

令和元年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08705

研究課題名(和文) Aktによる繊毛タンパク Inversinの制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of ciliary protein Inversin by Akt

研究代表者

水津 太 (Suizu, Futoshi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：90431379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトInversinのAktリン酸化サイトアミノ酸配列Thr-Ser-Thr(864-866)は霊長類などの高等動物には保存されているが、マウスやカエル、ゼブラフィッシュなどの動物群には保存されておらず、Inversinの細胞内局在やWntシグナル阻害活性に関しては全く影響が無かった。したがって、AktによるInversinリン酸化の機能的な保存性は無いと考えられる。またInversinは、転写活性中心の核内構造体へ集積し、ある特定の転写制御活性をもつことが明らかとなった。以上のことから、本研究では、Inversinが新規転写制御因子として機能していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を足掛かりに、Inversinをはじめとした様々な繊毛タンパク群のこれまでに知られていない転写制御因子としての生物機能発見に繋がると考えている。そして、それらの生物機能の理解により、これまで未解明であった繊毛タンパク異常が引き起こす平面内細胞極性異常や繊毛病発症の分子メカニズム解明の道標になると考えている。

研究成果の概要(英文)：The Akt phosphorylation site amino acid sequence Thr-Ser-Thr (864-866) of human Inversin is conserved in higher animals such as primates, but not in animal groups such as mice, frogs and zebrafish. There was no effect on intracellular localization of Inversin or Wnt signal inhibitory activity. Thus, there would be no functional conservation of Inversin phosphorylation by Akt. Moreover, Inversin was found to be accumulated in some nuclear structure which likely to be a transcriptional activation center and has a specific transcription activity. Taken together, this study strongly suggests that Inversin functions as a novel transcriptional regulator.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Akt Inversin 細胞極性 リン酸化 一次繊毛

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛 (primary cilia; non-motile cilia) は、細胞膜と 9 + 0 の微小管細胞骨格から成る一本の毛様体で、現在では哺乳類のほとんど全ての細胞に存在することが知られている (図 1 c、および図 2 参照)。9 + 2 の骨格から成る運動性繊毛 (motile cilia) と違い、一次繊毛は、これまで機能を持たない単なる遺残物として見なされてきた。近年、この一次繊毛が多様な機能を持ち、一次繊毛の欠失や機能異常により嚢胞性腎疾患をはじめ網膜萎縮、肝線維症、多指症、肥満、中枢神経系異常や骨格形成異常などの遺伝性疾患 (繊毛病; ciliopathy) が引き起こされることが分かってきた。

繊毛病のうち最も多い症例として、多発性嚢胞腎疾患 (図 1) が挙げられる。この疾患の腎臓尿細管上皮細胞は、平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) が破綻しており、そのため細胞分裂方向 (軸) が異常になる。分裂軸異常により、おおよそ尿の流れと垂直方向に分裂が進行し (図 1 c、d 参照)、尿細管が拡張し嚢胞を形成する (図 1 d-h 参照)。その結果、正常な尿の流れが阻害され、重篤な腎疾患をもたらす (図 1 f-h 参照)。PCP 破綻の原因として、尿細管細胞表面に存在する一次繊毛 (図 1 c 参照) の構造的・機能的異常が指摘されているが、未だその分子メカニズムについては不明である。

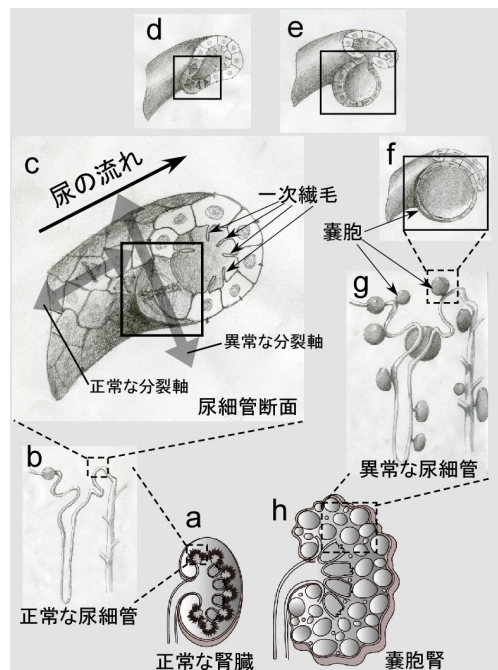


図 1. 繊毛病の一例、多発性嚢胞腎発生過程の模式図。PCP 破綻による尿細管細胞の分裂軸異常 (c)、嚢胞形成により (d-h)、尿の流れが阻害され (f)、重篤な腎不全 (g、h) へと発展する。

セリンスレオニンキナーゼ Akt (Protein Kinase B の別称) は、細胞死 (アポトーシス) や細胞生存制御において、要となる細胞内シグナル伝達因子である。Akt は細胞外成長因子などの刺激を受け PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) によって活性化される。この PI3K-Akt シグナル伝達系は細胞死と増殖の制御、細胞周期、タンパク合成、糖代謝、血管新生などの多岐にわたる細胞反応制御に重要な役割を果たす細胞内シグナル伝達系である。近年、Akt の細胞運動や細胞極性調節因子としての機能が注目され始めているが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。(Menager C. et al., *J Neurochem*, 2004, Yoshimura et al., *Cell*, 2005, Higuchi et al., *Nat. Cell Biol.*2008)

2. 研究の目的

筆者は最近、Yeast Two Hybrid システムを用いた包括的なスクリーニング法により、Akt 特異的に結合する繊毛タンパク Inversin を同定した。Inversin は新規 Akt リン酸化基質であり、そのリン酸化がイヌ腎臓 (MDCK) 細胞の分裂軸の傾き決定および、正しい細胞配向を伴った腎尿細管の三次元構築に必須であることが明らかとなった。(図 4 参照) Inversin 遺伝子の欠失マウスの表現型は、繊毛病 (嚢胞腎や内蔵逆位など) の原因遺伝子として認知されていたが、その疾病の分子メカニズムは明らかになっていなかった。本研究で初めて、Akt から Inversin へのリン酸化シグナル伝達が、Inversin 遺伝子欠失によって疾病に至る機序を説明できる重要

な分子制御機構である事実を解明した (Suizu et al. *EMBO J* 2016)。

これまでの解析からヒト Inversin の Akt リン酸化サイトはアミノ酸配列 Thr-Ser-Thr (864-866) であることが分かった。(図 3) 本研究では、研究期間内に

- (1) 各動物種由来の Inversin の Akt リン酸化の保存性とその生理的な重要性は何かを検討したい。
- (2) PCP 制御、および繊毛病責任遺伝子産物としての Inversin のリン酸化修飾による生物機能制御メカニズムをモデル動物を用いて明らかにしたい。

3. 研究の方法

先に筆者が新規同定した Akt 基質である Inversin (繊毛病責任遺伝子産物) のリン酸化が、一次繊毛の形態形成や維持、更にはバイオセンサーや細胞内シグナル伝達装置としての繊毛機能にどのような影響を与えるのか? 組織・生体レベルでの Inversin リン酸化の機能は何なのか? などの疑問を追求すべく、以下の戦略でプロジェクトを進める。

- (1) Inversin リン酸化の一次繊毛での細胞生物学的な機能を解析する。
- (2) 繊毛病の病態における Inversin の生理機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒト Inversin の Akt リン酸化サイトアミノ酸配列 Thr-Ser-Thr (864-866) はヒトやチンパンジーを始めとする霊長類、およびウシやイヌなどの進化上比較的霊長類との分岐が新しい種属には保存されているが、マウスやカエル、ゼブラフィッシュなどの動物群には欠如していることが明らかとなった。(図 3) Inversin リン酸化は、マウスには保存されておらず、Inversin の細胞内局在や Wnt シグナル阻害活性に関しては全く影響がなかった。したがって、Akt による Inversin リン酸化の機能的な保存性は無いと考えられる。

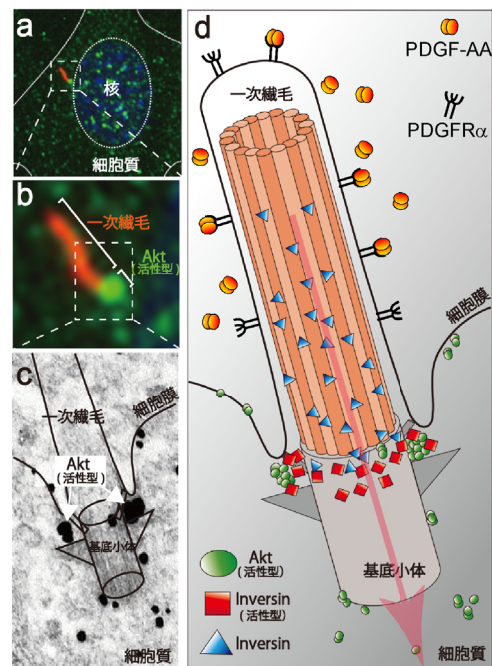


図. 2 (a および b) NIH3T3 細胞に存在する一次繊毛。間接免疫蛍光抗体法により活性型 Akt が一次繊毛の基部に局在することがわかる。(c) 透過型電子顕微鏡を用いた高解像観察から活性型 Akt (黒く見える金コロイド粒子) は基底小体から一次繊毛への移行帯 (transition zone) に多く存在する。(d) 一次繊毛における Akt と Inversin の相互作用のモデル図。PDGF-AA 刺激下で Inversin が Akt によってリン酸化され、そのリン酸化シグナル伝達は、一次繊毛の形態形成、および細胞極性、細胞分裂軸決定に重要な役割を果す。

Akt リン酸化サイト

ヒト	849	STEE	LRSGARRLETSTL	SED	870
チンパンジー	753	STEE	LRSGARRLETSTL	SKD	774
ウシ	848	STEV	LRSGVRKLGTSAR	SED	871
イヌ	848	NTEV	LRSGVRKSGTSTL	SED	871
マウス	846	STEA	SRSGCKQ---	LYED	868
ツメガエル	821	SEKE	FSSTGIQG---	RVD	847
ゼブラフィッシュ	815	REKDKRS--	RTEGDKQITVRE		832

図 3. 各動物種の Inversin アミノ酸配列の multiple alignment

(2) 興味深いことに、Inversin は、基本転写因子 TFIID と結合する ICP4 に高い相同性領域をもつことから、Inversin が新規転写制御因子として機能している可能性について解析を行った。(図4)

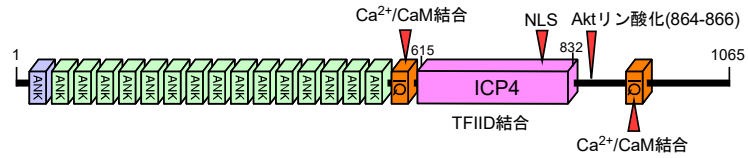


図4. Inversin タンパクの模式図。Inversin には、Ankyrin リピート領域、Ca²⁺/CaM 結合領域 (IQ)、転写因子 TFIID 結合性の ICP4 相同性領域、核移行シグナル領域 (NLS)、そして Akt リン酸化領域がある。(Yasuhiko et al. *Dev Growth Differ* 2001; Suizu et al. *EMBO J* 2016)

その結果、Inversin は、

転写活性中心の一つである核内 Cajal body 様構造体へ集積し、ある特定の転写制御活性をもつことが明らかとなった。(図5、6) 以上のことから、本研究では、Inversin が新規転写制御因子として機能していることが強く示唆された。今後はこの成果を足掛かりに、Inversin をはじめとした様々な繊毛タンパク群のこれまでに知られていない転写制御因子としての生物機能発見に繋がたいと考えている。そして、それらの生物機能の理解により、これまで未解明であった繊毛タンパク異常が引き起こす PCP 異常や繊毛病発症の分子メカニズム解明の道標になると考えている。

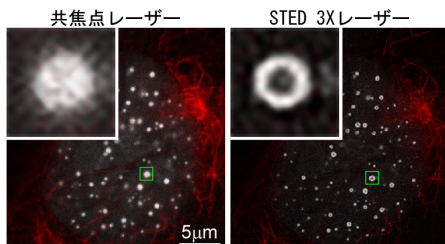


図5. 繊毛タンパク Inversin が転写活性中心の一つ核内 Cajal body 様構造体 (ドーナツ型) に局在する。

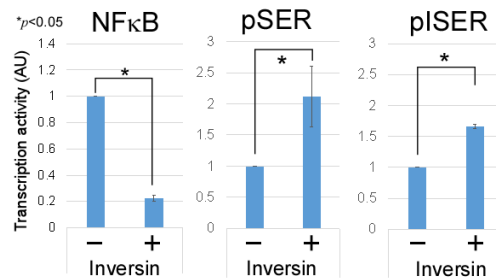


図6. Inversin タンパクの核内発現によって転写活性が制御される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- Hirata N, Suizu F, Matsuda-Lennikov M, Tanaka T, Edamura T, Ishigaki S, Donia T, Lithanatudom P, Obuse C, Iwanaga T, and Noguchi M. Functional characterization of Lysosomal interaction of Akt with VRK2. *Oncogene* (2018) on line: doi.org/10.1038/s41388-018-0330-0 査読有
- Noguchi M, Hirata N, and Suizu F. AKT keeps the beat in CLOCK's circadian rhythm. *J Biol Chem* 293(3): 9137-9138. (2018) 査読有
- Kawano N, Funadani R, Arikawa M, Harada T, Suizu F, Matsuoka K, and Matsuoka T. Photoresponse in the Ciliated Protozoan *Colpoda cucullus*. *Acta Protozoologica* 56: 1-7. (2017) 査読有
- Ihira K, Dong P, Xiong Y, Watari H, Konno Y, Hanley SJ, Noguchi M, Hirata N, Suizu F, Yamada T, Kudo M, Sakuragi N. EZH2 inhibition suppresses endometrial cancer progression via miR-361/Twist axis. *Oncotarget* Feb 21; 8(8): 13509-13520. (2017) 査読有
- Funadani R, Sogame Y, Kojima K, Takeshita T, Yamamoto K, Tsujizono T, Suizu F, Miyata S, Yagyuu KI, Suzuki T, Arikawa M, and Matsuoka T. Morphogenetic and Molecular Analyses of Cyst Wall Components in the Ciliated Protozoan *Colpoda cucullus* Nag-1 *FEMS Microbiology Letters* Aug 363 (2016) doi: 10.1093/femsle/fnw203 査読有
- Suizu F, Hirata N, Ishigaki S, Edamura T, Kimura K, Tanaka T and Noguchi M. (2016)

Primary cilium-mediated crosstalk of signaling cascades in ciliogenesis: Implications for tumorigenesis and senescence.

Cell Communication Insights. 8: 13-24. (2016) 査読有

- 7) Suizu F, Hirata N, Kimura K, Edamura T, Tanaka T, Ishigaki S, Donia T, Noguchi H, Iwanaga T and Noguchi M.

Phosphorylation dependent Akt-Inversin interaction at basal body of primary cilia.

EMBO J. Jun 15; 35(12):1346-1363. (2016) 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- 1) Hirata Noriyuki, Suizu Futoshi, Matsuda-Lennikov Mami, Tanaka Tsutomu, Edamura Tatsuma, Ishigaki Satoko, Donia Thoria, Lithanatudom Pathrapol, Obuse Chikashi, Iwanaga Toshihiko, Noguchi Masayuki
Functional characterization of lysosomal interaction of Akt with VRK2
第41回日本分子生物学会年会、横浜2018
- 2) 水津太、平田徳幸、Thoria Donia、Bala Jyoti、石垣聡子、野口昌幸
細胞膜リン脂質PI3Pの新規追跡技術の開発
第41回日本分子生物学会年会、横浜2018
- 3) Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Kohki Kimura, Tatsuma Edamura, Tsutomu Tanaka, Satoko Ishigaki, Thoria Donia, Hiroko Noguchi, Toshihiko Iwanaga & Masayuki Noguchi
Akt-dependent functional regulation of Inversin at basal body of primary cilia.
第2回北大・部局横断シンポジウム、札幌2017
- 4) Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Kohki Kimura, Tatsuma Edamura, Tsutomu Tanaka, Satoko Ishigaki, Thoria Donia, Hiroko Noguchi, Toshihiko Iwanaga & Masayuki Noguchi
Functional Inversin phosphorylation by Akt at basal body of primary cilia.
12th International Symposium of The Institute Network、東京2017
- 5) Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Kohki Kimura, Tatsuma Edamura, Tsutomu Tanaka, Satoko Ishigaki, Thoria Donia, Hiroko Noguchi, Toshihiko Iwanaga & Masayuki Noguchi
Phosphorylation dependent Akt-Inversin interaction at basal body of primary cilia.
第39回日本分子生物学会年会、横浜2016
- 6) Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Kohki Kimura, Tatsuma Edamura, Tsutomu Tanaka, Satoko Ishigaki, Thoria Donia, Hiroko Noguchi, Toshihiko Iwanaga & Masayuki Noguchi
Phosphorylation dependent Akt-Inversin interaction at the ciliary pocket of primary cilia.
第7回北海道大学遺伝子病制御研究所研究交流会、札幌2016
- 7) Futoshi Suizu, Noriyuki Hirata, Kohki Kimura, Tatsuma Edamura, Tsutomu Tanaka, Satoko Ishigaki, Thoria Donia, Hiroko Noguchi, Toshihiko Iwanaga & Masayuki Noguchi
Phosphorylation dependent Akt-Inversin interaction at the ciliary pocket of primary cilia.
第75回日本癌学会学術総会、横浜2016

〔図書〕（計 0 件）

〔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：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.igm.hokudai.ac.jp/hu_ifgm_cb/index.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。