

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460089

研究課題名(和文) 増殖生存シグナルと細胞分裂シグナルのクロストーク

研究課題名(英文) The crosstalk between growth signals and mitotic signals

研究代表者

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：90455535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、増殖生存シグナルと細胞分裂シグナルのクロストークについて主に以下の2点について明らかにした。

- 1) 増殖生存シグナルの中核経路の一つであるPI3キナーゼ-Akt/PKBキナーゼが、細胞分裂期(M期)においてPlk1 (Polo-like kinase 1) をリン酸化し酵素活性を制御することで、適切な染色体分配を制御していることを明らかにした。
- 2) 一次繊毛と呼ばれる細胞内オルガネラの形成機構を、ユビキチンE3リガーゼCRL3-KCTD17が制御することを示した。その分子機構として中心体タンパク質トリコプレインの安定化と、M期キナーゼAurora Aの活性制御を提示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have revealed that PI3-kinase-Akt/PKB signaling pathway is essential for proper mitotic progression. In mitosis, Akt kinase activity is responsible for Plk1 (Polo-like kinase 1) phosphorylation at Ser-99. This phosphorylation creates the docking site of 14-3-3 gamma and elevates the Plk1 kinase activity, thereby regulating the metaphase-anaphase transition. We further show that ubiquitin-proteasome system controls primary cilia formation. In response to serum starvation, the ubiquitin E3 ligase CRL3-KCTD17 induces polyubiquitination-dependent degradation of trichoplein, one of the most important negative regulator of ciliogenesis. The trichoplein degradation attenuates the kinase activity of Aurora A, and thereby triggers ciliogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞周期 中心体 リン酸化 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が無秩序に増殖する要因の1つとして、増殖因子とその受容体を起点とするリン酸化シグナル伝達の異常亢進が挙げられる。特に、増殖生存シグナルの中核経路として働いているPI3キナーゼ(PI3K)からAktキナーゼ(PKBとも呼ばれる)に至るシグナル伝達経路は、癌の増殖・進展に密接に関与することが知られ、抗癌剤の分子標的としても注目されている。

一方、異常な細胞分裂によって誘導される染色体の不均等分配(染色体不安定性)もヒト固形癌で頻繁に観察される現象の1つである。その原因としては、細胞分裂を制御するキナーゼ群(M期キナーゼ群:Plk1, Aurora Aなど)の制御異常が報告されている。

従来、特定の細胞周期では特定のシグナル伝達経路(シグナル伝達分子)が働いていると考えられてきたが、それぞれのシグナル伝達経路の間にクロストークが存在することも少しずつ報告され始めており、詳細な解析が求められていた。

2. 研究の目的

(1) 1つめに、増殖生存シグナル伝達経路であるPI3K-Akt経路による細胞分裂制御の分子機構を明らかにすることを目的とする。我々は既に、Aktのキナーゼ活性依存的にM期キナーゼPlk1がリン酸化される知見を得ており、この点に注目して解析を進めることにした。

(2) 2つめに、一次繊毛と呼ばれる細胞内オルガネラの形成機構の解明を目指した。一次繊毛は、増殖停止に伴い形成され、細胞外刺激を感知する役割を果たしている。増殖状態において、M期キナーゼであるAurora Aはトリコプレイン(trichoplein)と呼ばれる中心体タンパク質によって活性化され、一次繊毛の形成抑制に働くことが報告されていた。そこで我々は、トリコプレイン-Aurora Aによる一次繊毛制御のメカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

主に培養細胞を用いた実験系と、精製タンパク質による*in vitro*実験系で解析を行った。使用した培養細胞について、PI3K-Akt経路による細胞分裂制御の分子機構の解析には、細胞周期解析において多くの実績があるHeLa(ヒト子宮頸癌由来の上皮細胞株)を、一次繊毛の解析では、血清飢餓や高密度培養による増殖停止に伴い一次繊毛を形成するRPE1(ヒト網膜色素上皮細胞株)やIMR90(ヒト正常繊維芽細胞株)を使用した。プラスミド過剰発現による実験系ではHEK293Tを主に使用した。ノックダウンによる表現型解析は、Lipofecetamine RNAiMAXによるsiRNAのトランスフェクションで評価し、表

現型の回復を検討するため siRNA 抵抗性の目的タンパク質を誘導発現する TetOn 細胞株を樹立した。

タンパク質精製は、目的の cDNA に GST (glutathione-S-transferase) や His、MBP (maltose-binding protein) などのタグで標識し、大腸菌に発現させ、アフィニティ精製を行った。酵素タンパク質については、活性のあるタンパク質を精製するため、ヒト培養細胞 HEK293T やバキュロウィルス系を用いた。

4. 研究成果

(1)PI3K-Akt シグナル伝達経路による細胞分裂制御機構の解析

本研究により、PI3K-Akt 経路が細胞分裂期(M期)の進行を制御する分子機構を明らかにした。二重チミジン法による細胞周期同調により、G2期からM期にかけてAkt活性が亢進し、Akt活性依存的にMキナーゼPlk1のSer-99がリン酸化されることを見出した。リン酸化されたPlk1は、アダプタータンパク質14-3-3と結合して、キナーゼ活性が亢進する。siRNAによる14-3-3のノックダウン、Aktのノックダウンや低分子阻害剤処理、Ser99をAla置換したPlk1変異体(S99A)の発現のいずれもM期における染色体分配を妨げる(Kasahara K *et al*, Nature Communications, 2013)。

本研究成果により、PI3K-Akt活性がPlk1キナーゼの制御を介して、染色体分配に重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかしながら、精製タンパク質を用いた*in vitro*実験系から、AktがPlk1をリン酸化するためには新たなタンパク質の存在が必要であることも分かった。今後の研究で同定する必要がある。

(2)Aurora A キナーゼによる一次繊毛の抑制機構の解析

M期キナーゼAurora Aは、間期において中心小体タンパク質トリコプレインと結合して活性化し、一次繊毛の形成を抑制していることを我々の研究室は以前に報告した。細胞が血清飢餓や高密度培養など増殖停止シグナルを受けると、Aurora Aは不活性化し、一次繊毛の形成が開始される(Inoko A *et al*, J Cell Biol, 2012)。

本研究で、その分子機構を解析し、以下のことを明らかにした。血清飢餓などの増殖停止シグナルは、トリコプレインのLys-50及びLys-53のポリユビキチン化依存的なタンパク質分解を引き起こす。その結果、中心小体におけるAurora A活性は減衰し、一次繊毛の形成抑制を解除する。さらに、プロテインアレイとsiRNAを基盤とした網羅的ユビキチン化E3リガーゼスクリーニングの結果、KCTD17を基質認識タンパク質とするE3リガーゼCRL3^{KCTD17}がトリコプレインをポリユビキチン化することを見出した。KCTD17をノッ

クダウンした細胞は、血清飢餓後もトリコプレインがタンパク質レベルで安定化するため一次繊毛の形成が著しく抑制される。また、電子顕微鏡による観察の結果、トリコプレイン-Aurora A 経路は一次繊毛形成の軸糸伸長を抑制していることも明らかにした (Kasahara K *et al*, Nature Communications, 2014)。

今後、CRL3^{KCTD17} がトリコプレインをポリユビキチン化が、増殖停止シグナルにより亢進するメカニズムを解析する必要がある。現在、CRL3^{KCTD17} の翻訳後修飾による制御を検討している。また、脱ユビキチン化酵素による制御も検討する必要がある。

(3) 一次繊毛形成による G0 期停止メカニズムの解析

一次繊毛は増殖停止に伴い形成される細胞内オルガネラである一方、一次繊毛の形成が G0 期停止を引き起こすことが分かっている。その分子機構を明らかにするため、増殖条件にも関わらず一次繊毛を人為的に形成させた細胞で増殖停止因子の発現を解析した。その結果、CDK 阻害因子の一つである p27^{Kip1} の発現レベルが亢進していることを見出した。p53、p21^{cip1} p16^{INK4a} に変化はなかった (Izawa I *et al*, Cilia, 2015)。

今後、一次繊毛の形成が p27^{Kip1} の安定化を引き起こす原因について解析する必要がある。

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7件)

Inaba H, Goto H, Kasahara K, Kumamoto K, Yonemura S, Inoko A, Yamano S, Wanibuchi H, He D, Goshima N, Kiyono T, Hirotsune S, Inagaki M (2016) Ndel1 suppresses ciliogenesis in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora A pathway. The Journal of Cell Biology (査読有り) 212: 409-423, DOI: doi: 10.1083/jcb.201507046.

Goto H, Tanaka H, Kasahara K, Inagaki M (2015) Phospho-specific antibody proves of intermediate filament proteins. Methods in Enzymology (査読有り) 568: 85-111, DOI: 10.1016/bs.mie.2015.07.010.

Izawa I, Goto H, Kasahara K, Inagaki M (2015) Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. Cilia (査読有り) 4: 12. DOI: 10.1186/s13630-015-0021-1.

Bargagna-Mohan p, Lei L, Thompson A, Shaw C, Kasahara K, Inagaki M, Mohan R (2015) Vimentin phosphorylation

underlies myofibroblast sensitivity to withaferin A *in vitro* and during corneal fibrosis. PLoS One (査読有り) 10: e0133399. DOI: 10.1371/journal.pone.0133399.

Goto H, Kasahara K, Inagaki M (2015) Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation. Cell Structure Function (査読有り) 40: 43-50. DOI: 10.1247/csf.14017.

Kasahara K, Kawakami Y, Kiyono T, Yonemura S, Kawamura Y, Era S, Matsuzaki F, Goshima N, Inagaki M (2014) Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension. Nature Communications (査読有り) 5: 5081. DOI: 10.1038/ncomms6081.

Kasahara K, Goto H, Kiyono T, Watanabe N, Elowe S, Nigg EA, Inagaki M (2013) PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3g and is required for metaphase-anaphase transition. Nature Communications (査読有り) 4: 1882. DOI: 10.1038/ncomms2879.

[学会発表](計8件)

笠原 広介、青木 啓将、田中 宏樹、清野 透、高坂 美恵子、福田 枝里子、五島 直樹、稲垣 昌樹: 脱ユビキチン化酵素 Usp8 による 1 次シリアの制御. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会 (BMB2015), 2015 年 12 月 4 日、神戸ポートピアアイランド (神戸市)

Mohan R, Lei, L, Thompson A, Shaw C, Kasahara K, Inagaki M, Bargagna-Mohan P: Vimentin Phosphorylation Patterns Differentiate Corneal Fibroblasts from Myofibroblasts In Vitro and During Fibrosis. Association in Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) meeting 2015. May 3, 2015, Denver (USA)

笠原 広介: Ubiquitin-proteasome system controls primary cilia biogenesis. 第 6 回名古屋グローバルリトリート、2014 年 2 月 14 日、あいち健康プラザ (愛知県大府市)

後藤 英仁、江良 沙穂、李 萍、笠原 広介、猪子 誠人、井澤 一郎、望月 宏美、富樫 卓志、河村 義史、川上 和孝、五島 直樹、清野 透、稲垣 昌樹: 新規 Aurora-A 結合タンパク質のスクリーニング、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

Kasahara K, Goshima N, Matsuzaki F, Inagaki M.: Emerging role of the ubiquitin-proteasome pathway in primary cilia assembly. The 25th CDB meeting "Cilia and Centrosomes, from

Fertilization to Cancer ”, 12 June, 2013, RIKEN CDB (Kobe city)

笠原 広介、川上 和孝、河村 義史、衣斐 美歩、清野 透、五島 直樹、松崎文雄、稲垣 昌樹：A Cul3-based ubiquitin E3 ligase controls primary cilia assembly through degradation of Trichoplein. 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日、パシフィコ横浜（横浜市）

笠原 広介、川上 和孝、河村 義史、衣斐 美歩、五島 直樹、稲垣 昌樹：Emerging role of the ubiquitin-proteasome system in assembly of primary cilium. 第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月20日、ウインク愛知（名古屋市）

Li P, Goto H, Kasahara K, Inoko A, Izawa I, Mochizuki H, Togashi T, Kawamura Y, Kawakami Y, Goshima N, Kiyono T, Inagaki M: Screening of novel Aurora-A-associated proteins to prevent primary cilium 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、ウインク愛知（名古屋市）

〔図書〕(計1件)

笠原 広介、稲垣 昌樹、羊土社、一次繊毛を制御する Aurora A シグナル 実験医学増刊 知る・見る・活かす！シグナリング研究 2015、編集：一条 秀憲、南 康広、2015年、88-92 頁

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan_seigyosyo/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

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：90455535

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

田中 宏樹 (TANAKA, Hiroki)

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍医化学部・リサーチレジデント

川本 恵理子 (KAWAMOTO, Eriko)

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍医化学部・嘱託技師