

—— 勾坂記念賞受賞記念講演 ——

2019年5月18日：勝山館

細胞内シグナル伝達様式の多様性の解明

東北大学大学院医学系研究科 分子薬理学分野

斎藤 将 樹



略 歴

- 2001年 3月 昭和薬科大学薬学部卒業
- 2003年 3月 東北大学大学院薬学研究科 博士課程前期2年の課程 修了
- 2005年 3月 東北大学大学院薬学研究科 博士課程後期3年の課程 中途退学
- 2005年 4月 東北大学大学院薬学研究科 細胞情報薬学分野 助手
- 2007年 4月 東北大学国際高等研究教育機構 国際高等融合領域研究所 特別研究員(助教)
- 2009年 4月-2010年 8月 米国コーネル大学医学部 眼科学 博士研究員
- 2010年 12月 秋田大学大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学分野 助教
- 2012年 4月 東京女子医科大学医学部 生化学教室 助教
- 2014年 4月 東北大学大学院医学系研究科 分子薬理学分野 助教

細胞内シグナル伝達様式の多様性の解明

The Diversity of Intracellular Signal Transduction

斎藤 将 樹

東北大学大学院医学系研究科 分子薬理学分野

(1) はじめに

身体の発達や恒常性維持を司る制御機構が破綻すると、種々の発達障害や疾病の発症につながる。様々な治療法がある中で、薬物療法は比較的安かつ簡便である。治療薬の標的分子には、細胞膜受容体 (G タンパク質共役型受容体 [GPCR], 増殖因子受容体), 酵素, ホルモン・増殖因子, DNA, 核内受容体, イオンチャネルなどがあり, 細胞膜受容体が全体の半数を占めている¹⁾。そのため, 細胞膜受容体のシグナル伝達様式を解明し, その調節分子を標的とした新規治療薬を開発することが, 薬物療法の有用性を高めるために重要である。

シグナル伝達様式を解明するにあたり, 私は GPCR と一次繊毛に注目してきた。GPCR は 7 回膜貫通型の分子群で, 臨床使用されている医薬品の 34% が標的とする²⁾。一次繊毛は細胞小器官の一種であり, 限られた種類の細胞膜受容体が分布するため, シグナル受容器として働く。以下に研究内容の詳細を紹介する。

(2) GPCR の結合タンパク質によるシグナル調節機構

GPCR のシグナル伝達は, 主に三量体 G タンパク質 (G_q , G_s , G_i , および $G_{12/13}$) を介する。このうち, G_q はホスホリパーゼ C を活性化して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇し, 一方, G_s はアデニル酸シクラーゼ (AC) を活性化してサイクリック AMP (cAMP) 産生を引き起こす。ここで, GPCR はおよそ 1,000 種類あることから, GPCR がそれぞれのシグナル伝達に多様性を生じるためには, 三量体 G タンパク質活性を調節する機構の存在することが考えられる。

GPCR のカルボキシル (C) 末端は, GPCR の細胞内局在, 三量体 G タンパク質との会合や, エフェクター分子へのシグナル伝達効率などを調節すると考えられ

ている。しかし, GPCR に結合するタンパク質の種類と役割には不明なことが多く残されている。副甲状腺ホルモン (PTH) は骨や腎臓等に発現する PTH 受容体 (PTHR) に作用し, 血中 Ca^{2+} 濃度上昇や血中リン酸濃度低下などを司る。PTHR は G_s および G_q と共役する GPCR であり, 特に AC タイプ 6 (AC6) は PTHR/ G_s の下流で活性化する AC である。私は, PTHR の C 末端結合タンパク質を酵母ツーハイブリッド法で探索したところ, 細胞質ダイニン軽鎖 *t*-complex testis expressed -1 (Tctex-1) と細胞膜裏打ちタンパク質 4.1G を見出した。

(a) Tctex-1

細胞質ダイニンは, 微小管に沿った細胞内物質輸送に関わるモータータンパク質である。その軽鎖の一つである Tctex-1 は, 精子の鞭毛運動に関わるタンパク質として発見された。私は, Tctex-1 が PTHR の C 末端に直接結合すると, PTH 刺激依存的な PTHR の細胞内内在化を促進することを見出した³⁾ (図 1)。細胞内内在化には, 細胞表面 PTHR 量の減少によるシグナル伝達の減弱と, 細胞内エンドソーム膜上での新たなシグナル伝達の惹起という二つの役割がある。現在, PTHR の G_s /AC6/cAMP および G_q /[Ca^{2+}]_i シグナルにおける Tctex-1 の役割について解析している。

(b) 4.1G

4.1G は, 細胞膜裏打ちタンパク質 4.1 ファミリーの一種であり, 細胞膜の形態維持や膜タンパク質の細胞膜局在の安定化などに関与する。私は, 4.1G が PTHR の C 末端に結合すると PTHR の細胞表面量が増加し, G_q /[Ca^{2+}]_i シグナルが亢進することを見出した⁴⁾ (図 2A)。一方, 細胞表面 PTHR 量の増加にもかかわらず, 4.1G は AC6 に直接結合しその活性を減弱することから, PTHR/ G_s /AC6/cAMP シグナルを抑制することを見出した^{5,6)} (図 2B)。すなわち, 4.1G 発現

量が多い時には PTHR/G_q シグナルが優位に働き、4.1G 発現量が少ない時には PTHR/G_s シグナルが優位に働くことが明らかになった。

以上の研究により、PTHR の細胞内局在とシグナル伝達が、Tctex-1 と 4.1G によって精巧に制御されることが示された。Tctex-1 や 4.1G による PTHR シグナル制御機構の破綻は、副甲状腺機能低下症や亢進症の病態発症にかかわっている可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

(3) 一次繊毛由来シグナルの調節機構

繊毛には気管支および肺の運動繊毛や、精子および

微生物の鞭毛などのほか、一次繊毛がある。一次繊毛は不動性の繊毛で、中心体由来の基底小体を基にして、一つの細胞から一本のみ形成される (図 3A)。一次繊毛内部には“9+0 構造”の微小管が形成され、基底小体との境界部を transition zone と呼ぶ。一次繊毛を取り囲む膜 (一次繊毛膜) は凹状膜構造シリアポケット (CiPo) を介して細胞膜とつながっているものの、一次繊毛内外の物質輸送は transition zone によって制限されることから、一次繊毛膜上には限られた種類の細胞膜受容体やイオンチャネルが優位に分布する。そのため、一次繊毛はシグナル受容体として働く (図 3B)。一次繊毛は G₀/G₁ 期に形成された後、増殖因子を受容すると短縮・消失する。その短縮・消失をトリガーとして細胞周期を G₁/S 期に再駆動させたため、細胞の増殖と分化が制御される。一次繊毛の形成不全や機能破綻が発生すると種々の臓器形成不全が引き起こされ、それらを総称して繊毛病と呼ぶ。

一次繊毛の形成機構の解明に取り組む研究者は多く、繊毛内外の物質輸送を制御する分子など、400 以上の制御因子が明らかになってきた⁷⁾。一方、一次繊毛短縮・消失の制御機構はあまり解明されていない。これまで関与が報告された分子は、オーロラキナーゼ A⁸⁾、ヒストン脱アセチル化酵素 6 (HDAC6)⁸⁾ や、イノシトールリン脂質 5-ホスファターゼ (INPP5E)^{9,10)} など極めて少数である。そのため、一次繊毛短縮・消失の分子機構には未解明の部分が非常に多いと考えられる。私は、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) による (T94) Tctex-1 のリン酸化と、それに引き続く一次繊毛膜の細胞内内在化が重要であることを見出した。

(a) IGF-1/IGF-1R とリン酸化-(T94) Tctex-1

一次繊毛膜に分布する数種の増殖因子受容体のうち、短縮・消失に関与する受容体には PDGFR α のみ

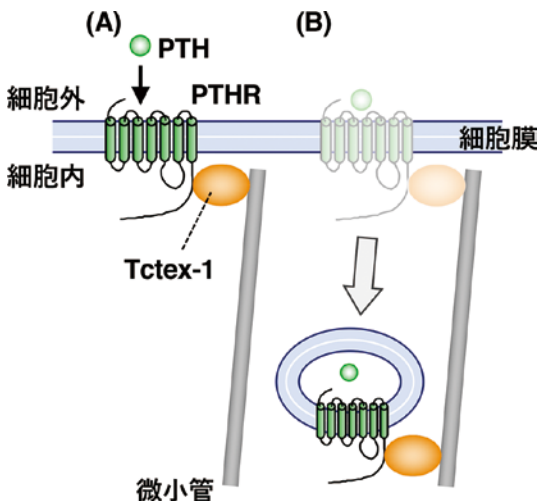


図 1. Tctex-1 による PTHR 機能の調節. (A) Tctex-1 は細胞膜直下で PTHR の C 末端に直接結合する. (B) アゴニスト (PTH) 依存的に PTHR の細胞内内在化を促進するため、細胞表面 PTHR 量が減少する。

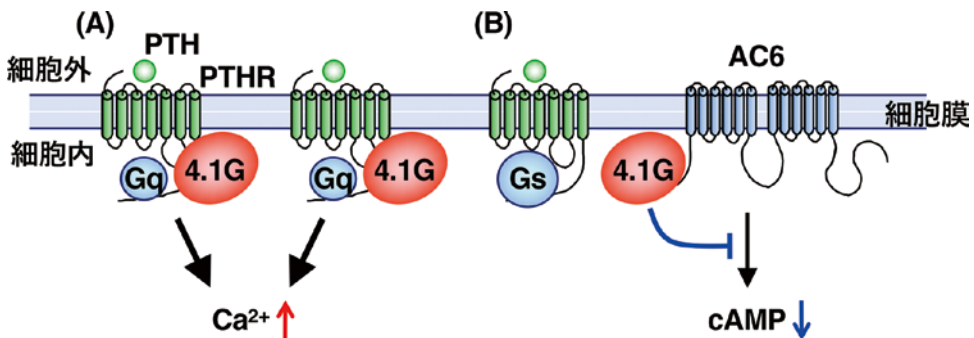


図 2. 4.1G による PTHR 機能の調節. (A) 4.1G は PTHR の細胞表面量を増加し、G_q/[Ca²⁺]_i シグナルを亢進する. (B) 4.1G は AC6 の機能を減弱する結果、PTHR/G_s/AC6/cAMP シグナルを抑制する。

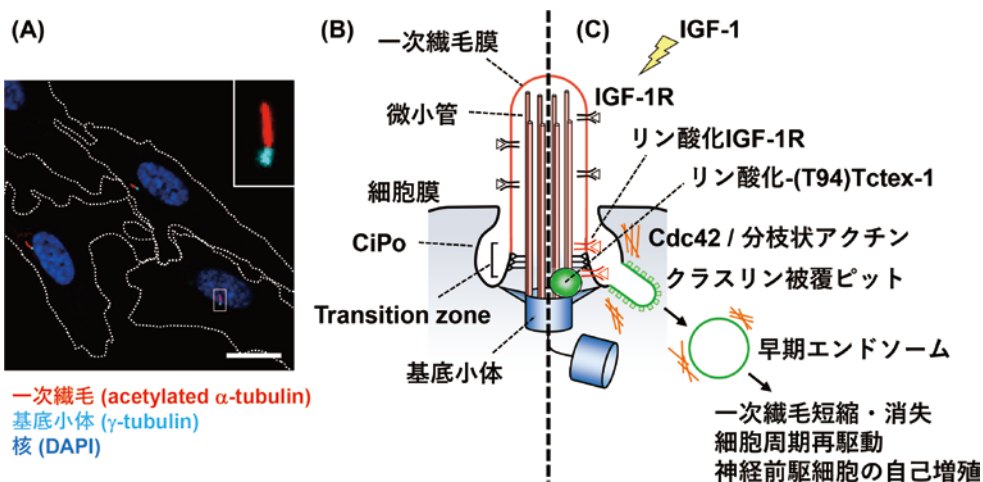


図3. 一次繊毛の構造と短縮・消失機構。(A) 一次繊毛の共焦点蛍光顕微鏡写真。赤：一次繊毛（アセチル化 α -チューブリン）、シアン：基底小体（ γ -チューブリン）、青：核（DAPI）、破線：細胞。挿入図は白線枠内の拡大図。スケールバー：20 μ m。(B) 一次繊毛の構造。一次繊毛は基底小体から形成され、内部には9+0構造の微小管がある。一次繊毛と基底小体の間はtransition zoneと呼ばれる。また、一次繊毛はシリアポケット(CiPo)に囲まれている。(C) IGF-1刺激によってtransition zoneで(T94)Tctex-1がリン酸化し、CiPoでエンドソームが形成される。

が知られていた⁸⁾。しかし、その短縮・消失活性は十分とは言えない。ここで、PDGFRの細胞増殖作用はIGF-1受容体(IGF-1R)を必要とすること、および神経前駆細胞でIGF-1Rを欠損すると小頭症様症状を示すことより、一次繊毛短縮・消失と細胞増殖には、IGF-1が本質的に関与する可能性が考えられた。

私は、ヒト網膜色素上皮細胞株(RPE-1細胞)およびマウス胎仔大脳皮質の神経前駆細胞(放射状グリア細胞)を用いた解析により、IGF-1Rは一次繊毛膜の全域に分布し、活性化型のリン酸化IGF-1Rはtransition zoneに集積することを見出した¹¹⁾。Tctex-1は94位のスレオニン(T94)がリン酸化されると細胞質ダイニン複合体から遊離し、低分子量Gタンパク質Rac1の活性化を介した神経軸索形成などのダイニン非依存的な役割を果たす¹²⁾。私は、IGF-1刺激を受けた一次繊毛のtransition zoneにはリン酸化-(T94)Tctex-1が集積することを見出した。そして、リン酸化-(T94)Tctex-1が一次繊毛短縮・消失と、それに引き続く細胞増殖に必須の役割を果たすことを明らかにした^{11,13)}(図3B)。

(b) CiPoにおける分枝状アクチン再構築とエンドソーム形成

リン酸化-(T94)Tctex-1は、Rac1を介して分枝状アクチン再構築を行うほか¹²⁾、アクチン重合を介して一

次繊毛短縮・消失を制御する¹³⁾。これらの知見より、リン酸化-(T94)Tctex-1が分枝状アクチン再構築を介して一次繊毛短縮・消失を促進することが考えられた。RPE-1細胞を用いた解析により、リン酸化-(T94)Tctex-1はRac1ではなく、低分子量Gタンパク質Cdc42を活性化して一次繊毛短縮・消失を促進することがわかった¹⁴⁾。一次繊毛はシリアポケット(CiPo)に取り囲まれている(図3B)。CiPoはアクチン重合とエンドソーム形成の場である¹⁵⁾。私は、Cdc42/分枝状アクチンによってCiPoから管状エンドソーム膜構造の形成されることが、短縮・消失に重要であることを見出した¹⁴⁾(図3C)。CiPoと一次繊毛膜は繋がっているため、CiPo膜のエンドサイトーシスによって一次繊毛膜が細胞内に移行し、一次繊毛膜が量的に減少したものと考えられる。

以上の結果より、IGF-1 \rightarrow IGF-1R \rightarrow リン酸化-(T94)Tctex-1 \rightarrow Cdc42 \rightarrow 分枝状アクチン再構築 \rightarrow CiPo膜のエンドサイトーシス \rightarrow 一次繊毛膜の減少、という一連の分子機構が、一次繊毛短縮・消失とそれに引き続く神経前駆細胞の増殖にかかわることを見出した(図3C)。しかし、一次繊毛短縮・消失の分子機構にはまだ不明な点が多く残されている上、短縮・消失によって発症する繊毛病の具体的な症状も分かっておらず、今後の検討課題である。

(4) おわりに

GPCR と一次繊毛を介するシグナル伝達様式の一部が、それぞれ解明されてきた。しかし、全容解明には遠く及ばない。私は本研究を進展させることによって、疾患発症機構の解明に取り組みたいと考えている。将来的には、未だ有効な治療薬が開発されていない疾患に対して、創薬を実現することが重要である。

最後に、勾坂記念賞という栄えある賞を受賞させて頂き、大変光栄に存じます。東北大学大学院薬学研究科の故中畑則道教授、東北大学大学院医学系研究科の柳澤輝行名誉教授、谷内一彦教授、および関わった全ての先生方や研究室員の皆様に、心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective. *Science*, **287**, 1960-1964.
- 2) Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., et al. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **16**, 829-842.
- 3) Sugai, M., Saito, M., Sukegawa, I., et al. (2003) PTH/PTH-related protein receptor interacts directly with Tctex-1 through its COOH terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 24-31.
- 4) Saito, M., Sugai, M., Katsushima, Y., et al. (2005) Increase in cell-surface localization of parathyroid hormone receptor by cytoskeletal protein 4.1G. *Biochem. J.*, **392**, 75-81.
- 5) Goto, T., Chiba, A., Sukegawa, J., et al. (2013) Suppression of adenylyl cyclase-mediated cAMP production by plasma membrane associated cytoskeletal protein 4.1G. *Cell. Signal.*, **25**, 690-697.
- 6) Saito, M., Cui, L., Hirano, M., et al. (2019) Activity of adenylyl cyclase type 6 is suppressed by direct binding of the cytoskeletal protein 4.1G. *Mol. Pharmacol.*, **96**, 441-451.
- 7) Reiter, J.F. and Leroux, M.R. (2017) Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 533-547.
- 8) Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., et al. (2007) HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, **129**, 1351-1363.
- 9) Jacoby, M., Cox, J.J., Gayral, S., et al. (2009) INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nat. Genet.*, **41**, 1027-1031.
- 10) Phua, S.C., Chiba, S., Suzuki, M., et al. (2017) Dynamic Remodeling of Membrane Composition Drives Cell Cycle through Primary Cilia Excision. *Cell*, **168**, 264-279 e215.
- 11) Yeh, C., Li, A., Chuang, J.Z., et al. (2013) IGF-1 activates a cilium-localized noncanonical G $\beta\gamma$ signaling pathway that regulates cell-cycle progression. *Dev. Cell*, **26**, 358-368.
- 12) Chuang, J.Z., Yeh, T.Y., Bollati, F., et al. (2005) The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Dev. Cell*, **9**, 75-86.
- 13) Li, A., Saito, M., Chuang, J.Z., et al. (2011) Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat. Cell Biol.*, **13**, 402-411.
- 14) Saito, M., Otsu, W., Hsu, K.S., et al. (2017) Tctex-1 controls ciliary resorption by regulating branched actin polymerization and endocytosis. *EMBO Rep.*, **18**, 1460-1472.
- 15) Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., et al. (2010) The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J. Cell Sci.*, **123**, 1785-1795.