated ciliogenesis

研究代表者

笠原 広介 (Kasahara, Kousuke)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90455535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、一次繊毛(primary cilia)と呼ばれる細胞内小器官の形成不全および機能異常が、種々の発達異常や疾患(繊毛病)の原因となることが明らかになり、形成メカニズムの解明が喫緊の課題となっている。研究代表者は、増殖因子受容体によって活性化された脱ユビキチン化酵素USP8によるトリコプレインのタンパク質安定化が、増殖細胞において一次線毛の形成抑制に働いていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、一次線毛の形成メカニズムの一端が明らかになり、且つ、一次線毛の形成動態を介して細胞増殖の制御が可能であることを示した。本研究成果により、一次線毛の異常に起因する種々の疾患の病態メカニズム解明や、一次線毛の形成動態を制御する分子群を標的とする新たな癌治療戦略の開発に繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ciliogenesis is generally inhibited in dividing cells, however, it has been unclear which signaling cascades regulate the phenomenon. Here, we report that EGFR kinase suppresses ciliogenesis by directly phosphorylating the deubiquitinase USP8 in RPE1 cells. The phosphorylations elevate the deubiquitinase activity, which then stabilizes the trichoplein-Aurora A pathway, an inhibitory mechanism of ciliogenesis. EGFR knockdown and serum starvation result in ciliogenesis through down-regulation of the USP8-trichoplein-Aurora A signal. Moreover, primary cilia abrogation, which is induced upon IFT20 or Cep164 depletion, ameliorates the cell cycle arrest of EGFR knockdown cells. The present data reveal that the EGFR-USP8-trichoplein-Aurora A axis is a critical signaling cascade that restricts ciliogenesis in dividing cells, and functions to facilitate cell proliferation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次線毛 細胞増殖 ユビキチン プロテアソーム 癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖停止や分化に伴い、中心体の一部は細胞膜とドッキングし“一次線毛”と呼ばれる毛状に突起した細胞内小器官へと変換する。このアンテナ様の構造物は、細胞外からの物理的・化学的シグナルを感知し、細胞内へと変換する重要な役割を担っている。さらに、一次線毛それ自体が増殖停止シグナルの発信基地として機能することを研究代表者の所属研究室は報告している (Inoko et al, *J Cell Biol.* 2012)。

我々は最近、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線毛の形成に必要不可欠であることを発見し、その分子機構の一端として、一次線毛の抑制因子であるトリコプレイン (Kasahara et al, *Nature Commun.* 2014) や Ndel1 (Inaba, Goto, Kasahara et al, *J. Cell Biol.* 2016) がユビキチン・プロテアソーム依存的に分解されることの重要性を明らかにしてきた。さらに前者の研究では、トリコプレインのユビキチン化酵素 (E3 リガーゼ) として CRL3<sup>KCTD17</sup> を同定し、詳細な分子機構を示した。一方で、新たな問題点として、CRL3<sup>KCTD17</sup> の酵素活性が一次線毛の形成前後で不変であることが分かり、脱ユビキチン化酵素からの制御を含めた統合的解析の必要性が提起された。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、脱ユビキチン化酵素の網羅的 siRNA スクリーニングにより、一次線毛の形成に抑制的に働く 6 つの脱ユビキチン化酵素 (USP8、USP38、USP43、USP52、USP54、UCHL3) を同定している。さらに、この中で USP8 がトリコプレインの脱ユビキチン化酵素として働くことを見出している (未発表データ)。本研究では、USP8 によるトリコプレインの脱ユビキチン化機構およびその生理的意義の解明をひとつめの目的とする。また、USP8 以外の 5 つの脱ユビキチン化酵素についても一次線毛の制御機構を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞: ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE1、ATCC CRL-4000) を 10% FBS 含有 DMED/F-12 (1:1 mixture) メディウムで培養した。一次線毛の形成誘導は、FBS 不含メディウム培養により行った。TetOn inducible expression system を用いて、Myc-USP8 の野生型 (WT) 及び不活性型 (CS) を薬剤誘導発現する RPE1 細胞株を樹立した。

(2) トランスフェクション: siRNA のトランスフェクションは、siRNA の最終濃度 10 nM で Lipofectamine RNA1MAX (Thermo-Fisher) を用いた。使用した siRNA 配列は発表論文 (Kasahara K et al, *Nat Commun.* 2018, 22: 758) に記載してある。プラスミドのトランスフェクションは、Lipofectamine 2000 (Thermo-Fisher) もしくは、FuGENE HD (Promega) を用いた。

(3) ユビキチン化解析: 細胞内におけるトリコプレインのユビキチン化レベルを解析するため (*in vivo* ユビキチン化アッセイ)、細胞に Myc-トリコプレイン及び HA-ユビキチンを遺伝子導入し、Myc 抗体で免疫沈降した Myc-トリコプレインのユビキチン化レベルを WB (HA 抗体) で解析した。USP8 がトリコプレインを直接脱ユビキチン化か検討するため、*in vivo* ユビキチン化アッセイでユビキチン化された Myc-トリコプレインに、大腸菌から精製した GST-USP8 を試験管内で反応させ、ユビキチン化レベル (WB: HA 抗体) の減少を解析した (*in vitro* ユビキチン化アッセイ)。

(4) リン酸化解析: 100 ng の GST 融合受容体型チロシンキナーゼ (EGFR, FGFR1, PDGFR, PDGFR; Carma Bioscience) と、1 µg の大腸菌から精製した USP8 を反応バッファー (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 µM ATP, 2 mM DTT) で反応させ (30、10 min) WB (チロシンリン酸化抗体、pTyr-1000, Cell Signaling Technology) でリン酸化を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) USP8 によるトリコプレインのタンパク質安定化と一次線毛制御

RPE1 細胞においてトリコプレインのタンパク質レベルの減少 (分解) 速度を検証した結果、USP8 をノックダウンした場合には分解が抑えられ一次線毛の形成が抑制されること、逆に、USP8 を過剰発現させた場合には、USP8 の酵素活性依存的にトリコプレインの分解が促進され、一次線毛の形成が促進することを見出した。以上より、USP8 はトリコプレインの安定化を介して、一次線毛の抑制に働く分子であることが明らかになった。

#### (2) USP8 によるトリコプレインの脱ユビキチン化

*In vivo* ユビキチン化アッセイにより細胞から回収したポリユビキチン化トリコプレインと、大腸菌より精製した GST-USP8 を試験管内で反応させた結果 (*in vivo* ユビキチン化アッセイ) USP8 の酵素活性依存的にトリコプレインが脱ユビキチン化されることが明らかになった。また、細胞に USP8 を過剰発現させた場合にも、酵素活性依存的な脱ユビキチン化が観察された。

#### (3) USP8 のチロシン 717/チロシン 810 リン酸化による酵素活性制御

大腸菌より精製した USP8 と、精製した受容体型チロシンキナーゼ（EGFR, FGFR1, PDGFR）を試験管内で反応させることで USP8 のチロシン 717/チロシン 810 がリン酸化され、脱ユビキチン化酵素の活性が亢進することを見出した。さらに、チロシン 717/チロシン 810 をフェニルアラニン置換した変異体（Y717/810F）では、酵素活性が亢進しないことも明らかになった。USP8 の Y717/810F 変異体を発現する細胞株において、内在性の USP8 をノックダウンする実験系において、Y717/810F 変異体はトリコプレインの安定化及び、一次線毛の抑制効果が著しく減衰することが判明した。

#### （４）上皮成長因子受容体 EGFR による一次線毛の制御

上記（３）の結果より、一次線毛形成における EGFR の役割について検討するため、RPE1 細胞の EGFR をノックダウンした結果、一次線毛の形成、USP8 の Y717/Y810 リン酸化の減少、トリコプレインのタンパク質レベルの減少が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishimura Y, Kasahara K, Shiromizu T, Watanabe M, Inagaki M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 1801138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.201801138.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka K, Goto H, Nishimura Y, Kasahara K, Mizoguchi A, Inagaki M.	4. 巻 109
2. 論文標題 Tetraploidy in cancer and its possible link to aging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2632-2640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasahara K, Aoki H, Kiyono T, Wang S, Kagiwada H, Yuge M, Tanaka T, Nishimura Y, Mizoguchi A, Goshima N, Inagaki M.	4. 巻 9
2. 論文標題 EGF receptor kinase suppresses ciliogenesis through activation of USP8 deubiquitinase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03117-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasahara K, Aoki H, Kiyono T, Wang S, Kagiwada H, Yuge M, Tanaka T, Nishimura Y, Mizoguchi A, Goshima N, Inagaki M	4. 巻 9
2. 論文標題 EGF receptor kinase suppresses ciliogenesis through activation of USP8 deubiquitinase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03117-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inaba H, Yamakawa D, Tomono Y, Enomoto A, Mii S, Kasahara K, Goto H, Inagaki M	4. 巻 498
2. 論文標題 Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 544-550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Andrieu G, Ledoux A, Branka S, Bocquet M, Gilhodes J, Walzer T, Kasahara K, Inagaki M, Sabbadini RA, Cuvillier O, Hatzoglou A	4. 巻 -
2. 論文標題 Sphingosine 1-phosphate signaling through its receptor S1P5 promotes chromosome segregation and mitotic progression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Signal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1126/scisignal.aah4007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笠原広介, 稲垣昌樹
2. 発表標題 一次線毛の形成動態によるがん細胞増殖制御機構の解明
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笠原広介, 青木啓将, 清野透, 山川大史, 稲垣昌樹
2. 発表標題 増殖因子による一次繊毛の形成抑制メカニズム
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 笠原広介、稲垣昌樹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 244
3. 書名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト4月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	稲垣 昌樹  (Inagaki Masaki)  (30183007)	三重大学・医学系研究科・教授   (14101)	
連携研究者	山川 大史  (Yamakawa Daishi)  (20631097)	三重大学・医学系研究科・助教   (14101)	