

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04347

研究課題名(和文)細胞周期依存的な一次繊毛の形成・崩壊機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of cell cycle-dependent primary cilium formation and degradation

研究代表者

水野 健作(Mizuno, Kensaku)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70128396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期依存的な一次繊毛形成を制御する分子機構を解明することを目的として研究を実施し、以下のことを見出した。1) NDR2はC末端配列依存的にペルオキシソームに局在し、このことが繊毛形成に関与する。2) 繊毛形成に必須のキナーゼTTBK2はCep164との結合によって活性化される。3) アクチン重合促進剤JasplakinolideはYAPの不活性化を介して繊毛形成を誘導する。4) グルコース飢餓やmTORC1の不活性化はp27KIP1の発現上昇を介して繊毛形成を誘導する。5) 増殖抑制刺激によってCep97はユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia are antenna-like sensory organelle that transmit various extracellular signals. Primary cilium formation is correlated with the exit from the cell cycle. In this project, we aimed to elucidate the mechanisms underlying cell-cycle-dependent primary cilium formation and obtained several findings as follows: 1) NDR2 localizes to peroxisomes in a manner dependent on the C-terminal GKL sequence, and this localization is required for its function in ciliogenesis. 2) The protein kinase activity of TTBK2 is promoted by the binding of the centrosomal protein Cep164. 3) Jasplakinolide, a potent inducer of actin polymerization, promotes ciliogenesis through cell rounding and YAP inactivation. 4) Glucose deprivation induces ciliogenesis through mTORC1 inactivation and p27KIP1 upregulation. 5) Cep97, a suppressor of primary cilium formation, is degraded upon serum starvation by the ubiquitin-proteasome system.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：一次繊毛 細胞周期 TTBK2 NDR2 アクチン

1. 研究開始当初の背景

多くの動物細胞は、増殖休止期に、細胞膜上に非運動性の一次繊毛を形成する。一次繊毛の膜表面にはイオンチャネルや受容体が集積しており、一次繊毛は、細胞外からの化学的・機械的シグナルを受容するアンテナとして、細胞の増殖・分化の制御や組織の形態形成、恒常性維持において重要な役割を担っている。一次繊毛の形成不全は嚢胞腎、網膜変性症、内臓逆位、多指症や Bardet-Biedl 症候群など繊毛病と総称される疾患の原因であることが明らかにされ、一次繊毛形成の分子機構の解明は医学的にも重要な研究課題である。一般に、一次繊毛は細胞休止期に形成され、増殖相では崩壊することが知られている。中心体は分裂期には紡錘体極として機能するが、増殖抑制シグナルによって細胞が休止期(G0期)へ移行すると、母中心小体遠位での繊毛小胞の形成、繊毛小胞と細胞膜の融合、軸系微小管の伸長等の諸過程が運動的に起こり、中心体は基底小体へと変換され、一次繊毛が細胞膜上に形成される。増殖相へ再入すると、繊毛は速やかに消失し、基底小体は細胞膜から解離し、紡錘体極として機能する。このように、一次繊毛形成と細胞周期の進行は相反すると考えられているが、細胞周期依存的な繊毛の形成と崩壊を制御する分子機構は未だ不明である。私達はこれまで、増殖抑制シグナルである Hippo 経路の下流キナーゼ NDR や、繊毛病に関わるキナーゼ TTBK2 の繊毛形成における役割を明らかにしてきた。本研究では、これらのキナーゼの一次繊毛形成における機能と活性化機構をはじめとして、細胞周期依存的な一次繊毛の形成と崩壊に関わるシグナル伝達経路を解明することを目指して、研究を行った。

2. 研究の目的

一次繊毛は細胞休止期に形成され、増殖期には消失するが、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構は未だ不明である。血清飢餓、接触阻害などの増殖抑制刺激によって一次繊毛形成が誘導されること、増殖抑制刺激によって Tau-tubulin kinase 2 (TTBK2) キナーゼが活性化され、一次繊毛形成阻害因子である CP110、Cep97 が中心体から除去されることが知られている。しかし、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成過程における TTBK2 の活性化機構、CP110、Cep97 の除去機構など、その詳細は不明である。本研究では、血清飢餓のような増殖抑制刺激による TTBK2 の活性化機構や CP110、Cep97 の除去機構を解明し、細胞周期依存的な一次繊毛の形成と崩壊を制御する中心的なシグナル経路を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、細胞周期依存的な一次繊毛の形成機構を解明するため、一次繊毛形成に関与する 2 種のプロテインキナーゼ NDR2 と

TTBK2 の活性化機構を解析した。NDR2 については、その細胞内局在を解析し、一次繊毛形成における NDR1 との機能的相違を解析した。TTBK2 については、分子内相互作用によるキナーゼ活性阻害機構と、Cep164 による分子内阻害の解除機構について解析した。また、アクチン脱重合によって、一次繊毛形成が誘導されるという報告があることから、アクチン重合促進剤である Jasplakinolide (Jasp) の一次繊毛形成に対する効果を解析した。その結果、Jasp も一次繊毛形成を誘導することを見出し、その機構を解析した。また、一次繊毛形成は様々なストレスによって形成されることから、栄養飢餓ストレスによって一次繊毛形成が誘導されるかを解析した。グルコース飢餓によって一次繊毛形成が誘導されることを見出し、その分子機構を解析した。さらに、血清飢餓による一次繊毛形成において中心的な役割を持つ CP110 と Cep97 の母中心小体からの除去機構について、プロテアソーム阻害剤である MG-132 の効果を解析し、血清飢餓刺激において、ユビキチン-プロテアソーム系依存的に Cep97 の分解が亢進されることを見出した。

4. 研究成果

(1) NDR2 のペルオキシソーム局在とその一次繊毛形成における機能：

NDR は細胞増殖抑制シグナルの下流で活性化されるセリン/スレオニンキナーゼであり、哺乳類では NDR1 と NDR2 の類似した 2 種類のキナーゼが別の遺伝子にコードされている。NDR2 の発現抑制は一次繊毛形成を抑制するが、NDR1 の発現抑制は影響しないことから、NDR2 のみが一次繊毛形成に関与していると考えられる。しかし、NDR1 と NDR2 の一次繊毛形成における機能の違いの原因は不明である。本研究では、NDR1 と NDR2 の細胞内局在を解析し、NDR1 は細胞内に拡散しているのに対して、NDR2 はペルオキシソームに局在することを明らかにした。NDR1 と NDR2 の C 末端配列が AK と GKL であること、NDR2 の C 末端配列 GKL がペルオキシソーム局在化配列 (PTS1) である SKL に類似していることから、NDR1 の C 末端にロイシンを付加した変異体 NDR1(+L) と、NDR2 の C 末端ロイシンを欠失した変異体 NDR2(-L) を作製し、それらの細胞内局在と機能を解析した。NDR2 と NDR1(+L) はペルオキシソームに局在し、PTS1 の受容体である Pex5p と結合したが、NDR2(-L) と NDR1 は細胞内に拡散して存在し Pex5p との結合は認められなかった。さらに、NDR2 の発現抑制による一次繊毛形成の阻害は、NDR2 の発現によって回復したが、NDR2(-L) の発現によって回復しなかった。以上の結果から、NDR2 は C 末端の GKL 配列を介してペルオキシソームに局在すること、NDR2 のペルオキシソームへの局在は一次繊毛形成に必要であることが示唆された。本研究により、NDR1 と NDR2 の機能的相違性の機構が示された。

(2) Cep164 による TTBK2 の活性化機構：

TTBK2 は一次繊毛形成時に Cep164 との結合依存的に母中心小体へと局在化するが、その活性化の分子機構は不明である。TTBK2 は、全長よりもキナーゼドメインを含む N 末端断片の方がキナーゼ活性が高いこと、TTBK2 の N 末端断片と C 末端断片が直接結合することから、TTBK2 は分子内結合により活性が阻害されている可能性が考えられる。Cep164 は TTBK2 の C 末端領域に結合することから、Cep164 の結合によって TTBK2 の N 末端側と C 末端側の結合が解離し、活性化される可能性について検討した。その結果、Cep164 を加えると TTBK2 の N 末端側と C 末端側の結合が解離することが明らかになった。また、Cep164 を加えると、TTBK2 のキナーゼ活性が上昇する様子が示された。これらの結果から、TTBK2 の C 末端側は N 末端側と結合することで TTBK2 のキナーゼ活性を抑制しており、Cep164 はこの分子内結合を解離することで TTBK2 のキナーゼ活性を促進していることが示唆された。

(3) アクチン重合促進剤 Jasplakinolide による一次繊毛形成：

アクチン脱重合剤であるサイトカラシン D やラトランキュリン B によって、低細胞密度や血清存在下といった増殖促進条件下であっても一次繊毛形成が誘導されることが示されており、アクチン脱重合が一次繊毛形成を惹起することが示されている。私達は、アクチン重合剤である Jasplakinolide (Jasp) がアクチン脱重合剤と同様に、低細胞密度、血清存在下で培養した RPE1 細胞の一次繊毛形成を誘導することを見出した。Jasp で処理すると細胞が丸く変形し、一次繊毛形成が引き起こされるが、高密度に培養した細胞では細胞の変形が起こらず、一次繊毛形成も促進されなかったことから、Jasp 処理による一次繊毛形成は、細胞の変形と相関していることが示唆された。さらに、Jasp 処理による細胞の変形によって、YAP のリン酸化、細胞質移行、不活性化が引き起こされた。一方、YAP の恒常活性化型の過剰発現によって Jasp 処理による一次繊毛形成が抑制されたことから、この過程には YAP の不活性化が必要であることが示唆された。しかし、YAP をリン酸化する主要キナーゼである LATS1/2 やその上流キナーゼである MST1/2 を発現抑制させても、Jasp 処理による一次繊毛形成には影響しなかったことから、Jasp 処理による YAP の不活性化と一次繊毛形成には LATS1/2 とは異なるキナーゼが関与している可能性が示唆された。さらに私たちは、Src キナーゼの過剰発現が Jasp 処理による一次繊毛形成を抑制し、YAP の活性を部分的に回復させることを見出した。以上の結果から、Jasp による一次繊毛形成においては、細胞の変形や細胞接着の低下とそれに伴う Src の不活性化が関与し

ていることが明らかとなった。また、増殖抑制刺激依存的な YAP の不活性化や一次繊毛形成において、アクチンの脱重合は必須の条件ではないことも明らかになった。

(4) グルコース飢餓と mTORC1 の不活性化による一次繊毛形成：

培地中の栄養成分が一次繊毛形成に与える影響を検証するために、ヒト網膜色素上皮由来 RPE1 細胞をグルコース不含培地で培養した結果、一次繊毛形成が誘導されることを見出した。さらに、培地中のグルコース濃度の低下による一次繊毛形成は、細胞内の栄養状態に応じて細胞の増殖や代謝を調節することが知られている mTORC1 の不活性化を介して誘導されることを明らかにした。mTOR は培地中のグルコース濃度に応じて活性化されるプロテインキナーゼであり、mTORC1 と呼ばれる機能的な複合体を形成して S6K1 などの基質のリン酸化を介してタンパク質の翻訳や細胞の増殖を正に制御することが知られている。私達は、mTORC1 のキナーゼ活性の低下が一次繊毛形成に与える影響を検証するために、RPE1 細胞を mTORC1 阻害剤であるラパマイシンで処理したところ、血清存在下にも関わらず、一次繊毛形成が引き起こされることを見出した。さらに、ラパマイシンで処理した RPE1 細胞では、サイクリン依存性キナーゼの阻害を介して G1-S 期の進行を停止させるタンパクである p27Kip1 の量が上昇した。MEF 細胞にラパマイシンを処理した結果、野生型 MEF 細胞では一次繊毛形成が誘導された一方で、p27Kip1^{-/-} の MEF 細胞では一次繊毛形成率の誘導が見られなかった。以上の結果から、培地中のグルコースの欠乏は mTORC1 の不活性化とそれに続く p27Kip1 の発現上昇を介して細胞周期を停止させ、その結果、一次繊毛形成が促進されることが示唆された。

(5) 増殖抑制刺激依存的な一次繊毛形成における Cep97 の分解：

中心体タンパク質 CP110 と Cep97 は、増殖相では母中心小体および娘中心小体に共局在し、増殖相での異常な一次繊毛形成を抑制している。細胞が増殖抑制条件下にさらされると、CP110、Cep97 は母中心小体から除去され、一次繊毛形成が誘導される。しかし、増殖抑制刺激依存的な一次繊毛形成時における CP110、Cep97 の除去機構はほとんど明らかでなかった。本研究では、CP110、Cep97 の除去機構を明らかにするためにユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解機構に着目した。RPE1 細胞を高密度で培養し、血清飢餓刺激およびプロテアソーム阻害剤である MG-132 を同時に加え、CP110、Cep97 のタンパク質の量を検出した。その結果、MG-132 処理をしない場合には Cep97 の量が時間依存的に減少すること、また、MG-132 処理によってその量が顕著に増加することが明

らかとなった。さらに、増殖抑制条件下における、MG-132 処理による Cep97 の局在変化を細胞染色によって観察した。コントロールの細胞では Cep97 が娘中心体のみ局在する様子が観察されたが、MG-132 を処理した細胞では Cep97 が中心体近傍に強く集積する様子が観察された。そこで、Cep97 に対する *in vivo* ubiquitination assay を行った結果、Cep97 が細胞内でユビキチン化修飾を受けることが明らかになった。以上の結果から、Cep97 は増殖抑制条件下においてユビキチン・プロテアソーム依存的に分解されることが示唆された。さらに、Cep97 ユビキチン化の重要性を確かめるため、ユビキチン化されない変異体を作製し、この変異体の過剰発現による一次繊毛形成および CP110 の母中心小体からの除去に対する効果を定量した結果、野生型の Cep97 に比べて、一次繊毛形成および CP110 除去が有意に抑制された。以上の結果から、Cep97 のユビキチン化は、母中心小体からの CP110 の除去を介した一次繊毛形成過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Takahashi, K., Nagai, T., Chiba, S., Nakayama, K., and Mizuno, K., Glucose deprivation induces primary cilium formation through mTORC1 inactivation, *J. Cell Sci.*, 査読有, 131 巻, 2018, jcs208769, doi:10.1242/jcs.208769.

Nagai, T., and Mizuno, K., Jasplakinolide induces primary cilium formation through cell rounding and YAP inactivation, *PLoS One*, 査読有, 12 巻, 2017, e0183030, doi: 10.1371/journal.pone.0183030.

Abe, S., Nagai, T., Masukawa, M., Okumoto, K., Homma, Y., Fujiki, Y., and Mizuno, K., Localization of protein kinase NDR2 to peroxisomes and its role in ciliogenesis, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 292 巻, 2017, 4089-4098, doi: 10.1074/jbc.M117.775916.

Konotop, G., Bausch, E., Nagai, T., Turchinovich, A., Becker, N., Benner, A., Boutros, M., Mizuno, K., Krämer, A., and Raab, M. S., Pharmacological inhibition of centrosome clustering by slingshot-mediated cofilin activation and actin cortex destabilization, *Cancer Res.*, 査読有, 76 巻, 6690-6700, 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1144.

Amagai, Y., Itoh, T., Fukuda, M., and Mizuno, K., Rabin8 suppresses autophagosome formation independently of its guanine nucleotide-exchange activity toward Rab8, *J. Biochem.*, 査読有, 158 巻, 2015, 139-153, doi: 10.1093/jb/mvv032.

〔学会発表〕(計 15 件)

高橋 健悟、永井 友朗、水野 健作、グルコース飢餓ストレスによる一次繊毛形成は mTORC1-p27Kip1 経路を介する、日本生化学会東北支部 第 83 回例会、2017

増川 萌瑛、阿部 彰子、永井 友朗、奥本 寛治、本間 悠太、藤木 幸夫、水野 健作、NDR2 のペルオキシソーム膜への局在と一次繊毛形成における役割、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017

山添 隆史、梅田 真也、菅谷 優子、永井 友朗、水野 健作、中心体タンパク質 Cep104 の微小管重合活性と一次繊毛形成における役割、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017

高橋 健悟、永井 友朗、水野 健作、mTORC1 の不活性化は一次繊毛を促進するが、繊毛の長さを短くする、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017

向山 祥帆、永井 友朗、水野 健作、増殖抑制刺激依存的な一次繊毛形成における Cep97 の分解の役割、第 40 回日本分子生物学会年会、2017

山添 隆史、梅田 真也、菅谷 優子、永井 友朗、水野 健作、Cep104 は微小管重合活性を持ち一次繊毛の伸長に寄与する、第 40 回日本分子生物学会年会、2017

永井 友朗、水野 健作、Jasplakinolide による細胞の球状化は YAP を不活性化し一次繊毛形成を惹起する、第 68 回日本細胞生物学会大会、2016

T. Nagai, K. Mizuno, Jasplakinolide induces primary cilium formation via cell rounding and YAP inactivation, The 28th CDB Meeting, Cilia and Centrosomes: Cilia and Centrosomes: Current Advances and Future Directions (国際学会)、2016

高橋 健悟、永井 友朗、水野 健作、mTOR の不活性化を介したグルコース飢餓ストレスによる一次繊毛形成、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

T. Nagai, K. Mizuno, Jasplakinolide-induced cell rounding provokes ciliogenesis, 2016 ASCB Annual Meeting Program (国際学会)、2016

永井 友朗、小田 聡明、千葉 秀平、水野 健作、細胞増殖抑制時の一次繊毛形成における TTBK2 キナーゼの機能解析、日本生化学会東北支部 第 81 回例会・シンポジウム、2015

水野 健作、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構、第 67 回日本細胞生物学会、2015

阿部 彰子、永井 友朗、藤木 幸夫、水野 健作、一次繊毛形成制御キナーゼ NDR は C 末端 GKL モチーフを介してペルオキシソームに局在化する、第 67 回日本細胞生物学会、2015

入江 和樹、Alfredo M. Torres、永井 友朗、水野 健作、Furry は YAP のリン酸化と局在を制御する、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会、2015

永井 友朗、高橋 健悟、向山 祥帆、水野健作、Jasplakinolide による細胞の球状化は一次繊毛形成を誘導する、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学大会、2015

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/

6．研究組織

(1)研究代表者

水野 健作 (MIZUNO KENSAKU)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70128396