

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840065

研究課題名(和文) Hippo経路による一次繊毛形成機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of primary ciliogenesis by Hippo signalling

研究代表者

千葉 秀平 (Chiba, Shuhei)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：60572493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：主要な増殖抑制経路Hippo経路の下流因子であるNuclear Dbf2-related kinase2 (NDR2)に着目し、生理基質として低分子量Gタンパク質Rab8の活性化因子Rabin8を同定した。NDR2はRabin8のリン酸化により、そ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Sec15にスイッチすることを見出し、これにより繊毛鞘の形成を担う被覆小胞の中心体への繫留に関わることを明らかにした。さらに、NDR2の下流シグナルの探索にも積極的に着手し、新たなNDR2下流因子の同定により一次繊毛形成に関わる一連のシグナル伝達機構を明らかにしている。

研究成果の概要(英文)：NDR2, an effector molecule for mammalian Hippo signalling, was identified as the causal gene for a canine ciliopathy, early retinal degeneration. Little is known how NDR2 regulates cilium formation. Ciliary membranes are generated by transport and fusion of Golgi-derived vesicles to the pericentrosome, a process requiring Rab11-mediated recruitment of Rabin8, subsequent activation of Rab8 and Rabin8 binding to Sec15. I found that NDR2 phosphorylates Rabin8 and defects in this phosphorylation impair preciliary membrane assembly and ciliogenesis. 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. Additionally, I identified a certain member of lipid kinase as a new physiological substrate for NDR2. These results suggest that the NDR2 is crucial for ciliogenesis by regulating intracellular vesicle trafficking.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 細胞周期 NDR Rabin8 Hippo 基底小体 繊毛症 Rab8

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物を構成するほとんどの細胞が血清飢餓や接触阻害など細胞増殖を休止させる条件下では、細胞膜表面上に一次繊毛を形成する。一次繊毛は、基底小体、そこから伸びた微小管構造である軸糸、軸糸を取り囲む繊毛膜から構成される。繊毛膜には各種イオンチャンネルや受容体が局在しており、一次繊毛は細胞外からの機械的・化学的シグナルに加え、各種の液性因子を受容するアンテナとして機能している。一次繊毛の構築面、機能面での異常は多発性嚢胞腎、網膜変性、肥満、内臓逆位などの多くの症状を多発的に呈する遺伝性疾患の発症と深く関連することから、一次繊毛の構築を担う分子基盤の理解は医学的に重要な研究命題であるといえる。

基底小体は間期中心体の母中心小体由来する。中心体はG1期には細胞内に一つ存在するが、S期には自己複製し、倍加する。その後、成熟・分離を経て、紡錘体極として染色体の分配に関わる。細胞が血清飢餓や細胞間接触によってG1期から休止期に移行すると、母中心小体の遠位側からはCP110と呼ばれるキャッピング因子が解離し(中心体-基底小体変換)、軸糸が伸長することで、一次繊毛が形成される。一方、細胞が増殖相に再移行すると一次繊毛は速やかに退縮し、基底小体は細胞膜から解離し、紡錘体極としての機能を担う。このような一連の過程から、一次繊毛の形成は細胞周期依存的であり、増殖相の進行と相反する関係にあるということができる。しかし、休止期への移行と一次繊毛形成を結びつけるシグナル経路は不明であった。

Hippo(MST)シグナル経路は進化的に高度に保存された経路であり、細胞分裂、細胞死、器官サイズの調節に関わることが知られている。ショウジョウバエ Hippo キナーゼのヒトホモログであるMST1/2 キナーゼ(MST)はNDRとLatsの両キナーゼの上流因子にあたるが、MSTによるLatsのリン酸化・活性化

は、転写活性化補助因子YapとTazの核内移行を阻害することで増殖阻止に働く。MST-Lats経路による増殖阻止機構の解明が進む一方で、MSTによるNDRの活性化機構とその下流シグナル、さらにその機能的意義の詳細は不明であった。申請者が研究開始当初にNDR2の下流因子として同定したRabin8はゴルジ体からの小胞輸送を担う低分子量Gタンパク質Rab8のグアニンヌクレオチド交換因子として、繊毛形成に先立って中心体近傍に形成される繊毛小胞の形成に関わることが明らかになっていった。Rabin8は中心体方向へと輸送される小胞上でRab8を活性化し、繊毛小胞の形成に関わることが報告されていたが、一次繊毛形成の過程でのRabin8の機能や活性を制御する分子機構については不明であった。そこで、申請者は、NDR2によるRabin8のリン酸化の制御実態を中心にその下流シグナルを解析し、さらにHippoシグナルによるNDR2という上流機構の解析から、一連のシグナルネットワークが一次繊毛形成に与える影響を解析することとした。

## 2. 研究の目的

一般的に、一次繊毛は細胞休止期に形成され、増殖相では消失することから、一次繊毛形成は細胞増殖サイクルの停止と相反すると考えられているが、細胞増殖停止と一次繊毛形成をつなぐシグナル経路は不明であった。申請者は増殖抑制シグナルHippo(MST)経路の下流キナーゼである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見出したことをきっかけに、本研究遂行期間中に、1) Hippo(MST)シグナル経路を中心に増殖抑制シグナルによるNDR2の活性化機構、2) NDRの下流シグナル探索の2点を主旨として、一次繊毛形成を担う一連の新規膜輸送経路の実態を明らかにし、増殖抑制シグナルと一次繊毛形成を結びつけるシグナル経路を

世界に先駆けて解明することを目的として解析を行った。

### 3. 研究の方法

1) 増殖抑制シグナルによる MST-NDR 経路の活性化機構と一次繊毛形成における役割の解明: 血清飢餓刺激等の増殖抑制シグナルによる NDR の活性化、Rabin8 のリン酸化、一次繊毛形成に対する MST 発現抑制の効果を調べ、一次繊毛形成における MST の関与を検証する。また、ショウジョウバエの Hippo の上流因子や関連因子として知られる Fat, Dachous, Crumbs, Merlin/NF2, Expanded, Sav 等がヒト細胞における MST の活性化に関与するかを明らかにする。

2) 繊毛小胞形成における NDR, Rabin8 の機能の解明: Rabin8, Sec15 及びその他の Exocyst 構成因子と結合する蛋白質の解析や NDR の新規基質の機能解析により、NDR による膜輸送の制御機構と繊毛小胞の形成機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

1) 増殖抑制シグナルによる MST-NDR 経路の活性化機構と一次繊毛形成 における役割の解明

Nuclear Dbf2-related (NDR) kinaseは進化的に高度に保存されたNDR/ LATS subfamily に属するセリンスレオニンキナーゼであり、その活性はFurryやMOBの結合や上流キナーゼであるMSTによるリン酸化を介して上昇する。申請者は、実際にMSTがNDR2の444番目のセリン残基をリン酸化すること、これによりNDR2の活性が上昇することをin vitro kinase assayにより確認し、続いてMSTの発現抑制が一次繊毛形成に与える影響を解析することとした。しかしながら、本研究の遂行期間中にMSTが結合タンパク質Sav 1 と協調して、一次繊毛形成の抑制因子であるAuroraAとHDAC6の活性を負に制御すること、MST-Sav1がNPHP関連タンパク質と相互作用

することで、繊毛基部の移行帯で繊毛関連因子の輸送に関わることが明らかとなった。一次繊毛形成におけるMSTからNDR2の活性制御の実態は依然として不明であるが、上記の報告により、本研究の一つであるHippo経路の一次繊毛経路における役割が示されることとなった。

2) 繊毛小胞形成におけるNDR, Rabin8の機能の解明

ヒト網膜色素上皮細胞株RPE細胞では一次繊毛形成の序盤に中心体近傍に膜小胞が集積・融合して繊毛小胞とよばれる構造を形成するが、本研究ではこの過程に必要な低分子量Gタンパク質であるRab8の活性化因子であるRabin8をNDR2の基質として見出した。さらに、中心体への小胞の繫留には膜繫留因子複合体の構成蛋白質のひとつであるSec15が関与するが、Rabin8はNDR2にリン酸化されることで、その結合特異性を膜構成脂質のひとつであるホスファチジルセリンからSec15にスイッチすることを見出した。以上の結果から、NDR2は一次繊毛形成過程におけるRabin8-Rab8の機能を調節し、一次繊毛形成の初期段階である繊毛小胞の形成過程において重要な役割を担っていることが明らかになった (雑誌論文4参照)。

本研究では、さらなるNDRの生理基質の同定を目指し、NDRの基質候補因子として提唱されていたPI4K、Rab11-FIP5、AAK1の各分子に着目し、これらの一次繊毛形成への関与を検証した。ヒト網膜色素上皮細胞にPI4K、Rab11-FIP5、AAK1に対する特異的なsiRNAを導入し、血清飢餓依存的に誘導される一次繊毛形成に対する影響を評価した。この結果、PI4K、Rab11-FIP5、AAK1、いずれの発現抑制において一次繊毛構築の阻害がみられた。中でも、PI4KはNDRによって実際にリン酸化されることをin vitro kinase assayよりみとめ、リン酸化によりその活性を正に制御する可能性を見出した。そこで、蛍光蛋白質を融合した

PI4Kの野生型およびNDRによるリン酸化部位をリン酸化されないアラニン残基に置換したリン酸化部位変異体を細胞に発現させ細胞内局在を解析した結果、PI4Kの野生型と比較してリン酸化部位変異体はゴルジ体またはリサイクリングエンドソームと思われる部位に強く局在することがわかった。一次繊毛の形成の序盤には親中心小体遠位側に特有の膜構造である繊毛小胞が形成される。繊毛小胞は、以前からゴルジ体やリサイクリングエンドソームに由来するとの報告がある。このことから、NDRによるPI4Kのリン酸化は、その局在や活性の制御を介してゴルジ体をはじめとする内膜系の脂質構成を変化させ、一次繊毛形成に必要な繊毛小胞の形成に関与している可能性が示唆された。

#### 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 4 件)

1. Oda, T.\*, Chiba, S.\*, Nagai, T., Mizuno, K. (equally contributed) Binding to Cep164, but not EB1, is essential for centriolar localization of TTBK2 and its function in ciliogenesis. (2014) *Genes to Cells*, 19: 927-940.
2. Su, S., Phua, S.C., Derose, R., Chiba, S., Narita, K., Kalugin, P.N., Katada, T., Kontani, K., Takeda, S., Inoue, T. Genetically encoded calcium indicator illuminates calcium dynamics in primary cilia (2013) *Nature Methods*, 10: 1105-1109.
3. Nagai, T., Ikeda, M., Chiba, S., Kanno, S.-I., Mizuno, K. Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase (2013) *J. Cell Sci.*, 126: 4369-4380.
4. 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 (2013) *EMBO J.*, 32: 874-885.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 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、仙台、2015.05.09
2. 小田聡明、千葉秀平、永井友朗、水野健作 TTBK2 は Cep164 と結合することで中心体に局在し、一次繊毛形成を促進する  
第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014.11.25-27
3. Nagai, T., Oda, T., Chiba, S., Mizuno, K. Cep164, but not EB1, is essential for centriolar localization of TTBK2 and its function in ciliogenesis  
2014 ASCB/IFCB meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2014.12.06-10
4. 水野健作、小田聡明、永井友朗、千葉秀平 細胞周期依存的な中心体-基小体変換機構  
新学術研究領域「シリア・中心体による生体情報フローの制御」第3回領域会議、倉敷、2014.07.17-18
5. 小田聡明、千葉秀平、永井友朗、水野健作 一次繊毛形成における EB1 の機能  
第5回繊毛研究会、浜松、2014.05.24-25.
6. 千葉秀平、天貝佑太、本間裕太、福田光則、水野健作 一次繊毛形成を担うRabin8のリン酸化制御解析  
第86回日本生化学会大会、横浜、2013. 9.13.
7. 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” Niagara Falls, New York, USA, 2013. 6.23-28

8. 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、仙台、2013.5.11

9. 千葉秀平

NDRによるRabin8 のリン酸化と一次繊毛形成における機能

大阪大学大学院医学系研究科、大阪、2013.4.30

10. 千葉秀平

一次繊毛形成における膜輸送制御機構

神戸大学大学院医学系研究科分野セミナー、神戸、2013.4.26

〔図書〕(計 2 件)

1. 千葉秀平、井上尊生

遺伝子コード型インジケータによる一次繊毛内 Ca<sup>2+</sup>ダイナミクスの可視化

実験医学、Close up 実験法、31 (2), 1275-1280(2014)羊土社

2. 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、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」、実験医学、31 (2), 252-256 (2013) 羊土社

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. 東北大学 大学院生命科学研究科 情報伝達分子解析分野 水野研究室

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/)

2. 東北大学生命科学研究科

[http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research\\_ja/15442/](http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research_ja/15442/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉秀平 (Chiba, Shuhei)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：60572493

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：