

## 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

(東北大学大学院生命科学研究科)

大橋 一正

(東北大学大学院生命科学研究科)

研究費:物件費 40 万円

### [2] 研究経過

真核細胞の多くは、細胞表面に一本の非運動性繊毛(一次繊毛)を有している。一次繊毛は細胞外からの機械的・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。そのため、一次繊毛の形成や機能の不全は嚢胞性腎疾患、網膜変性症、肥満、多指症、内臓逆位等の複合的症候を呈する疾患の原因となることが知られており(繊毛症 ciliopathy とよばれる)、繊毛形成関連遺伝子群の同定と繊毛形成機構の解明は医学的にも重要な研究課題として、多くの研究者の注目を集めている。

一次繊毛は、母中心小体に由来する基底小体、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) 繊毛鞘の細胞表面膜への融合、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 の基質としてリン酸化されることを見出した。さらに、NDR2 による Rabin8 の Ser-272 のリン酸化は、Rabin8 のホスファチジルセリンへの結合を弱め、Sec15 への結合を強めるスイッチとして、中心体近傍での Rab8 の活性化と CV の形成に寄与していることを示唆する結果を得た。本共同研究では、NDR の一次繊毛形成における機能をさらに解明し、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。その結果、NDR の新規基質である PI4KIIIβ が一次繊毛形成に関与することを見出した。また、NDR の活性化因子である Furry の結合蛋白質として SIRT2 を同定し、この結合が紡錘体微小管のアセチル化に寄与していることを明らかにした。

### [3] 成果

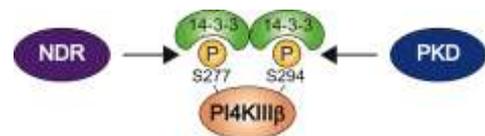


図 1. NDR によるリン酸化を介した PI4KIIIβ と 14-3-3γ の結合のモデル図

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

##### (1) 繊毛形成における PI4KIIIβ の機能

最近、NDR の新規基質として PI4KIIIβ が報告された。PI4KIIIβ はゴルジ体に局在し、PI4P の産生や

Rab11 のリクルートを介して、ゴルジ体から細胞膜への小胞輸送を制御することが知られているが、一次繊毛形成における PI4KIII $\beta$  の機能は不明である。まず、NDR による PI4KIII $\beta$  のリン酸化部位として Ser-277 を同定した。PI4KIII $\beta$  は PKD によって Ser-294 がリン酸化され、14-3-3 $\gamma$  と結合することが報告されており、Ser-277 の近傍配列は 14-3-3 の結合モチーフと類似していることから、NDR によるリン酸化が PI4KIII $\beta$  と 14-3-3 の結合に関与している可能性について検討した。GST プルダウンアッセイにより、PI4KIII $\beta$  (WT) は GST-14-3-3 $\gamma$  と結合するが、PI4KIII $\beta$  (S277A) は結合できないことから、PI4KIII $\beta$  は Ser-277 のリン酸化依存的に 14-3-3 $\gamma$  と結合することが明らかになった (図 1)。次に、Ser-277 のリン酸化が PI4KIII $\beta$  の脂質キナーゼ活性に与える影響について検討した。PI を基質とする脂質キナーゼアッセイの結果、PI4KIII $\beta$  (WT) と比較して、非リン酸化型 PI4KIII $\beta$  (S277A) は野生型と同等の活性をもつが、擬以リン酸化型 PI4KIII $\beta$  (S277D) は野生型より顕著に高い活性をもつことが示された。したがって、NDR による PI4KIII $\beta$  の Ser-277 のリン酸化は PI4KIII $\beta$  の活性を促進することが示唆された。PI4KIII $\beta$  が一次繊毛形成に必要であるかを検証するために、網膜色素上皮由来 hTERT-RPE 細胞を用いて、一次繊毛形成に対する PI4KIII $\beta$  の発現抑制効果を検討した。その結果、PI4KIII $\beta$  を発現抑制した細胞では一次繊毛形成が顕著に抑制された。今後は、NDR による PI4KIII $\beta$  のリン酸化や 14-3-3 との結合が一次繊毛形成において果たす役割を明らかにしていくことが重要である。

#### (2) Furry 結合タンパク質の同定

Furry は NDR に結合しそのキナーゼ活性を促進することが知られている。本共同研究では、Furry の結合蛋白質を解析し、微小管脱アセチル化酵素である SIRT2 を同定した。Furry は N 末端領域で SIRT2 と結合し、その微小管脱アセチル化活性を抑制した。Furry の N 末端断片を過剰発現すると、間期及び分裂期の微小管のアセチル化レベルの上昇が認められた。また、Furry を発現抑制した細胞では分裂期紡錘体の微小管アセチル化レベルが低下していること、このアセチル化レベルの低下は SIRT2 阻害剤である AGK2 によって回復することを見出した。以上の結果から Furry は SIRT2 の微小管脱アセチル化酵素活性を阻害することで分裂期紡錘体の微小管アセチル化を促進していることが示唆され

た。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では、NDR キナーゼ経路を中心に、一次繊毛形成を制御するシグナル伝達機構の解明を目的として研究を実施し、昨年度は NDR による Rabin8 のリン酸化が繊毛小胞、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 (Chiba et al., EMBO J., 2013)。また、本年度は、NDR の新たな基質として同定された PI4KIII $\beta$  も一次繊毛形成に必要であることを明らかにした。今後は、NDR-Rabin8 及び NDR-PI4KIII $\beta$  経路が嚢胞性腎疾患など繊毛性疾患に関与している可能性を解明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知ら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・分化シグナルによる NDR 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 経路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、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。本共同研究により、加齢研究者との交流が飛躍的に活性化し、プロテオーム解析などの協力によって研究が著しく進展した。

#### [4] 成果資料

(1) Nagai, T., Ikeda, M., Chiba, S., Kanno, S., and Mizuno, K. Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase. *J. Cell Sci.*, 126 (19), 4369-4380 (2013).

(2) Nagai, T., and Mizuno, K. Multifaceted roles of Furry proteins in invertebrates and vertebrates.

*J. Biochem.*, 155(3), 137-146 (2014)