

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所)
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所)

研究費:物件費30万円

[2]研究経過

動物細胞の多くは、細胞休止期に、細胞表面に一本の非運動性繊毛(一次繊毛)を構築する。一次繊毛は細胞外環境からの多様な機能的・化学的シグナルを受容するアンテナとして機能し、細胞の増殖・分化の制御や組織の形態形成・機能発現に重要な役割を果たしている。その形成異常や機能不全は嚢胞性腎疾患、網膜変性症、肥満、多指症、男性不妊、内臓逆位等の複合的症候を呈する Bardet-Biedle 症候群などの疾患(繊毛症 ciliopathy)の原因となることが判明しており、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に形成され、増殖相では消失することが知られており、一次繊毛形成と増殖サイクルの進行は相反すると考えられている(右図参照)。増殖シグナルによる一次繊毛退縮機構の解析が進む一方で、血清飢餓等の増殖抑制シグナルによる一次繊毛の形成促進機構は未だ不明である。

一次繊毛は、母中心小体由来する基底小体、そこから伸長した微小管構造である軸糸、軸糸を取り囲む繊毛膜を基本構造とする。一次繊毛の構築は、1) 増

殖抑制シグナルによる中心体の母中心小体遠位側への輸送小胞の繫留と融合(繊毛小胞 ciliary vesicle (CV) の形成)、2) CV 直下での微小管軸糸の伸長と CV の伸長による繊毛鞘の形成、3) 繊毛鞘の細胞表層膜への融合、の3段階で進行するが、最初の段階である CV の形成に関わる小胞輸送と融合機構については不明な点が多く残されている。

母中心小体遠位への輸送小胞の融合過程において低分子量 G 蛋白質 Rab8 が重要な機能を担うことが知られている。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 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、本共同研究では、NDR-Rabin8 経路を中心として、細胞増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成、特にその初期段階である繊毛膜形成に関与する一連のシグナル伝達分子群をプロテーム解析を用いて同定し、一次繊毛構築を制御する新規シグナル伝達経路を解明することを目的として解析を行った。

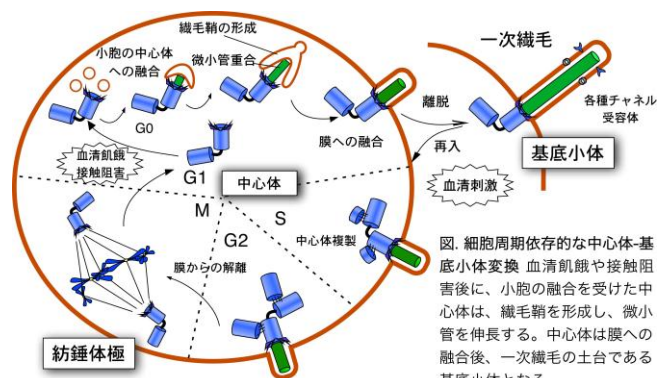


図. 細胞周期依存的な中心体-基底小体変換 血清飢餓や接触阻害後に、小胞の融合を受けた中心体は、繊毛鞘を形成し、微小管を伸長する。中心体は膜への融合後、一次繊毛の土台である基底小体となる。

[3]成果

(3-1)研究成果

Rabin8 結合蛋白質のプロテオーム解析

加齢研の菅野講師、安井教授との共同研究により、Nano/LC/MS/MS 質量分析装置による Rabin8 結合蛋白質のプロテオーム解析を行い、TRAPPC-4, -5, -10 (TMEM1)を同定した。これらの蛋白質は Golgi 体由来の膜小胞の輸送に關与する TRAPP II 複合体を構成する蛋白質であり、Rabin8 の小胞への繫留や中心体への輸送に關与すると考えられる。また、NDR による Rabin8 のリン酸化部位である Ser-272 を Ala に変異させた S272A 変異体を用いて、NDR による Ser-272 のリン酸化依存的に Rabin8 に結合する蛋白質として 14-3-3 を同定した。さらに、中心小体に局在することが知られている Exocyst 複合体の構成成分である Sec15 と結合することを見出した。この結合は SA 変異体では認められず、Rabin8 は Ser-272 のリン酸化依存的に Sec15 に結合することが示唆された。

Rabin8 とホスファチジルセリンの結合

Rabin8 は Rab11 と結合することが知られていたが、その結合は弱く、Rabin8 が Rab11 含有小胞に繫留されるためには膜成分であるリン脂質が關与している可能性が考えられた。そこで、Rabin8 と結合するリン脂質を探索した結果、phosphatidylserine (PS) と最も強く結合することが明らかとなった。さらに、Rabin8 と PS の結合は、Rabin8 の Ser-272 のリン酸化依存的に減弱することが明らかとなった。上記の結果を含めて考えると、Rab11/PS 含有小胞上にリクルートされた Rabin8 は、中心体近傍で NDR によって Ser-272 がリン酸化されると Rab11/PS 含有小胞から解離し、母中心小体上の Sec15 と結合し、そこで Rab8 活性化因子として中心小体局所での Rab8 の活性化を誘導し、Exocyst が關与する小胞の融合と繊毛膜の形成に關与することが示唆される。

(3-2)波及効果と発展性など

本共同研究では、NDR-Rabin8 経路を中心にして、増殖停止シグナルによる一次繊毛形成機構の解明を目的として研究を実施し、NDR による Rabin8 のリン酸化がその結合特異性を PS から Sec15 にスイッチすることによって繊毛小胞、繊毛膜の形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。最近になって、ヒトの Lever 先天性黒内障に相当するイヌの繊毛症の一つである early retinal degeneration の原因遺伝子として NDR

が同定された。今後は、NDR-Rabin8 経路が囊胞性腎疾患など他の繊毛性疾患にも關与している可能性を検討していくことが重要である。また、MST/Hippo 経路は *Drosophila* の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が、MST/Hippo の下流因子である NDR 経路は哺乳類細胞内における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-Rabin8 経路の機能解析は今後の重要な研究課題であると考えられる。一次繊毛形成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一つであることが予想され、基礎生物学的にも、医学への応用面においても、今後の研究の発展が期待される。

[4]成果資料

1. Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., and Mizuno, K. Furry protein promotes Aurora A-mediated Polo-like kinase 1 activation. *J. Biol. Chem.*, 287, 27670-27681 (2012).
2. Chiba, S., Amagai, Y., Homma, Y., Fukuda, M., and Mizuno, K. NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by switching binding specificity from phosphatidylserine to Sec15. *EMBO J.*, 32, 874-885 (2013).
3. 千葉秀平, 天貝佑太, 水野健作: 一次繊毛形成と細胞周期のクロストーク, 実験医学増刊「細胞周期」による高次生命現象の制御と疾患, 実験医学 31 (2), 252-256 (2013), 羊土社