

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) 一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20370082

研究課題名(和文) 細胞間接着と細胞増殖の二律背反

研究課題名(英文) Antinomy of cell-cell adhesion and cell proliferation

研究代表者

稲垣 昌樹 (INAGAKI MASAKI)

愛知県がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・部長

研究者番号：30183007

研究成果の概要(和文)：中間径フィラメント蛋白質ケラチンと結合するトリコプレインおよびアルバトロスの機能について研究した。そして、ケラチンおよびアルバトロスが上皮細胞の極性化に重要であることを見出した。また、トリコプレインは、中心体にも局在し、一次繊毛の形成制御に関与していることを発見した。他方、損傷DNAを修復する機構に関与するチェックポイントキナーゼ1(Chk1)のリン酸化による新しい制御機構を見出した。

研究成果の概要(英文)：We studied the functions of Trichoplein and Albatross that bind to keratin intermediate filaments. We found that keratin and Albatross play an important role in the polarization of epithelial cells, and that Trichoplein is localized at centrosomes and is involved in the regulation of primary cilia formation. On the other hand, we found novel regulatory mechanisms of Chk1, which has important functions in the DNA damage checkpoint, via its phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格、中間径フィラメント、トリコプレイン、中心小体、細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、タイトジャンクション(Tight Junction)、アドヘレンスジャンクション(Adherence Junction)、デスモソーム(Desmosome)などからなる細胞間接着装置を介して互いに結合している。しかし、隣接している細胞が死ぬなど、細胞間接着装置が消失すると、細胞は極性を失い、増殖サイクルへと向かう。しかしながら、この過程における詳細な分子メカニズムはほとんど解明

されていないのが現状である。また、それぞれの細胞間接着装置には、細胞骨格分子が裏打ちしていることが知られている。これまで、アクチン細胞骨格およびそれがアンカーするアドヘレンスジャンクションに関する研究はこれまで精力的に行われてきた。しかし、中間径フィラメント(IF)およびそれがアンカーするデスモソームの研究は、上記に比べ、立ち後れているのが現状である。

## 2. 研究の目的

上皮細胞では、細胞間接着装置が互いを結合させているが、増殖サイクルへと向かう際には、細胞間接着装置は消失する。我々は、これまで、中間径フィラメント構成蛋白質のなかでも上皮細胞にのみ発現するケラチンに着目し、それに結合する蛋白質群を同定してきた。本研究では、ケラチン結合蛋白質であるトリコプレインおよびアルバトロスの解析を通じて、細胞間接着の解除から細胞増殖へと向う分子機構を明らかにすることを主目的とする。また、細胞周期チェックポイント機構の解除等、細胞が増殖していく環境への移行のメカニズムについても併せて検討する。これらの解析を通じて、細胞間接着と細胞増殖という組織構築にとっての二律背反の分子機構を細胞レベルで明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

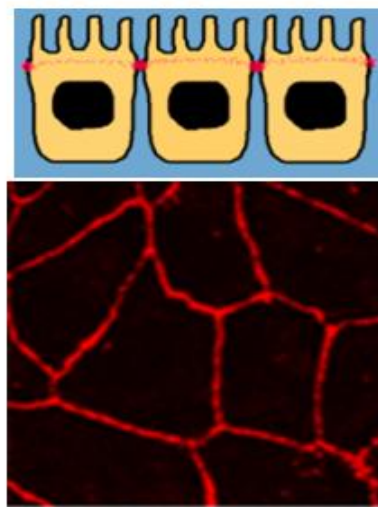
細胞間接着、細胞増殖（中心体）におけるトリコプレインおよびアルバトロスの役割を主に、RNA 干渉法や免疫細胞染色などによって解析する。その後、主に、トリコプレインおよびアルバトロスの細胞間接着装置および中心体における結合蛋白質、または、それぞれに特異的な翻訳後修飾を解析することで、トリコプレインおよびアルバトロスの局在および機能変化をもたらす分子メカニズムを明らかにしていく。また、CdkによるChk1のSer286・Ser301のリン酸化反応がChk1の核外移行およびDNA複製チェックポイントからの離脱に重要な役割を担っている可能性を中心に検索することによって、チェックポイント機構を解除し細胞が増殖していく環境へ移行するメカニズムについても併せて解析する。

## 4. 研究成果

### (1) ケラチン結合蛋白質アルバトロスの機能解析

我々は、以前にケラチン結合蛋白質として同定したトリコプレインがもつTPHDドメインと相同性を有する蛋白質をデータベースで解析し、それらの分子群のひとつとしてアルバトロスを同定した。そして、生化学的結合実験などを用いて、アルバトロスがケラチンと結合することを見出した。アルバトロスは、非極性化細胞ではケラチンと共局在するが、極性化した上皮細胞では、主にAJC (apical junctional complex) 近傍に存在した。アルバトロスの上皮細胞における機能を解析するため、その機能欠失（ノックダウン）実験をRNA干渉法を用いて行った。アルバトロス・ノックダウン細胞では、AJCの主要構成因子が細胞間接着部位から消失し、さらにケラチンの局在にも変化が認められた。またアル

バトロス・ノックダウン細胞では、側部ドメイン分子であるE-カドヘリンやデスマoglein 2の頂部への流入が認められた。Par3は頂部ドメインおよび細胞間接着装置形成を制御する重要な極性制御分子であるが、我々は、アルバトロスとPar3が複合体を形成していることを見出した。アルバトロスのノックダウン時にはPar3の頂部ドメインの局在には変化がないが、細胞間接着部位における局在が障害された。また、ケラチン欠失上皮細胞にケラチンを導入する実験の結果、ケラチンはこのアルバトロスを安定化し、そしてさらにAJC形成を促進することがわかった。これらの結果はケラチンおよびその結合蛋白質アルバトロスが上皮細胞の極性化に重要であることを示している。

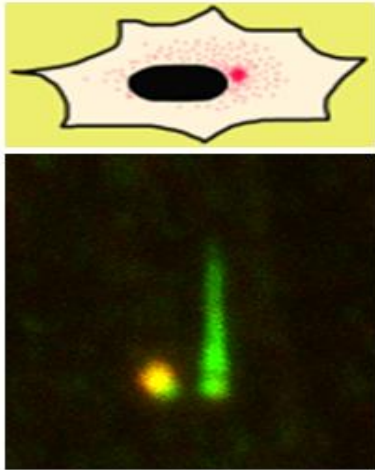


赤:アルバトロス

### (2) 中心体におけるトリコプレインの機能解析

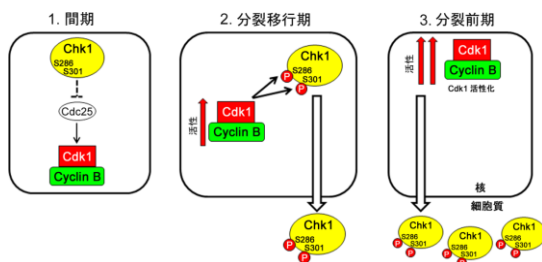
上皮細胞特異的に発現している中間径フィラメントであるケラチンフィラメントに結合する蛋白質として我々が同定したtrichoplein(トリコプレイン)について解析を行った。トリコプレインは、分化させた培養細胞および組織細胞（小腸絨毛部）ではケラチンフィラメント上および細胞間接着部位に局在していた。一方、増殖のさかんな培養上皮細胞および組織細胞（小腸陰窩）では、トリコプレインは中心小体に局在することを見出した。そしてトリコプレインをsiRNAiによりノックダウンすると、母中心小体のappendagesにおけるnineinの局在が低下することを見出した。そして、寒冷刺激による微小管のregrowth実験を行い、トリコプレインが微小管の母中心小体のappendagesへのアンカリングの安定化を担っていることを見出した。さらにこの制御が母中心小体に

局在する ninein, Odf2 との相互連関によって起こることを明らかにした。また驚くべきことにトリコプレインが中心小体において Aurora-A と結合すること、そしてトリコプレイン-Aurora-A 複合体が形成され、Aurora-A が活性化することで一次線毛 (primary cilia) 形成を抑制する機能を有していることを新たに発見した。これらの結果はトリコプレインが、細胞が分化した状態と増殖している状態とでは明らかに異なった細胞機能を果たしていることを示唆している。



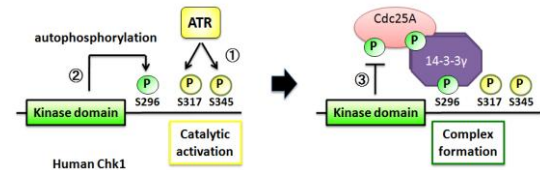
赤:トリコプレイン 黄:共局在  
緑:中心小体と一次線毛

(3) 分裂期進行におけるサイクリン依存性キナーゼ 1 (Cdk1) による Chk1 の制御機構  
Cdk1 が Chk1 のセリン 286 およびセリン 301 をリン酸化することで Chk1 を核から細胞質に移行させ、この Chk1 の核外排出により、細胞がより円滑に分裂期へ進行しやすくなっていることを見出した。これは、Cdk1 の活性化の際に、Chk1 との間にポジティブフィードバック機構が存在することを示唆している。これらの結果は、細胞周期進行のエンジンである Cdk1 とブレーキとなる Chk1 が緊密且つ相互的に制御されていることを示した初めての知見であり、細胞周期研究に大きな進展をもたらすことが期待される。



(4) DNA ダメージチェックポイントにおける Chk1 自己リン酸化の生理的意義の解明

Chk1 が DNA ダメージチェックポイントを誘導させるには、上流キナーゼである ATR によって Chk1 がセリン 317 とセリン 345 をリン酸化されて活性化するだけでなく、活性化した Chk1 がセリン 296 を自己リン酸化することが重要であることを発見した。Chk1 はセリン 296 リン酸化依存的に多機能性蛋白質 14-3-3 $\gamma$  と結合し、さらに 14-3-3 $\gamma$  が Chk1 の重要な基質である Cdc25A と結合することで、Cdc25A のリン酸化と蛋白質分解を引き起こし、DNA ダメージチェックポイントを誘導することを見出した。



(5) 核内における Chk1 の役割

これまで我々は、Chk1 は分裂期の進行に伴い、核内から細胞質へ移行することを明らかにしてきた。一方、他の研究グループにおいて、Chk1 は間期には中心体に局在し、その局在は分裂期に消失するという報告がある。そこで今回我々は、Chk1 が中心体に局在するという根拠の元になっているモノクローナル Chk1 抗体 (DCS-310) について網羅的な検討を行い、DCS-310 抗体による中心体の染色像は、Chk1 ではなく、Cdc151 タンパクに反応したものであることを見出した。さらに、さまざまな分子細胞生物学的手法を用いて、中心体ではなく核に局在する Chk1 が、細胞周期の制御に重要であることを明らかにした。

## 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 14 件)

- ① Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N. and Inagaki, M. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. J. Cell Sci. in press. (査読有)
- ② Ibi, M., Zou, P., Inoko, A., Shiromizu, T., Matsuyama, M., Hayashi, Y., Enomoto, M., Mori, D., Hirotsune, S., Kiyono, T., Tsukita, S., Goto, H. and Inagaki, M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and

- ninein. *J. Cell Sci.* 124: 857-864, 2011. (査読有)
- ③ Helfand, B. T., Mendez, M. G., Murthy, S. N., Shumaker, D. K., Grin, B., Mahammad, S., Aebi, U., Wedig, T., Wu, Y. I., Hahn, K. M., Inagaki, M., Herrmann, H. and Goldman, R. D. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol. Biol. Cell* 22: 1274-1289, 2011. (査読有)
- ④ Ichijima, Y., Yoshioka, K., Yoshioka, Y., Shinohe, K., Fujimori, H., Unno, J., Takagi, M., Goto, H., Inagaki, M., Mizutani, S. and Teraoka, H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* 5: e8821, 2010. (査読有)
- ⑤ Bargana-Mohan, P., Paranthan, R. R., Hamza, A., Dimova, N., Trucchi, B., Srinivasan, C., Elliott, G. I., Zhan, C. G., Lau, D. L., Zhu, H., Kasahara, K., Inagaki, M., Cambi, F. and Mohan, R. Withaferin A targets intermediate filaments glial fibrillary acidic protein and vimentin in a model of retinal gliosis. *J. Biol. Chem.* 285:7657-7669, 2010. (査読有)
- ⑥ Kawase, T., Matsuo, K., Suzuki, T., Hirose, K., Hosono, S., Watanabe, M., Inagaki, M., Iwata, H., Tanaka, H. and Tajima, K. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. *Cancer Sci.* 101: 1234-1240, 2010. (査読有)
- ⑦ Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. 14-3-3 $\gamma$  mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J.* 29: 2802-2812, 2010. (査読有)
- ⑧ Enomoto, M., Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T. and Inagaki, M. Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during the G2/M transition. *J. Biol. Chem.* 284: 34223-34230, 2009. (査読有)
- ⑨ Li, Z. F., Wu, X., Jiang, Y., Liu, J., Wu, C., Inagaki, M., Izawa, I., Mizisin, A. P., Engvall, E. and Shelton, G. D. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J. Neurol. Sci.* 264: 77-86, 2008. (査読有)
- ⑩ Toyo-oka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A. and Hirotsune, S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J. Cell Biol.* 180: 1133-1147, 2008. (査読有)
- ⑪ Izawa, I., Nishizawa, M., Hayashi, Y. and Inagaki, M. Palmitoylation of ERBIN is required for its plasma membrane localization. *Genes Cells* 13: 691-701, 2008. (査読有)
- ⑫ Lin, Y. M., Chen, Y. R., Lin, J. R., Wang, W. J., Inoko, A., Inagaki, M., Wu, Y. C. and Chen, R. H. eIF3k regulates apoptosis in epithelial cells by releasing caspase 3 from keratin-containing inclusions. *J. Cell Sci.* 121: 2382-2393, 2008. (査読有)
- ⑬ Sugimoto, M., Inoko, A., Shiromizu, T., Nakayama, M., Zou, P., Yonemura, S., Hayashi, Y., Izawa, I., Sasoh, M., Uji, Y., Kaibuchi, K., Kiyono, T. and Inagaki, M. The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 183: 19-28, 2008. (査読有)
- ⑭ Ikegami, Y., Goto, H., Kiyono, T., Enomoto, M., Kasahara, K., Tomono, Y., Tozawa, K., Morita, A., Kohri, K. and Inagaki, M. Chk1 phosphorylation at Ser286 and Ser301 occurs with both stalled DNA replication and damage checkpoint stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 1227-1231, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 稲垣昌樹: 癌治療に向けての新しい標的分子の探索. 第 32 回泌尿器科分子・細胞研究会, 2011 年 3 月 11 日, (津), [シンポジウム]
- ② 稲垣昌樹: 多彩なリン酸化によってチェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) は機能修飾される. 日本分子生物学会第 10 回春季シンポジウム, 2010 年 6 月 8 日, (松島), [シンポジウム]
- ③ 稲垣昌樹, 笠原広介, 李萍, 後藤英仁: 抗リン酸化ペプチド抗体とチェックポイントシグナル. H22 生化学会中部支部例会, 2010 年 5 月 29 日, (名古屋), [シンポジウム]
- ④ 笠原広介, 後藤英仁, 稲垣昌樹: 多彩

- なリン酸化によってチェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) は機能修飾される。第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 2 日, (横浜), [シンポジウム]
- ⑤ Inagaki, M.: Anti-phospho peptide antibodies - a tool to address the regulatory function of intermediate filaments and cell cycle progression in astrocytes. the 6th European Conference on Intermediate Filaments (Nanofilaments) in Health and Disease, 2009 年 6 月 20 日, (Sweden), [シンポジウム]
- ⑥ Inagaki, M.: Signaling and cell architecture. Receptor Program Ad Hoc Seminar, 2009 年 6 月 15 日, (Turku), [シンポジウム]
- ⑦ Inagaki, M.: Cell cycle and architecture. Regulation and Manipulation of Information Flow within Dynamic Protein and Lipid Environments (SFB 645 Workshop Cell Architecture and Cell Signalling), 2009 年 6 月 12 日, (Bonn), [シンポジウム]
- ⑧ Inoko, A., Inagaki, M.: Trichoplein, a keratin-binding protein, maker of microtubule-organization and breaker of cilia assembly. Cell Cycle and Cell Architecture, 2009 年 2 月 27 日, (名古屋), [シンポジウム]
- ⑨ Inagaki, M.: Trichoplein regulates microtubule anchoring and suppresses a cilia assembly program at the mother centriole. GCOE 第一回国際シンポジウム, 2009 年 1 月 23 日, (名古屋), [シンポジウム]
- ⑩ 稲垣昌樹: GCOE と愛知県がんセンター. GCOE 国内シンポジウム, 2008 年 11 月 14 日, (名古屋), [シンポジウム]
- ⑪ Goto, H., Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinases (Cdk). 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日, (名古屋), [シンポジウム]
- ⑫ Inoko, A., Inagaki, M.: Novel TPHPD proteins: keratin-binding proteins act as the regulator for the cell-cell adhesion. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日, (名古屋), [シンポジウム]

[図書] (計 7 件)

- ① 衣斐美歩、稲垣昌樹: 「中間径フィラメント」生化学事典 朝倉書店 in press
- ② 佐方功幸、稲垣昌樹、岸本健雄 (編) 編 細胞周期フロンティア 総 268 ページ,

- (2010) 共立出版
- ③ 後藤英仁、稲垣昌樹: 「G2/M 移行期における CDK 1 の活性化およびチェックポイント解除機構」細胞周期フロンティア 52-57 (2010) 共立出版
- ④ 笠原広介、稲垣昌樹: 「抗リン酸化ペプチド抗体と細胞周期研究」細胞周期フロンティア 5-10 (2010) 共立出版
- ⑤ 稲垣昌樹、佐方功幸: 「細胞周期研究の現状と展望」細胞周期フロンティア 248-250 (2010) 共立出版
- ⑥ 大室 (松山) 有紀、稲垣昌樹: リン酸化抗体と細胞周期 細胞工学 Vol. 28 No. 1 50-51 (2009) 秀潤社
- ⑦ 後藤英仁、稲垣昌樹: Close UP 実験法 特定部位の翻訳後修飾を特異的に認識する. 抗体作製法-抗リン酸化 (ペプチド) 抗体作製法, 実験医学, 26 巻, 18 号, 2965-2972, (2008) 羊土社

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲垣 昌樹 (INAGAKI MASAKI)  
愛知県がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・部長  
研究者番号: 30183007

### (2) 研究分担者

猪子 誠人 (INOKO AKIHITO)  
愛知県がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・主任研究員  
研究者番号: 30393127

笠原 広介 (KASAHARA KOUSUKE)  
愛知県がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・研究員  
研究者番号: 90455535

井澤 一郎 (IZAWA ICHIRO)  
愛知県がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・室長  
研究者番号: 20311441  
(H20 のみ)