

細胞増殖と分化の両局面で異なる機能を果たす新規分子群の研究

愛知県がんセンター研究所 発がん制御研究部
稲垣 昌樹

1. はじめに

最近我々は、上皮細胞に特異的に発現している中間径フィラメント蛋白質ケラチン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、その解析を進めている。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。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。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。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biplayerとして機能している可能性が示唆された。

本研究では、TPHDをもつ新規蛋白質群の機能解析を行い、これらの蛋白質群が、細胞の増殖と分化という相反する事象をどのような分子機序で統合的に制御しているのかを解明することを目的とする。

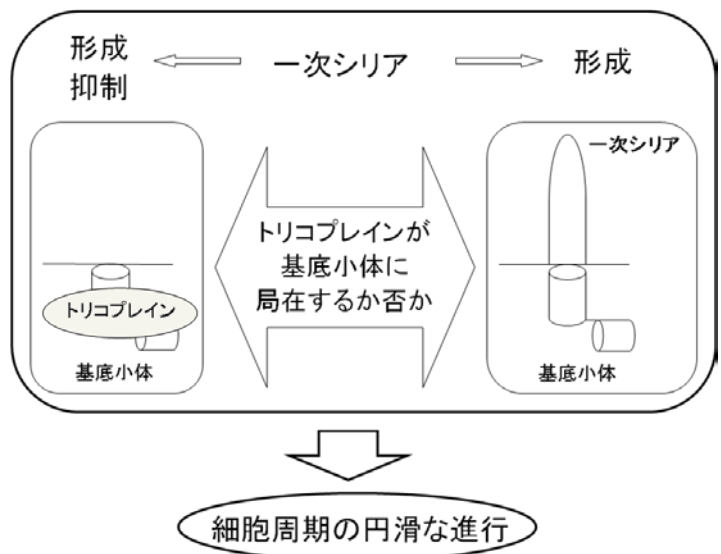
2. 方法

本研究では、まずトリコプレインが、一次繊毛形成と細胞周期制御を連関しているメカニズムを、siRNAiによるノックダウン実験や変異体の強制発現を行い、詳細に解析した。さらにTPHD類似の構造をもつ蛋白質群がもつ機能を網羅的に検討している。他方、中間径フィラメント蛋白質のリン酸化について、ノックイン・マウスを作製して個体レベルでの機能解析を行い、また、細胞周期・チェックポイント制御機構については、種々の分子細胞生物学的手法を用いて解析した。

3. 結果

(1) トリコプレインによる一次繊毛・細胞周期制御機構の解明

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、トリコブ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。

さらに我々は、トリコブレイン蛋白質が分化・増殖転換のカギとなる可能性と、それが一次繊毛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。一次繊毛とは細胞膜上の突起物で、G1 期に中心体から生じ、細胞周期進行に伴い消失する構造物である。その異常が発生や癌化に影響を及ぼすことから、分化や増殖のシグナルを仲介するアンテナとして最近注目されている。

我々が増殖状態の RPE1 細胞でトリコブレイン機能欠失（ノックダウン）を行ったところ、一次繊毛が形成された。つまり、トリコブレインは増殖期に一次繊毛形成が生じないようにしている。このトリコブレインの機能には①中心体局在化と②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、トリコブレインノックダウンでは細胞周期の休止を認めたが、一次繊毛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、この細胞でトリコブレインは一次繊毛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。

この結果は、分化・増殖転換のカギとなり得る蛋白質とそのメカニズムの新たな発見を意味しており、癌を理解する上での可能性を広げたといえる。

(2) 中間径フィラメント蛋白質のリン酸化の個体レベルでの機能解析

我々は、中間径フィラメント蛋白質ビメンチンの構築がヘッドドメインのリン酸化によって制御されていることを世界で初めて明らかにし、そのリン酸化反応が分裂期における細胞質分裂に必須である事を報告してきた。しかし、個体レベルにおいて、ビメンチンのリン酸化の生理的な機能はほとんど解明されていない。そこで本研究では、ビメンチンの細胞周期に依存した特異的リン酸化部位の変異マウスの作製・解析を行った。今回作製したホモ変異マウスでは、生後 1 年前後から乳がんや白内障を生じる事が明らかになった。ホモ変異マウスの水晶体の上皮細胞において、細胞分裂が終了しているにもかかわらず、2つの娘細胞が完全に断裂されていない細胞が見られ、多倍体の細胞も認められた。すなわち、今回作製した遺伝子改変マウスにおける白内障という表現型は、ビメンチンが細胞周期依存的にリン酸化されない事によって、分裂期の異常を引き起こした結果であることが示唆された。

(3) 細胞周期・チェックポイント制御機構の解明

(i) 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、Ccdc151 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。

(ii) Chk1-セリン 280 リン酸化修飾の役割

Chk1 は、ATR 以外のキナーゼによってもリン酸化されることが知られているが、そのリン酸化反応の詳細については不明な点が多い。我々は、増殖因子刺激によって活性化された MAP キナーゼカスケイド (MEK-ERK-p90RSK) の p90RSK によって、Chk1 のセリン 280 が特異的にリン酸化されることを見出した。Chk1 は、この Chk1-セリン 280 のリン酸化修飾に伴って細胞質から核に移行すること、さらに、紫外線照射における DNA 損傷時にもこのリン酸化経路が働いていることが判明した。そして、このリン酸化は、DNA が損傷された際に、細胞が DNA 修復を行うための準備状態を形成する役割を果たしている可能性を見出した。

(iii) 新規リン酸化反応による分裂期キナーゼ Plk1 の活性制御メカニズム

細胞分裂期 (M 期) のすみやかな進行には、M 期キナーゼ群を中心としたリン酸化シグナル伝達が重要な役割を担う。我々は、14-3-3 γ が M 期キナーゼ Plk1 (Polo-like kinase 1) とそのセリン 99 リン酸化依存的に結合することを見出した。そして、Plk1 が活性化するためにはこれまで知られているスレオニン-210 リン酸化以外にセリン 99 リン酸化が必要不可欠であることを明らかにし、セリン 99 をリン酸化する酵素として AKT を見出している。

4. まとめ

細胞のがん化において、細胞周期およびそのチェックポイント機構の異常が重要な役割を果たしている。また、がん組織では、正常な細胞極性が失われて上皮組織構築の破綻をきたしている。我々は、トリコプレイン類縁蛋白質の解析を通して、細胞増殖制御機構と組織構築制御機構の連関を明らかにし、がんにおけるこれらの破綻メカニズムを明らかにすることをめざしていきたいと考えている。

5. 発表論文

1. Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Izawa, I., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T. and Inagaki, M. Trichoplein blocks aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. **J. Cell Biol.** in press
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
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
4. 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.** 124: 2113-2119, 2011
5. Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. 14-3-3 γ mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. **EMBO J.** 29: 2802-2812, 2010
6. 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
7. Bargagna-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