

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657126

研究課題名(和文)細胞周期依存的な中心体-基底小体変換機構

研究課題名(英文)Mechanisms of cell cycle-dependent conversion of the mother centriole to the basal body

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：一次繊毛は細胞休止期に中心体が基底小体に変換されることにより形成されるが、細胞周期依存的な一次繊毛形成機構は不明である。本研究では、Hippo経路の下流因子であるNDRの一次繊毛形成における機能解明を目的として研究を実施し、NDR2がRabin8のリン酸化を介して一次繊毛形成に関与することを解明した。NDR2はRabin8のSer-272のリン酸化により、Rabin8とexocyst成分であるSec15の結合を促進し、Rabin8の中心体への移行と中心体近傍でのRab8の活性化を促進し、一次繊毛形成の初期過程である繊毛小胞の形成に重要な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia are formed by conversion of the mother centriole to the basal body. Ciliary membranes are generated by fusion of vesicles to the pericentrosome, a process requiring Rab11-mediated recruitment of Rabin8, Rab8 activation and Rabin8 binding to Sec15, a component of the exocyst. This study showed that NDR2 phosphorylates Rabin8 at Ser-272 and defects in this phosphorylation impair preciliary membrane assembly and ciliogenesis, resulting in accumulation of Rabin8/Rab11-containing vesicles at the pericentrosome. Rabin8 binds to and colocalizes with GTP-bound Rab11 and phosphatidylserine (PS) on pericentrosomal vesicles. The phospho-mimetic S272E mutation of Rabin8 decreases affinity for PS but increases affinity for Sec15. These results suggest that NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by triggering the switch in binding specificity of Rabin8 from PS to Sec15, thereby promoting local activation of Rab8 and ciliary membrane formation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：一次繊毛 中心体 細胞周期 基底小体 NDR Rabin8 Rab8 小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

多くの動物細胞は G0 期に一次繊毛とよばれる非運動性の突起を形成する。一次繊毛は内部に微小管軸系をもち、機械的刺激に対するセンサーとして、また、Hedgehog や Wnt 等の受容体が集積するシグナル受容センターとしても重要な役割を担っている。血清飢餓や接触障害等により細胞が G0 期に移行すると、中心体は細胞表層に移行し、母中心小体は細胞膜と結合して基底小体となり、さらに微小管の伸長により一次繊毛が形成される。一方、細胞が増殖相に再入すると、中心小体は複製を開始し、膜から解離して、紡錘体極として機能する。このように中心体-基底小体変換は細胞増殖サイクルの休止と進行に密接に関与しているが、その制御機構は不明である。また、癌や嚢胞性腎疾患では一次繊毛の形成不全と細胞の異常増殖の関連が示唆されているが、細胞増殖制御における繊毛形成の機能は不明である。私達は癌抑制遺伝子 MST/Hippo の下流で活性化される Ser/Thr キナーゼ NDR の発現抑制によって紡錘体形成に異常が生じることを報告したが、最近、NDR が血清飢餓によって活性化されること、NDR の発現抑制によって繊毛形成が抑制されること、さらに、NDR が繊毛形成に関与する Rabin8 をリン酸化することを見出した。Rabin8 は繊毛形成に関わる Rab8 の活性化因子 (GDP-GTP 交換因子) であり、Rab11、BBS1 など繊毛形成関連蛋白質と結合する。中心体-基底小体変換過程において、中心体周辺に膜小胞が集積し、その小胞が細胞膜と融合して基底小体が形成されることが知られているが、増殖抑制シグナルと膜輸送と中心体-基底小体変換をつなぐ機構は全く不明である。本研究では、細胞周期依存的な中心体-基底小体変換機構を解明するため、中心体-基底小体変換ならびに一次繊毛形成における NDR、Rabin8、Rab8 の機能の解明を進める。本研究により、中心体-基底小体変換という観点から、細胞増殖制御の新しい機構が解明されることが期待できる。

## 2. 研究の目的

動物細胞は増殖抑制シグナルによって増殖休止期に移行すると、中心体が細胞表層に移行し基底小体に変換され、基底小体を土台として一次繊毛が形成される。一方、増殖刺激によって増殖相に再入すると基底小体は膜から解離し一次繊毛は消失する。すなわち細胞増殖サイクルの進行と一次繊毛の形成は相反するが、細胞周期依存的な中心体-基底小体変換の分子機構は不明である。私達は最近、増殖抑制シグナルの下流で活性化されるキナーゼ NDR が血清飢餓による一次繊毛形成に関与することを見出した。さらに、NDR は繊毛形成に関わる Rab8 の GDP-GTP 交換因子である Rabin8 をリン酸化することを見出した。本研究では、NDR 経路を中心に、増殖抑制シグナル依存的な中心体-基底小体変

換機構及び一次繊毛形成機構を解明し、さらに、一次繊毛形成が細胞増殖の制御において果たす役割を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、細胞周期依存的な中心体-基底小体変換機構を解明するため、以下の解析を行った。まず、NDR によるリン酸化が Rabin8 の GEF 活性、局在、結合蛋白質との結合能に与える影響や、繊毛形成に与える影響を解析するため、Ser-272 を Ala に置換した S272A 変異体や Glu に置換した S272E 変異体を作成し、野生型の機能と比較する。Rabin8 結合タンパク質や結合脂質を同定し、一次繊毛形成との関係を明らかにする。血清飢餓や接触障害等の細胞増殖抑制シグナルによる NDR の活性化機構と Rabin8 のリン酸化レベルの変化を測定し、また、これらの変化に伴って、Rab8 や Rab11 小胞の細胞内分布や繊毛小胞の形成、繊毛内成分や中心体成分の細胞内移行に与える効果を解析し、NDR-Rabin8-Rab8 経路の中心体-基底小体変換及び一次繊毛形成における機能を解明する。また、NDR 活性化因子である Furry や Mob についてもその結合タンパク質を解析し、中心体機能や一次繊毛形成における機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) NDR-Rabin8 による一次繊毛形成機構

哺乳類細胞の NDR キナーゼ (NDR1, NDR2) の細胞機能を解明するため、私達はまず出芽酵母の NDR 相同分子である Cbk1 が哺乳類 Rabin8 の相同分子である Sec2 をリン酸化するという報告に着目した。まず、*in vitro* キナーゼアッセイにより、NDR1, NDR2 が Rabin8 をリン酸化することを見出した。次に、NDR の基質のコンセンサス配列 (HxRxxS/T) に相当する Ser-272 を Ala に置換した S272A 変異体を作製し、キナーゼアッセイを行ったところ、NDR1, NDR2 は野生型 Rabin8 をリン酸化するが、S272A 変異型 Rabin8 はリン酸化しなかった。この結果から、NDR1, NDR2 は Rabin8 の Ser-272 を特異的にリン酸化することが明らかとなった。

Rabin8 の S272A 及び S272E 変異体を作成し、Rab8 に対する GEF 活性を測定した結果、野生型と同程度の活性を示したことから、Rabin8 の Ser-272 のリン酸化は Rabin8 の Rab8-GEF 活性には影響しないと考えられる。

次に、ヒト網膜色素上皮細胞 (RPE 細胞) において、血清飢餓依存的な一次繊毛形成に対する NDR1, NDR2 の siRNA による発現抑制の効果を検討した。その結果、NDR1 の発現抑制の効果は認められなかったが、NDR2 の発現抑制によって一次繊毛形成は著しく抑制された。この結果は、NDR2 が一次繊毛形成に関与していることを示している。また、Rabin8 の発現抑制によっても一次繊毛形成が抑制されたが、この抑制は野生型 Rabin8 の発現によって回復したが、S272A 変異体の発現では

回復しなかった。この結果は、Rabin8 の Ser-272 のリン酸化が一次繊毛形成に必要であることを示している。

一次繊毛が形成されるためには、母中心小体の近傍に低分子量 G タンパク質 Rab11 を含有する膜小胞が集積・融合して繊毛小胞が形成されることが必要である。この過程には、Rab8 とその活性化因子である Rabin8 や、膜小胞の繫留に必要な exocyst の成分である Sec15 が関与することが知られている。私達は、Rabin8 が Rab11 含有小胞局在すること、膜小胞の脂質成分であるホスファチジルセリンと結合することを見出した。また、Rabin8 は Ser-272 のリン酸化によって、ホスファチジルセリンとの結合が低下し、逆に、Sec15 との結合が促進することを見出した。さらに、NDR2 の発現抑制や、Rabin8 の S272A 変異によって、Rabin8 を含む膜小胞が母中心小体に集積はするが融合できず、繊毛小胞の形成と一次繊毛形成が阻害されることを見出した。以上の結果から、NDR2 による Rabin8 のリン酸化は、Rabin8 の結合特異性を膜小胞を構成する脂質であるホスファチジルセリンから母中心小体に局在する Sec15 にスイッチし、その結果、Rabin8 の膜小胞から中心体への移行に寄与していることが示唆された。Rabin8 の中心体への移行は、中心体での Rab8 の活性化を促進し、一次繊毛形成の初期過程である Rab8 と Sec15 による繊毛小胞の形成に重要な役割を担っていると考えられる。

## (2) Furry による微小管アセチル化機構

Furry は NDR に結合しそのキナーゼ活性を促進することが知られている。本研究では、Furry の結合蛋白質を解析し、微小管脱アセチル化酵素である SIRT2 を同定した。Furry は N 末端領域で SIRT2 と結合し、その微小管脱アセチル化活性を抑制した。Furry の N 末端断片を過剰発現すると、間期及び分裂期の微小管のアセチル化レベルの上昇が認められた。また、Furry を発現抑制した細胞では分裂期紡錘体の微小管アセチル化レベルが低下していること、このアセチル化レベルの低下は SIRT2 阻害剤である AGK2 によって回復することを見出した。以上の結果から、Furry は SIRT2 の微小管脱アセチル化酵素活性を阻害することで分裂期紡錘体の微小管アセチル化を促進していることが示唆された。

## 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 5 件)

Nagai, T., and Mizuno, K., Multifaceted roles of Furry proteins in invertebrates and vertebrates., J. Biochem., 査読有、155 巻、2014 年、137-146、10.1093/jb/mvu001.

Nagai, T., Ikeda, M., Chiba, S., Kanno, S., and Mizuno, K., Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase., J. Cell Sci., 査読有、126 巻、2013 年、4369-4380、10.1242/jcs.127209.

Chiba, S., Amagai, Y., Homma, Y., Fukuda, M., and Mizuno, K., NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by switching binding specificity from phosphatidylserine to Sec15., EMBO J., 査読有、32巻、2013年、874-855、10.1038/emboj.2013.32.

Nishio, M., Hamada, K., Kawahara, K., Sasaki, M., Noguchi, F., Chiba, S., Mizuno, K., Suzuki, S. O., Dong, Y., Tokuda, M., Morikawa, T., Hikasa, H., Eggenschwiler, J., Yabuta, N., Nojima, H., Nakagawa, K., Hata, Y., Nishina, H., Mimori, K., Mori, M., Sasaki, T., Mak, T. W., Nakano, T., Itami, S., and Suzuki, A., Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice., J. Clin. Inv., 査読有、122 巻、2012 年、4505-4518、10.1172/JCI63735.

Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., and Mizuno, K., Furry protein promotes Aurora A-mediated Polo-like kinase 1 activation., J. Biol. Chem., 査読有、287 巻、2012 年、3707-3721、10.1074/jbc.M112.378968.

〔学会発表〕(計 9 件)

清水 祐子、高橋 克宣、水野 健作、NDR による PI4KIII $\beta$  のリン酸化と一次繊毛形成における機能、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸

永井 友朗、池田 真教、千葉 秀平、菅野 新一郎、水野 健作、Furry によるチューブリン脱アセチル化酵素 SIRT2 の活性制御と分裂期紡錘体微小管のアセチル化に対する役割、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日-6 日、神戸

千葉秀平、天貝佑太、本間悠太、福田光則、水野健作、NDR2 による Rabin8 のリン酸化と一次繊毛形成における機能、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-13 日、横浜

Chiba, S., Amagai, Y., Homma, Y., Fukuda, M., Mizuno, K., NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by switching binding specificity from phosphatidylserine to Sec15, FASEB Science Research Conferences Biology of Cilia & Flagella, 2013 年 6 月 23 日-28 日、Niagara Falls, New York, USA.

Tomoaki Nagai, Shuhei Chiba, Masanori

Ikeda, Shin-ichiro Kanno, Kensaku Mizuno, Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle via inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase. 第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 19 日-21 日、名古屋

Chiba, S., Mizuno, K.、NDR2-mediated Rabin8 Phosphorylation is Crucial for Ciliogenesis by Switching Binding Specificity from Phosphatidylserine to Sec15、第25回CDBミーティング、2013年6月17日-18日、神戸

千葉秀平、天貝佑太、本間悠太、福田光則、水野健作、NDR2 によるRabin8 のリン酸化と一次繊毛形成における機能、日本生化学会東北支部第79回例会・シンポジウム、2013年5月11日、仙台

水野健作、千葉秀平、一次繊毛形成における膜輸送制御：繊毛病との関連、東北大学GCOE シンポジウム「Network Medicine による医学・生命科学の新たな潮流」、2013年2月1日、仙台

T. Nagai, S. Chiba, M. Ikeda, S-I. Kanno, A.Yasui, K. Ohashi, K. Mizuno, Furry is a positive regulator of microtubule acetylation in mitotic spindle.、第52回 American Society for Cell Biology Annual Meeting、2012年12月13日-20日、San Francisco, USA.

〔図書〕(計 1 件)

千葉秀平、天貝佑太、水野健作、一次繊毛形成と細胞周期のクロストーク、羊土社、実験医学増刊「細胞周期による高次生命現象の制御と疾患」、2013年、252-256 ページ

〔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.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno\\_lab/](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所・教授

研究者番号：70128396

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし