

繊毛構築を制御する新規シグナル経路の同定とその機能解析

[1]組織

代表者:水野 健作
(東北大学大学院生命科学研究科)
対応者:安井 明
(東北大学加齢医学研究所)
分担者:菅野 新一郎
(東北大学加齢医学研究所)
千葉 秀平
(東北大学大学院医学系研究科)
大橋 一正
(東北大学大学院生命科学研究科)

研究費:物件費30万円

[2]研究経過

脊椎動物の多くの細胞は血清飢餓や接触阻害などの増殖阻害シグナルに応じて、一本の繊毛(一次繊毛)を細胞表面に構築する。繊毛は光、浸透圧、機械刺激等の受容に加えて、発生や器官形成・維持に必要な各種受容体やチャネルを高密度に配することで細胞外環境を感知する高感度な“アンテナ”として機能する。近年、その構築異常や機能不全が嚢胞性腎疾患や肥満、失明、男性不妊、内臓逆位等の複合的症状を有する疾患(繊毛症)の原因となることが判明し、繊毛関連遺伝子群の同定と繊毛形成の分子機構の解明は重要な研究課題となってきた。

繊毛は血清飢餓や接触阻害に応じて微小管形成中心である中心体が分化した基底小体、それを土台として伸長した高度にアセチル化修飾を受けた微小管である軸糸、それを取り囲む繊毛膜を基本構造とする。間期中心体は体細胞分裂を介する細胞増殖サイクルにおいて、分裂装置である紡錘体の形成を担うことから(図参照)、細胞増殖サイクルと一次繊毛の形成は相反することが予想される。以上のことから、増殖阻害シグナルを起因として、中心体-基底小体への遷移を担う分子機構の存在が示唆されるが、その実態については不明のままである。

私達は最近、進化的に保存された Ser/Thr キナーゼである NDR が血清飢餓による一次繊毛形成に関与することを見出した。NDR は接触阻害に応じて活性化することが知られているがん抑制遺伝子 MST/Hippo の下流因子であるが、私達は血清飢餓による繊毛形成において中心的な役割を担う small GTPase である Rab8 の GDP-GTP 交換因子(GEF)である Rabin8 が NDR の新規基質としてリン酸化されることを見出した。そこで、本研究は、MST/Hippo-NDR-Rabin8 経路を中心として、細胞増殖抑制シグナル依存的な中心体-基底小体変換経路に関与する一連のシグナル伝達分子群の同定とその分子機構を解明することを目的として解析を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

本年度の加齢研共同研究プロジェクトの期間中に、Rabin8 について Nano/LC/MS/MS 質量分析装置による結合蛋白質の網羅的解析を行い、複数の新規結合蛋白質の同定に成功しており、現在はそれらの機能解析が進行中である。この間、水野と同研究室の千葉助教、大橋准教授と、加齢研の菅野講師、安井教授との間で緊密に連絡を取り合っており、研究を進めてきた。特に、千葉助教と菅野講師は頻繁に行き来しており、十分な議論により共同研究を円滑に遂行してきた。

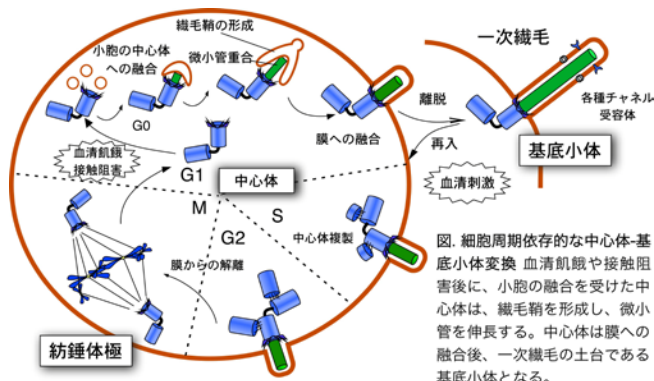


図. 細胞周期依存的な中心体-基底小体変換。血清飢餓や接触阻害後に、小胞の融合を受けた中心体は、繊毛鞘を形成し、微小管を伸長する。中心体は膜への融合後、一次繊毛の土台である基底小体となる。

[3]成果

(3-1)研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

Rabin8 結合蛋白質のプロテオーム解析

まず、第一に Rabin8 を NDR の生理的基質として同定し、Rabin8 の野生型 (WT) および NDR がリン酸化する Ser 残基をリン酸化されないアラニン残基に置換した Rabin8 変異体 (SA) を発現するヒト網膜色素上皮細胞を作製し、結合蛋白質のプロテオーム解析を行った。その結果、多数の Rabin8 新規結合蛋白質の同定に至った。特にその中でも、14-3-3 蛋白質は NDR による Ser 残基のリン酸化依存的に結合していることを明らかにし、Rabin8 のリン酸化と 14-3-3 の結合が一次繊毛形成時の Rabin8 の細胞内局在を制御していることを明らかにした (現在投稿準備中)。

NDR の上流機構の解析

NDR はハエを用いた遺伝学的解析により、増殖阻害から分化を促す主要ながん抑制遺伝子として認知される MST/Hippo の下流因子である。私達は、*in vitro* キナーゼアッセイにより、ヒト MST2 および MST3 が NDR の Thr-444 をリン酸化することを明らかにした。現在、一次繊毛構築の際にこれら上流キナーゼが Thr444 のリン酸化を介して NDR を活性化し、Rabin8 の細胞内局在を制御するか解析中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

近年、MST/Hippo 経路はハエを用いた遺伝学的解析により、増殖阻害から分化を促す主要ながん抑制遺伝子として認知されるようになってきた。一方で、MST/Hippo の下流因子である NDR 経路は哺乳類細胞内における生体機能の理解がほとんど進んでおらず、増殖阻害・分化シグナルに応じた NDR 経路の解析は重要な研究課題であると考えられる。私達はこれまで、NDR の新規基質として Rabin8 を同定し、さらに、NDR による Rabin8 のリン酸化と 14-3-3 の結合が繊毛構築に必要であることを明らかにした。繊毛の構築は増殖サイクルからの遷移と分化状態を特徴付けるイベントであり、NDR による Rabin8 のリン酸化制御が中心体から基底小体への変換を保障し、細胞の分化状態を規定する重要なシグナル経路の1つであることが予想される。したがって、本研究の成果の発展により、増殖阻害シグナルを中心体-基底小体変換、さらには繊毛構築に結びつける重要なシグナル伝達経路を明らかにできることが期待される。さらに繊毛機能の欠陥は多様な疾患を併発し、重篤化のリスクが極めて高いことから、NDR 経路による Rabin8 のリン酸化制御と Fry

による微小管アセチル化制御機構を解明することが医学分野での病因解明や治療薬の開発につながると期待される。

[4] 成果資料

1. Itoh, G, Kanno, S., Uchida, K. S. K., Chiba, S., Sugino, S., Watanabe, K., Mizuno, K., Yasui, A., Hirota, T., and Tanaka, K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J.*, 30,130-144 (2011).
2. Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. *J. Cell Biol.*, 193,365-380 (2011).
3. Spratley, S. J., Bastea, L. I., Doppler, H., Mizuno, K., and Storz, P. Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4. *J. Biol. Chem.*, 286, 34254-34261 (2011).
4. Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kondo, H., Kiuchi, T., Sato, M., and Mizuno, K. LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization. *J. Biol. Chem.*, 286, 36340-36351 (2011).
5. Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., Watanabe, N., and Mizuno, K. Live-cell imaging of G-actin dynamics using sequential FDAP. *BioArchitecture*, in press (2011)
6. Freeman, S. A., Lei, V., Dang-Lawson, M., Mizuno, K., Roskelley, C. D., and Gold, M. R. Cofilin-mediated F-actin severing is regulated by the Rap GTPase and controls the cytoskeletal dynamics that drive lymphocyte spreading and BCR microcluster formation. *J. Immunol.*, 187, 5887-5900 (2011).
7. Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., and Mizuno, K. Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *BioTechniques*, 52, 45-50 (2012).