

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293072

研究課題名(和文) 臓器の構築・維持を支えるシグナルファインチューニング

研究課題名(英文) Cell signaling fine-tuning that supports animal tissue development and homeostasis

研究代表者

石谷 太 (Tohru, Ishitani)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：40448428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物組織の構築や維持は、WntシグナルやShhシグナルなどの限られた種類のシグナル群によって制御される。しかしながら、わずかな数のシグナル群のON/OFFの制御のみで複雑な組織構築を支えられるとは考えにくい。これに加え、シグナル群の活動の局所的で厳密な微調整(シグナルファインチューニング)が必須であると考えられる。本研究ではまず、Wntシグナルのファインチューナー分子であるNLKについて解析を行い、NLKの機能破綻が悪性脳腫瘍を引き起こす分子基盤を解明した。また、大規模スクリーニングによりNLK特異的阻害剤を同定した。また、WntシグナルやShhシグナルの新たなファインチューナーを発見した。

研究成果の概要(英文)：Animal tissues contain a variety of specialized cells and exert complex and accurate functions. Construction and maintenance of animal tissues are regulated by cell signaling pathways, such as Wnt and Shh signaling pathways. Interestingly, the number of cell signaling pathways is very few. Simple ON/OFF regulation of these few signaling pathways must be NOT sufficient to achieve the highly complex processes during tissue construction and maintenance. We believe that the spatial-temporal regulation of signaling pathways (Signal Fine-tuning) varies the roles of signaling pathways and contributes to tissue construction and maintenance. In this study, we focused on nemo-like kinase (NLK), which is a fine-tuner of Wnt signaling. We first revealed the molecular basis by which dysregulation of NLK causes malignant brain tumor. We also developed the small molecules that specifically inhibit NLK activity. We also discovered new molecules that fine-tune the activity of Wnt and Shh signaling.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：シグナルファインチューニング 臓器構築

## 1. 研究開始当初の背景

私たちの生命活動に必須の装置である“組織・臓器”は、多種多様な細胞から構成され、かつ、複雑精緻な構造と機能を持つ。非常に興味深いことに、複雑な構造と機能を持つ組織・臓器の構築と維持は、わずかな種類の細胞運命制御シグナル群の活動によって支えられている。しかしながら、わずかな数のシグナル群の ON/OFF の制御のみで、複雑な組織の構築と維持を支えられるとは考えにくい。私は、シグナルの活動の強さの時空間的な微調整、すなわち“シグナルファインチューニング”がお式・臓器の構築と維持の達成に重要であると考えている。

私たちはこれまでの 14 年間の継続的な研究により、タンパク質リン酸化酵素 NLK によるシグナルファインチューニングが組織・臓器構築に貢献することを発見している。例えば、NLK が神経板の神経前駆細胞集団において、転写制御因子 Notch1 をリン酸化して Notch1 転写複合体の形成を阻害し、Notch シグナルの活動領域を制限することにより、適切な数の神経細胞の形成を導くこと (Ishitani et al., Nature Cell Biol 2010) や NLK による転写因子 Lef1 のリン酸化が、中脳の神経前駆細胞において Lef1 とヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 の結合を解除することにより Wnt シグナルを増強して中脳視蓋の成長を促すこと (Ota et al., EMBO J 2012) を見いだしている。非常に興味深いことに、NLK による Notch/Wnt シグナルの制御は、普遍的な現象ではなく、時期組織特異的であり、Notch/Wnt シグナルの活動領域の一部とその隣接領域でしか起きない。つまり、NLK は Notch/Wnt シグナルの活動の強さや範囲を局所的に微調整することで中枢神経系の構築に貢献していると考えられる。しかしながら、中枢神経系における NLK の機能の全容は未だ明らかになっていない。

また、腫瘍形成に関わる Notch/Wnt シグナルの制御に NLK が関与することから、NLK の腫瘍形成への関与が期待できる。最近、海外のグループが、肝細胞がんでは NLK の発現亢進が起きており、肝細胞がん細胞株で NLK を RNAi すると細胞増殖が低下すること (Jung et al., J Cell Biochem 2010) や、前立腺がんではがんの進行に伴い NLK の発現が低下すること (Emami et al., Prostate 2009) を報告した。これらの発見は、NLK が肝細胞がんや大腸がん、前立腺がんの発症や悪性化に関与する可能性を示唆している。しかしながら、NLK によるシグナルファインチューニングの腫瘍形成における重要性や、NLK の機能破綻が引き起こすがんの発症機序は、大部分が未解明である。また、NLK の活性の人為的制御を可能にする化合物が開発されれば、がんの治療に貢献しうる可能性があるが、そのような化合物は未だに同定されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質リン酸化酵素 NLK を中心とするシグナルファインチューニングに関わる分子群の作用機序とその組織構築・維持・破綻における機能を明らかにする。これにより、動物組織の構築・維持を支える分子基盤の新たな一面を明らかにする。また、NLK の活性制御化合物も同定し、将来的な疾患治療・組織再生医療への貢献を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、ゼブラフィッシュなどのモデル脊椎動物を用いて、*in vivo* におけるシグナルファインチューニングのメカニズムと役割を解析する。また、モデル動物を用いた遺伝学的・細胞生物学的解析と、ヒトサンプルを用いたゲノム解析、及び *in vitro* 系と動物細胞株を用いた生化学的解析を効果的に組み合わせ、独自の系統的アプローチを行い、これにより「シグナルファインチューニングの分子基盤とその臓器構築・維持における意義、及びがんにおけるその破綻」をより詳細かつ正確に解明する。また、NLK の活性制御化合物の同定にあたっては、化合物ライブラリーをライブラリー保有機関より入手し、スクリーニングを行う。

## 4. 研究成果

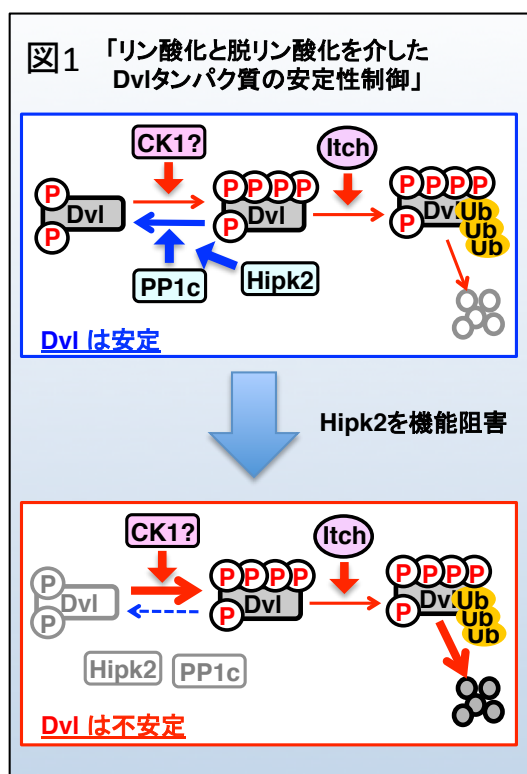
(1) NLK による Lef1 リン酸化を介した Wnt シグナル抑制はグリオブラストーマの増殖、生存を負に制御する (Sa et al. *Oncotarget*, 2016)

韓国 成均館大学校、サムスンバイオメディカル研究所、米国クリーブランドクリニックとの共同研究により、悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマの悪性化に NLK の発現低下が関与することを見いだした。具体的には、グリオブラストーマの悪性度の高さと、NLK の発現レベルの低さ、Wnt シグナル活性の高さが相関することを発見した。また、グリオブラストーマの細胞において NLK が転写因子 Lef1 のリン酸化を介して Wnt シグナルを負に制御し、グリオブラストーマ細胞の増殖、生存を負に制御することを発見した。このように、グリオブラストーマの悪性化機構の一端を明らかにした。

(2) Hipk2 は PP1c と協働して Dvl タンパク質の量を維持し、Wnt シグナルの活性化を支える (Shimizu et al. *Cell Reports*, 2014)

以前に、タンパク質リン酸化酵素 Hipk2 を、NLK を *in vitro* でリン酸化する分子として同定していた (Kanei-Ishii et al., *Genes Dev*, 2004)。そこで、脊椎動物組織構築における Hipk2 と NLK の関係を調べた。ところが、その解析の過程で、Hipk2 が NLK 非依存的に Wnt シグナルの制御に関わることを見いだした。まず私たちは、ヒト培養細胞株及びゼブラフィッシュ胚における Hipk2 機能阻害実験により、Hipk2 が Wnt シグナルの主要構成因子 Dvl のタンパク質安定性に必

須であることと、Hipp2 が Dvl の安定化を介して、初期胚発生に必要な Wnt シグナルの強い活性化を支えていることを見いだした。続いて、生化学的な解析を行い、Hipp2 がその酵素活性非依存的にタンパク質脱リン酸化酵素 PP1c による Dvl の脱リン酸化を誘導し、これにより E3 ユビキチンリガーゼ Itch による Dvl のユビキチン化を阻害して Dvl を安定化することを発見した (図 1)。私たちはまた、高密度培養条件下のヒト培養細胞株を Wnt 刺激すると、Hipp2-PP1c と Dvl の結合が低下し、その結果として Dvl が Itch にユビキチン化されて分解され、Wnt シグナル活性が即時低下することを発見した。一方、細胞を低密度で培養した場合は、Wnt 刺激による Dvl の分解は起きず、Wnt シグナルの活性が持続した。この現象は、細胞の過剰増殖を防ぐ、一種の「細胞間協調システム」ではないかと考えている。この考えに合致するように、Wnt シグナル活性に異常を持つ様々な腫瘍組織において Dvl タンパク質の増加が観察されており、また、Dvl の Itch ドッキング部位に変異が検出される。おそらく、本研究



で発見した Hipp2-PP1c システムは、Dvl タンパク質の量を適正に制御 (ファインチューン) し、腫瘍の発生を防ぐ重要なシステムの一つと考えられる。

### (3) NLK の活性制御化合物の探索

上述のように、NLK の活性制御化合物は、がんなどの疾患の治療薬となりうると期待される。そこで、NLK のキナーゼ活性をハイスループットかつ高精度で評価する系を構築し、東京大学創薬機構より入手した約 17000 種の化合物を対象とした大規模スクリ

ーニングを実行した。次に、ヒット化合物について、NLK と基質を同じくする他のキナーゼに対する効果と、NLK と類似した構造を持つキナーゼに対する効果を調べ、これにより、NLK に特異的に作用する化合物を絞り込んだ。さらにここから、ヒト細胞内において NLK のキナーゼ活性を低濃度で阻害する化合物を選別し、その結果、6 つの NLK 阻害化合物を得た。これら 6 つのうち 5 つは類似した構造を持っており、これを NLK inhibitor-I 群とし、構造が大きく異なる残りの 1 つを NLK inhibitor-II とした。現在、これらの化合物のがん細胞の増殖・生存に対する効果を検討中である。

### (4) ユビキチンシグナルを介した NFκB 活性のファインチューニングが初期胚背腹軸の形成を支える (Anai et al. submitted)

NFκB ファミリーの転写因子は、炎症誘導や免疫制御などにおいて重要な役割を担う。一方で、NFκB はショウジョウバエ初期胚の背腹軸の決定においても必須の役割を果たす。しかしながら、脊椎動物初期胚における NFκB の活性動態や役割は全く不明であった。まず NFκB の活動を GFP の蛍光に変換して可視化する新規レポーター遺伝子をモデル脊椎動物ゼブラフィッシュに組み込み、脊椎動物初期胚における活性動態を解析した。その結果、NFκB レポーターが初期胚から活性化し、その活性が徐々に予定背側領域に局限していくことを見出した。このレポーターの活性化は、NFκB ファミリーの転写因子である Rel の機能を阻害することで消失した。また、Rel の機能阻害は、背側形成を促進し、腹側形成を抑制した。これらの結果は、Rel が予定背側領域において活性化して背側形成を抑制することを示唆する。ところが興味深いことに Rel mRNA は初期胚全域で一様に発現しており、このことから、Rel の活動を予定背側領域に局限するメカニズムがあることが示唆された。詳細な解析の結果、初期胚全域で発現した Rel タンパク質が予定腹側領域で特異的に分解されることにより予定背側領域特異的な Rel の活性化が導かれることがわかった。さらに、腹側での Rel の分解は、ユビキチン-プロテアソーム系を介して起こっており、この Rel ユビキチン化を阻害すると Rel の活性化領域が広がり、結果として背側領域が拡大し、腹側が縮小した。このように、ユビキチンシグナルを介した NFκB/Rel 活性のファインチューニングが初期胚背腹軸の形成を支えることが明らかになった。

### (4) その他の成果

九州大学生体防御医学研究所の中山教授らとの共同研究により、ANKMY2-FKBP38 経路がソニックヘッジホッグ (Shh) シグナルの活性を微調整し、ゼブラフィッシュ筋肉の形成に関与することを示した (Saita et al.,

2014)。また、順天堂大学の奥野博士らとの共同研究によりロイコトリエン受容体のシグナルがゼブラフィッシュの原腸陥入運動に関わることを示した。このように、ゼブラフィッシュの組織構築に関わるシグナル制御機構の一端を解明した。

#### 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 4 件)

1. Sa JK, Yoon Y, Kim M, Kim Y, Cho HJ, Lee JK, Kim GS, Han S, Kim WJ, Shin YJ, Joo KM, Paddison PJ, Ishitani T, \*Lee J, \*Nam DH. : In vivo RNAi screen identifies NLK as a negative regulator of mesenchymal activity in glioblastoma. *Oncotarget* 6: 20145-59, 2015
2. Shimizu N, Ishitani S, Sato A, Shibuya H, \*Ishitani T : Hipk2 and PP1c cooperate to maintain Dvl protein levels required for Wnt signal transduction. *Cell Rep.* 8: 1391-404, 2014
3. Saita S, Shirane M, Ishitani T, Shimizu N, \*Nakayama KI : Role of the ANKMY2-FKBP38 Axis in Regulation of the Sonic Hedgehog (Shh) Signaling Pathway *J. Biol. Chem.* 289: 25639-54, 2014
4. Okuno T, Ishitani T, \*Yokomizo T: Biochemical Characterization of Three BLT Receptors in Zebrafish. *PLoS One.* 10: e0117888, 2015

[学会発表] (計 35 件)

1. Tohru Ishitani, Satoshi Anai, Shizuka Ishitani, Satoshi Ota  
Ubiquitin-mediated NF- $\kappa$ B degradation directs dorsal-ventral patterning in vertebrate early embryo.  
Keystone Symposia Ubiquitin Signaling (Oral presentation in Workshop), Whistler Conference Centre, Whistler, Canada  
2016年3月15日
2. 石谷 太  
動物組織構築を支えるシグナル制御機構の理解を目指して  
大阪大学微研セミナー, 大阪大学微生物学研究所  
2016年3月4日
3. Tohru Ishitani  
Molecular systems that control Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during animal tissue development and homeostasis.  
Universiti of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia  
2016年2月25日
4. Tohru Ishitani  
Molecular systems that control Wnt/ $\beta$ -catenin

signaling during animal tissue development and homeostasis.

Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia

2016年2月24日

#### 5. 石谷 太

動物組織の構築・維持を支える Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル制御機構

難治疾患共同研究拠点シンポジウム, 東京医科歯科大学

2015年11月26日

#### 6. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

Spatially restricted Rel/NF- $\kappa$ B activation directs dorsal-ventral patterning in zebrafish

第21回 小型魚類研究会, 大阪大学

2015年9月19日

#### 7. Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Yusuke Takenoshita, Tohru Ishitani

タンパク質リン酸化酵素 NLK は Shh シグナルの負の制御を介して後脳組織の構築を支える

第67回日本細胞生物学会大会, タワーホール船堀

2015年7月2日

#### 8. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

The NF $\kappa$ B transcription factor Rel fine-tunes dorsal-ventral pattern of zebrafish early embryos.

第48回日本発生物学会, つくば国際会議場

2015年6月3日

#### 9. 石谷 閑, 山下 智大, 石谷 太

細胞運命を制御するタンパク質リン酸化酵素の活性制御化合物の探索

日本薬学会第135年会 シンポジウム, 神戸学院大学

2015年3月26日

#### 10. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Tohru Ishitani

The NF $\kappa$ B transcription factor Rel fine-tunes zebrafish dorsoventral pattern by regulating admp expression.

the 6th Strategic Conference of Zebrafish Investigators, Asilomar conference grounds, Pacific Grove, USA

2015年1月17日

#### 11. Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

タンパク質リン酸化酵素 NLK は Shh シグナルの負の制御を介して後脳組織の構築を支える第2回新学術領域「細胞競合」研究会議, 門司港ホテル, 北九州市

2015年1月13日

#### 12. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Tohru Ishitani

NF $\kappa$ B ファミリーの転写因子 c-Rel は Admp の発現制御を介して脊椎動物初期胚の背腹軸形成に貢献する

第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜

2014年11月25日

#### 13. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

Hipk2 and PP1c cooperate to maintain Dvl protein levels required for Wnt signal transduction

第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム, 京都国際会館

2014 年 10 月 17 日

14. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

Hipk2 and PP1c-mediated dephosphorylation of Dishevelled sustains Wnt signal transduction  
EMBO Workshop on Wnt signalling: Stem cells | Development | Disease, Blue Seas Resort, Australia

2014 年 10 月 6 日

15. Tohru Ishitani

New mechanisms that regulate Wnt $\beta$ -catenin signaling and their potential roles in cancer

第 73 回日本癌学会総会 シンポジウム, パシフィコ横浜

2014 年 9 月 25 日

16. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Tohru Ishitani

The NF $\kappa$ B transcription factor c-Rel regulates zebrafish dorsal-ventral patterning.

第 20 回小型魚類研究会, 慶応大学

2014 年 9 月 20 日

17. Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

Nemo-like kinase negatively regulates Hedgehog signaling in neural progenitor cells and brain tumor.

第 20 回小型魚類研究会, 慶応大学

2014 年 9 月 20 日

18. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Atsushi Sato, Hiroshi Shibuya, Tohru Ishitani

Hipk2 and PP1c-mediated dephosphorylation of Dishevelled sustains Wnt signal transduction

11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, Overture Center, Madison, USA.

2014 年 6 月 27 日

19. ~~Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani,~~ Atsushi Sato, Hiroshi Shibuya, Tohru Ishitani

Dephosphorylation of Dishevelled mediated by Hipk2 and PP1c sustains Wnt signal transduction

第 66 回日本細胞生物学会年会, 奈良新公会堂

2014 年 6 月 11 日

20. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Tohru Ishitani

NF $\kappa$ B regulates dorsoventral patterning in zebrafish embryos.

第 47 回日本発生生物学会, ウィンクあいち

2014 年 5 月 28 日

21. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Atsushi Sato, Hiroshi Shibuya, Tohru Ishitani

Hipk2 and PP1c-mediated dephosphorylation of Dishevelled sustains Wnt signal transduction

第 47 回日本発生生物学会, ウィンクあいち

2014 年 5 月 27 日

22. 石谷 太, 清水 誠之, 石谷 閑

タンパク質リン酸化酵素 NLK による神経前駆細胞の運命制御

日本薬学会第 134 年会シンポジウム, 熊本大学

2014 年 3 月 30 日

23. 清水 誠之, 石谷 閑, 石谷 太

Hipk2 と PP1c による Dishevelled の脱リン酸化は、細胞の Wnt シグナル応答性を支える

第三回細胞競合コロキウム, 北海道大学

2014 年 3 月 14 日

24. 石谷 閑, 清水 誠之, 石谷 太

タンパク質リン酸化酵素 NLK は Shh シグナルの負の制御を介して後脳組織の構築を支える

第三回細胞競合コロキウム, 北海道大学

2014 年 3 月 14 日

25. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

Hipk2 and PP1c-mediated dephosphorylation of Dvl mediated by sustains Wnt signal transduction.

the 6th Asia Oceania Zebrafish Meeting, HKUST, Hong Kong

2014 年 1 月 21 日

26. Satoshi Anai, Satoshi Ota, Tohru Ishitani

NF $\kappa$ B regulates dorsal-ventral patterning in vertebrates.

第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場

2013 年 12 月 3 日

27. Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani

Hipk2 negatively regulates Wnt $\beta$ -catenin signaling in colorectal cancer.

第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場

2013 年 12 月 3 日

28. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Atsushi Sato, Mitsuhiro Totani, Hiroshi Shibuya, Tohru Ishitani

Dephosphorylation of Dvl mediated by Hipk2 and PP1c sustains Wnt signal transduction.

第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場

2013 年 12 月 3 日

29. Shimizu Nobuyuki, Mitsuhiro Totani, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

Hipk2 plays essential roles in the Wnt-mediated early developmental events by cooperating with PP1 to induce Dishevelled dephosphorylation and stabilization.

第 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜

2013 年 9 月 11 日

30. Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani

Dephosphorylation of Dishevelled mediated by Hipk2 and PP1c sustains Wnt signal transduction

第 19 回小型魚類研究会, アエル仙台

2013 年 9 月 21 日

31. Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani, Tohru Ishitani

Hipk2 plays essential roles in the Wnt-mediated

early developmental events by inducing Dishevelled dephosphorylation and stabilization.  
第 65 回日本細胞生物学会年会, ウィンクあいち

2013 年 6 月 19 日

32. Shizuka Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani

Nemo-like kinase blocks Hedgehog signaling by phosphorylating Gli1 transcription factor in neural progenitor cells and brain tumor.

第 65 回日本細胞生物学会年会, ウィンクあいち

2013 年 6 月 19 日

33. Tohru Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani

Nemo-like kinase blocks Hedgehog signaling by phosphorylating Gli1 transcription factor in neural progenitor cells and brain tumor.

Neuro2013, 京都国際会議場

2013 年 6 月 22 日

34. Tohru Ishitani, Nobuyuki Shimizu, Shizuka Ishitani

Nemo-like kinase blocks Hedgehog signaling by phosphorylating Gli1 transcription factor in neural progenitor cells and brain tumor.

第 46 回日本発生生物学会, くまびきメッセ

2013 年 5 月 30 日

35. Nobuyuki Shimizu, Tohru Ishitani

Hpk2 plays essential roles in the Wnt-mediated early developmental events by inducing Dishevelled dephosphorylation and stabilization.

第 46 回日本発生生物学会, くまびきメッセ

2013 年 5 月 30 日

〔図書〕 (計 2 件)

(1) Tohru Ishitani

Post-translational modification of Tcf/Lef: New insights into the regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling

Protein modifications in pathogenic dysregulation of signaling

Springer 社

ページ 327-342 2015 年発行

(2) Tohru Ishitani

Context-Dependent Bidirectional Modulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling

New Principles in Developmental Processes

Springer 社

ページ 213-226 2014 年発行

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/crs/top.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

石谷 太 (ISHITANI TOHRU)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 40448428