

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23247035

研究課題名(和文) 増殖と分化を連係する中間径フィラメントの新しい機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of new functions of intermediate filaments linking a relationship between proliferation and differentiation

研究代表者

稲垣 昌樹 (INAGAKI, Masaki)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・部長

研究者番号：30183007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円、(間接経費) 9,690,000円

研究成果の概要(和文)：中間径フィラメントが、増殖・分化過程で担っている役割を明らかにするために、ケラチン結合蛋白質トリコプレインとその類縁蛋白質群の機能解析を行った。そして、トリコプレイン-オーロラA経路は、一次シリア形成の抑制を介して、円滑な細胞周期(G1期)進行に寄与していることを発見した。また、ビメンチンリン酸化不全マウスでは、レンズ上皮細胞の多核化および染色体異数性(aneuploidy)を引き起こし、老化の表現型である白内障をきたすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To uncover roles of intermediate filaments in proliferation and differentiation, we studied the functions of trichoplein, a keratin-binding protein, and trichoplein-related proteins. We found that trichoplein-Aurora-A pathway is required for G1 progression through a key role in the continuous suppression of primary cilia assembly. On the other hand, we revealed that knock-in mice expressing phosphodeficient vimentin variants developed binucleation and aneuploidy in lens epithelial cells, which promoted lens cataract, an aging phenotype.

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：中間径フィラメント 増殖 分化 ケラチン 細胞骨格 中心体

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、中間径フィラメントの構築制御機構およびその細胞生物学的機能について、精力的に研究をおこなってきた。まず申請者らは、*in vitro*において、中間径フィラメント構成蛋白質がリン酸化されることによって、中間径フィラメントが脱重合することを世界ではじめて明らかにした (Inagaki, M., *et al.*, *Nature*, 1987)。そして、このようなリン酸化反応による中間径フィラメント構築の制御機構が細胞内でも引き起こされているかについて解析するため、目的タンパク質のリン酸化部位およびその前後5アミノ酸配列を含むリン酸化ペプチド抗原を用いて、抗リン酸化抗体の作成法を世界に先駆けて確立した。この抗リン酸化抗体を免疫細胞染色に用いることによって、細胞内における目的部位のリン酸化反応を個々の細胞レベルで時間的かつ空間的に解析することが可能になり、リン酸化反応を介するあらゆる細胞現象を解析する上で必須の道具になっている。(Izawa, I. & Inagaki, M., *Cancer Sci.*, 2006; Goto, H. & Inagaki, M., *Nature Protocols*, 2007)。我々は、これらリン酸化抗体を用いて、細胞内シグナル伝達または細胞周期進行の際に、種々のプロテインキナーゼによって中間径フィラメント構成蛋白質がリン酸化され、そのリン酸化反応によって中間径フィラメントの構築変化が引き起こされていることを種々の研究結果より証明した (Yasui, Y., *et al.*, *J. Cell Biol.*, 1998; Goto, H., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1998; Kawajiri, A., *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2003; Yamaguchi, T., *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2005)。また、我々は、中間径フィラメント以外にも、抗リン酸化抗体を最大限利用することで種々の細胞現象における蛋白質リン酸化反応の重要性を明らかにしてきた (Goto, H., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1999; Minoshima, Y., *et al.*, *Dev. Cell*, 2003; Yasui, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004; Goto, H., *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2006; Enomoto, M., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2009; Kasahara, K., *et al.*, *EMBO J.*, 2010)。

最近さらに我々は、ケラチン8/18に結合する蛋白質としてトリコプレインおよびアルバトロスを同定した。トリコプレインおよびアルバトロスは、Trichohyalin/Plectin Homology Domain (TPHD) と我々が命名した新規のドメインをもつ (Nishizawa, M., *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2005)。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みられるが、増殖のさかんな培養上皮細胞および組織細胞 (小腸陰窩) では中心小体に局在することを見出した (Ibi, M., *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2011)。一方、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、重要な極性制御分子であるPar3と複合体を形成し、上皮細胞の極性化に重要な役割を果たしてい

る (Sugimoto, M., *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2008)。これらのことから、TPHDをもつトリコプレインやアルバトロスが、細胞増殖と分化でのbi-playerとして機能している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

中間径フィラメント蛋白質に属するケラチンおよびビメンチンは、上皮 - 間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition; EMT) のマーカーとして、そしてネスチンは幹細胞マーカーとして広く用いられている。しかし、中間径フィラメントが、幹細胞から種々の細胞・組織へ変換していく複雑な過程で、どのようにして増殖と分化という現象を主体的に制御しているのかは現在のところ不明である。本研究課題では、我々が発見したケラチン結合蛋白質トリコプレインとその類縁蛋白質群の機能解析を通して、中間径フィラメントが、増殖・分化過程で担っている役割を包括的に明らかにしていく。具体的には以下の3点について検討する。

(1) ケラチン結合蛋白質トリコプレインおよびアルバトロスの機能解析：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機能を、これらに結合する蛋白質を同定し、詳細に解明する。

(2) トリコプレイン類縁蛋白質の網羅的解析：トリコプレインおよびアルバトロスは、Trichohyalin/Plectin Homology Domain (TPHD) と我々が命名した新規のドメインをもつが、その機能は不明である。ホモロジー検索で同定したTPHDを持つ蛋白質群について、それらの機能を網羅的に解析し、これらの蛋白質群が増殖・分化の統合的制御に関与する共通の機能をもつのかを探索する。

(3) 中間径フィラメントのリン酸化の *in vivo* における生理学的意義の解明：前述のように我々は、リン酸化されることによって中間径フィラメントが脱重合することを世界ではじめて明らかにし、その後、細胞レベルでの解析を行ってきた。本研究課題では、リン酸化されない変異ビメンチンをロックインした変異マウスを作製し、中間径フィラメントのリン酸化が担っている役割を個体レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ケラチン結合蛋白質トリコプレインおよびアルバトロスの機能解析：最近我々は、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に関与し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ている (Ibi, M., *et al.*, *J. Cell Sci.*, 2011)。そこで、トリコプレインが、中心体・一次シリアの制御にどのように関与しているのかを、種々の細胞生物学的手法により解明する。また、トリコプレイン結合蛋白質の同定も試みる。そ

の方法としては、MBP タグなどをつけたトリコプレイン蛋白質を作製し、産総研の五島博士らが開発した蛋白質アレイを用いて、トリコプレイン結合蛋白質を同定する（五島博士との共同研究）。得られた結合候補蛋白質の中で特に、中心体、細胞間接着、細胞極性機能などに関与する分子に着目して、トリコプレインとの相互作用を解析する。これにより、トリコプレインが細胞増殖と分化を連係する分子メカニズムを明らかにする。

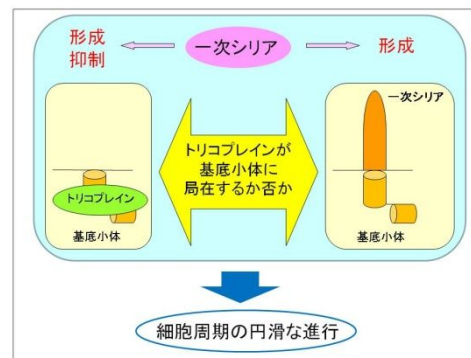
(2) トリコプレイン類縁蛋白質の網羅的解析：トリコプレインおよびアルバトロスは、Trichohyalin/Plectin Homology Domain (TPHD) と我々が命名した新規のドメインをもつことから、この新規の蛋白質ドメインの機能が細胞の増殖と分化の統合的制御に関与しているのではないかと推測している。我々は、産総研の五島博士との共同研究で、TPHD 様の構造を有する 97 個の蛋白質群を同定している。本研究課題では、まず、これらの TPHD 蛋白質群を培養細胞で強制発現して、それらの局在を確認する。そして、これらの中で、中心体および細胞間接着部位や細胞骨格などにも局在する分子に注目して観察する。次に、これら TPHD 蛋白質群の siRNAi によるノックダウン実験や変異体の強制発現を行って詳細に解析する。

(3) 中間径フィラメントのリン酸化の *in vivo* における生理学的意義の解明：これまでに我々は、ビメンチンフィラメントの重合・脱重合がリン酸化修飾によって制御されること、試験管レベルにおいてビメンチンリン酸化部位のセリンをアラニンに置換した細胞において、細胞質分裂をひきおこすことを明らかにしてきた。今回、ビメンチンのヘッド・ドメインに存在するこのリン酸化部位のセリンをアラニンに置換したビメンチンを発現するノックイン・マウスを作製して、その性状解析を行う。

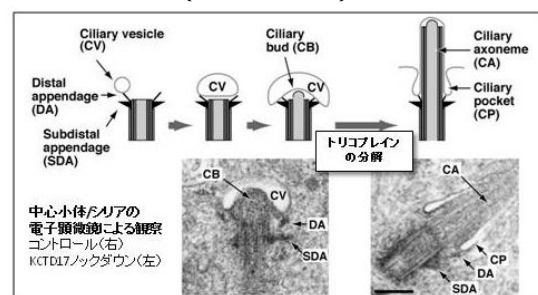
4. 研究成果

(1) ケラチン結合蛋白質トリコプレインおよびアルバトロスの機能解析：トリコプレイン蛋白質が分化・増殖転換のカギとなる可能性と、それが一次シリア形成制御を介した新規メカニズムによることを示す結果を得た (Inoko, A., et al., *J. Cell Biol.*, 2012)。我々が増殖状態の RPE1 細胞でトリコプレイン機能欠失 (ノックダウン) を行ったところ、一次シリアが形成された。つまり、トリコプレインは増殖期に一次シリア形成が生じないようにしている。このトリコプレインの機能には中心体局在化と分裂期キナーゼであるオーロラ A を G1 期に活性化することの両方が必要なことを *in vitro* の生化学的実験および培養細胞を用いた実験で明らかにした。さらに、トリコプレインノックダウンでは細胞周期の休止を認めしたが、一次シリアを除去した系ではノックダウンでも細胞周期が休止していなかった。以上のことから、この細胞で

トリコプレインは一次シリア形成を抑制しており、そのことが円滑な細胞周期 (G1 期) 進行に大きく寄与していると考えられる。



一次シリア形成が誘発される際に、トリコプレインがポリユビキチン化依存的に分解され、中心小体より消失することを見出した。また、そのユビキチン化部位として Lys-50 および Lys-57 を同定した。ユビキチン化されないトリコプレイン変異体 (K50/57R) を発現する細胞や、プロテアソーム阻害剤を処理した細胞では、一次シリアが形成されないことから、ユビキチン・プロテアソーム系によるトリコプレインの分解が一次シリア形成に必要な不可欠であることを証明した。さらに、トリコプレインのユビキチン化酵素を網羅的スクリーニングにより探索した結果、KCTD17-RING E3 リガーゼ複合体を同定した。ヒト正常細胞において KCTD17 をノックダウンすると、トリコプレインのポリユビキチン化依存的タンパク質分解が抑制され、一次シリアの形成も顕著に阻害された。電子顕微鏡による観察の結果、KCTD17 によるトリコプレインの分解は、一次シリアの軸系 (axoneme) が伸長する段階に必要なことも分かった (論文投稿中)。

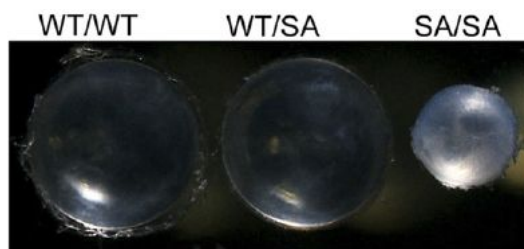


(2) トリコプレイン類縁蛋白質の網羅的解析：トリコプレインのもつ TPHD ドメインを有する 81 分子について hTERT-RPE-1 細胞における siRNA スクリーニングを行った。その結果、4 分子が一次シリア形成を抑制することが示唆された。それらの 1 つである Ndel1 は中心体蛋白質で、神経発生や細胞分裂など様々な現象への関与が知られおり、Ndel1 のノックアウトマウスは初期胚致死であることが報告されている。増殖中の RPE-1 細胞で Ndel1 を siRNA によりノックダウンしたところ、48 時間後に約 40% の細胞が一次シリアを

形成し、G0 期での細胞周期停止がみられた。IFT20 とのダブルノックダウン実験により、この細胞増殖の停止は一次シリア依存的であることが示唆された。また、血清飢餓により一次シリアを形成し細胞増殖が停止した細胞に血清を加えたところ、Ndel1 をノックダウンした細胞では細胞周期への再進入が見られなかった。Ndel1 は中心体の sub-distal appendage に局在し、その局在は Odf2 依存的であった。また、血清飢餓による一次シリア形成時には局在の変化は見られなかった。広常ら（阪市大）との共同研究で、Ndel1 の hypomorphic mutant マウスの腎臓では、生後 0 日齢において尿管の一次シリアが野生型と比べ長く、若干の細胞増殖の低下がみられることが明らかとなった。以上より、Ndel1 の欠損は一次シリアの形成を引き起こし、細胞増殖を阻害することが示唆された（論文投稿準備中）。

(3) 中間径フィラメントのリン酸化の *in vivo* における生理学的意義の解明：本研究課題において、我々は、ビメンチンリン酸化部位のセリンをアラニンに置換したビメンチンリン酸化不全マウスを作製して、その機能解析を行った。

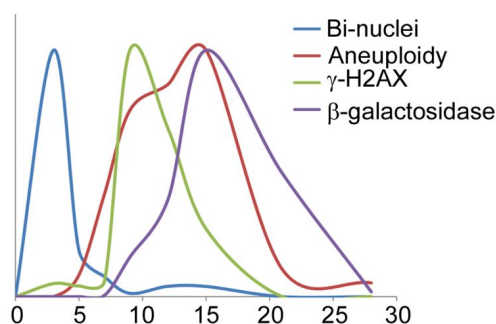
水晶体におけるビメンチンリン酸化の機能解析：ビメンチンは間葉系の細胞に発現しているが、目のレンズも非常に豊富に発現している組織であることが知られている。我々が作出したビメンチンリン酸化部位のリン酸化不全変異マウス（VIM^{SA/SA}）の全身組織を組織形態学的に検討したところ、生後数か月頃より小眼症、生後 6 か月頃より白内障をひきおこすことを見出した。一方、野生型（VIM^{WT/WT}）やヘテロ（VIM^{WT/SA}）マウスではこのような表現型を認めなかった。



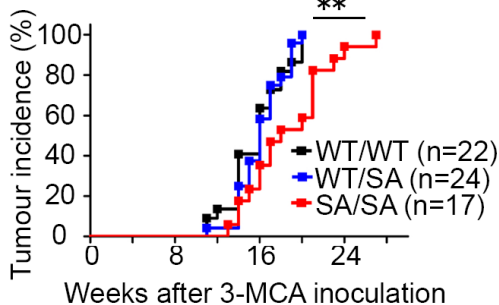
マウスの目は水晶体が大部分の容積を占めるため、水晶体の形成過程を検討した。レンズの形態形成に關与するレンズ上皮細胞を検討したところ、レンズ前方部では 2 核細胞の出現を認め、レンズ赤道部では染色体異数性（aneuploidy）を示す核の出現を見出した。さらに、レンズ線維細胞においても線維配向の異常、染色体の異数性を認めた。電子顕微鏡を用いて微細構造を検討したところ、細胞は不均一な大きさを示し、12 か月齢では細胞境界が不鮮明で一部は変性し aggregation を呈した部分も認められた。これらの結果は、細胞質分裂障害が原因で引き起こされた染色体異数性が細胞老化のみならず、個体の老化にも關与していることを示している

(Matsuyama, M., et al., *J. Biol. Chem.*, 2013)

損傷治癒におけるビメンチンリン酸化の機能解析：老化の特徴として 1 つとして、損傷治癒遅延が表現型としてあげられる。ビメンチン変異マウスにおいて皮膚に損傷を与えて検討した結果、損傷治癒の遅延を認めた。この治癒遅延の過程で、損傷部位の皮膚線維芽細胞を観察したところ、損傷後ビメンチンは一過性に発現が亢進していることを認めた。それと同時に、変異マウス特異的に損傷後 3 日目の組織では細胞質分裂障害の結果として娘細胞間の架橋構造、2 核細胞、多中心体の出現を認めた。その後、損傷後 7 日目頃より、染色体異数性を示す核が認められ、続いて、損傷後 9 日目には DNA 損傷反応を示す核、損傷後 15 日目には老化マーカーである γ -ガラクトシダーゼ陽性細胞の出現を認めた。すなわち、細胞質分裂障害による娘細胞間の架橋構造・2 核細胞の出現、多中心体、染色体異数性、DNA 損傷反応、細胞老化という事象が時間を追って起きていることを見出した。これらの表現型は一過性で、最終的に傷は治癒する。この結果は、我々のモデルマウスにおいて染色体異数性は老化を誘導するという示唆を強く示唆している（論文投稿準備中）。



腫瘍形成におけるビメンチンリン酸化の機能解析：染色体異数性はがんの hallmark として考えられている。我々のマウスは、染色体異数性を示すことから、高発がんモデルマウスとなりうると予期された。しかしながら、生後 2 年以上にわたりマウスを観察したが自然発がんの亢進を認めなかった。また、皮膚に 3 週間おきに損傷を与えて、腫瘍形成の亢進を検討したが野生型と同様、全く腫瘍形成を認めなかった。そこで、3-メチルコラントレン（3-MCA）の皮下投与をおこない化学発がんによる腫瘍形成を検討したところ、野生型に比べ変異マウスにおいて腫瘍発生の遅延および腫瘍による個体死の遅延を認めた。この腫瘍を組織学的に検討したところ、すべての遺伝子型で線維肉腫を形成し、染色体異数性を呈した。この結果から、腫瘍形成初期における染色体異数性が誘導する細胞老化（AIS; Aneuploidy-induced senescence）はがん化へのセーフガードとしての役割をしている可能性を示唆している（論文投稿準備中）。



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12件)

Goto, H., and Inagaki, M. New insights into roles of intermediate filament phosphorylation and progeria pathogenesis. *IUBMB Life*, 66: 195-200, 2014

Kitagawa, M., Fung, S.Y.S., Hameed, U.F.S., Goto, H., Inagaki, M., Lee, S.H. Cdk1 Coordinates Timely Activation of MKlp2 Kinesin with Relocation of the Chromosome Passenger Complex for Cytokinesis. *Cell Rep.*, 7:166-179, 2014

Ikawa, K., Satou, A., Fukuhara, M., Matsumura, S., Sugiyama, N., Goto, H., Fukuda, M., Inagaki, M., Ishihama, Y. and Toyoshima, F. Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle*, 13:126-137, 2014

Matsuyama, M., Tanaka, H., Inoko, A., Goto, H., Yonemura, S., Kobori, K., Hayashi, Y., Kondo, E., Itoharu, S., Izawa, I. and Inagaki, M. Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 288: 35626-35635, 2013

Kasahara, K., Goto, H., Izawa, I., Kiyono, T., Watanabe, N., Elowe, S., Nigg, E.A. and 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, doi: 10.1038/ncomms2879, 2013

Goto, H., Inoko, A. and Inagaki, M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 3893-3905, 2013

Neise, D., Sohn, D., Stefanski, A., Goto, H., Inagaki, M., Wesselborg, S., Budach, W., Stühler, K. and Jänicke, R.U. The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor

BI-D1870 prevents gamma irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK- and p53-independent accumulation of p21WAF1/CIP1. *Cell Death and Dis.* 4: e859, 2013

Odaka, C., Loranger, A., Takizawa, K., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Murata, S., Inoko, A., Inagaki, M. and Marceau, N. Keratin 8 Is Required for the Maintenance of Architectural Structure in Thymus Epithelium. *PLoS ONE* 8: e75101, 2013

Jeong, H.J., Ohmuro-Matsuyama, Y., Ohashi, H., Ohsawa, F., Tatsu, Y., Inagaki, M. and Ueda, H. Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchbodies. *Biosens Bioelectron* 40: 17-23, 2013

Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., Izawa, I. and Inagaki, M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J. Cell Biol.* 197: 391-405, 2012

Li, P., Goto, H., Kasahara, K., Matsuyama, M., Wang, Z., Yatabe, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* 23: 1582-1592, 2012

Toda, M., Kuo, C.H., Borman, S.K., Richardson, R.M., Inoko, A., Inagaki, M., Collins, A., Schneider, K. and Ono, S.J. Evidence that formation of Vimentin/Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) complex mediates mast cell activation following Fc RI/CC chemokine receptor 1 cross-talk. *J. Biol. Chem.* 287: 24516-24524, 2012

[学会発表](計7件)

Inagaki, M. Emerging role of the ubiquitin-proteasome pathway in primary cilia assembly. The 25th CDB meeting "Cilia and centrosomes, from fertilization to cancer". June 17-18, 2013. Kobe, Japan.

稲垣昌樹. ビメンチンリン酸化の生理学的意義の解明. 第13回日本蛋白質科学会年会. 2013年6月12日. 鳥取.

Inoko, A. Translocation of keratin-binding proteins between the cell-cell adhesion and the centrosome as the functional switch of differentiation and proliferation. 第65回日本細胞生物学会大会. 2013年6月19日. 名古屋.

Goto, H. Screening of novel Aurora-A-associated proteins to prevent primary cilia assembly at the centrosome in proliferating cells. 第65回日本細胞生

物学会大会 . 2013 年 6 月 20 日 . 名古屋 .

田中宏樹 . 細胞質分裂障害は染色体不安定性の亢進および細胞老化を誘導する . 第 65 回日本細胞生物学会大会 . 2013 年 6 月 21 日 . 名古屋 .

Inagaki, M. Intermediate filaments and site-and phosphorylation state-specific antibodies. Lecture at The University of Gothenburg. Sep. 24, 2012. Gothenberg, Sweden.

Inagaki, M. Intermediate filaments and site-and phosphorylation state-specific antibodies. Global COE the 4th International Symposium. Nov. 15, 2012. Nagoya, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

Goto, H. and Inagaki, M. Method for generation of antibodies specific for site-and post-translational modifications. Ossipow V. and Fischer N. (eds.), *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1131, Springer Science+Business Media New York 2014, in press.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center>

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)・腫瘍医化学部・部長

研究者番号 : 3 0 1 8 3 0 0 7

(2)研究分担者

井澤 一郎 (IZAWA, Ichiro)

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 : 2 0 3 1 1 4 4 1

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 : 2 0 3 9 3 1 2 6

笠原 広介 (KASAHARA, Kousuke)

愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍医化学部・研究員

研究者番号 : 9 0 4 5 5 5 3 5