

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22689008  
 研究課題名（和文） シグナル伝達の活性強度を加減調節するレオスタット分子NLKの機能と制御の解明  
 研究課題名（英文） Clarification of the function and regulation of the rheostat molecule NLK, which fine-tunes the activity strength of signal transduction.  
 研究代表者  
 石谷 太（ISHITANI TOHRU）  
 九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
 研究者番号：40448428

### 研究成果の概要（和文）：

NLK は種を越えて保存されたタンパク質リン酸化酵素であり、様々なシグナル伝達の活性強度を加減調節する能力を有する。私たちは本研究により、NLK が神経前駆細胞において転写因子 Lef1 のリン酸化を介して Wnt シグナルを増強し、これにより脊椎動物の脳組織のサイズ成長に貢献していることを明らかにした。また、NLK が自己リン酸化により活性化することや、タンパク質 DP1 が NLK の活性を抑制することなどを見いだした。本研究により NLK の新たな機能と制御が明らかになった。

### 研究成果の概要（英文）：

NLK is an evolutionarily conserved protein kinase, which fine-tunes the activity strength of various signal transduction systems. In this study, we discovered that NLK strengthen Wnt signaling activity by phosphorylating a transcription factor Lef1 in neural progenitor cells and this regulation contributes to the size expansion of vertebrate brain tissues. We also found that NLK autoactivates via its autophosphorylation and that DP1 protein inhibits NLK activity. Thus, we revealed new functions and regulations of NLK.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6800000	2040000	8840000
2011年度	6100000	1830000	7930000
2012年度	6100000	1830000	7930000
年度			
年度			
総計	19000000	5700000	24700000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般・細胞内シグナル伝達

キーワード：リン酸化、器官形成、がん、イメージング

#### 1. 研究開始当初の背景

Nemo-like kinase (NLK)は、種を越えて保存されたタンパク質リン酸化酵素である。申請者は、本研究開始以前に、NLK が様々なシグナル伝達経路の転写制御因子をリン酸化してその活性を変化させ、シグナル伝達強度の加減調節を行う、“シグナル伝達のレオ

スタット（加減抵抗器）分子”であることを明らかにしていた。例えば NLK は、ヒト培養細胞株 HEK293 及び HeLa において Lef1(Wnt シグナルの転写因子)をリン酸化することによりその DNA 結合能を低下させて Wnt シグナル活性を減弱させたり、転写因子 c-Myb をリン酸化することによりその安定性

を低下させたり)、転写因子 STAT3 をリン酸化してその活性を促進したり、転写制御因子 Notch1 をリン酸化することにより Notch1 の DNA 上における転写複合体形成を低下させ、Notch シグナルを減弱させたりする。しかしながら、これら NLK による基質リン酸化の脊椎動物個体における生理学的意義は殆ど明らかになっていない。研究開始以前に解明されていたのは、STAT3 リン酸化と Notch1 リン酸化がそれぞれ、中胚葉誘導と初期神経形成に必須であることのみである。

一方、NLK の制御下にある Wnt シグナルや Notch シグナルは、疾患の発症や幹細胞の運命制御に関わっている。このため、NLK の活性制御を自在に行うことができれば、新たな疾患治療技術や再生医療技術の開発に貢献しうると期待できる。しかしながら、NLK の活性制御機構は、本研究開始以前はほとんどわかっていなかった。また、NLK がどのような疾患の発症に関わっているかも明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、「①NLK によるシグナル活性制御の分子/細胞/組織/個体レベルにおける意義」、「②NLK の活性調節機構」、「③NLK の疾患への関与」の3項目の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

研究①では、組織構築（個体発生）過程における NLK による基質リン酸化/シグナル制御の時空間的動態と組織構築の統合的理解、研究②では、NLK の活性調節機構の解明、研究③では、NLK によるシグナル制御と大腸癌発症の関与解明を目標に研究を進める。特に①②の解析では、「(i)試験管内の反応や細胞株を用いた *in vitro* でのシグナル伝達解析」、「(ii)脊椎動物モデル“ゼブラフィッシュ”を用いた遺伝学的発生生物学的解析」、「(iii)シグナルを可視化したゼブラフィッシュを用いた *in vivo* でのシグナル伝達解析」を並行して行い、分子/細胞/組織/個体レベルにおける NLK の機能と制御の統合的理解を目指す。

## 4. 研究成果

(1) NLK は神経前駆細胞において Lef1 のリン酸化を介して Wnt シグナルを正に制御する (Ota et al. *EMBO Journal*, 2012)

Wnt シグナルは種を超えて保存されており、動物の組織構築/器官形成だけでなく、幹細胞性の維持や癌発生など様々な局面で重要な役割を担っている。私たちは以前、NLK がヒト培養細胞株 HEK293 及び HeLa において Lef1 をリン酸化してその DNA 結合能を低下させることにより Wnt シグナル活性を減弱させることを発見していた

(Ishitani et al., *Nature*, 1999; Ishitani et al., *MCB*, 2003)。しかしながら、その後十年近く、NLK による Lef1 リン酸化の動物生体内における生理学的意義は全く不明のままであった。

私たちは、Wnt シグナルを可視化したゼブラフィッシュ系統 TOPdGFP-fish を用いてこれを解析した。その結果、驚くべきことに、ゼブラフィッシュ NLK ホモログ Nlk2 が形成途中の中脳視蓋の神経前駆細胞において Lef1 のリン酸化を介して Wnt シグナルの活性を促進することがわかった。また、哺乳動物の神経前駆細胞様の細胞株である neuro-2a 細胞や PC12 細胞においても NLK が Lef1 のリン酸化を介して Wnt シグナルを促進することがわかった。詳細な解析により、NLK による Lef1 リン酸化は HEK293 細胞や HeLa 細胞においては Lef1 の標的遺伝子への結合を低下させるのに対し、neuro-2a 細胞や PC12 細胞、ゼブラフィッシュ中脳神経前駆細胞では標的遺伝子への結合には影響を与えずに Lef1 とその活性抑制因子 HDAC1 の結合を低下させることにより Lef1 の活性を促進することがわかった。さらに、neuro-2a 細胞や PC12 細胞、ゼブラフィッシュ中脳神経前駆細胞では、Wnt 分子の刺激によって NLK が活性化し、これにより Lef1 のリン酸化と Lef1 と HDAC1 の解離、それにつづく Lef1 の活性化が起きることがわかった。加えて、ゼブラフィッシュを用いた解析により、この Wnt-NLK-Lef1 経路が中脳の神経前駆細胞の増殖を促進し、これが中脳視蓋のサイズ拡大に貢献していることが明らかになった。

このように、NLK の新しい機能と神経組織構築における意義、および Wnt シグナルの新たな制御機構が明らかになった。

(2) 高感度 Wnt シグナルレポーターの作成 (Shimizu et al. *Developmental Biology*, 2012)

上述の研究では、NLK の新たな機能を明らかにできたが、NLK による Lef1 の負の制御の意義を明らかにすることはできなかった。これを解析するために、高感度 Wnt シグナルレポーターとそれを組み込んだゼブラフィッシュ系統を作成した。

(3) NLK の活性化と核局在には、NLK のホモ二量体形成が必須である (Ishitani et al. *Molecular Biology of the Cell*, 2011)

上述のように、NLK の活性制御機構はほとんどわかっていない。本研究で私たちは、NLK のホモ二量体形成が NLK の活性化と NLK の核局在に必須であることを発見した。私たちはまず、生化学的解析により、NLK がホモダイマーを形成し、intermolecular

manner で自身の Thr-286 をリン酸化することを見いだした。さらに、この自己リン酸化が NLK の活性化に必須であることを発見した。また、線虫 *C. elegans* における NLK のホモログ *lit-1* の機能欠損変異に相当する部位である Cys-425 に変異を導入した NLK はホモダイマーを形成できないだけでなく、酵素活性も核への局在活性も失っていた。これに対して、既知の NLK 活性化因子である神経成長因子 NGF によって細胞を刺激すると、細胞内在性の NLK がダイマー形成し、Thr-286 の自己リン酸化を行なうことがわかった。加えて、NLK のダイマー形成と自己リン酸化が NGF 刺激によって誘導される PC12 細胞の神経突起伸長に必須であることがわかった。これらの結果から、NLK のダイマー形成が NLK の機能的活性化の「最初のカギ」となることが示唆された。

このように全く未解明であった NLK の活性制御メカニズムの中核部分を解明することに成功した。

#### (4) NLK の新規抑制因子 DP1 (Kim et al., EMBO J 2012)

韓国ソウル大学との共同研究により、NLK の抑制因子として DP1 を発見した。また、DP1 が細胞外リガンド分子 Wnt の存在下においては NLK の抑制を介して Wnt シグナル活性を増強し、その一方で、Wnt 非存在下では Wnt シグナル制御因子 Dvl 及び Axin に結合して Wnt シグナル活性を抑制することを見いだした。

さらに、脊椎動物の構築過程の神経組織において DP1 による Wnt シグナル制御がおきることも発見した。脊椎動物の中枢神経組織の原基である神経板の前後極性は、胚発生初期に後方組織から分泌される Wnt 分子の活性によって規定される。Wnt 分子濃度の濃い神経板後方は、将来、後脳や脊髄といった後方神経組織になり、Wnt 分子濃度の低い神経板前方は前脳などの前方神経組織になる。今回私たちは、DP1 が Wnt 分子濃度の濃い神経板後方では NLK の抑制を介して Wnt シグナルを増強し、Wnt 分子の少ない神経板前方では Wnt シグナルをさらに減弱させることにより、神経板の前と後で明確な Wnt シグナル活性の違いを作り出すことと、この双方向性の制御が神経組織の前後極性を明確にするのに必須であることを発見した。

#### (5) その他の成果

大腸がん と NLK の関係の解析を行い、その結果、多くのヒト大腸がんにおいて NLK の発現が亢進していることと、大腸がん細胞株において NLK を過剰発現すると Wnt シグナルの活性化が起きることを発見した (投稿準備中)。これらの結果から、NLK の発現亢

進が大腸がんの発生や進行に関与する可能性が期待できる。

また、NLK の新たな基質も同定しており、現在 NLK によるこれらの制御機構と器官構築における意義を探っている。

さらに、本研究課題の成果と現在までの NLK についての知見、および今後の医化学研究における NLK の重要性をまとめた総説を執筆した (Ishitani & Ishitani Cell Signal 2013)。

今後も NLK 研究を引き続き行い、上記の論文未発表な知見を論文として発表していくとともに、さらに NLK および NLK を中心とした生命現象、疾患の理解を深めていきたい。

#### 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 6 件)

1. Ishitani S, Inaba K, Matsumoto K, Ishitani T. Homo-dimerization of Nemo-like kinase is essential for activation and nuclear localization. 2011. *Molecular Biology of the Cell*. 22. 266-277.
2. Ota S, Ishitani S, Shimizu N, Matsumoto K, Itoh M, Ishitani T. NLK positively regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling by phosphorylating LEF1 in neural progenitor cells. 2012. *EMBO Journal*. 31. 1904-1915 doi: 10.1038/emboj.2012.46.
3. Ishitani T. Context-dependent dual and opposite roles of nemo-like kinase in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. 2012. *Cell Cycle* 11. 1743-1745 doi: 10.4161/cc.20183.
4. Shimizu N, Kawakami K, Ishitani T. Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. 2012. *Developmental Biology*, 370. 71-85 doi: 10.1016/j.cell.2012.09.017.
5. Kim WT, Kim H, Katanaev VL, Joon Lee S, Ishitani T, Cha B, Han JK, Jho EH. Dual functions of DP1 promote and stabilize biphasic Wnt-on and Wnt-off states during anteroposterior neural patterning. 2012. *EMBO Journal*, 31. 3384-3397 doi: 10.1038/emboj.2012.181.
6. Ishitani T, Ishitani S. Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator. 2013. *Cellular Signalling* 25. 190-197 doi: 10.1016/j.cell.2012.09.017.

[学会発表] (計 18 件)

1. 石谷 太、石谷 閑、平尾 智子、鈴木 真帆、磯田 美帆、北川 元生、松本 邦弘、伊藤 素行、Nemo-like kinaseはNotch転写複合体の形成を阻害することによりNotchシグナルを抑制する, 第62回日本細胞生物学会年会, 大阪国際会議場, 2010年5月19日
2. Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Shizuka Ishitani, Motoo Kitagawa, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh, Nemo-like kinase promotes neurogenesis by interfering with formation of Notch transcription complex., 9th International Zebrafish Development and Genetics Conference, Wisconsin, USA, 2010年6月17日
3. Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh, Tohru Ishitani, Nemo-like kinase positively regulates Wnt signaling via phosphorylating Lef1 in developing midbrain tectum., 第43回日本発生生物学会大会 京都国際会議場, 2010年6月20日
4. Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Shizuka Ishitani, Motoo Kitagawa, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh, Nemo-like kinase promotes neurogenesis by interfering with formation of Notch transcription complex., 第43回日本発生生物学会大会 京都国際会議場, 2010年6月22日
5. 太田 聡、石谷 閑、清水 誠之、松本邦弘、伊藤素行、石谷 太, 神経細胞におけるWnt-βカテニン経路の活性化には、NLKによる転写因子Lef1のリン酸化が必須である, 第16回小型魚類研究会, 埼玉, 2010年9月18日
6. 清水 誠之、太田 聡、石谷 太, ゼブラフィッシュにおけるWntシグナルの活動の時空間的動態の可視化, 第16回小型魚類研究会, 埼玉, 2010年9月18日
7. 清水 誠之、太田 聡、石谷 太, ゼブラフィッシュ生個体におけるWntシグナルの活動の時空間的動態の可視化, BMB2010, 神戸ポートピアホテル, 2010年12月7日
8. 太田 聡、石谷 閑、清水 誠之、松本邦弘、伊藤素行、石谷 太, NLKによるLef1のリン酸化は、神経前駆細胞におけるWnt/β-cateninシグナルの伝達に必須である, BMB2010 神戸ポートピアホテル, 2010年12月7日
9. Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh, Tohru Ishitani, Lef1 phosphorylation by NLK is essential for the Lef1-mediated Wnt/β-catenin signaling in Neural progenitor cells., 4th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, Asilomar Conference Center, USA, 2011年1月31日
10. Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh, Tohru Ishitani, Lef1 phosphorylation by NLK is essential for the Lef1-mediated Wnt/β-catenin signaling in neural progenitor cells, 沖縄コンベンションセンター, 第44回日本発生生物学会, 2011年5月20日
11. Shizuka Ishitani, Kenji Inaba, Kunihiro Matsumoto, Tohru Ishitani, Homo-dimerization of Nemo-like kinase is essential for activation and nuclear localization., 第63回日本細胞生物学会大会, 北海道大学, 2011年6月28日
12. Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani, Analysis of the spatiotemporal dynamics and its regulatory mechanisms of Wnt/β-catenin and Hedgehog signaling pathways using the transgenic zebrafish lines carrying the signaling reporters., 第17回小型魚類研究会, 東レ総合研修センター, 2011年9月8日
13. Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani, Analysis of the molecular mechanisms that regulate the activity of Nemo-like kinase, 第34回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2011年12月15日
14. Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh, Tohru Ishitani, Lef1 phosphorylation by NLK is essential for the Lef1-mediated Wnt/β-catenin signaling in neural progenitor cells, 第34回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2011年12月16日
15. Tohru Ishitani, Shizuka Ishitani, A dual and opposite role of NLK-mediated Lef1 phosphorylation on the Wnt/beta-catenin signaling, 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同年会, 神戸国際会議場, 2012年5月31日
16. Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Kunihiro Matsumoto, Motoyuki Itoh, Tohru Ishitani, NLK positively regulates Wnt/β-catenin signalling by

phosphorylating LEF1 in neural progenitor cells, 第35回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場, 2012年9月19日

17. Nobuyuki Shimizu, Koichi Kawakami, Tohru Ishitani, Exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish, 第18回小型魚類研究会, 京都大学, 2012年9月22日
18. 石谷 太, 清水 誠之, 石谷 閑, Nemo-like kinase Blocks Hedgehog signaling by phosphorylating Gli1 transcription factor., 第85回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, 2012年12月16日

[図書] (計 3件)

1. 石谷太, 松本邦弘, 伊藤素行. 2010. Nemo-like kinaseはNotch転写複合体の形成を阻害し、神経細胞形成を促進する, 実験医学, 28, 1417-1420
2. 石谷太, 石谷閑. 2010. 転写因子TCF/LEFの修飾によるWntシグナル制御, 医学のあゆみ, 233, 971-978
3. 石谷太. 2012. 神経組織構築を担うタンパク質リン酸化酵素NLKの機能と制御  
ブレインサイエンス・レビュー2012, 59-82

[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.bioreg.kyushu-u.ac.jp/laboratories/top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石谷 太 (ISHITANI TOHRU)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：40448428