

課題番号 43

増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構

[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)

大橋 一正

(東北大学大学院生命科学研究科)

永井友朗

(東北大学大学院生命科学研究科)

研究費：物件費 35 万円

[2] 研究経過

多くの動物細胞は一次繊毛とよばれる非運動性の繊毛を有している。一次繊毛は細胞外からの機械的刺激やヘッジホッグなどの化学的シグナルを受容、伝達するアンテナとして機能しており、その形成不全は多発性嚢胞腎、網膜変性、肥満、精神遅滞など複合的な症状を呈する繊毛病と総称される疾患を引き起こすことが知られている。一次繊毛は細胞休止期に形成され、増殖期には消失するが、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構は未だ不明である。また、多くの癌細胞では一次繊毛が消失しており、一次繊毛が細胞の増殖・分化を制御し、個体の発生・恒常性維持や癌化にも関与していることが示唆されている。血清飢餓、接触阻害などの増殖抑制刺激やアクチン脱重合によって転写調節因子YAP/TAZが不活性化されると一次繊毛形成が誘導されること、また、増殖抑制刺激によってTTBK2キナーゼが活性化され、一次繊毛形成阻害因子であるCP110、Cep97を中心体から除去し、一次繊毛形成を促すことが知られている。しかし、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成過程におけるYAP/TAZの不活性化機構や、TTBK2の活性化機構、CP110、Cep97の除去機構は不明である。本研究では、増殖抑制刺激やアクチン再構築によるYAP/TAZの不活性化機構、TTBK2の活性化機構、及びCP110、Cep97の除去機構を解明し、一次繊

毛形成の分子機構を解明し、細胞の増殖、分化の制御機構とその破綻による繊毛病の病因を解明することを目的として研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

1) 増殖抑制シグナルによるYAPの不活性化機構:

動物細胞は、高密度、血清飢餓、軟らかい細胞外基質等の培養条件下では、細胞-基質間接着やストレスファイバーが減弱し、アクチンが脱重合し、それに伴って、YAPのリン酸化と細胞質局在化が亢進し、YAPは不活性化され、一次繊毛が形成される。逆に、血清添加などの増殖シグナルによってアクチンは重合し、それに伴って、YAPは脱リン酸化され核移行し、YAPの活性化により一次繊毛は退縮する。アクチン重合依存的なYAPの脱リン酸化、活性化機構として、アクチン単量体に結合するホスファターゼであるPhactr-PP1複合体がアクチン重合によって活性化され、その結果、YAPの脱リン酸化が亢進するというモデルを考えた。しかし、Phactr-PP1はインビトロ実験ではYAPを脱リン酸化することができるが、Phactrの発現抑制によって増殖刺激依存的なYAPの脱リン酸化は阻害されなかった。以上の結果から、Phactrは増殖刺激依存的なYAPの脱リン酸化に関係していないと考えられた。

次に、アクチン脱重合時に活性化されるYAPキナーゼを探索するため、加齢研プロテオーム寄付研究部門の菅野講師、安井教授との共同研究で、重合できないアクチン変異体を用いて、単量体アクチン結合タンパク質のプロテオーム解析を行った。多くのアクチン制御因子が同定できたが、プロテインキナーゼは検出できなかった。

次に、アクチンの重合、脱重合を制御する化合物を用いてYAPのリン酸化、細胞内局在や一次繊毛形成に対する影響を調べ、アクチン脱重合剤であるサイトカラシンDやラトランキュリンBだけでなく、アクチン重合剤であるJaspplakinolide (Jasp) も、一次繊毛形成を促進することを見出した。

2) 一次繊毛形成におけるCP110、Cep97の除去機構:

増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成において、母中心小体からのCP110とCep97の除去機構の解明は重要である。加齢研プロテオーム寄付研究部門の菅野講師、安井教授との共同研究で、Cep97結合タン

パク質のプロテオーム解析を行った。しかし、Cep97の除去に関するキナーゼ、プロテアーゼ、ユビキチン化タンパク質を同定することはできなかった。一方、Cep97、CP110と結合するタンパク質としてCep104が最近同定された。私達は、Cep104の一次繊毛形成における機能解析を行い、Cep104が微小管重合活性をもつことを明らかにした。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1) Jasplakinolideによる一次繊毛形成促進機構：

アクチン脱重合剤であるサイトカラシンDやラトランキュリンBによって、低細胞密度や血清存在下といった増殖促進条件下であっても一次繊毛形成が誘導されることが示されており、アクチン脱重合が一次繊毛形成を惹起することが示されている。私達は、アクチン重合剤であるJasplakinolide (Jasp) がアクチン脱重合剤と同様に、低細胞密度、血清存在下で培養したhTERT-RPE1細胞の一次繊毛形成を誘導することを見出した。Jaspで処理すると細胞が丸く変形し、一次繊毛形成が引き起こされるが、高密度に培養した細胞では細胞の変形が起こらず、一次繊毛形成も促進されなかったことから、Jasp処理による一次繊毛形成は、細胞の変形と相関していることが示唆された。さらに、Jasp処理による細胞の変形によって、YAPのリン酸化、細胞質移行、不活性化が引き起こされた。一方、YAPの恒常活性化型の過剰発現によってJasp処理による一次繊毛形成が抑制されたことから、この過程にはYAPの不活性化が必要であることが示唆された。しかし、YAPをリン酸化する主要キナーゼであるLATS1/2やその上流キナーゼであるMST1/2を発現抑制させても、Jasp処理による一次繊毛形成には影響しなかったことから、Jasp処理によるYAPの不活性化と一次繊毛形成にはLATS1/2とは異なるキナーゼが関与している可能性が示唆された。さらに私たちは、Srcキナーゼの過剰発現がJasp処理による一次繊毛形成を抑制し、YAPの活性を部分的に回復させることを見出した。以上の結果から、Jaspによる一次繊毛形成においては、細胞の変形や細胞接着の低下とそれに伴うSrcの不活性化が関与していることが明らかとなった(図1)。また、増殖抑制刺激依存的なYAPの不活性化や一次繊毛形成において、アクチンの脱重合は必須の条件ではないことも明らかになった。

2) CP110/Cep97結合タンパク質Cep104の一次繊毛形成における機能：

CP110とCep97に結合するタンパク質としてCep104が同定された。Cep104は、血清存在下では中心小体

上でCP110、Cep97と3者複合体を形成しているが、血清飢餓条件下ではCep104が解離し、母中心小体から繊毛の先端部へ移行することが知られている。私達は、Cep104分子中に存在するTOGドメインが微小管の重合を促進する活性をもつことを証明した。また、Cep104の発現抑制によって一次繊毛の長さが短くなることを見出した。これらの結果から、Cep104は血清飢餓刺激依存的にCP110、Cep97から解離し、母中心小体遠位からの微小管の重合を促進し、一次繊毛の軸系の伸長に関与していることが示唆された。

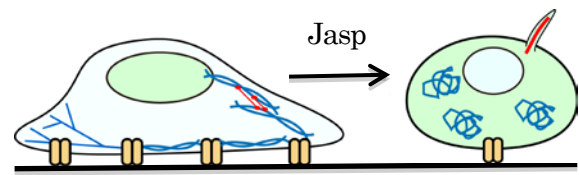


図1. Jasplakinolide (Jasp)による一次繊毛形成。Jasp処理によって、アクチンは凝集し、細胞は丸くなり、接着は弱くなり、YAPは細胞質に移行し、その結果、細胞周期は停止し、一次繊毛が形成される。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、増殖抑制シグナルによる一次繊毛機構の一端が明らかにされた。これらの成果は現在進行中であるが、さらに詳細な分子機構を解明することによって、細胞の増殖、分化と一次繊毛形成をつなぐ新しいシグナル経路が明らかとなり、繊毛病の病因解明にも貢献することが期待される。加齢研との共同研究によって、一次繊毛形成に関わる多くのタンパク質のプロテオミクス解析が進行中であり、新たな知見が得られつつある。

[4] 成果資料

学会発表

(1) Nagai, T. and Mizuno, K : Jasplakinolide induces primary cilium formation via cell rounding and YAP inactivation. The 28th CDB Meeting, Cilia and Centrosomes: Current Advances and Future Directions. Kobe, 2016. 11. 27-29.

(2) Nagai, T. and Mizuno, K : Jasplakinolide-induced cell rounding provokes ciliogenesis. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology 2016, San Francisco, 2016. 12. 3-7.