

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02398

研究課題名（和文）増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of growth arrest-induced primary cilium formation

研究代表者

水野 健作（Mizuno, Kensaku）

東北大学・生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：70128396

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成の分子機構を解明することを目的として研究を行い、以下の成果を得た。1) 増殖抑制シグナルに応答してCEP97が母中心小体から除去されるが、CEP97の分解に関わるユビキチンリガーゼとしてCullin3-RBX1-KCTD10複合体を同定した。2) 繊毛病の原因遺伝子の一つであるCEP104について、TOGドメインが微小管重合活性を持つことを解明し、その活性を介して、軸系微小管の伸長とHedgehogシグナルの伝達に関与していることを解明した。3) Furryは、NDRの活性化とYAPへの直接結合によって、YAPの細胞質繫留に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛は、多くの動物細胞が有する非運動性の繊毛で、ヘッジホッグなどの多様なシグナルを受容するアンテナとして、細胞の増殖・分化や組織の形成・恒常性維持に重要な役割を担っている。一次繊毛の形成不全は嚢胞腎、網膜変性など繊毛病とよばれる多様な疾患の原因となることが知られており、一次繊毛形成機構の解明は発生学的にも医学的にも重要な課題である。本研究では、一次繊毛形成の初期過程で重要な役割を担っているCEP97の分解機構とCEP104の微小管制御機構について新たな知見を得た。これらの成果は、一次繊毛形成の重要な機構を解明したものであり、基礎生物学の進展だけでなく医学分野にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Primary cilia are antenna-like sensory organelles that transmit various extracellular signals. Deficits in ciliogenesis cause human disorders that are termed ciliopathies. In this project, we aimed to elucidate the mechanisms of growth arrest signal-induced ciliogenesis and obtained several findings as follows: 1) Ciliogenesis requires the removal of CEP97 from the mother centriole for initiating ciliary axoneme extension. We showed that CEP97 is degraded by the cullin-3-RBX1-KCTD10 ubiquitin ligase complex and this process is crucial for serum starvation-induced ciliogenesis. 2) CEP104 is a causative gene for Joubert syndrome. We showed that the TOG domain of CEP104 exhibits microtubule-polymerizing activity and this activity is essential for growth arrest-induced cilium elongation and Hedgehog signaling. 3) We showed that Furry suppresses nuclear localization of YAP by activating NDR1/2 kinases and directly binding to YAP.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：一次繊毛 ユビキチン化 ユビキチンリガーゼ 繊毛病 CEP97 CEP104 ヘッジホッグ YAP

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛は、多くの動物細胞が有する非運動性の繊毛で、Hedgehog や Wnt などの化学シグナルや液流などの機械的シグナルを受容・伝達するアンテナとして、細胞の増殖・分化や組織の形成・恒常性維持に重要な役割を担っている。一次繊毛の形成不全は嚢胞腎、網膜変性、内臓逆位、多指症、肥満など繊毛病とよばれる多様な疾患の原因となることが知られており、一次繊毛形成機構の解明は発生学的にも医学的にも重要な研究課題である。一般に、一次繊毛は細胞休止期(G0 期)に形成されることが知られている。一次繊毛形成は、母中心小体由来する基底小体から微小管が伸長することによって開始される。血清飢餓や高密度培養などの増殖抑制シグナルによって細胞が G1 期から G0 期へ移行すると、中心体は細胞膜に移行・繫留され、母中心小体(基底小体)の遠位から微小管が伸長することによって、細胞膜上に一次繊毛が形成される。このように、一次繊毛形成は増殖抑制シグナルによって誘導されるが、その分子機構は未だ不明である。

私達はこれまで、増殖抑制シグナル経路として知られる 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を促進すること、細胞の基質接着能の低下は YAP の不活性化を介して、グルコース飢餓は mTORC1 の不活性化を介して一次繊毛形成を誘導することや、一次繊毛形成に必須のキナーゼである TTBK2 の母中心小体への局在化機構を明らかにしてきた。Cep97/CP110 は母及び娘中心小体遠位に局在する蛋白質複合体で、増殖期には中心小体からの微小管伸長を阻害しているが、細胞が G0 期へ移行すると、母中心小体から特異的に除去され、その結果、母中心小体から軸系微小管が伸長し、一次繊毛が形成される。したがって、増殖抑制シグナルによる一次繊毛形成の引き金となる機構を理解するためには、増殖抑制シグナルにตอบสนองして Cep97/CP110 が母中心小体から除去される機構、および Cep97/CP110 の除去が軸系微小管の伸長を促す機構を解明することが極めて重要である。私達は最近、血清飢餓によって Cep97 がユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることを見出したが、この過程に関与するユビキチンリガーゼは不明である。また、Cep97/CP110 結合蛋白質である CEP104 は、増殖細胞中では CEP97 と CP110 とともに母および娘中心小体の先端部に局在しているが、血清飢餓依存的に CEP97/CP110 から解離し、伸長中の一次繊毛の先端部に局在する。CEP104 は繊毛病であるジュベール症候群の原因遺伝子の一つでもあることから、一次繊毛形成に重要な役割を果たしていると考えられる。私達は Cep104 が微小管重合活性をもつことを見出したが、その詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

上述の研究背景に基づいて、本研究では、Cep97/CP110 の分解・除去機構、及び Cep104 による軸系微小管重合の制御機構を解明し、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構を解明することを目的に研究を実施した。Cep97/CP110 の分解・除去機構については、血清飢餓刺激によって Cep97 がユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されることを見出していたので、Cep97 のユビキチンリガーゼを同定することを第 1 の目的とした。さらに、同定したユビキチンリガーゼが増殖抑制シグナルによって活性化される仕組みを明らかにし、一次繊毛形成の引き金となる分子機構を明らかにすることを目指した。また、CEP97/CP110 結合タンパク質である Cep104 については、その微小管伸長活性を見出しているため、その分子機構を解明するとともに、一次繊毛形成における CEP104 と CEP97/CP110 の相互作用の意義を解明し、Hedgehog シグナルにおける機能を明らかにして、繊毛病の病因解明につながる知見を得ることを目的とした。さらに、Hippo シグナルの関連タンパク質である Furry についても、YAP の活性化と一次繊毛形成における役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CEP97 の分解に関わるユビキチンリガーゼの同定：

一次繊毛形成および CEP97/CP110 の局在解析には不死化したヒト網膜色素上皮細胞(RPE1 細胞)を用いた。発現抑制実験は siRNA を用いた。150 種類の BTB 含有タンパク質の cDNA は産総研のヒトプロテオーム発現リソース(HuPEX) cDNA ライブラリーを用いた。CEP97 と BTB 含有タンパク質の相互作用のスクリーニングには、操作の簡単な visible immunoprecipitation (VIP) 法を用いた。BTB 含有タンパク質と Venus の融合タンパク質と CEP97-mCherry を HEK293T 細胞に共発現し、mCherry-nanobody で CEP97 を免疫沈降し、共沈してくる Venus-BTB 含有タンパク質を蛍光顕微鏡で蛍光観察した。

(2) CEP104 の一次繊毛形成と Hedgehog シグナルにおける役割：

一次繊毛形成および Hedgehog シグナルの解析には RPE1 細胞を用いた。CEP104 の TOG ドメインは GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、グルタチオンセファロースで精製後、GST は PreScission protease により除去してから用いた。インビトロ微小管重合アッセイでは、精製したチューブリンを TOG ドメインと 37 度でインキュベートし、濁度を測定した。一次繊毛の長

さは、細胞を固定後、Ac-tubulin あるいは Arl13b 抗体で免疫蛍光染色し、共焦点蛍光顕微鏡の Z-stack 画像から計測した。

(3) Furry による YAP の不活性化機構：

Furry の発現抑制細胞は、HEK293A 細胞の Furry 遺伝子を CRISPR/Cas9 法でノックアウトすることで作成した。YAP と TAZ の核-細胞質局在は、各々の抗体を用いた免疫蛍光染色により解析した。NDR1/2 のキナーゼ活性は、GST-YAP を基質として用いたインビトロキナーゼアッセイにより解析した。

4. 研究成果

(1) CEP97 の分解に関わるユビキチンリガーゼの同定：

CEP97 の発現抑制によって CP110 は減少するが、CP110 の発現抑制によって CEP97 の減少は認められないことから、CEP97 が CEP97/CP110 複合体の安定化に寄与していることが示された。プロテアソーム阻害剤 MG-132 によって、血清飢餓依存的な CEP97 のユビキチン化が促進され、分解が抑制されたことから、CEP97 はユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることが示された。CEP97 のユビキチン化部位 (K582, K617, K618) の変異体の過剰発現によって、CP110 の母中心小体からの除去、および一次繊毛形成が抑制されたことから、CEP97 のユビキチン化は CEP97/CP110 の母中心小体からの除去と一次繊毛形成に必要であることが示された。次に、種々のユビキチンリガーゼ阻害剤を用いて、CEP97 の分解には Cullin-RING 型の E3 リガーゼが関与することが分かった。7 種の Cullin の中、Cullin-3 の発現抑制によってのみ、CEP97 の中心体への過剰な集積が認められ、血清飢餓依存的な CP110 の母中心小体からの除去と一次繊毛形成が抑制されたことから、Cullin-3 が血清飢餓依存的な CEP97 の分解に関与していることが示された。Cullin-3 とともに機能する RBX1 の発現抑制によっても、CEP97/CP110 の母中心小体からの除去と一次繊毛形成が抑制された。Cullin-3 によるユビキチン化には、BTB ドメインを持つ基質認識タンパク質が必要である。私たちは VIP 法を用いて、150 種類の BTB 含有タンパク質の中から CEP97 と結合する 24 種類の BTB 含有タンパク質を同定した。これらのタンパク質の発現抑制効果を調べた結果、KCTD10 の発現抑制によって、血清飢餓依存的な一次繊毛の形成と CP110 の母中心小体からの除去が抑制され、CEP97 の中心小体への集積が認められた。また、KCTD10 の BTB ドメインの変異体の過剰発現によって、CEP97 の母中心小体からの除去や一次繊毛形成が抑制された。以上の結果から、Cullin-3-RBX1-KCTD10 複合体による CEP97 のユビキチン化とプロテアソームによる分解は、血清飢餓依存的な CEP97/CP110 の母中心小体からの除去と一次繊毛形成に重要な役割を担っていることが示された。(Nagai et al., J. Cell Sci., 2018)

(2) CEP104 の一次繊毛形成と Hedgehog シグナルにおける役割：

CEP104 の一次繊毛形成における役割を解明するため、CEP104 の発現抑制を行ったところ、繊毛の形成頻度には影響がなかったが、繊毛の長さが有意に減少した。CEP104 のもつ TOG ドメインは微小管結合活性を持つことが知られている。私たちはインビトロ微小管重合アッセイを用いて、CEP104 の TOG ドメインが微小管の重合促進活性を持つことを示した。また、CEP104 の TOG ドメインの変異体 (W448A/V493D/R626A) は微小管重合活性が減少し、一次繊毛の長さが短くなった。CEP104 は微小管の先端に結合する +TIPs である EB1 と結合することが知られているが、EB1 の発現抑制実験や CEP104 の EB1 結合モチーフ変異体の解析から、CEP104 の一次繊毛先端部への局在や一次繊毛の伸長反応には EB1 との結合は必要がないことがわかった。また、CEP104 は血清存在下では CP110 と結合しているが、血清飢餓刺激によってこの結合は解離する。CEP104 の発現抑制によって CP110 の母中心小体からの除去は影響を受けず、また、CP110 の発現抑制によって、CEP104 の軸系微小管伸長機能も影響を受けないことがわかった。CEP104 は N 末端部に Jelly-roll ドメインを持つが、この領域を欠失した変異体では軸系微小管の伸長が抑制されることから、Jelly-roll ドメインは一次繊毛の軸系の伸長に必要であることが示された。さらに、CEP104 の繊毛病における機能を解析するため、Hedgehog シグナルの伝達における CEP104 の機能を解析した。Hedgehog シグナルによって、一次繊毛内へ Smoothed (Smo) が流入し、GPR161 が流出することが知られている。CEP104 の発現抑制によって、Hedgehog シグナル依存的な Smo の流入と GPR161 の流出が阻害されることが明らかになった。さらに、Hedgehog シグナルによる GLI1 の転写の促進も CEP104 の発現抑制によって大きく阻害された。以上の結果から、CEP104 の TOG ドメインと Jelly-roll ドメインは、増殖抑制刺激依存的な一次繊毛形成において、軸系微小管の伸長反応に重要な役割を持つことが明らかになった。また、CEP104 は Hedgehog シグナルの伝達において重要な機能を担っていることが明らかになり、CEP104 の欠失は Hedgehog シグナルの不全を介して繊毛病の発症に関与していることが示唆された。(Yamazoe et al., J. Biol. Chem., 2020)

(3) Furry による YAP の不活性化機構：

私たちは以前、増殖抑制シグナル経路として知られる Hippo(MST)経路の下流キナーゼである NDR2 は一次繊毛形成を促進すること、細胞の基質接着能の低下は YAP の不活性化を介して一次繊毛形成を促進すること、を報告した。Furry は NDR1/2 の活性化を促進するタンパク質として知られているが、YAP の活性化や核-細胞質局在に対する機能や一次繊毛形成における機能は不

明であった。本研究では、高密度培養細胞における YAP と TAZ の核外移行、細胞質繫留が、Furry の発現抑制によって抑制されることを見出した。Furry の発現抑制は、NDR1/2 のキナーゼ活性を低下させ、YAP のリン酸化と細胞質繫留を抑制した。NDR1/2 の発現抑制は、YAP のリン酸化と細胞質繫留を抑制した。一方、Furry の発現抑制は一次繊毛形成の頻度には影響を与えなかった。また、Furry は N 末端側で YAP と直接結合することを見出した。YAP を細胞質に繫留する Furry の活性は、Furry の N 末端側断片では維持されていたが、C 末端側断片では認められなかった。以上の結果から、Furry は NDR1/2 の活性化を介して YAP のリン酸化を促進するとともに、細胞質で直接結合することで、YAP の細胞質繫留を促進し、細胞増殖の抑制に関与していることが示された。(Irie et al., J. Biol. Chem., 2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagai, T., Mukoyama, S., Kagiwada, H., Goshima, N., and Mizuno, K.	4. 巻 133
2. 論文標題 Cullin-3-KCTD10-mediated CEP97 ubiquitination promotes primary cilium formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs219527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.219527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Irie, K., Nagai, T., and Mizuno, K.	4. 巻 295
2. 論文標題 Furry protein suppresses nuclear localization of yes-associated protein (YAP) by activating NDR kinase and binding to YAP.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3017-3028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.010783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazoe, T., Nagai, T., Umeda, S., Sugaya, Y., and Mizuno, K.	4. 巻 295
2. 論文標題 Roles of TOG and jelly-roll domains of centrosomal protein CEP104 in its functions in cilium elongation and Hedgehog signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Boil. Chem.	6. 最初と最後の頁 14723-14736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 永井友朗、水野健作	4. 巻 69
2. 論文標題 微小管 アセチル化、脱アセチル化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学書院	6. 最初と最後の頁 484-485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 入江和樹、永井友朗、向山祥帆、鍵和田晴美、五島直樹、水野健作
2. 発表標題 一次繊毛形成におけるCEP97の分解機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 友朗、向山 祥帆、水野 健作
2. 発表標題 Cullin3-KCTD10複合体によるCEP97の分解は増殖抑制依存的な一次繊毛形成を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江 和樹、菅野 新一郎、永井 友朗、水野 健作
2. 発表標題 一次繊毛形成時のCEP97のコピキチン化における14-3-3タンパク質の関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuno, K.
2. 発表標題 Cullin3-KCTD10-mediated CEP97 degradation is crucial for serum-starvation-induced ciliogenesis.
3. 学会等名 Gordon Research Conference "Cilia, mucus and mucociliary interactions" (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院生命科学研究科 情報伝達分子解析分野
http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------