



オートファジーが一次繊毛形成を促進するメカニズム

1. 発表者：

山本 康博（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野および
内科学専攻 呼吸器内科分野 博士課程4年（研究当時））

千野 遥（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 特任研究員）

水島 昇（東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆細胞の分化や正常な胚発生などを司る一次繊毛（注1）の形成には、その抑制因子（MYH9、注2）がオートファジー（注3）によって分解されることが重要であることを発見しました。
- ◆MYH9が分解されないと、正常な繊毛が形成されず、腎臓の尿細管細胞が腫大することを発見しました。
- ◆オートファジーによる繊毛形成制御は陸上脊椎動物に固有なので、この機構が腎臓の陸上生活への適応に重要であった可能性が考えられます。

3. 発表概要：

繊毛は、細胞表面から突出した細胞小器官で原生動物からヒトに至るまで真核生物に広く保存された細胞小器官です。そのうち一次繊毛は非運動性で、細胞外の環境を感知して細胞内に伝えるアンテナとして働き、胚発生、細胞分化、臓器形成などにおいて重要です。一次繊毛が形成されるときには、細胞内のダイナミックな変化を伴いますが、その詳細な仕組みは解明されていませんでした。今回、東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授らの研究グループは、マクロオートファジー（以後、オートファジー）が一次繊毛の形成を促進していることを明らかにしました。

オートファジーとは、オートファゴソーム（注4）が細胞質の一部を取り囲み、リソソーム（多種類の分解酵素を含む細胞小器官）と融合することで中身を分解する細胞内分解システムです。オートファジーによる分解は主に非選択的（ランダム）ですが、傷ついた細胞小器官、変性たんぱく質、細胞内の病原体などを選択的に分解することもできます（図1）。今回同グループは、オートファゴソームに結合するたんぱく質を網羅的に検索して、繊毛機能に関連することが示唆されていたNEK9（注5）を同定しました。さらに、NEK9は、一次繊毛形成の抑制因子であるMYH9と結合して、MYH9をオートファジー分解に導くアダプターとして機能することを見いだしました。NEK9がオートファゴソームに結合できないようにした細胞を作製したところ、MYH9は分解されず、一次繊毛の形成が顕著に抑制されました。また、同様の変異を導入したマウスでは、腎臓の近位尿細管細胞の一次繊毛形成が阻害され、細胞が腫大しました（図2）。以上のことから、NEK9を介したオートファジーによるMYH9の選択的分解は一次繊毛の形成に重要であると考えられました。

オートファジーによる繊毛形成制御は哺乳類などの陸上脊椎動物だけにみられるので、この機構が腎臓の陸上生活への適応に重要であった可能性が考えられます（図4）。また、本研究成果は、オートファジーの生理的意義や、繊毛形成の異常を伴う疾患の理解につながると考えられます。

本研究は、東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻システムズ薬理学教室の上田泰己教授、大出晃士講師、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所生物研究推進室の塚本智史主幹研究員との共同研究であり、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究（ERATO）「水島細胞内分解ダイナミクスプロジェクト」（研究総括：水島昇）として行われました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景

オートファジーは細胞内の主要な分解系であり、飢餓などのストレスに対する応答や細胞内の品質管理に重要な役割を果たしています。オートファジーが駆動されると、細胞質の一部がオートファゴソームに取り囲まれ、リソソームと呼ばれる細胞小器官と融合し、内容物はリソソームに含まれる酵素で分解されます。オートファジーは主に非選択的な分解機構ですが、特定のたんぱく質や傷ついた細胞小器官、細胞内病原体などを選択的に分解することもできます（これを選択的オートファジーと呼びます）（図1）。選択的に分解されるターゲットは現在も次々と明らかにされており、それらのほとんどはオートファゴソーム膜上に存在する LC3 あるいは GABARAP ファミリーたんぱく質と結合することでオートファゴソームに取り込まれることがわかっています。

(2) 研究内容

本研究では、今まで知られていない新規の選択的オートファジーのターゲットを網羅的に解析することを目指しました。まず、選択的オートファジーのターゲットの多くが GABARAP と結合する性質を利用して、GABARAP ファミリーたんぱく質の一つである GABARAPL1 と結合するたんぱく質を網羅的に探索するという大規模スクリーニングを実施しました。選択的オートファジーのターゲットを精度良く同定するため、GABARAPL1 に結合するたんぱく質群と、選択的基質を認識する部位に変異を導入した GABARAPL1 変異体に結合するたんぱく質群を質量分析解析によって同定し、それらを比較しました。その結果、選択的オートファジーで分解される分子として、一次繊毛関連たんぱく質 NEK9 を同定しました。

一次繊毛は中心体をベースとして細胞表面に生えている細胞小器官です。細胞外のシグナル分子の量や物理的なストレスなどの細胞外の環境を感知して細胞内に伝えるアンテナとしての役割を持っており、細胞の分化や正常な臓器形成、胚発生などに重要です。そのため、一次繊毛の形成異常は繊毛病（注6）と呼ばれる一連の疾患群の原因となることが知られています。NEK9 は細胞周期の制御に重要なたんぱく質で、一次繊毛の形成に関与することが示唆されていましたが、NEK9 とオートファジーの関係は不明でした。そこで、CRISPR/Cas9 法によって NEK9 に変異を導入し、NEK9 が GABARAP ファミリーたんぱく質と結合できなくなるような細胞を作製したところ、一次繊毛の形成が著明に抑制されていることが明らかとなりました。また、同様の変異を導入したマウスの腎尿細管においても一次繊毛形成が阻害され、細胞が腫大しました。これらのことから、選択的オートファジーによる NEK9 の分解は一次繊毛形成に重要であることが明らかとなりました（図2）。

さらに、NEK9 が一次繊毛形成を制御する機構を明らかにするために、NEK9 と結合するたんぱく質を網羅的に探索し、新たな結合因子として MYH9 を同定しました。MYH9 はアクチン細胞骨格を安定化させることで一次繊毛形成を抑制する因子として知られています。同グループは NEK9 が MYH9 をオートファジーに導くアダプター分子であり、MYH9 の分解は

一次繊毛形成の初期段階に起こるアクチン細胞骨格のリモデリングを促進することで一次繊毛形成を制御するという一連の過程を見いだしました（図3）。

NEK9の機能のうち、細胞周期に関連するキナーゼ（リン酸化酵素）としての働きは脊椎動物全体で保存されています。今回の同グループ解析によって、このオートファジーに関連する機能は哺乳類、爬虫類、鳥類、両生類などの陸上脊椎動物にのみ保存されており、魚類には保存されていないことがわかりました（図4）。脊椎動物の陸上への進化の過程では、老廃物の排泄や体液の恒常性維持のために腎臓に劇的な機能進化が起こったとされています。このことから、オートファジーによる繊毛形成制御機能は陸上脊椎動物で発達した腎臓の恒常性維持に重要であると考えられます。

(3) 社会的意義

繊毛病は多発性嚢胞腎、網膜色素変性症、多指症、水頭症、不妊、肥満など、多岐にわたる症状を呈しますが、繊毛形成異常の原因の全貌は明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていません。今回発見したオートファジーによる一次繊毛形成の制御機構は、オートファジー不全が繊毛形成異常につながりうることを示唆しました。本研究が端緒となり、オートファジーと一次繊毛のさらなる関係性や、繊毛病の病態形成の分子基盤と統合的な理解、治療に向けた基礎的な知見に結び付くことが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Nature Communications*」（英国夏時間 6月2日：オンライン版）

論文タイトル：NEK9 regulates primary cilia formation by acting as a selective autophagy adaptor for MYH9/myosin IIA

著者：Yasuhiro Yamamoto, Haruka Chino, Satoshi Tsukamoto, Koji L. Ode, Hiroki R. Ueda, Noboru Mizushima

6. 問い合わせ先：

<本研究に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 分子生物学分野
教授 水島 昇（みずしま のぼる）

Tel：03-5841-3440、Fax：03-3815-1490

E-mail：nmizu[at]m.u-tokyo.ac.jp

<JSTの事業に関すること>

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部
内田 信裕（うちだ のぶひろ）

Tel：03-3512-3528、Fax：03-3222-2068

E-mail：eratowww[at]jst.go.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 総務係

Tel：03-5841-3304、Fax：03-5841-8585

E-mail：ishomu[at]m.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel : 03-5214-8404、Fax : 03-5214-8432

E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp

7. 用語解説 :

(注1) 一次繊毛

細胞表面から外側に向けて突出している1本の不動性の細胞小器官である。一次繊毛には数多くの細胞膜受容体やチャネルが集積しており、これらの分子を介してさまざまな細胞外シグナルを受容し細胞内へ伝達する。哺乳類細胞では、細胞を静止期(G0期)に誘導すると古い方の中心小体である母中心小体が細胞膜の内側に接着して基底小体となり、そこから細胞膜外側へ向けて微小管が伸長して一次繊毛が形成される。

(注2) Myosin heavy chain 9 (ミオシン重鎖9) (Myosin IIA (ミオシン重鎖IIA)とも呼ばれる)の略で、収縮を引き起こす線維状タンパク質ミオシンの構成因子の一つ。ミオシンの機能としては筋収縮がよく知られているが、MYH9は非筋細胞型ミオシンの構成因子で、細胞の分裂や運動、接着や形状維持などの機能をもつ。

(注3) (マクロ)オートファジー

細胞の主要な分解機能の一つ。通常、単にオートファジーと呼ばれる。オートファゴソームが細胞質基質やミトコンドリアなどの細胞小器官を取り囲み、リソソームと融合することで内容物を分解する仕組み(図1)。その生理的機能としては、飢餓への適応や細胞内の恒常性維持などが知られており、近年では特に神経変性疾患などとの関連が注目されている。

(注4) オートファゴソーム

オートファジーを仲介する細胞小器官で、細胞質に存在するたんぱく質やミトコンドリアなどを包み込む(図1)。オートファゴソームはリソソームと融合し、リソソーム内の分解酵素によって内容物が消化される。

(注5) NEK9

NIMA-related kinase

9 (NIMA 関連キナーゼ)の略で、NEKファミリーと呼ばれるキナーゼ(リン酸化酵素)群の一つ。細胞分裂の制御に関わる因子であり、繊毛形成にも関連することが示唆されていた。

(注6) 繊毛病

一次繊毛を含む繊毛の異常によって引き起こされる疾患群のこと。

8. 添付資料

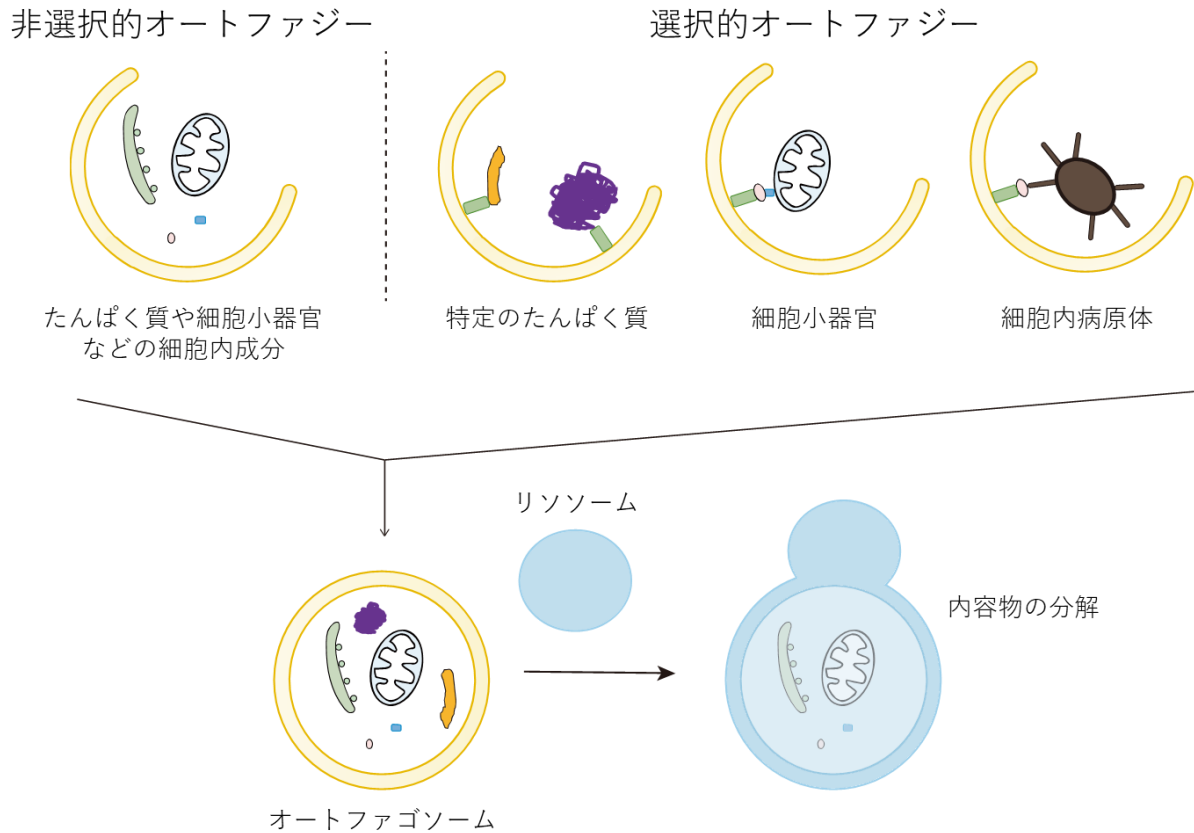


図1：オートファジーの仕組み

飢餓などのストレスでオートファジーが誘導されると、膜成分が細胞質成分を取り囲みながら伸長し、二重膜からなるオートファゴソームが形成される。続いて、オートファゴソームは分解酵素を含むリソソームと融合し、内容物が分解される。直径約1マイクロメートルの細胞質成分をランダムに取り囲み分解する非選択的オートファジー（左）と特定のたんぱく質や傷害を受けた細胞小器官、細胞内病原体などを選択的に分解する選択的オートファジー（右）の模式図を示す。LC3あるいはGABARAPファミリーたんぱく質を緑四角で示した。

野生型マウス

NEK9-GABARAP
結合不全変異マウス

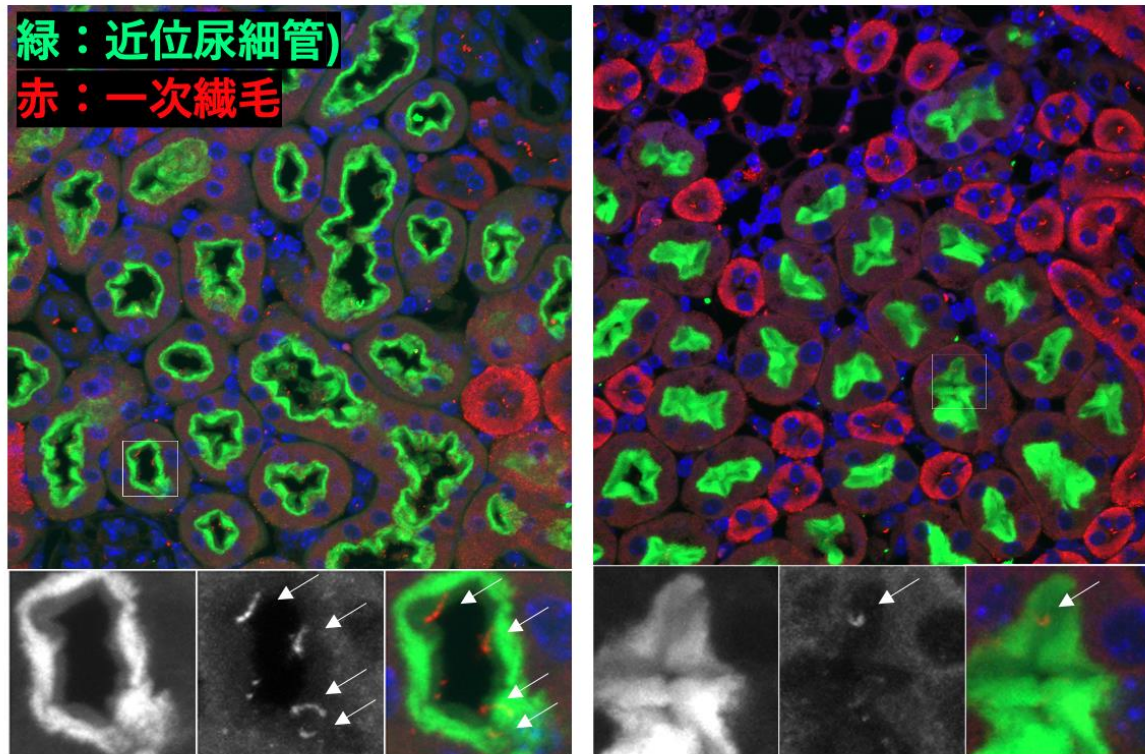


図2：NEK9の選択的オートファジーによる分解は腎尿細管での一次繊毛の形成に重要

NEK9のGABARAP結合不全変異を導入したマウスをCRISPR-Cas9システムを用いて作製した。GABARAP結合不全変異マウスは野生型（正常型）マウスに比較して腎臓の近位尿細管細胞において一次繊毛の形成障害を認めた。矢印で一次繊毛を示している。

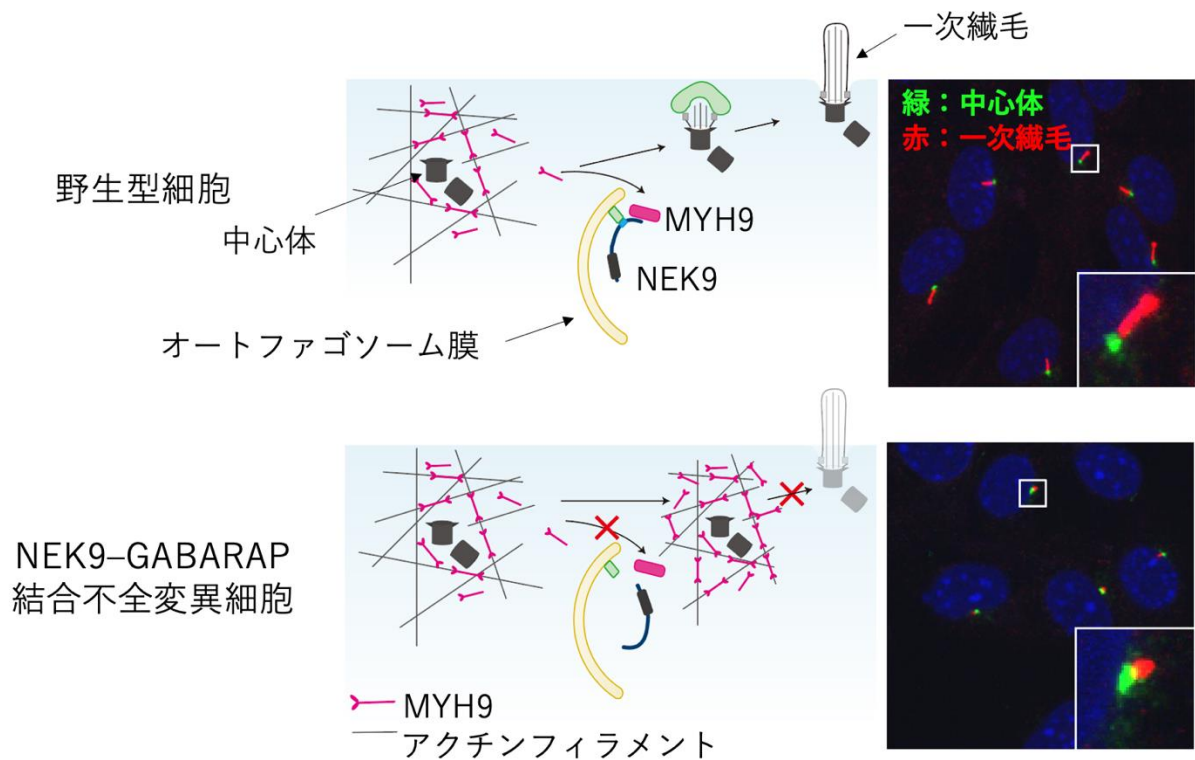


図3：オートファジーによる MYH9 の分解は一次繊毛形成に重要

MYH9 はアクチン細胞骨格と結合し、安定化されることで一次繊毛形成を阻害している。野生型（正常）細胞（上）では MYH9 が NEK9 によってオートファゴソームに誘導され分解されるため、アクチン細胞骨格が変化し、中心体が細胞表面に移動して一次繊毛が形成される。NEK9-GABARAP 結合不全変異を導入した細胞（下）では MYH9 が分解されないため、アクチン細胞骨格が安定化されたままであり中心体が細胞表面に移動できず、一次繊毛が形成されない。

魚類から陸上脊椎動物への進化

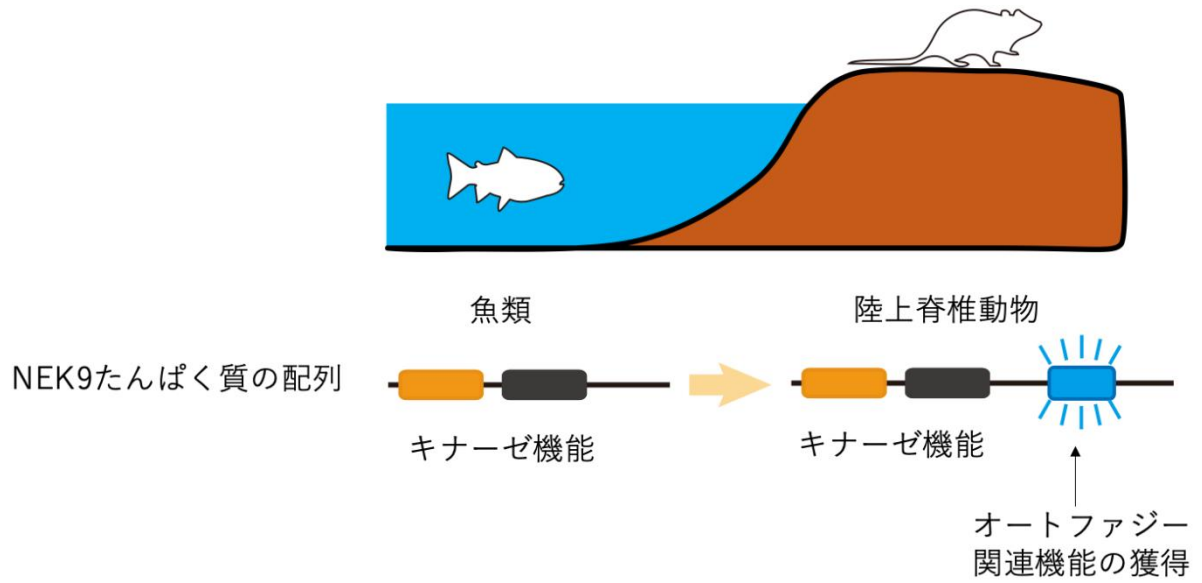


図4：NEK9 のオートファジー関連機能は陸上脊椎動物に固有である

魚類と陸上脊椎動物（哺乳類、爬虫類、鳥類、両生類）のNEK9たんぱく質の構造を示している。キナーゼ（リン酸化酵素）機能は脊椎動物全体で保存されているが、オートファジー関連機能は陸上脊椎動物でのみ存在する。