

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790222

研究課題名（和文） 哺乳動物細胞におけるNDRキナーゼの制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of regulation of NDR kinases in mammalian cells

研究代表者

中川 健太郎 (NAKAGAWA KENTAROU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70451929

研究成果の概要（和文）：真核生物で高度に保存されている Serine/Threonine (Ser/Thr) キナーゼである Nuclear Dbf2-Related (NDR) キナーゼの活性化機構の解析を行った。上流キナーゼである MST2 と MOB1 によって NDR キナーゼのひとつである NDR1 が相乗的に活性化することを示した。またその際に MOB1 が MST2 によってリン酸化され、リン酸化された MOB1 が MST2 と NDR1 をつなぐリン酸化依存的な scaffold protein として機能することを明らかにした。MOB1 は MST2 により複数の部位がリン酸化され、そのリン酸化状態によって NDR1/2 および NDR キナーゼである LATS1/2 の活性化に際して異なる特性を有する可能性を提示している。また、Ras 結合領域を持つ RASSF ファミリーのひとつである RASSF6 が MST2 に結合し、NDR1/2 と LATS1/2 の活性化を抑制していること、同時に MST2 は RASSF6 による細胞死を抑制していることを明らかにしている。

研究成果の概要（英文）：Mammalian nuclear Dbf2-Related (NDR) kinases (NDR1/2, LATS1/2) play a role in cell proliferation, apoptosis and morphological changes. These kinases are regulated by mammalian sterile 20-like kinases (MSTs) and Mps one binder (MOB) 1. MST2 and MOB1 synergistically activate NDR1. Activated MST2 facilitates the tripartite complex formation of MOB1, MST2 and NDR1 in cells. The *in vitro* biochemical study demonstrates the phosphorylation of MOB1 by MST2 at several sites. Point mutation analysis revealed that phosphorylation of MOB1 is crucial for the activation of NDR1/2 and LATS1/2. We also demonstrated that MST2 suppressed RASSF6 induced cell death. And at the same time, adaptor protein RASSF6 inhibits MST2 dependent NDR kinase activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医化学一般

科研費の分科・細目：細胞内シグナル伝達

キーワード：アダプター分子、リン酸化、シグナル伝達、細胞死

1. 研究開始当初の背景

NDR キナーゼは真核生物において高度に保存されているセリン・スレオニンキナーゼである。ショウジョウバエには Warts と Trc の 2 つの NDR キナーゼが存在する。Warts は細胞増殖・細胞死制御を通じて臓器の大きさを決定するシグナル伝達系 Hippo pathway の構成分子として機能し、その異常は細胞の異常増殖をもたらす。Trc は神経細胞の樹状突起の伸長を制御している。ヒトには 4 つの NDR キナーゼがある。LATS1/2 は、large tumor suppressor という名前が示すように、腫瘍抑制因子として見出され、Warts と類似の機能を担うと想定される。一方、研究開始の時点では NDR1/2 の機能は十分に明らかでないが、centrosome の形成を促進すること、高転移性メラノーマで NDR1 の活性が上昇していること、進行性の breast ductal carcinoma で NDR2 の発現量が増加していることなどから、NDR1/2 は LATS1/2 とは逆に、むしろ細胞増殖促進的に働き、発癌を誘導、促進する可能性が考えられた。また、ヒトの NDR1 はショウジョウバエの Trc 変異をレスキューすることからは、NDR1 は Trc 相当のホモログとして位置づけられ、神経突起伸長の制御に関わる可能性も推測されるが、この点は明らかでない。

このように、NDR キナーゼは細胞増殖・細胞死・細胞骨格の制御に関わるキナーゼで、種を超えて保存されている。一方で NDR キナーゼを制御する分子機構も種を超えて保存されており、ヒトでは mammalian Ste20-like kinase (MST) と MOB1/2 が NDR キナーゼを活性化する。NDR キナーゼの数が増え、個々に異なる役割を担うようになったにもかかわらず、制御機構は基本的に共有されており、MST と MOB1 がどのように異なる機能を持つ複数の NDR キナーゼを制御仕分けしているのか不明となっていた。MST と MOB1 による NDR キナーゼの活性化機構の解明は NDR キナーゼの生理的、病態的機能の解明にもつながると考えられた。

2. 研究の目的

MST と MOB1 が、どのようにして、複数の異なる機能を持つ NDR キナーゼを制御仕分けしているのか興味深い問題であり、しかもこの問題の解明は、「腫瘍抑制的な LATS1/2 の機能不全によって発症している癌病変において、腫瘍促進的な NDR1/2 を抑制して、両者のバランスを回復することによって、癌の増殖をおさえる」という従来にない新しい治療戦略に示唆を与えることが想定された。

そこで、本申請研究では、NDR1/2 と LATS1/2 の制御機構の分子レベルの解析を中心課題とし、同時に、まだ十分に明らかでない哺乳動物における NDR キナーゼの生理

的、病態生理的役割の解明をおこなうことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MOB1, MST が NDR1/2 と LATS1/2 を活性化すること、また MOB1 が MST によってリン酸化されることが報告されていた。このことから、MOB1 のリン酸化が NDR キナーゼの活性化に重要な役割を持つと考え、MOB1 のリン酸化が NDR キナーゼの活性化に与える影響を *in vitro* のキナーゼアッセイにおいて検討を行った。

(2) MOB1 に存在する計 26 個の全てのセリン、スレオニンをアラニン置換した変異体と MST2 を組み合わせて試験管内で NDR1 キナーゼのアッセイを行い、NDR1 の活性化に関わる MOB1 の複数のリン酸化サイトを同定した。さらに、LATS2 の試験管内アッセイを行い、NDR1 と LATS2 の活性化に際し、MOB1 のリン酸化サイトの要求性の違いを検討した。

(3) 上記(2)で同定された残基に対するリン酸化抗体を作成し、細胞内で MOB1 のどの残基がリン酸化されているか解析を行った。

(4) NDR キナーゼ活性化の分子機構にはショウジョウバエでは Salvador と dRASSF とよばれるアダプター分子が加わる。ヒトでは hWW45 と RASSF ファミリーが相当する。この hWW45 と RASSF ファミリーの一つである RASSF6 が NDR1/2、LATS1/2 の活性化に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* の NDR1 キナーゼアッセイ系において、MST2 と MOB1 の両方を加えることにより NDR1 が著しい活性化を示すことを見出した。また培養細胞を用いた共沈実験から、NDR1 と MST2 の結合が脱リン酸化酵素の阻害剤であるオカダ酸で促進されること、また MOB1 の強制発現がこの結合を増強することが認められた。このことから MOB1 が MST2 と NDR1 の scaffold protein として機能していることが示唆された。

(2) MOB1 の計 26 個のセリン、スレオニンをアラニン置換した変異体を用いて MST2 の存在下、NDR1 のキナーゼアッセイを行ったところ、MOB1 の Thr74 と Thr181 をアラニンに置換した変異体で NDR1 の活性化が強く阻害され、MOB1 上のこの 2 つの残基が NDR1 の活性化に重要な機能を果たしていることを見出した。またこのうち Thr74 の周辺配列を含むペプチドが実際に MST2 によりリン酸化されることが認められた。

(3) MOB1 の Thr74 に対するリン酸化特異的な抗体を作成し、実際に MOB1 の Thr74 が MST2 によってリン酸化されていることを明らかにした。また MOB1 のリン酸化部位と

して報告されている Thr12, Thr35、および Thr74 の 3 箇所のリン酸化部位をアラニン置換すると NDR1 の活性化が完全に失われることから、NDR1 の活性化にはこの 3 箇所のリン酸化が関わると考えられる。各リン酸化部位は異なる生化学的特性を有しており、Thr35 のリン酸化が NDR1/2、LATS1/2 の活性化に重要であること、また Thr12 のリン酸化の阻害はむしろ NDR1 の活性化を増強し、Thr12 のリン酸化が NDR1 と MOB1 の乖離を促進するシグナルとして機能する可能性を見出した。一方、LATS2 の活性化は MOB1 の Thr12 のリン酸化を阻害することにより抑制されることから、MOB1 のリン酸化状態が NDR1/2 と LATS1/2 の活性化の強さをコントロールしている可能性が考えられる。

(4) RASSF6 が MST2 に結合して活性を阻害し、NDR1/2、LATS1/2 によるシグナル伝達に拮抗することが示唆された。このとき、RASSF6 による細胞死は MST2 により抑制される。しかし、RASSF6 は、hWW45 依存的に活性化 MST2 から遊離すると、アポトーシスを誘発することが認められ、hWW45 が RASSF6 と MST2 を介する NDR1/2、LATS1/2 の活性化、および細胞死の誘導を制御していることを明らかにした。

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 6 件)

① Aguilera C, Nakagawa K, Sancho R, Chakraborty A, Hendrich B, Behrens A. c-Jun N-terminal phosphorylation antagonizes recruitment of the Mbd3/NuRD repressor complex. *Nature* 469 巻 7329 号 231-235 (2011) 査読有

② Nakagawa K, Sugahara M, Yamasaki T, Kajiho H, Takahashi S, Hirayama J, Minami Y, Ohta Y, Watanabe T, Hata Y, Katada T, Nishina H. Filamin associates with stress signalling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK activation. *Biochem. J.* 427 巻 2 号 237-245 (2010) 査読有

③ Tanemura S, Momose H, Shimizu N, Kitagawa D, Seo J, Yamasaki T, Nakagawa K, Kajiho H, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Blockade by SP600125 of Fcεpsilon receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J. Biochem.* 145 巻 3 号 345-354 (2009) 査読有

④ Bao Y, Sumita K, Kudo T, Withanage K, Nakagawa K, Ikeda M, Ohno K, Wang Y, Hata Y. Roles of mammalian sterile 20-like kinase 2-dependent phosphorylations of Mps one binder

1B in the activation of nuclear Dbf2-related kinases. *Genes Cells* 14 巻 12 号 1369-1381 (2009) 査読有

⑤ Ikeda M, Kawata A, Nishikawa M, Tateishi Y, Yamaguchi M, Nakagawa K, Hirabayashi S, Bao Y, Hidaka S, Hirata Y, Hata Y. Hippo pathway-dependent and -independent roles of RASSF6. *Sci. Signal.* 2 巻 90 号 ra59 (2009) 査読有

⑥ Hirabayashi S, Nakagawa K, Sumita K, Hidaka S, Kawai T, Ikeda M, Kawata A, Ohno K, Hata Y. Threonine 74 of MOB1 is a putative phosphorylation site by MST2 to form the scaffold to activate nuclear Dbf2-related kinase 1. *Oncogene* 27 巻 4281-4292 (2008) 査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 中川健太郎、包義君、工藤琢己、壽美田一貴、畑裕：「アダプター分子 MOB1 のリン酸化が Nuclear Dbf2-related キナーゼファミリーの選択的な活性化を制御する」第 31 回日本分子生物学会年回、第 81 回日本生化学会大会 平成 20 年 12 月 10 日ポスター発表、12 月 11 日口頭発表 神戸

[図書] (計 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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

中川 健太郎 (NAKAGAWA KENTARO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：70451929

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：