

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20910

研究課題名(和文) 増殖抑制シグナルによるTTBK2の活性化機構と一次繊毛形成における機能解明

研究課題名(英文) Mechanisms of growth arrest-induced TTBK2 activation and its role for ciliogenesis

研究代表者

永井 友朗 (Nagai, Tomoaki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10723059

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)：一次繊毛は細胞周期休止期に中心体から形成される。TTBK2は増殖抑制依存的な一次繊毛形成に必須のキナーゼであるが、その活性化機構は不明である。本研究では、TTBK2の母中心小体への局在化に関わるCep164と、DNA損傷応答キナーゼATRに着目し、TTBK2の活性化機構の解明を目的として研究を実施した。その結果、TTBK2の分子内結合がキナーゼ活性を抑制していること、Cep164がTTBK2のC末端に結合することで、その分子内結合を解離させTTBK2を活性化させることを明らかにした。このことから、Cep164がTTBK2の局在だけでなくその活性化にも寄与し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 from the mother centriole in cellular quiescence. TTBK2 is a serine-threonine kinase that is essential for growth arrest-induced ciliogenesis, but its regulatory mechanism is largely unknown. In this study, I investigated the role of Cep164, a mother centriole protein known to recruit TTBK2 to the mother centriole, and ATR, a DNA damage response-related kinase, for TTBK2 activation. This study showed that an auto-interaction of TTBK2 between C-terminus and N-terminal kinase domain inhibits its kinase activity and that Cep164 interacts with the C-terminal region of TTBK2 and activate it through suppressing its autoinhibitory interaction. These results suggest that Cep164 plays an important role for not only the localization but also the activation of TTBK2.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 中心体 TTBK2 Cep164 母中心小体

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は、脊椎動物の多くの細胞に見られる微小管を軸とした突起状の器官であり、細胞外からの物理的・化学的な刺激を受容する「アンテナ」としての役割を有する。一次繊毛は個体の発生や組織の恒常性維持に必須であり、その形成や機能の欠損は、嚢胞腎・網膜変性・肥満・多指症など様々な疾患を併発する繊毛病と総称される遺伝病の原因となる。一次繊毛は中心体を起点として形成されるため、増殖相では消失し、細胞周期休止期において形成される。培養細胞においては、血清飢餓や接触阻害などの増殖抑制条件下において一次繊毛形成が惹起されることが知られている。遺伝学的手法や発現抑制系をもちいたスクリーニングなどにより、これまでに一次繊毛形成因子が多数同定されたが、増殖抑制依存的な一次繊毛形成の分子機序は未だに多くが不明である。

Tau tubulin kinase-2 (TTBK2)は微小管関連タンパク質であるタウやチューブリンをリン酸化するセリン・スレオニンキナーゼであり、神経変性疾患の一つである脊髄小脳変性症の原因遺伝子である。2012年 Goetz らの研究により、血清飢餓依存的な一次繊毛形成の初期段階において TTBK2 が母中心体へとリクルートされ、それによって母中心体上で一次繊毛形成を抑制している中心体タンパク質 CP110 を母中心体から除去し、さらに繊毛内輸送 (Intraflagellar transport; IFT) 関連タンパク質の中心体へのリクルートを促すことで、一次繊毛軸系の伸長を誘導することが明らかになった。このことから、TTBK2 は細胞増殖抑制に応じた一次繊毛形成の引き金を引く重要な役割を担うことが示唆されるが、増殖抑制シグナルによる TTBK2 の制御機構は不明であった。私たちは以前に、一次繊毛形成過程における TTBK2 の母中心体への局在化機構を明らかにする目的で研究を行い、母中心体を構成するタンパク質の一つである Cep164 が N 末端側の WW ドメインを介して TTBK2 のプロリンリッチ領域 (Pro2) と直接結合し、TTBK2 を母中心体へリクルートすることを明らかにした。しかし、増殖抑制依存的な一次繊毛形成時における TTBK2 のキナーゼ活性の制御機構は全く不明であった。

TTBK2 は N 末端側にキナーゼドメイン、C 末端側に母中心体への局在に必要なプロリンリッチ領域 (Pro2) および微小管プラス端への結合に必要な SxIP モチーフを有することに加え、C 末端側が自己リン酸化されることが知られている。また、N 末端側と C 末端側が互いに相互作用することで、微小管プラス端への局在を抑制する自己阻害機構の存在が報告されている。私たちは、Cep164 と TTBK2 を細胞内で共発現させると、TTBK2 のリン酸化レベルが亢進することを示しており、Cep164 が TTBK2 の局在だけでなくその活性化にも寄与している可能性を見出した。さ

らに、DNA 損傷チェックポイントキナーゼである ATR のリン酸化基質を認識する抗体を用いてウェスタンブロットを行なった結果、Cep164 による TTBK2 のリン酸化レベルの上昇は、TTBK2 の自己リン酸化に加えて ATR によるリン酸化の可能性が示唆された。

ATR は DNA 損傷ストレスに応答して活性化し細胞周期進行を阻害するキナーゼであり、小頭症や小人症などの発達障害を引き起こす遺伝性疾患 Seckel 症候群の原因遺伝子である。最近、ATR が中心体や一次繊毛に局在することが報告され、DNA 損傷応答だけでなく中心体や一次繊毛の形成や機能に参与している可能性が考えられた。以上の点から、一次繊毛形成過程における TTBK2 のリン酸化・活性化に ATR が関与していることを予想した。

以上に基づき、本研究では増殖抑制依存的な一次繊毛形成機構における TTBK2 の活性化機構を解明するために、Cep164 と ATR の関与に着目して研究を行う。本研究により、増殖抑制シグナルと一次繊毛形成を結ぶ新しい分子機序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細胞周期休止期に移行すると、中心体が細胞膜に結合し基底小体へ変換され、軸系微小管を伸長させて一次繊毛を形成する。TTBK2 は Cep164 との結合に依存して母中心体局在し、中心体から基底小体への変換を阻害している中心体タンパク質 CP110 を母中心体から除去することで、一次繊毛形成を促す。私たちの以前の解析によって、TTBK2 のキナーゼ不活性化型、および Cep164 との結合能を欠いた Pro2 欠損 (Pro2) 変異体のいずれも一次繊毛形成能を著しく欠いていることが示され、Cep164 との結合とキナーゼ活性の両方が TTBK2 による一次繊毛形成の誘導に必要であることが明らかになっている。しかし、増殖抑制シグナルの下流で TTBK2 がどのように活性化されるかは不明である。本研究では、Cep164 や ATR による TTBK2 のキナーゼ活性制御機構を解明し、増殖抑制依存的な一次繊毛形成の分子機構の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、増殖抑制依存的な一次繊毛形成機構を解明するため、以下の解析を行った。まず、TTBK2 の N 末端側と C 末端側同士分子内相互作用が TTBK2 のキナーゼ活性に与える影響を検証するため、TTBK2 のキナーゼドメインを含む N 末端断片タンパク質 (TTBK2-N) と全長タンパク質 (TTBK2-FL) のキナーゼ活性を比較する。さらに、TTBK2 の N 末端断片に C 末端断片 (TTBK2-C) を共存させた際のキナーゼ活性への影響を検証する。また、脊髄小脳変性症の原因となる TTBK2 の N 末端断片変異体のキナーゼ活性を測定する。

TTBK2の活性化に対するCep164の関与を明らかにするため、Cep164との結合がTTBK2の分子内相互作用やTTBK2のキナーゼ活性を上昇させるかどうかを解析する。ATRによるTTBK2の活性化機構を明らかにするため、ATR阻害剤による一次繊毛形成、TTBK2の自己リン酸化やキナーゼ活性に与える影響を検証する。さらに、ATRによるTTBK2のリン酸化機構を解明するため、DNA損傷応答によるTTBK2の局在変化やリン酸化レベルの変化を解析する。

4. 研究成果

(1) TTBK2の分子内相互作用による活性制御機構の解明

私たちは、TTBK2の分子内相互作用がTTBK2のキナーゼ活性に与える影響を明らかにするために、TTBK2-NとTTBK2-FLのキナーゼ活性を比較するためにキナーゼアッセイを行った。その結果、TTBK2-FLは全長に比べてキナーゼ活性が著しく亢進していることが明らかになった。さらに、TTBK2-NとTTBK2-Cを予め結合させてキナーゼ活性を測定すると、TTBK2-Cとの結合によってTTBK2-Nのキナーゼ活性が減弱することがわかった。これらの結果から、TTBK2の分子内相互作用は局在だけでなくキナーゼ活性も負に制御していることが明らかとなった。

脊髄小脳変性症を引き起こすTTBK2の変異体では、TTBK2のキナーゼドメインの直後にフレームシフトを生じ、結果としてC末端側を欠損した断片変異体を生ずる。過去の報告で、このTTBK2変異体の発現により一次繊毛形成が阻害されることが明らかとなっているが、この変異がTTBK2の活性に及ぼす影響は不明であった。私たちは、脊髄小脳変性症を発症する2つ家系の変異体に相当するTTBK2のN末端断片変異体(TTBK2-Family1、TTBK2-Family2)を作製し、キナーゼアッセイにより活性を測定した結果、TTBK2-Family1、-Family2はともに-FLに比べて著しくキナーゼ活性が低下していた。このことから、TTBK2の変異による脊髄小脳変性症の発症には、TTBK2のキナーゼ活性の低下とそれに伴う一次繊毛の形成不全が関係していることが示唆された。

(2) Cep164によるTTBK2の活性化機構の解明

Cep164がTTBK2の活性化に寄与しているかどうかを検証するために、まずCep164がTTBK2の分子内相互作用に影響を与えるか検証した。Cep164のN末端断片変異体(Cep164-N)を作製し、予め結合させたTTBK2-NとTTBK2-Cに加えたところ、Cep164-Nの添加によってTTBK2-NとTTBK2-Cが解離する一方、TTBK2のPro2領域と結合できない変異体Cep164-N(2YA)ではTTBK2-NとTTBK2-Cの解離が起らなかった。このことから、Cep164はTTBK2のC末端側への結合依存的に、TTBK2の分子内相互作用を解離させることが明らかになった。さらに、この分子内相互作用

の解離によってTTBK2が活性化するかどうかを検証するため、予め結合させたTTBK2-NとTTBK2-CにCep164-Nを加えてキナーゼアッセイを行なったところ、Cep164-Nの添加によってTTBK2-Nのキナーゼ活性が回復することが示された。以上の結果より、Cep164はTTBK2のC末端側に結合することで、TTBK2の母中心小体への局在化だけでなくそのキナーゼ活性の上昇にも寄与していることが明らかになった。

(3) ATRによるTTBK2の活性化機構の解明

TTBK2はATRの基質コンセンサス配列であるSQ/TQモチーフを複数箇所有する。ATRのリン酸化基質に対する抗体を用いたウェスタンブロットによりCep164と共発現させたTTBK2のバンドが検出されたことから、ATRによってTTBK2がリン酸化される可能性が示唆された。そこで、ATR阻害剤CGK-733によるTTBK2のリン酸化およびキナーゼ活性と、一次繊毛形成への影響を検証した。その結果、CGK-733は血清飢餓依存的な一次繊毛形成を阻害したが、TTBK2のリン酸化には影響しなかった。また、キナーゼアッセイの結果CGK-733によるTTBK2キナーゼ活性への阻害効果も見られなかった。ATRによるTTBK2活性化の可能性をさらに検証するため、UV照射やヒドロキシウレア処理によりDNA損傷ストレスを与えたときのTTBK2のリン酸化レベルや局在変化を解析した。その結果、DNA損傷ストレスによってTTBK2が核内に移行する様子が観察された一方、TTBK2のリン酸化レベルは変化しなかった。以上の結果から、ATRによるTTBK2のリン酸化や活性化を示す結果は得られなかった。

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1件)

Nagai, T., Mizuno, K. Jasplakinolide induces primary cilium formation through cell rounding and YAP inactivation. *PLoS One*, 査読有、12巻、2017年、e0183030、doi: 10.1371/journal.pone.0183030

〔学会発表〕(計1件)

永井友朗、藤井崇平、水野健作 Cep164による一次繊毛形成キナーゼTTBK2の活性化機構、2017年6月13日-15日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

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/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 友朗 (NAGAI, TOMOAKI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：10723059

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()