

機関番号：83901

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770225

研究課題名（和文） 上皮細胞極性を制御する分子Albatrossの結合蛋白質と新規TPHD分子の検索

研究課題名（英文） Research on the Albatross protein, a regulator of epithelial cell polarity, with its binding partners and related TPHD proteins

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ケラチンは分化上皮細胞に特異的に発現する細胞骨格蛋白質であるにも関わらず、分化制御への関与は不明な点が多かった。報告者らが同定したケラチン結合蛋白質 Albatross および trichoplein は、そのアミノ酸配列から TPHD 分子群（トリコヒアリン・プレクチン類似ドメイン分子群）と名付けられたが、本研究において細胞現象、結合分子の面から検討を行ったところ、これらが分化・増殖に関与する bi-player 分子群である根拠を増すことができた。今後も多角的な検証を追加することで、ケラチンおよびケラチン結合蛋白質を介した新規上皮分化・増殖転換メカニズムの解明に期待ができる。

研究成果の概要（英文）：Keratins are the components specifically expressed in differentiated epithelial cells. Nevertheless, their contribution to the regulation of the differentiation was still unknown. We identified keratin filament-binding proteins, Albatross and trichoplein, as TPHD (trichohyalin and plectin homology domain) proteins, according to their unique amino acid sequences. In this study, we focused on their relation to cellular phenomenon and the molecular mechanistic insight with the binding partners. The findings raised the possibility that TPHD proteins are “bi-player proteins” which coordinate differentiation and proliferation. By further examinations from other aspects, this study may pave the way for understanding the mechanism of the transition between epithelial differentiation and proliferative state, through keratins and keratin-binding proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

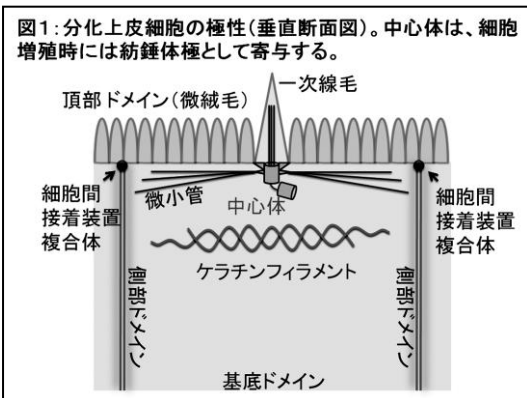
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：上皮分化、ケラチン、中心体、細胞増殖、微小管

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮分化におけるケラチンの役割

上皮細胞の分化の特徴として、細胞内成分は極性を持って局在する(図1)。ケラチン(図1)は分化上皮細胞に特異的に発現する細胞骨格(中間径フィラメント)蛋白質であり、その主な機能としては細胞に機械的強度を与えることが知られていた(Fuchs、Clevelandら、Science、1998; Coulombe、Wongら、Nat. Cell Biol.、2004)。近年にいたって、ケラチンの新たな機能がいくつかのグループから報告されるようになった。すなわち、ケラチンは蛋白質の生合成を促したり、上皮細胞増殖を促進したりもする(Kimら、Nature、2006; Vijayarajら、J. Cell Biol.、2009; DePiantoら、Nature Genetics、2010)。しかし、上皮分化におけるケラチンの役割は依然不明な点が多かった。



(2) 報告者らによるTPHD分子群の同定

①ケラチン結合蛋白質の解析

報告者らはケラチンを bait にした酵母ツーハイブリッド法により新規ケラチン結合蛋白質を複数同定・解析するアプローチを行ってきた。その結果、新規ケラチン結合蛋白質 Albatross および Trichoplein を同定し、これらの分子構造上共通する特徴あるドメインをもとに TPHD 分子群として解析を進めた(西澤、井澤、猪子ら、J. Cell Sci.、2005; 杉本、猪子ら、J. Cell Biol.、2008)。これまでの解析によると TPHD 分子とは Trichohyalin と Plectin (どちらも既知のケラチン結合蛋白質である) に似たアミノ酸配列 Trichohyalin and Plectin Homology Domain (TPHD) を持ち、同部位でケラチンと結合する。このうち、Albatross が上皮細胞極性を制御することを以下のように見出した(杉本、猪子ら、J. Cell Biol.、2008)。

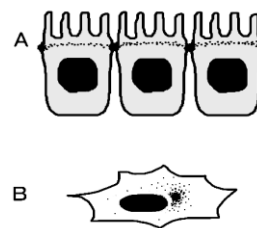
②Albatross は上皮細胞極性を制御し、ケラチンはそれを促進していた

Albatross は分化上皮の「細胞間接着装置複合体」(図1)に局在する。この装置の機能は上皮の機械的強度、そして上皮全体としてのバリア機能である(月田ら、Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001)。この複合体全体を形成・維持する制御分子の知見は極めて限られていたが、Albatross はまさにこの複合体の統合的形成及び生理機能を制御していた。詳細には、Albatross は①極性制御分子 Par3 と複合体を作り、②細胞間接着装置複合体の形成を制御し、③また側部ドメイン蛋白質の極性を制御していた。④しかし、頂部ドメイン蛋白質の極性には関与していなかった。すなわち、Albatross 機能は上皮細胞極性の限局的制御であった。加えて、ケラチンはこの Albatross 分子を安定化することで促進的に機能することを明らかにした。

③TPHD 分子群の特徴

一方これら TPHD 分子群の共通点として、分化上皮では細胞間接着部位に(図2A)、そして細胞増殖中は主に中心体に(図2B)局在していた。このことは、それぞれの部位に特異的な機能すなわち細胞極性と細胞増殖の両方に(図1)関わることを示唆しており、分化増殖制御転換の解明の鍵を握る新規 bi-player 分子群としての可能性を見出し、着目するに至った。

図2: Albatross, Trichoplein (TPHD分子群)の局在変化と上皮細胞機能との関わり。これらの新規ケラチン結合蛋白質群は、分化上皮(A)では細胞間接着部位に、そして細胞増殖中(B)は主に中心体に局在し、それぞれの部位特異的な機能すなわち細胞極性と細胞増殖に関わる事が明らかになりつつある。



2. 研究の目的

本研究の大きな目的は、TPHD 分子群による細胞間接着部位および中心体における上皮細胞分化・増殖制御の分子基盤を明らかにしていくことである。そのためにまず Albatross をはじめとした TPHD 分子群について、その結合蛋白質を多角的に検索し、可能な限り表現型の細胞生物学的解釈を行った。

3. 研究の方法

(1) 分子間結合実験

スクリーニングも含めたイーストハイブリッド法、免疫沈降法、リコンビナント精製蛋白質による *in vitro* 結合実験を適宜行った。

(2) 中心体局在の解析

それぞれに特異的な抗体を作成し、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行いその局在を高解像度顕微鏡（デルタビジョン）および共焦点レーザー顕微鏡により確認した。また、分画を調整しそのイムノプロットを行うことで生化学的にも局在を検討した。

(3) 中心体機能の解析

siRNA による機能欠失、すなわちノックダウンを HeLa あるいは RPE1 細胞に対して行い、その発現を減弱させた。その状態において免疫染色により解析必要な分子の検討をした。trichoplein 機能欠失による一次線毛形成については主に RPE1 細胞で検討した。表現型の確認のためには適宜遺伝子を再導入しレスキューを試みた。

(4) オーロラ A キナーゼアッセイ

HeLa 細胞を用い、trichoplein とオーロラ A の共発現によるオーロラ A リン酸化 (pT288) の変化を検討した。また *in vitro* のキナーゼ活性変化は trichoplein とオーロラ-A のリコンビナント精製蛋白質を混合し、ヒストン H3 を基質にすることで検討した。

4. 研究成果

(1) Albatross

①Albatross の細胞間での分子基盤

引き続き Albatross の上皮細胞機能制御における分子機序の詳細を明らかにするために、その結合蛋白質の同定を多角的に行ってきた。現在のところ、イーストハイブリッド法を用いた Albatross 結合蛋白質の検索では、細胞間接着を制御する低分子量 G 蛋白質に結合する蛋白質を含む新規上皮細胞間接着制御機構に関わる候補を複数見出した。今後も複数の方法で Albatross 結合蛋白質を検索し、最終的には細胞生物学的解析を行う予定である。

②Albatross の中心体局在と機能解析

増殖状態の HeLa 細胞で免疫染色を行ったところ、Albatross の局在は中心体に強く認められた。詳細な画像解析からは、Pericentriolar material (PCM) にある可能性を認めた。PCM には γ -tubulin ring complex が存在し、その機能としては微小管重合核となることが知られている。機能的解析からも、Albatross との中心体機能の相関が示唆された。このことは、中心体 Albatross が増殖制御に関わる可能性を示しており、今後確証を得るための多角的検討を計画している。

(2) trichoplein

①trichoplein の中心体での微小管係留機能

trichoplein の細胞内局在については、極性化すなわち分化した上皮細胞ではケラチンフィラメント上と細胞間接着部位にあるが、増殖中の細胞では中心体、詳細には母中心小体にもあることを見出した。母中心小体の機能は、その付属器への微小管の係留と増殖休止期における一次線毛形成が知られている。そこで、まず微小管係留との関連について検討した。RNA 干渉法により trichoplein を HeLa 細胞でノックダウンし、免疫染色と微小管再生実験を行ったところ、母中心小体付属器へのナイニンの局在化障害とそれによる微小管係留の障害が確認された。trichoplein とナイニンの結合は、イーストハイブリッド法、免疫沈降法および *in vitro* 結合実験により示された。また、この trichoplein の局在化は Odf2 に依存することと、trichoplein、ナイニン、Odf2 は複合体を形成することを同様に確認した。最終的に、trichoplein は母中心小体遠位端で微小管細胞骨格の係留を行っており、その分子基盤はナイニン、Odf2 との結合を介していることを論文報告し、受理された (衣斐、鄒、猪子ら, J. Cell Sci., 2011)。微小管係留は、細胞周期間期の細胞内に広がる微小管ネットワークと中心体の間に方向性すなわち極性を付加することが知られており、分化増殖制御の点からも今後の解析に期待を持っている。

②trichoplein の中心体での一次線毛形成抑制機能

一次線毛形成との関連については以下のような結果を得た。血清飢餓による増殖停止で一次線毛が形成されると RPE1 細胞では trichoplein の母中心小体での局在が減弱した。同状態で trichoplein を強制発現すると、

一次線毛形成が抑えられた。そこで増殖状態で trichoplein ノックダウンを行ったところ、一次線毛形成が見られた。同時に細胞周期の停止を認めた。この時オーロラ A キナーゼの活性化の指標である T288 のリン酸化は免疫染色およびイムノブロットで減弱した。この一次線毛形成はオーロラ A ノックダウンでも見られた。さらに、trichoplein とオーロラ A キナーゼの直接結合を in vitro で確認し、in vitro キナーゼアッセイでは trichoplein がオーロラ A キナーゼを直接活性化することが明らかになった。

これらの分子内解析としては、オーロラ A キナーゼ活性化に必要なドメインを絞り込んだ。

このように、trichoplein の中心体機能の特異性が、一次線毛形成抑制を含めた分化・増殖制御との関わりにおいて示せつつある。オーロラ A キナーゼの機能は活性化因子に依存して多様で、細胞分裂に伴う紡錘体形成のための中心体成熟に加え、非対称分裂や一次線毛形成抑制等、様々な分化・増殖制御との関連の報告が増えつつあるが、trichoplein オーロラ A 活性化経路による一次線毛形成抑制の特異性を示せることの意味は大きい。特に一次線毛は増殖シグナルが入るアンテナとしても機能しており、細胞周期制御との関連性も含め今後の多角的検討に期待が持てる。

(3) まとめ

上皮細胞において細胞間接着は細胞極性すなわち分化の特徴のひとつであり、一方で中心体は細胞増殖、特に紡錘体形成に必要な場である。また、細胞周期の上では分化状態は休止期にあたるため、増殖とは相反する。この2つの状態の統合制御を新規ケラチン結合蛋白質の併せ持つ分子メカニズムとして理解し、さらに上皮特異的にケラチンが発現する意味を検討していくことは、上皮の分化増殖制御研究に新しい視点を提示し得る。

現時点での解析結果を統合すると、分化上皮細胞の細胞間接着部位に Albatross と trichoplein は局在し、そのうち Albatross は極性化分子 Par3 と複合体を形成し、細胞極性を制御している。また、ケラチンはこの機能に対し促進的に働いている。中心体局在での分化増殖制御としては、Albatross は微小管重合核制御、trichoplein は微小管係留そして一次線毛形成抑制とそれに関連した細胞周期制御が明らかになりつつある。これらの結果は、TPHD 分子群が上皮分化と増殖の bi-player 分子群であることを強く支持するものである。

今後、これらの未解決な分子機構を結合分子の検索等も駆使して補完し、その分子メカニズムの相違点を明らかにし、統合していくこ

とで、bi-player 分子群およびケラチンによる上皮細胞の新規分化増殖制御機構の全容解明につなげたいと考えている。

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1件)

- ① Ibi M *, Zou P *, Inoko A *, Shiromizu T, Matsuyama M, Hayashi Y, Enomoto M, Mori D, Hirotsune S, Kiyono T, Tsukita S, Goto H, Inagaki M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein. *J Cell Sci.*, 124: 857-864. 2011 (*三名第一著者、査読有)

[学会発表] (計 5件)

- ① 猪子誠人、ケラチン結合蛋白質であるトリコプレインは一次線毛形成を抑制する、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日、大阪国際会議場(大阪)
- ② 猪子誠人、The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells、The 6th European Conference on Intermediate Filaments (Nanofilaments) in Health and Disease、2009年6月18-20日、Säröhus (Sweden)
- ③ 猪子誠人、The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells、Receptor Program Ad Hoc Seminar、2009年6月15日、Åbo Akademi (Finland)
- ④ 猪子誠人、The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells、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、University of Bonn (Germany)
- ⑤ 猪子誠人、ケラチン結合蛋白質アルバトロスは上皮細胞極性を制御する、第61回日本細胞生物学会大会、2009年6月2日、名古屋国際会議場(愛知県)

[その他]

ホームページ等

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/
400/420/421/421-08.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-08.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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