

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：83901
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770238
 研究課題名（和文） 新規ケラチン結合蛋白質による上皮細胞分化および増殖制御メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Research on the mechanism of epithelial cell differentiation and proliferation through novel keratin-binding 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）： ケラチン細胞骨格は上皮細胞に特異的に存在するにもかかわらず、上皮分化やそれと相反する細胞増殖への寄与は不明な点が多い。報告者は新規ケラチン結合蛋白質をアミノ酸配列の相同性や局在の類似性から TPHP 分子群と名付け、これらがまさに上皮分化・細胞増殖の両面で機能することを実験的根拠により明らかにしつつある。本課題ではトリコプレイン蛋白質による全く新しい細胞増殖制御機構、すなわち中心体で一次線毛動態を制御することにより細胞周期の進行と休止を切替える仕組みを論文報告した。このことは、がん細胞を特異的に死滅させるヒントともなった。また、中心体での G1 期制御が上皮分化に及ぼす影響も今後の検討課題として示された。

研究成果の概要（英文）： Keratin cytoskeleton is specifically observed in differentiated epithelial cells. Nevertheless, our knowledge of its contribution to epithelial cell differentiation and proliferation has been fragmentally. We identified keratin filament-binding proteins, Albatross and trichoplein, as TPHP (trichohyalin and plectin homology domain) proteins, according to their unique amino acid sequences. Indeed, growing evidences indicate that TPHP proteins are locationally and functionally “bi-player proteins” which coordinate differentiation and proliferation of epithelia. In this project, we published a report that trichoplein regulates cell proliferation through a novel mechanism, thus, centriolar trichoplein controls primary cilia kinetics that changes cell cycle progression and cellular quiescence. Also, this mechanism raised an idea how primary cilia-deficient cancer cells specifically damaged. Moreover, this finding of G1 phase regulation by primary cilia kinetics allowed us to examine its effect on cell differentiation in the future study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

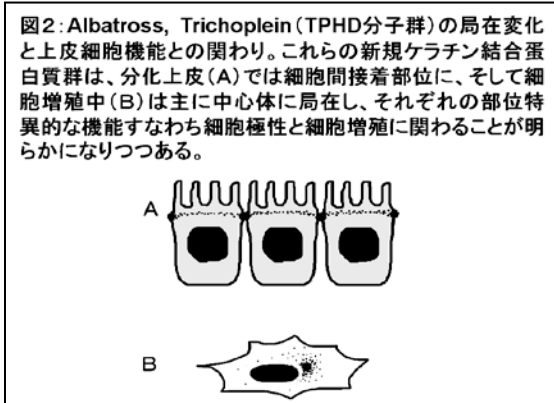
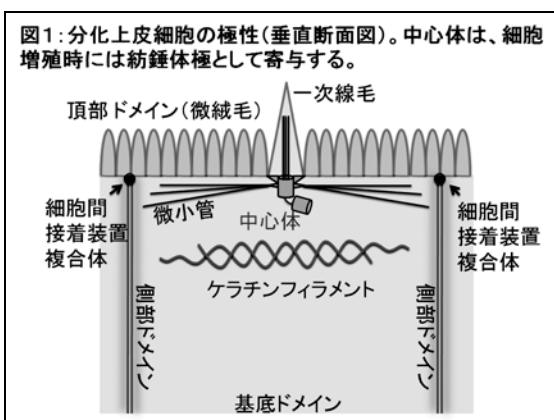
キーワード：上皮分化、ケラチン、中心体、細胞周期、一次線毛

1. 研究開始当初の背景

ケラチンは上皮特異的に発現する細胞骨格蛋白質である（図1）。にも関わらず、上皮分化・増殖における役割は不明であった。これまでに申請者らはケラチン結合蛋白質

アルバトロスが上皮分化すなわち細胞極性の制御に関わり、ケラチンがこれを促進することを見出してきた (Sugimoto, Inoko et al., J. Cell Biol., 2008)。さらにアルバトロスおよびトリコプレイン (Nishizawa, Izawa,

Inoko et al., J Cell Sci., 2005) をそのアミノ酸配列から TPHPD 分子群 (トリコプレイン・プレクチン類似ドメイン分子群) と名付けた。この分子群の特徴はケラチン結合蛋白質であることに加え、分化状態では主に細胞間接着部位に、そして増殖中は主に中心体に局在を変えることである (図 2; Ibi, Zou, Inoko et al., J. Cell Sci., 2011)。この 2 つの場所はそれぞれ分化と増殖の特徴的な現象の拠点であり、特に中心体は分化と増殖に際し、ダイナミックに構造を転換する (図 1)。すなわち、分化状態で増殖が休止すると一次線毛を形成するが、細胞分裂時には紡錘体極として増殖に貢献する。このように、報告者らの実験結果からは TPHPD 分子群が分化・増殖の両方の制御に関わる可能性が考えられた。



2. 研究の目的

本研究の目的は、このような新規ケラチン結合蛋白質群と分化・増殖制御との関わりを分子レベルで明らかにすることである。特に今回、報告者は中心体のトリコプレインを欠失させた正常二倍体細胞が一次線毛形成と同時に細胞周期休止を示す結果を得ていたため、一次線毛動態制御による積極的な細胞周期調節機構が新規に存在すると仮定し、その具体的な分子基盤の解明、すなわち同様の表現型を新たに示すこととなったオーロラ A 分裂期キナーゼとの分子レベルでの相互作用

の解明に主眼を置いた (図 5)。

3. 研究の方法

基本的な細胞生物学の解析、すなわち特異的抗体による細胞内局在解析、細胞内での蛋白質の発現阻害あるいは誘導による表現型変化の検討、また分子間相互作用の検討を行ったが、特記事項を以下に記した。

(1) 中心体での蛋白質局在解析:

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) により確認した。

(2) 分子間結合実験:

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。

(3) オーロラ A キナーゼアッセイ:

HeLa 細胞を用い、トリコプレインとオーロラ 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トリコプレインとオーロラ 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) トリコプレイン・オーロラ A の中心体機能の解析:

RNA 干渉法による機能抑制実験、すなわちノックダウンを正常二倍体である RPE1 細胞 (hTERT 不死化網膜色素上皮細胞) あるいは HeLa 細胞 (子宮頸癌細胞) に対して行い、その発現を減弱させた。その状態において相互作用する分子の変化を検討をした。トリコプレイン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。

(5) 一次線毛を介した細胞周期制御機構の検討:

RPE1 細胞では一次線毛形成と細胞周期休止は同時に起こることが知られている。この 2 つの現象の序列を決めるため、一次線毛を生じない系を IFT20 蛋白質のノックダウンにより確立した。これにトリコプレインあるいはオーロラ A の siRNA を組み合わせ、各種細胞周期マーカーの変化を検討した。同様の目的で一次線毛形成能がない HeLa 細胞も用いた。

(6) トリコプレイン変異体解析:

分子内ドメイン解析のため、トリコプレインの断片を蛋白質および発現ベクターとして作製し、上述の実験系で適宜使用した。

4. 研究成果

(1) トリコプレイン・オーロラ A キナーゼによる一次線毛形成抑制機能 (図3):

一次線毛形成制御の分子機構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 細胞ではトリコプレインの母中心小体での局在が減弱した。同状態でトリコプレインを強制発現すると、一次線毛形成が抑えられた。そこで増殖状態でトリコプレインノックダウンを行ったところ、一次線毛形成が見られた。同時に細胞周期の休止を認めた。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、トリコプレインとオーロラ 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トリコプレインがオーロラ A キナーゼを直接活性化することが明らかになった。トリコプレインの分子内解析としては、オーロラ A キナーゼ活性化かつ中心体局在・機能に必要な最小単位が、1-130 アミノ酸残基であることを確認した。特に 52 番目のアラニンと 54 番目のトリプトファンがオーロラ A キナーゼの活性化に重要であった。以上のことから、正常二倍体細胞では中心体でトリコプレインがオーロラ A キナーゼを活性化すると一次線毛形成が抑制されると考えられる。

(2) 一次線毛動態制御による細胞周期制御 (図3, 図5):

一次線毛形成は細胞周期進行中には努めて抑制されることは知られていたが、その原理は今まで不明であった。トリコプレイン機能抑制では細胞周期の休止を起こしたが、一次線毛を除去した系ではそれが見られなくなった。このことは増殖マーカーである Cyclin A の発現、BrdU の取り込み、FACS での S, G2/M 期の存在により確認した。つまり、トリコプレインが一次線毛形成を抑制することは円滑な G1 期細胞周期進行に寄与していると考えられる (図3)。まとめると、この成果の特徴は、中心体のトリコプレインによるオーロラ A 分裂期キナーゼの活性化が実はまったく新しい G1 期細胞周期制御に関わるということと、この系の抑制により正常二倍体細胞

で一次線毛が形成されると強制的に細胞周期が休止するという新発見にある (図5)。

(3) オーロラ A キナーゼ阻害によるがん細胞特異的傷害 (図4):

がん細胞では一次線毛形成能の欠失が見られることが知られている。同時にオーロラ A キナーゼはがん細胞の増殖において要求性の高い分裂期の酵素でもある。そこで、がん細胞である HeLa 細胞でオーロラ A をノックダウンしたところ、正常二倍体細胞のような一次線毛形成も細胞周期休止も起こらず、分裂障害により死滅した。この結果は、がん細胞を特異的に傷害する分子標的治療のヒントともなり得る。

(4) 類似機能蛋白質の同定:

TPHD 分子群のノックダウンスクリーニングを RPE1 細胞で行うことにより、同様の機能、すなわち増殖条件下でも一次線毛形成と細胞周期休止を導く蛋白質を新たに複数見出した。

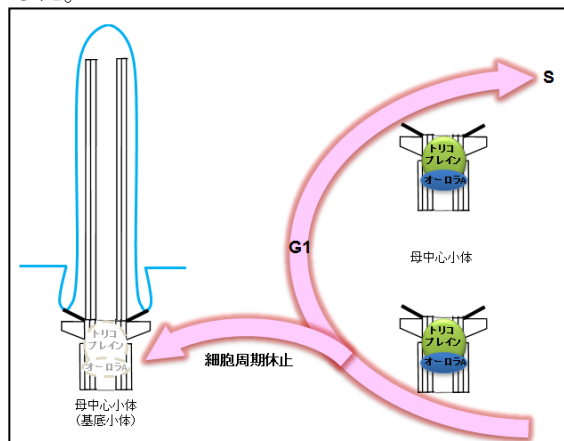


図3 増殖と休止のスイッチとなるトリコプレイン・オーロラA複合体
トリコプレインとオーロラAは増殖中のRPE1-hTERT細胞では母中心小体への局在を認めるが、血清飢餓による細胞周期休止で一次線毛が誘導されるとこの中心体局在は消失する。このような中心体局在の消失による一次線毛形成は、それぞれのノックダウンによっても確認された。また、この一次線毛形成に依存して細胞周期が休止した。このように、中心体のトリコプレイン・オーロラA複合体は、一次線毛の組立を抑制することで増殖細胞の円滑なG1期進行に寄与する。あわせて、その中心体局在の変化は一次線毛動態を介した細胞増殖と休止のスイッチにもなっている。

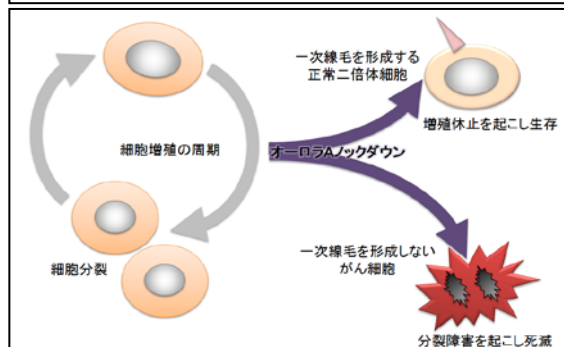
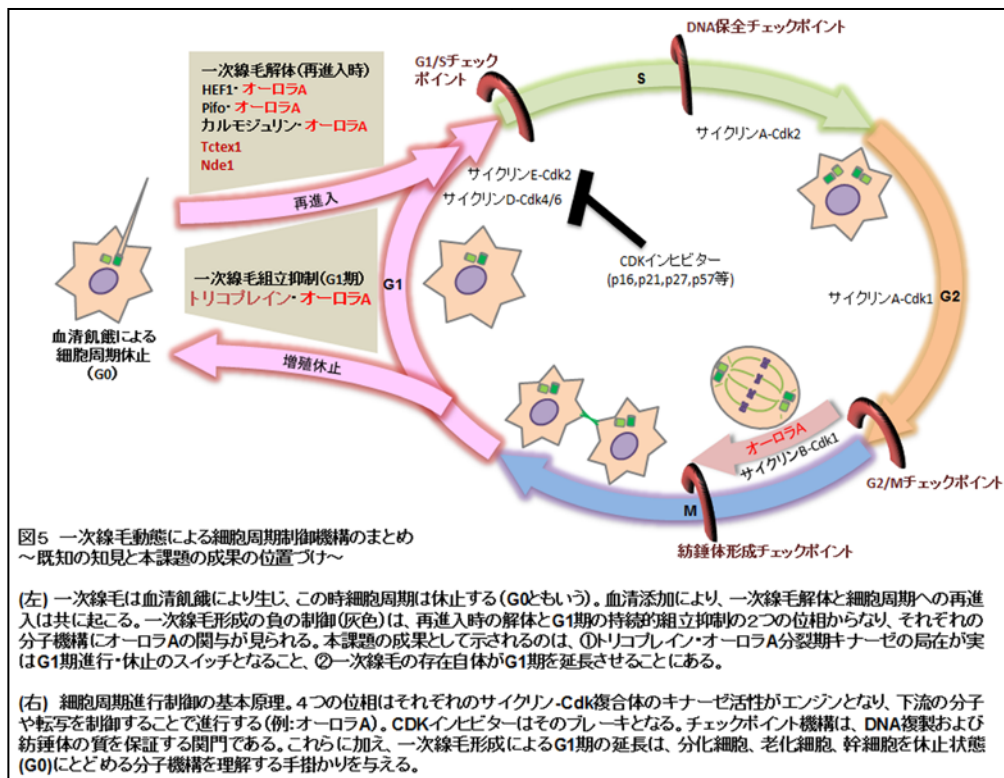


図4 オーロラA阻害の反応性の違いによるがん細胞特異的傷害
オーロラAキナーゼは、細胞分裂に必須の酵素でもある。そのノックダウンによる発現抑制が、正常二倍体細胞では一次線毛形成を誘導し、その結果積極的に細胞増殖休止に至る。同じ操作でも、一次線毛形成能を失っているがん細胞(HeLa細胞)は増殖休止が起こらず分裂障害により死滅する。



(5) まとめ：

これまで報告者は、新規ケラチン結合蛋白質「TPHD分子群」を同定し、その特性が上皮細胞の細胞間と中心体で局在を遷移させることに加え、それぞれの場において分化・増殖制御に関わる実験的根拠を見出してきた。このうち、本課題ではトリコプレインの中心体機能に注目して解析を行った。その結果、中心体に局在するトリコプレイン・オーロラAキナーゼによる一次線毛動態制御がG1期細胞周期を調節する仕組みが新たに示された。G1期の延長は細胞分化と相関することから、TPHD分子群による上皮分化制御機構の理解においては細胞間での現象のみならず、このような中心体G1期制御からの入力も合わせて検討していくことで、より複合的な分子基盤の理解が可能になると思われる。

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5件)

- ① 猪子誠人, 稲垣昌樹: 一次線毛動態による新たな細胞増殖制御機構～トリコプレイン-オーロラAキナーゼ経路～, 化学と生物, 日本農芸化学学会誌, in press, 査読有り
- ② Goto H, Inoko A, Inagaki M.: Cell cycle

progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. Cell Mol Life Sci.; 2013 Mar 9. [Epub ahead of print], doi: 10.1007/s00018-013-1302-8, 査読有り

- ③ Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I, Inagaki M.: Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. J Cell Biol.;197(3):391-405. 2012, doi: 10.1083/jcb.201106101, 査読有り
- ④ Toda M, Kuo CH, Borman SK, Richardson RM, Inoko A, Inagaki M, Collins A, Schneider K, Ono SJ: Evidence that formation of vimentin mitogen-activated protein kinase (MAPK) complex mediates mast cell activation following FcεRI/CC chemokine receptor 1 cross-talk. J Biol Chem. 287(29):24516-24. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.319624, 査読有り
- ⑤ 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, doi: 10.1242/jcs.075705, 査読有り (*共同第一著者)

[学会発表] (計2件)

- ① Inoko et al., : “Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells”, The 12th biennial Gordon Conference on Intermediate Filaments, 2012年06月17～22日, Bates College (Lewiston, USA)
- ② Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Inagaki M: “Trichoplein blocks aberrant assembly of primary cilia in proliferating cells”, 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2011年10月3日(Nagoya)

[その他]

報道関連情報:

Ben Short: News - In Focus: Trichoplein keeps primary cilia silent. J Cell Biol.;197(3): 341. 2012, doi:10.1083/jcb.1973if
<http://jcb.rupress.org/content/197/3/341.full>

F1000 Prime
<http://f1000.com/prime/714597892>

愛知県がんセンター研究所のがん研究に関する新発見が 米科学誌で大きく紹介されました。
<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/03event/press/120611.pdf>

ヒトのがん細胞だけを死滅させる特効薬の開発に大きなヒント - 愛知がん研
<http://news.mynavi.jp/news/2012/06/12/087/index.html?gaibu=hon>

ホームページ情報:
科学誌ジャーナル・オブ・セル・バイオロジーで研究成果が大きく紹介されました。
http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan_seigyو/index.html

新着細胞生物学用語集(中間径フィラメント)
<http://www.jscb.gr.jp/glossary/category>

[_glossary.php?category_id=4&category=%E4%B8%AD%E9%96%93%E5%BE%84%E3%83%95%E3%82%A3%E3%83%A9%E3%83%A1%E3%83%B3%E3%83%88](http://www.jscb.gr.jp/glossary.php?category_id=4&category=%E4%B8%AD%E9%96%93%E5%BE%84%E3%83%95%E3%82%A3%E3%83%A9%E3%83%A1%E3%83%B3%E3%83%88)

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