

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06192

研究課題名(和文) 一次繊毛を介して組織発生を制御する新規リン酸化酵素DYRK2の標的分子解明

研究課題名(英文) Roles of DYRK2 Kinase in Controlling Development via Primary Cilia

研究代表者

吉田 彩舟 (YOSHIDA, SAISHU)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40772744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織発生の制御メカニズムの理解は、奇形疾患だけでなく腫瘍形成の理解にもつながる。本研究では、新規に同定した発生関連分子であり、一次繊毛に局在する「リン酸化酵素Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2)」の機能解析を実施した。インタラクトームをはじめとするオミックス解析の結果、DYRK2はHedgehogシグナル活性化制御機構のブラックボックスを解消する「正のレギュレーター」であることを、分子レベル・マウス個体レベルで証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hedgehogシグナルの異常活性は、奇形疾患だけでなく、髄芽腫や基底細胞がんをはじめとする腫瘍形成を促進する。本研究から、これまでブラックボックスであったSmoothed (SMO)下流のHedgehogシグナル活性化機構とその責任分子(DYRK2)を同定した。本研究成果をもとに、現行のHedgehog阻害薬 (Vismodegib/Sonidegib)とは作用点の異なる、新たな創薬シーズの開発へ応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：Understanding the control mechanisms of tissue development not only contributes to the comprehension of developmental disorders but also to the understanding of tumor formation. In this study, we conducted functional analysis of Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2), a newly identified developmental-related molecule localized to primary cilia. Omics analyses, including interactome, revealed that DYRK2 acts as a "positive regulator" in the control mechanism of Hedgehog signaling activation, thereby elucidating critical gaps of the Hedgehog signaling.

研究分野：発生生物学

キーワード：Hedgehogシグナル 一次繊毛 GLI2/GLI3 DYRK2 髄芽腫 基底細胞がん

1. 研究開始当初の背景

組織発生メカニズムの理解は、基礎的な生物学の理解だけでなく、奇形疾患や発がんといった疾患機序の理解と治療法開発につながる。近年、細胞に1本だけ存在する細胞小器官「一次繊毛」の組織発生における重要性が明らかになってきた。したがって、新規の一次繊毛制御因子の同定は、組織発生の制御機序、さらに、それらの異常による奇形疾患(繊毛病)、さらに、がんの発症機序を理解する手がかりになる。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類における新規の発生制御因子として機能同定したリン酸化酵素 Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) に関し、その分子機序の解明を目的とする。特に DYRK2 が哺乳類の細胞に1本だけ存在する細胞小器官「一次繊毛」の関連部位に局在することに注目し、DYRK2 のリン酸化基質を同定、組織発生ならびに発がんにおける DYRK2 の機能解析を目指す。

3. 研究の方法

- (1) DYRK2 の相互作用分子の探索
近位依存性ビオチン標識系 (BioID) と質量分析を組み合わせた BioID-MS により、DYRK2 の相互作用分子を網羅的に探索した。
- (2) DYRK2 のリン酸化基質の同定
同定した DYRK2 の相互作用分子の中から、Hedgehog シグナルに関連するリン酸化基質を選抜した。Ser/Ala 変異体を用いて、生化学的にリン酸化サイトを同定した。また、同定したリン酸化サイトに対するリン酸化特異抗体を作出した。
- (3) DYRK2 によるリン酸化の生物学的意義の解析
DYRK2 によるリン酸化の生物学的意義を、生化学的手法 (Biacore) ならびに、培養細胞と DyRK2 欠損マウス由来の初代細胞を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) DYRK2 のリン酸化基質として、Hedgehog シグナルの中核的制御因子 GLI2/GLI3 を同定

網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) ならびに相互作用分子探索 (BioID-MS) (図 1A) をはじめとするオミックス解析から、DYRK2 の新規なリン酸化基質として、Hedgehog シグナル制御の中核を担う転写因子 GLI2/GLI3 を同定した (図 1B)。

さらに、変異体を用いた生化学的解析から、GLI2/GLI3 の分子間、ならびに生物種間で高度に保存されたリン酸化サイト (GLI2^{S252}/GLI3^{S313}) を同定した (図 2)。

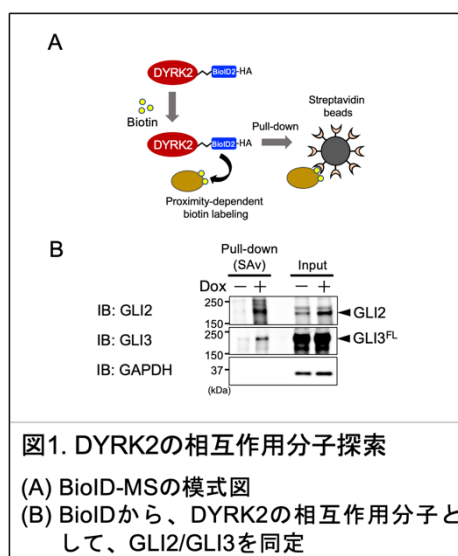


図1. DYRK2の相互作用分子探索

(A) BioID-MSの模式図

(B) BioIDから、DYRK2の相互作用分子として、GLI2/GLI3を同定

(2) DYRK2 によるリン酸化 GLI2^{S252}/GLI3^{S313} の生物学的意義の解析

次に、DYRK2 によるリン酸化 (GLI2^{S252}/GLI3^{S313}) の誘導条件を検証した。その結果、DYRK2 によるリン酸化は、Hh リガンド刺激により G タンパク質共役受容体である Smoothened (SMO) が活性化されることに依存して誘導されることを見出した (図 3)。

さらに、DYRK2 によるリン酸化は、GLI2/GLI3 に結合する抑制性のアダプター(SUFU)を乖離させ活性型 GLI2/GLI3 へ変換すること(図 4A)、さらに、活性型 GLI2/GLI3 の核移行を促進すること(図 4B)を見出した。

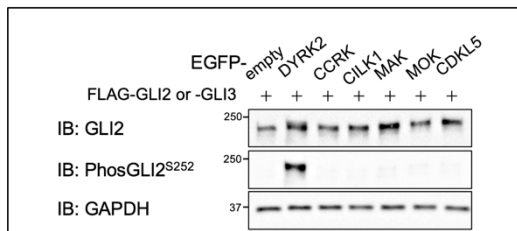


図2. DYRK2によるGLI2/GLI3のリン酸化
 作出したリン酸化GLI2^{S252}/GLI3^{S313}抗体を用いた解析から、DYRK2の過剰発現は、GLI2^{S252}/GLI3^{S313}のリン酸化を誘導することを示した。

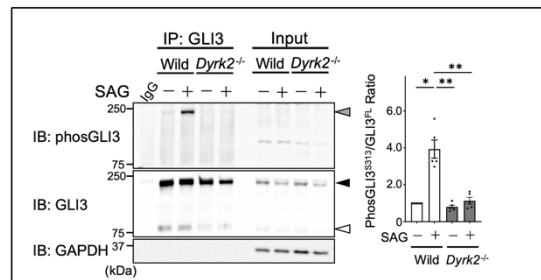


図3. リン酸化GLI2^{S252}/GLI3^{S313}の誘導条件
 DYRK2によるGLI2/GLI3のリン酸化は、SMOの活性化に依存して誘導される。

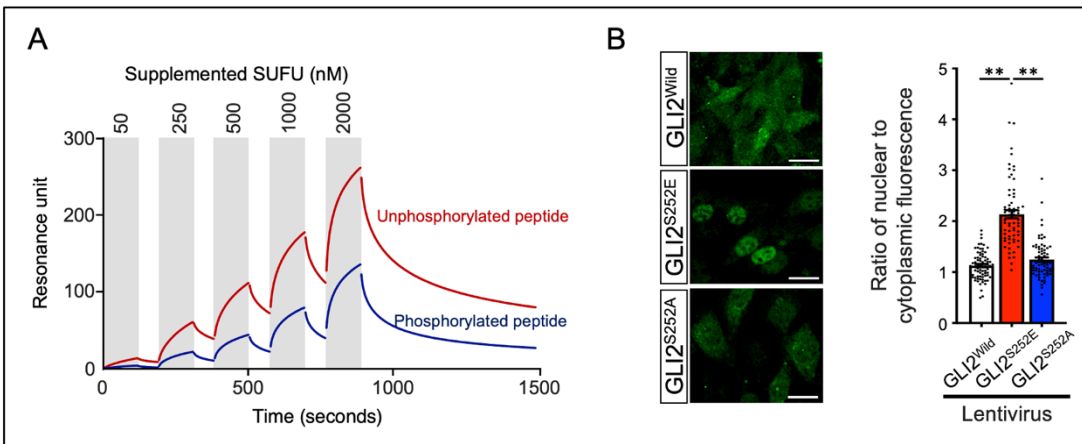


図4. リン酸化GLI2^{S252}/GLI3^{S313}は、SUFUの解離と核移行を促進する
 (A) GLI3^{S313}のリン酸化によるSUFUとGLI3の結合性評価 (Biacore)
 (B) GLI2^{S252}のリン酸化による、GLI2の核移行率

(3) DYRK2 によるリン酸化 GLI2^{S252} の四肢形成における機能解析

四肢発生における DYRK2 の機能を、Dyrk2 欠損マウス胚の初代培養細胞に対し、GLI2^{S252} リン酸化をミミックしたコンストラクト(GLI2^{S252E})を導入することで評価した。その結果、GLI2^{S252E} は、Hedgehog シグナルの活性化と細胞増殖の回復を誘導することを確認した。

以上の解析から、DYRK2 がこれまでブラックボックスであった SMO 下流における Hedgehog シグナル活性化を制御する「正のレギュレーター」であることを明らかにした。本研究結果は、原著論文[Yoshida et al., PNAS (2024)]として発表した。

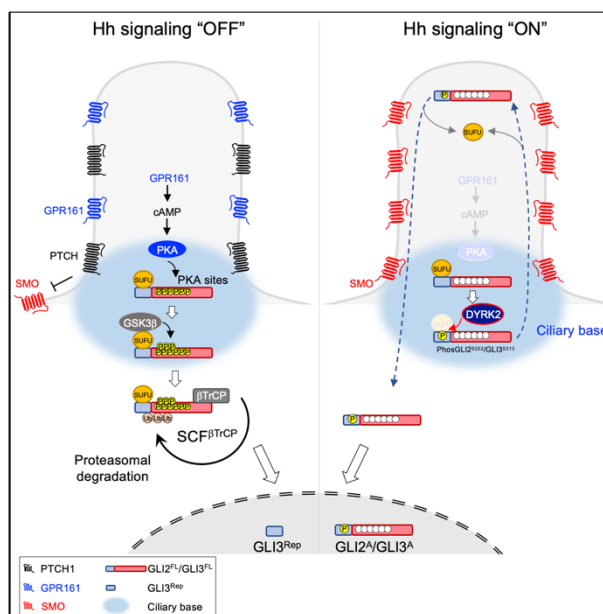


図5. SMO下流におけるHedgehogシグナル活性化機序の模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Yoshida S, Kawamura A, Aoki K, Wiryasermkul P, Sugimoto S, Tomiyoshi J, Tajima A, Ishida Y, Katoh Y, Tsukada T, Tsuneoka Y, Yamada K, Nagamori S, Nakayama K, Yoshida K	4. 巻 in press
2. 論文標題 Positive regulation of Hedgehog signaling via phosphorylation of GLI2/GLI3 by DYRK2 kinase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Harada E, Yoshida S, Imaizumi Y, Kawamura A, Ohtsukab T, Yoshida K	4. 巻 1868
2. 論文標題 Dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2 exerts anti-tumor effects by induction of G1 arrest in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BBA - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2024.130600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawamura A, Yoshida S, Yoshida K	4. 巻 NA
2. 論文標題 The Diverse Functions of DYRK2 in Response to Cellular Stress	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 18744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Horiguchi K, Tsutsui Y, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S	4. 巻 69
2. 論文標題 Fluctuation of CD9/SOX2-positive cell populations during the turnover of GH- and TSH-producing cells in the adult anterior pituitary gland	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 308-316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2023-023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato Y, Yoshida S, Kato T	4. 巻 394
2. 論文標題 Missing pieces of the pituitary puzzle: Participation of extra-adenohypophyseal placode-lineage cells in the adult pituitary gland	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 487-496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-023-03829-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada K, Hannya Y, Oikawa T, Yoshida A, Katagiri K, Yoshida S, Koizumi R, Tago N, Shimoyama Y, Kawamura A, Mochimaru Y, Eto K, Yoshida K	4. 巻 28
2. 論文標題 Extended-Synaptotagmin 1 Enhances Liver Cancer Progression Mediated by Cancer-Related Unconventional Protein Secretion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules28104033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimoyama Yuya, Yamada Kohji, Yoshida Saishu, Kawamura Akira, Hannya Yoshito, Imaizumi Yuta, Kumamoto Tomotaka, Takeda Yasuhiro, Shimoda Masayuki, Eto Ken, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 114
2. 論文標題 Inhibition of protein kinase C delta leads to cellular senescence to induce anti tumor effects in colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2213-2692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Kohji, Motohashi Saya, Oikawa Tsunekazu, Tago Naoko, Koizumi Rei, Ono Masaya, Tachibana Toshiaki, Yoshida Ayano, Yoshida Saishu, Shimoda Masayuki, Oka Masahiro, Yoneda Yoshihiro, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 119
2. 論文標題 Extended-synaptotagmin 1 engages in unconventional protein secretion mediated via SEC22B ⁺ vesicle pathway in liver cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2202730119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2202730119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 HORIGUCHI Kotaro, FUJIWARA Ken, TSUKADA Takehiro, NAKAKURA Takashi, YOSHIDA Saishu, HASEGAWA Rumi, TAKIGAMI Shu	4. 巻 68
2. 論文標題 Differentiation of stem progenitor CD9/SOX2-positive cells is promoted with increased prolactin-producing and endothelial cells in the pituitary	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 278 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 吉田 彩舟, 吉田 清嗣	4. 巻 94
2. 論文標題 一次繊毛を介し組織発生を制御するCMGCキナーゼ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 590-593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.94059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Akira, Yoshida Saishu, Aoki Katsuhiko, Shimoyama Yuya, Yamada Kohji, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 135
2. 論文標題 DYRK2 maintains genome stability via neddylation of cullins in response to DNA damage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S	4. 巻 388
2. 論文標題 The multiciliated cells in Rathke's cleft express CYP26A1 and respond to retinoic acid in the pituitary.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell and tissue research	6. 最初と最後の頁 583-594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-022-03614-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Saishu, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 10
2. 論文標題 New insights into the roles for DYRK family in mammalian development and congenital diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Diseases	6. 最初と最後の頁 758-770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gendis.2021.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imaizumi Yuta, Yoshida Saishu, Kanegae Yumi, Eto Ken, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 113
2. 論文標題 Enforced dual specificity tyrosine regulated kinase 2 expression by adenovirus mediated gene transfer inhibits tumor growth and metastasis of colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 960 ~ 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yukio, Yoshida Saishu, Kato Takako	4. 巻 386
2. 論文標題 New insights into the role and origin of pituitary S100 -positive cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 227 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-021-03523-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Nakakura T, Yoshida S, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S	4. 巻 156
2. 論文標題 CD9-positive cells in the intermediate lobe migrate into the anterior lobe to supply endocrine cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 301 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-02009-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田彩舟、河村明良、恒岡洋右、塚田岳大、中倉敬、Pattama Wiriyasermkul、甲斐亘、山田幸司、永森収志、吉田清嗣
2. 発表標題 一次繊毛制御因子DYRK2による下垂体の組織構築機構の解明
3. 学会等名 第97回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上周
2. 発表標題 下垂体前葉ホルモン産生細胞の増加時における成体組織幹細胞の関与
3. 学会等名 第129回日本解剖学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田彩舟、河村明良、恒岡洋右、塚田岳大、中倉敬、Pattama Wiriyasermkul、山田幸司、永森収志、吉田清嗣
2. 発表標題 下垂体の発生における一次繊毛制御因子DYRK2の機能解析
3. 学会等名 第47回比較内分泌学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、東森生、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 プロラクチン産生細胞増加時におけるCD9/SOX2陽性細胞の関与
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田彩舟、河村明良、恒岡洋右、塚田岳大、中倉敬、Pattana Wiriyasermkul、山田幸司、永森収志、吉田清嗣
2. 発表標題 一次繊毛制御因子DYRK2を介した下垂体の発生制御
3. 学会等名 第37回下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田彩舟
2. 発表標題 ISH chain reactionを用いたマウス下垂体の発生制御因子解析
3. 学会等名 第56回日本発生生物学会大会 ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側のMarginal Cell LayerにおけるTetraspanin 1の発現
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側のCD9陽性細胞は前葉へ移動する
3. 学会等名 第36回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田彩舟、中倉敬、藤原研、河村明良、吉田清嗣
2. 発表標題 一次繊毛を介した下垂体の発生制御機構の解析
3. 学会等名 第35回日本下垂体研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell LayerにおけるCD9/CD81/S100 /SOX2陽性細胞の機能
3. 学会等名 第35回日本下垂体研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 妊娠、泌乳期におけるラット下垂体前葉内プロラクチン産生細胞の増殖機構の解明
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体中葉側Marginal Cell Layer細胞によるホルモン産生細胞供給の可能性
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田彩舟
2. 発表標題 一次繊毛による下垂体の発生制御
3. 学会等名 第12回ペプチド・ホルモン研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀口幸太郎、藤原 研、塚田岳大、中倉 敬、吉田彩舟、長谷川瑠美、瀧上 周
2. 発表標題 ラット下垂体前葉内のCD9/SOX2陽性細胞は血管内皮細胞供給を担う
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Hedgehogシグナルの阻害剤	発明者 吉田彩舟、吉田清嗣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-059035	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------