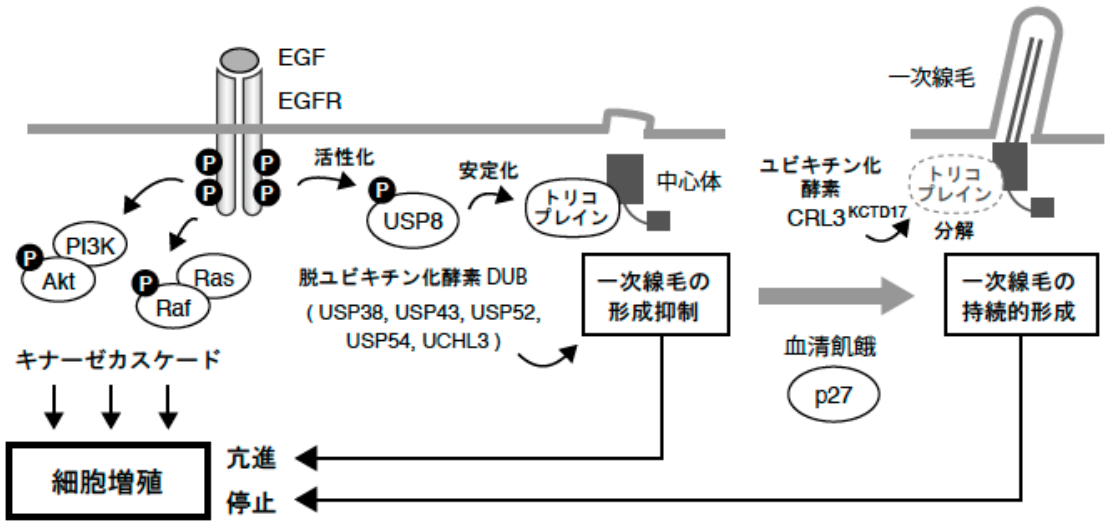
29　一次線毛ダイナミクスによる細胞増殖制御機構の解明	笠原　広介

【目的】近年、癌治療において EGFR などの受容体型チロシンキナーゼや、その下流に位置するキナーゼカスケードを分子標的とした薬剤が臨床導入され、高い有効性と比較的軽微な副作用から大きな期待が寄せられている。一方、これらの分子標的薬には変異型 RAS 遺伝子を発現する癌に効果が見込めないことや、耐性獲得による再発などの問題も残されている。このような難治性癌に対する治療方法を創出するため、細胞の増殖制御機構を従来とは異なる観点から解析し、新しい分子標的を見つけ出すことが喫緊の課題である。これまでの研究で我々は、従来のキナーゼカスケードによる細胞増殖（図 : 左側）に加えて、一次線毛と呼ばれる細胞小器官の形成が細胞増殖を制御することを発見し、一次線毛の制御に関与する種々の因子およびシグナル伝達機構を明らかにしてきた（図 : 右側）。本研究では、これらの研究をさらに進展させ、一次線毛の形成を制御するメカニズムの詳細について解明を進め、これらが癌細胞増殖抑制を誘導する分子標的となるか検証することを目的とする。我々は最近、cyclin/CDK の阻害因子である p27kip1 が一次線毛の新規制御因子である可能性を示唆するデータを得たため、本研究で検証する。

【方法】CRISPR/Cas9 テクノロジーにより、p27kip1（*CDKN1B* 遺伝子）をノックアウトした hTERT-RPE1 細胞（不死化ヒト網膜色素上皮細胞株）を作製し、一次線毛の形成について、免疫細胞染色および電子顕微鏡で解析した。一次線毛の形成に必要な領域を決定するため、種々の p27kip1 変異体を作製し、p27kip1 ノックアウト細胞に発現させて一次線毛の形成能の回復の有無を検証した。一次線毛の制御領域に結合するタンパク質を共免疫沈降法／質量分析で探索した。

【結果】p27kip1 ノックアウト細胞は、一次線毛の形成が著しく阻害されていることが明らかとなった。電子顕微鏡解析の結果、一次線毛の形成初期であるシリア小胞が中心小体（基底小体）に輸送される過程が阻害されていることも判明した。この細胞に、p27kip1 の各種変異体を発現させたところ、少なくとも 86～140 aa 領域を含む p27kip1 変異体に、一次線毛の形成を誘導する能力があることが判明した。p27kip1 の 86～140 aa 領域に結合する分子として Hsc70 を同定し、Hsc70 のノックダウンも一次線毛の形成を抑制することが分かった。

一次線毛の形成動態を制御する分子メカニズムと細胞増殖



29. 一次線毛ダイナミクスによる細胞増殖制御機構の解明

笠原　広介

三重大学 大学院医学系研究科 分子生理学分野

Key words : 一次線毛，細胞増殖，中心体，p27kip1

緒　言

近年、癌治療において EGFR などの受容体型チロシンキナーゼや、その下流に位置するキナーゼカスケードを分子標的とした薬剤が臨床導入され、高い有効性と比較的軽微な副作用から大きな期待が寄せられている。一方、これらの分子標的薬には変異型 RAS 遺伝子を発現する癌に効果が見込めないことや、耐性獲得による再発などの問題も残されている。このような難治性癌に対する治療方法を創出するため、細胞の増殖制御機構を従来とは異なる観点から解析し、新しい分子標的を見つけ出すことが喫緊の課題である。本研究では、「一次線毛の形成動態による細胞増殖制御」という我々が発見した細胞現象についてその分子メカニズムを解明し、癌細胞の増殖抑制へ展開することを目的とする。

一次線毛は、中心体が構造的・機能的に変化したアンテナ様の細胞小器官であり、細胞外環境を感知するセンサーとして働く。線毛研究の黎明期から、一次線毛の形成は細胞増殖と逆相関する（増殖細胞で形成が抑制され、血清飢餓などによる増殖停止で誘導される）ことが報告されてきた。我々は、血清飢餓により一次線毛形成が誘導される分子メカニズムとして、増殖因子及びその受容体に制御されるユビキチン・プロテアソームシグナル伝達系が一次線毛の形成を制御していること、このシグナル伝達系を阻害することで、一次線毛の形成に依存した細胞増殖停止を誘導できることを発見した［1〜3］。そこで、一次線毛の形成動態を制御する分子メカニズムの詳細を明らかにし、細胞増殖を制御する標的分子としての可能性を検証することにした。

Cyclin/CDK 阻害因子である p27kip1 は、一次線毛が形成される条件と同じ刺激で発現レベルが亢進する［4］。そこで本研究では、p27kip1 ノックアウト細胞を樹立して、一次線毛形成における p27kip1 の役割について検証を進めた。

方　法

1. 細胞培養

不死化ヒト網膜色素上皮細胞株 hTERT-RPE1（以下、RPE1 ; ATCC CRL-4000）は、10%ウシ胎児血清（Hyclone）を添加した DMEM/F-12（1 : 1）メディウムで培養した。プラスミドトランスフェクションは FuGENE HD（Roche）を、siRNA トランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen）を使用した。一次線毛の形成は、トランスフェクションの翌日から血清不含メディウムで 48 時間培養により誘導した。

2. プラスミド

プラスミドの入手先は以下の通りである。p27kip1/*CDKN1B*（DNAFORM、clone ID : 5202261）、stathmin/*STMN1*（DNAFORM、clone ID : ccsbBroadEn06515）、RhoA（名古屋大学・貝淵弘三先生より分与）。変異体は、InFusion HD Cloning（TOYOBO）を用いて作製し、作製した変異体のシークエンスは全て確認した。

3. GST プルダウンによるタンパク質同定

p27kip1 及びその変異体の cDNA は、pGEX6P-3 ベクターにサブクローニングし、大腸菌 BL21（DE3）株に形質転換した。増殖状態において、0.1 mM IPTG 存在下、25℃で 3 時間培養し発現させた GST 融合タンパク質は、グルタチオンセファロースを用いてアフィニティ精製した。Cell Lysis Buffer（Cell Signaling Technology）を用いて調製した RPE1 細胞液から GST-p27kip1（86〜140 aa）と結合するタンパク質を探索し、質量分析により同定した

（医薬基盤・健康・栄養研究所）。

4. ATP アーゼ活性測定

ATPase Activity Assay Kit（Colorimetric; BioVision）を使用した。活性測定に使用した p27kip1、Hsc70（DNAFORM, clone ID: 1000008485）、Hsp40（DNAFORM, clone ID: 4152608）は、pGEX6P-3 にサブクローニング後、上記 3. と同様の方法で大腸菌よりタンパク質精製した。精製した GST 融合タンパク質は、Turbo3C プロテアーゼ（ナカライ）を用いて GST から切断した。

5. 抗体

使用した抗体の入手先と希釈条件は以下の通りである。Arl13b（17711-1-AP、細胞染色 1：250、ProteinTech）、BrdU1（BU-1、細胞染色 1：4、Millipore）、cyclin A（clone 25、細胞染色 1：250、BD Transduction）、gamma-tubulin（GTU-88、細胞染色 1：1,000、Sigma-Aldrich）、gamma-tubulin（T3559、細胞染色 1：500、Sigma-Aldrich）、GAPDH（14C10、WB 1：4,000、Cell Signaling Technology）、Hsc70（1B5、WB 1：2,000、Santa Cruz Biotechnology）、p27kip1（SX53G8.5、WB 1：2,000、Cell Signaling Technology）。

結果および考察

1. p27kip1 ノックアウト（KO）細胞の一次線毛形成不全

CRISPR/Cas9 システムを用いて、p27kip1 ノックアウト RPE1（以下、p27kip1-KO）細胞株を樹立し、p27kip1 の発現が無いことを WB で確認した（図 1a）。血清飢餓 48 時間後の一次線毛形成を 2 つの一次線毛マーカー（Arl13b、Glu-tubulin）で検討した結果、親株 RPE1 細胞で観察される一次線毛の形成が、p27kip1-KO 細胞ではほとんど観察されないことが明らかとなった（図 1b）。

一次線毛の形成は、細胞増殖停止によって誘導されるため、p27kip1-KO 細胞の増殖状態について、BrdU の取り込み及び、S/G2 期マーカーである cyclin A の発現レベルで検討した結果、p27kip1-KO 細胞は、BrdU の取り込み、cyclin A の発現の両方について、親株と同程度の低下を示した（図 1c）。これらの結果は、血清飢餓によって p27kip1-KO 細胞の増殖が停止していることを示している。

p27kip1 は、cyclin/CDK に直接結合して活性を阻害する機能以外に、RhoA に結合してアクチンの動態制御に寄与すること、stathmin に結合して微小管の動態制御に寄与することが報告されている。そこで、p27kip1 の cyclin/CDK 非結合変異体および、stathmin/RhoA 非結合変異体を作製して p27kip1-KO 細胞に発現させ、一次線毛の形成能を回復するか検証したところ、野生型（WT）と同様の一次線毛形成能を持つことが分かった。また、p27kip1-KO 細胞に RhoA や stathmin の過剰発現およびノックダウンをしても一次線毛の形成能を回復しないことも確認した。以上の結果より、p27kip1 による一次線毛の制御は、従来報告されている p27kip1 結合分子に依存しない可能性が示唆される。

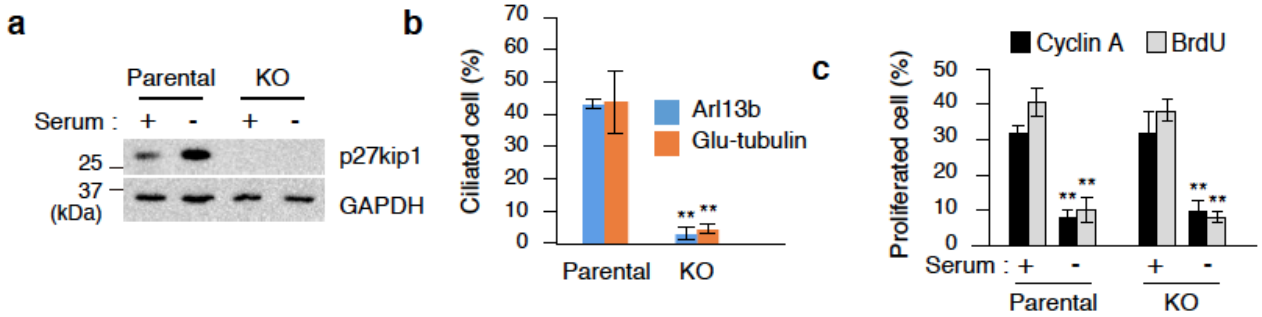


図 1. p27kip1-KO 細胞の一次線毛形成不全

a）親株 RPE1（parental）および p27kip1-KO 細胞の p27kip1 発現レベル

b）一次線毛マーカーArl13b と Glu-tubulin 陽性細胞の割合

c）細胞増殖マーカーcyclin A と BrdU の陽性細胞の割合

グラフは 3 回の実験の平均値±標準偏差で示してある。Student *t*-test, **P < 0.01。

2. p27kip1 の一次線毛制御領域の同定と結合タンパク質の探索

次に、p27kip1 の一次線毛形成に関与する領域の探索を進めた。図 2 に示すように、種々の deletion 変異体を作製し、p27kip1-KO 細胞に発現させ、一次線毛の形成能を検討した。検討の結果、少なくとも 86～140 アミノ酸（aa）領域を含む変異体に一次線毛の形成能を回復させることが分かった。

そこで、p27kip1 の 86～140 aa に結合するタンパク質を FLAG 共免疫沈降と質量分析法により探索した結果、Hsc70（Heat Shock Cognate Potein 71 kDa）を同定した。p27kip1 のノックダウンも一次線毛の形成を抑制すること、精製タンパク質を用いた *in vitro* アッセイにおいて、Hsc70-Hsp40 複合体が p27kip1 の ATP アーゼ活性を促進させることが判明した。

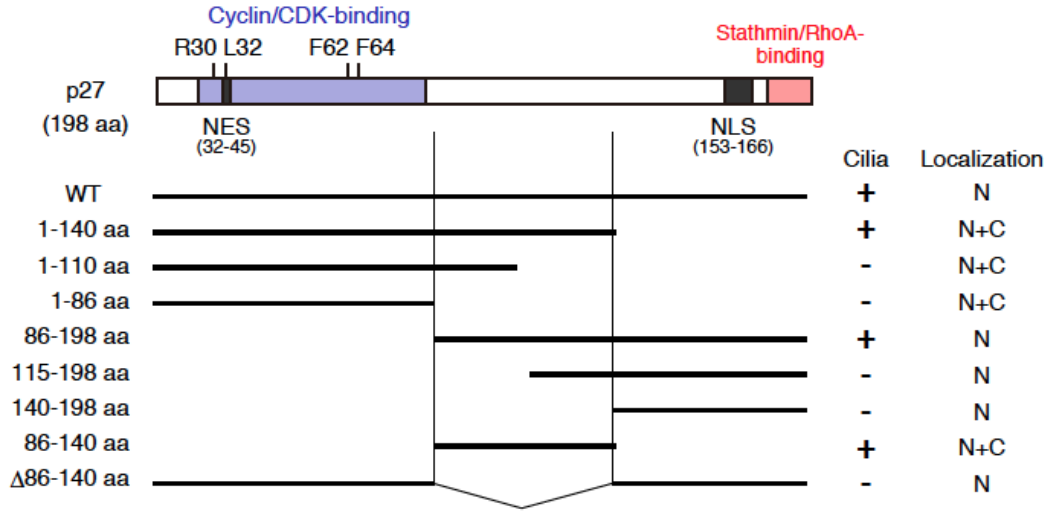


図 2. p27kip1 の一次線毛の形成に関与する領域の探索

上）p27kip1の全長（198 aa）と機能領域; cyclin/CDK結合領域（青）、stathmin/RhoA結合領域（赤）、NEB: 核外移行シグナル、NLS: 核内移行シグナル。

下）p27kip1の各変異体及び、p27kip1-KO細胞に発現させた時の一次線毛形成能の回復の有無（cilia：＋もしくはー）と、細胞内局在（Localization）N：核、C：細胞質。

3. 電子顕微鏡による p27kip1 ノックアウト細胞の解析

一次線毛の形成過程は、以下のような段階的な進行を示すことが電子顕微鏡を用いた解析で明らかにされている。1. 中心小体に小胞（CV：ciliary vesicle）が輸送され、2. CV は融合して徐々に大きくなる。3. 巨大化した CV は中心小体から伸長する軸糸に押し上げられ湾曲し、4. 最終的に細胞膜と融合して一次線毛が細胞外に突起する。血清飢餓 48 時間後の p27kip1-KO 細胞を電子顕微鏡で観察した結果、1. の段階もしくは、それ以前の段階の状態で止まっていることが明らかとなった（図 3）すなわち、p27kip1-KO 細胞は、一次線毛形成の極めて初期の段階である小胞が中心小体に輸送される段階が阻害されていることが分かった。

我々は今回、p27kip1-KO 細胞を解析した結果、p27kip1 が一次線毛の形成に必要不可欠であることを発見した。さらに、従来報告されている p27kip1 の結合分子である cyclin/CDK、RhoA、stathmin は関係ないことが明らかとなり、p27kip1 の新たな結合分子による一次線毛の制御が示唆された。さらに、一次線毛の制御には p27kip1 の 86～140 aa が重要であることが判明し、その領域に結合する分子として Hsc70 を同定した。Hsc70 のノックダウンは、一次線毛の形成を抑制したことから、p27kip1-Hsc70 による一次線毛の制御機構が示唆されるが、詳細は今後の研究成果が待たれる。

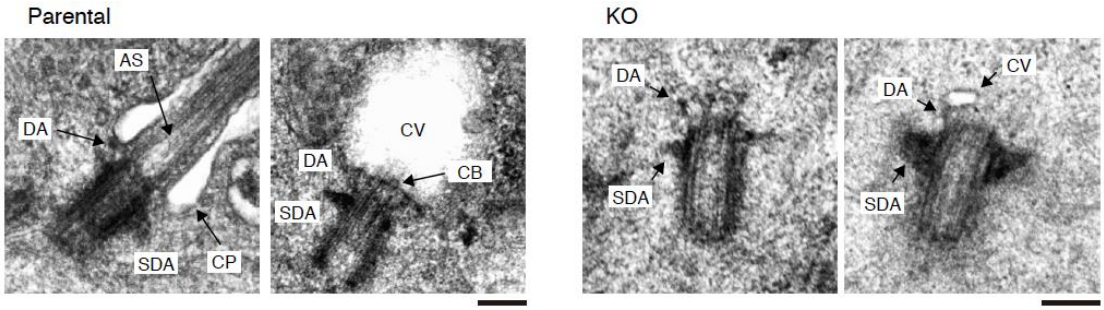


図 3. p27kip1-KO 細胞の電子顕微鏡解析

血清飢餓48時間後の親株RPE1（parental、左）とp27kip1-KO細胞（右）の中心小体の電子顕微鏡写真。AS：axoneme shaft、DA：distal appendage、SDA：subdistal appendage、CP：ciliary pocket、CV：ciliary vesicle、CB：ciliary bud。スケールバー 200 nm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、三重大学大学院医学系研究科分子生理学分野の稲垣昌樹博士、神経再生医学・細胞情報学分野の溝口明博士、王淑杰博士、国立がん研究センター発がん・予防研究分野の清野透博士、広島大学原爆放射線医科学研究所ゲノム障害医学研究センターの松浦伸也博士、宮本達雄博士である。RhoA の cDNA は、名古屋大学大学院医学系研究科神経情報薬理学の貝淵弘三博士より分与された。

文　献

1） 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. 2012 Apr 30;197(3):391-405. doi: 10.1083/jcb.201106101. Epub 2012 Apr 23. PMID: 22529102

2） Kasahara K, Kawakami Y, Kiyono T, Yonemura S, Kawamura Y, Era S, Matsuzaki F, Goshima N, Inagaki M. Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension. Nat Commun. 2014 Oct 1;5:5081. doi: 10.1038/ncomms6081. PMID: 25270598

3） Kasahara K, Aoki H, Kiyono T, Wang S, Kagiwada H, Yuge M, Tanaka T, Nishimura Y, Mizoguchi A, Goshima N, Inagaki M. EGF receptor kinase suppresses ciliogenesis through activation of USP8 deubiquitinase. Nat Commun. 2018 Feb 22;9(1):758. doi: 10.1038/s41467-018-03117-y. PMID: 29472535

4） Izawa I, Goto H, Kasahara K, Inagaki M. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. Cilia. 2015 Dec 29;4:12. doi: 10.1186/s13630-015-0021-1. eCollection 2015. Review. PMID: 26719793