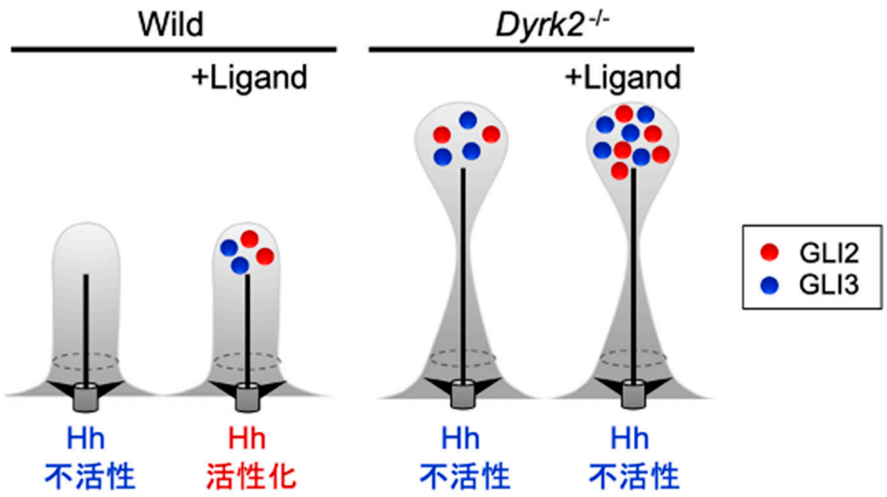
169　新規繊毛病原因遺伝子*Dyrk2*による組織発生機構の解明	吉田　彩舟

【目的】組織発生は、シグナル分子（Hedgehog、FGF、Wnt など）により時空間的に制御され、その異常は様々な発生異常や奇形疾患を呈する。近年、細胞に 1 本だけ存在する細胞小器官「一次繊毛」の組織発生における重要性が明らかになってきた。したがって、新規の一次繊毛制御因子の同定は、組織発生の制御機序、さらに、それらの異常による奇形疾患（繊毛病）の発症機序解明に繋がる。本研究では、哺乳類の組織発生に関して知見のなかったリン酸化酵素 Dual-specificity tyrosine-regulated kinase（DYRK2）の欠損マウスを用いて、組織発生との関連を評価した。
【方法】作出した *DYRK2* 欠損マウスを用いて、個体レベルにおける組織形成異常の有無を評価した。さらに、DYRK2 の制御するシグナルを同定するために、*DYRK2* 欠損マウスから胎仔線維芽細胞（MEF）を樹立し、Hedgehog リガンドへの応答性を解析した。また、細胞免疫染色ならびに走査型電子顕微鏡観察により、一次繊毛の異常を検証した。
【結果】*DYRK2* 欠損マウスの解析から、DYRK2 が哺乳類の広域な組織発生に必須な分子であることを明らかにした。その分子機序として、DYRK2 は細胞小器官である一次繊毛の形成・機能を制御し、Hedgehog シグナルを正に制御する新規リン酸化酵素であることを明らかにした。

リン酸化酵素 DYRK2 は一次繊毛を介して Hedgehog シグナルを制御する



169. 新規繊毛病原因遺伝子 *Dyrk2* による組織発生機構の解明

吉田　彩舟

東京慈恵会医科大学 医学部 生化学講座

Key words：一次繊毛，組織発生，Dyrk2，Hedgehog

緒　言

組織発生は Hedgehog、FGF、Wnt などのシグナル分子、ならびに転写因子の時間的・空間的発現パターンにより、厳密に制御されている。この組織発生において、2000 年以降、血球を除く全ての細胞に存在する細胞小器官「一次繊毛」の重要性が明らかとなってきた［1］。一次繊毛は細胞膜が突出した器官であり、一つの細胞に一本だけ形成される（図 1）。一次繊毛上には多くの G タンパク質共役型受容体（GPCR）や成長因子受容体・チャネルが集積しており、液性因子や機械刺激を受容する「細胞のアンテナ」として機能する。それら受容体の中には、組織発生を制御する Hedgehog（SHH、IHH、DHH）や FGF、EGF、TGFβなどの受容体群の存在が確認されている。したがって、一次繊毛の新規制御分子を同定することは、組織発生機構の解明につながる。実際に、一次繊毛の異常による疾患（水頭症・内臓逆位・腎嚢胞・骨格形成異常などを総称して“繊毛病 Ciliopathies”と呼ばれる）が認知され、その重要性が明らかになってきた。

近年、プロテオミクス解析から約 1,000 種に上る繊毛構成タンパク質が同定されている［2］。しかし、タンパク質の機能は、リン酸化をはじめとした翻訳後修飾により厳密に制御されることから、それら繊毛構成タンパク質だけでは、繊毛の機能制御や異常を説明しきれていない。機能制御には繊毛構成タンパク質の翻訳後修飾を担う「制御因子」の存在が不可欠である。

我々は、組織発生や発がんを制御する翻訳後修飾酵素に注目し、研究を展開してきた。本研究で注目したリン酸化酵素 Dual-specificity tyrosine-regulated kinase（DYRK2）は、アポトーシス誘導に関わる p53 のリン酸化酵素として機能同定された分子である［3］。興味深いことに、DYRK2 のがん細胞における知見は蓄積しているが、組織発生に関する報告はない。そこで、本研究では *DYRK2* 欠損マウスを作出し、組織発生における関与を検証した。その結果、DYRK2 が哺乳類の広域な組織発生において、必須な分子であることを明らかにした［4］。

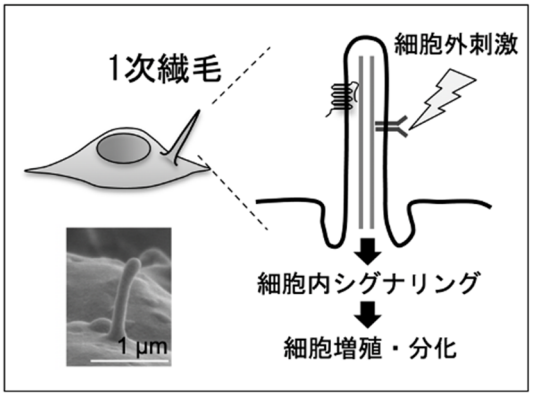


図 1. 細胞に 1 本だけ存在する細胞小器官“一次繊毛”
一次繊毛上には多種の GPCR が集積し、細胞外刺激を受容するアンテナとして機能する。

方法および結果

1. *Dyrk2* 欠損マウスは Hedgehog シグナル異常に起因した組織形成の異常を呈する

作出した *Dyrk2* 欠損（*Dyrk2* $^{-/-}$）マウスは、広域な組織形成不全を示し、出生時の呼吸障害により出生時致死に至った（図 2A）。特に骨格系の異常が顕著であり、口蓋裂、頭蓋底骨の形成不全や欠損、四肢の短縮や骨化の遅延などが観察された（図 2B～F）。

次に、*Dyrk2* 欠損マウスの表現系を手掛かりに、DYRK2 が制御する下流シグナルを探索した。*Dyrk2* 欠損マウスと類似の骨格形成異常を呈するシグナルに、Hedgehog シグナルが報告されている［5］。そこで、Hedgehog シグナルの活性指標である転写因子 *Gli1* の発現を解析した。その結果、*Dyrk2* 欠損個体において、*Gli1* の発現が低下していることが確認された（図 2G、H）。

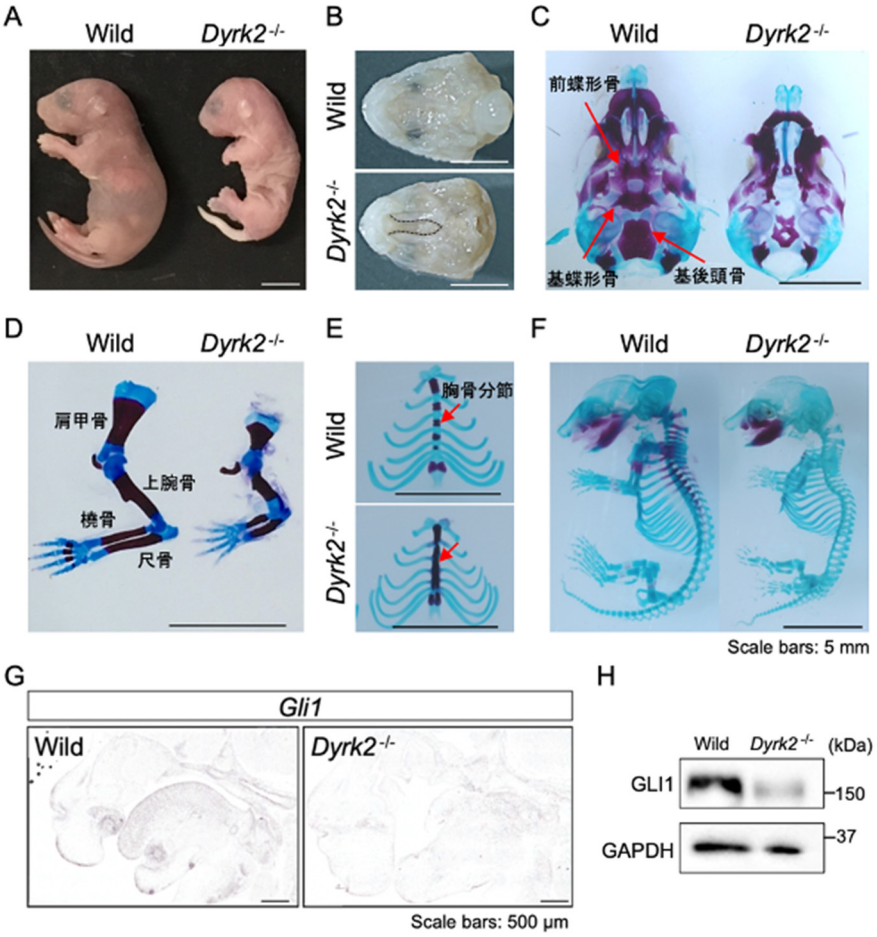


図 2. *Dyrk2* 欠損マウス（*Dyrk2* $^{-/-}$）の表現系

A） 野生型（Wild）ならびに *Dyrk2* 欠損（*Dyrk2* $^{-/-}$）マウスの出生時における全身像。

B） 野生型ならびに *Dyrk2* 欠損マウス（胎齢 E18.5 日齢）の口蓋像。点線は、口蓋裂を示す。

C～F） 野生型ならびに *Dyrk2* 欠損マウスの骨格標本（C～E：E18.5 日齢、F：E16.5 日齢）。
硬骨を紫色（アリザリンレッド S 染色）、軟骨を水色（アルシアンブルー染色）で示す。

G，H） 野生型ならびに *Dyrk2* 欠損マウスにおける、Hedgehog 活性指標 *Gli1* の遺伝子。
mRNA（G：*in situ* hybridization）とタンパク質（H：Western blotting）の発現解析。

この個体レベルで観察された Hedgehog シグナル低下におけるメカニズムを解析するために、*Dyrk2* 欠損マウスから胎仔線維芽細胞（MEF）を樹立し、Hedgehog リガンドへの応答性を検証した（本研究では、リガンドの代わりに、Smoothened Agonist：SAG を使用）。その結果、野生型では SAG に応答し、*Gli1* の発現が上昇した（図 3A、B）。一方で、*Dyrk2* 欠損細胞では、SAG への応答性が消失することが確認された（図 3A、B）。次に、*Dyrk2* 欠損細胞に対し、DYRK2 のレスキュー実験を行った。アデノウイルスを用いて、DYRK2 を発現させると、消失していた SAG 応答性が回復する（図 3C）。興味深いことに、DYRK2 のリン酸化活性を欠損させた 1 アミノ酸変異コンストラクト（K251R）では、野生型でみられたレスキュー作用は消失した（図 3C、D）。以上のことから、DYRK2 は、リン酸化活性依存的に Hedgehog シグナル応答を正に制御する分子であることが確認された。

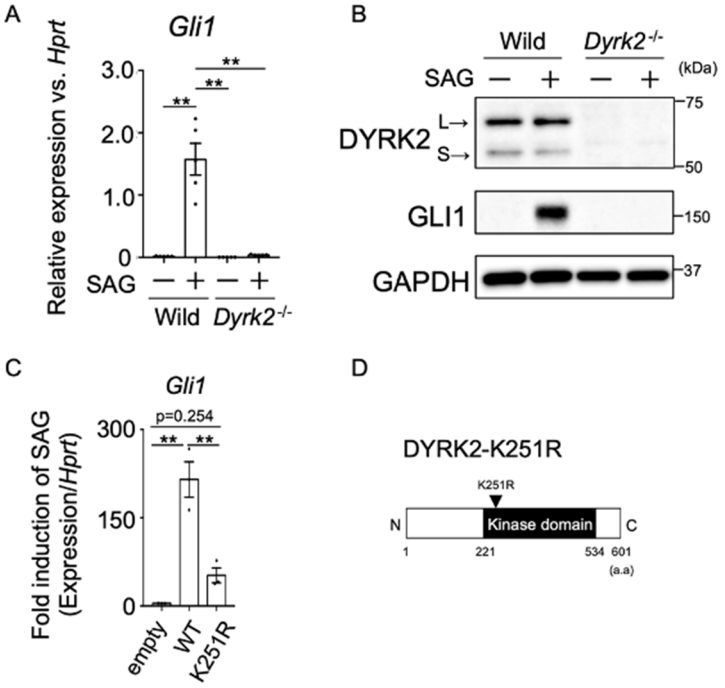


図 3. *Dyrk2* 欠損細胞を用いた Hedgehog リガンド応答性の解析

A, B）野生型ならびに *Dyrk2* 欠損マウス由来の胎仔線維芽細胞（MEF）における Smoothened Agonist（SAG）への応答性解析。Hedgehog シグナルの活性指標である *Gli1* の遺伝子（A）ならびにタンパク質（B）の発現量を示す。野生型では、SAG 刺激に応じて、GLI1 の顕著な発現誘導が確認されるが、*Dyrk2* 欠損細胞では GLI1 誘導が消失する。図 B 中の L ならびに S は、DYRK2 の Long ならびに Short アイソフォームを示す。Means±SEM、n＝5、**P＜0.01（One-way ANOVA）。

C）*Dyrk2* 欠損細胞に対する DYRK2 のレスキュー実験。*Dyrk2* 欠損細胞に野生型（WT）ならびにリン酸化不活性型（K251R）の DYRK2 を発現させ、SAG 添加時の *Gli1* 遺伝子発現を解析した。Means±SEM、n＝3、**P＜0.01（One-way ANOVA）。

D）DYRK2 タンパク質の構造、ならびにリン酸化不活性型変異体（K251R）の模式図。

2. DYRK2 は一次繊毛の形成を制御する

次に、*Dyrk2* 欠損による Hedgehog シグナル活性異常の原因を追求するために、Hedgehog シグナルの反応の場である一次繊毛に注目した。前述のように、一次繊毛には GPCR など多くの受容体が集積し、細胞のアンテナとして機能する。なかでも、哺乳類の Hedgehog シグナルは、一次繊毛に強く依存したシグナル系であることが知られている［6］。そこで、*Dyrk2* 欠損細胞の一次繊毛を蛍光免疫染色で解析した。その結果、*Dyrk2* 欠損細胞の一次繊毛は、顕

著に長化していることが確認された（図 4A、B）。さらに、走査型電子顕微鏡で *Dyrk2* 欠損マウス胚を観察すると、一次繊毛の長化、さらに先端の膨張や、ねじれなどの形態異常が確認された（図 4C）。こうした一次繊毛の異常は、マウス線維芽細胞だけでなく、繊毛研究のモデルであるヒト網膜色素上皮由来 hTERT-RPE1 細胞に DYRK2 をノックダウンすることでも再現できた。以上から、DYRK2 はヒトを含む哺乳類において、一次繊毛を制御することが確認された。

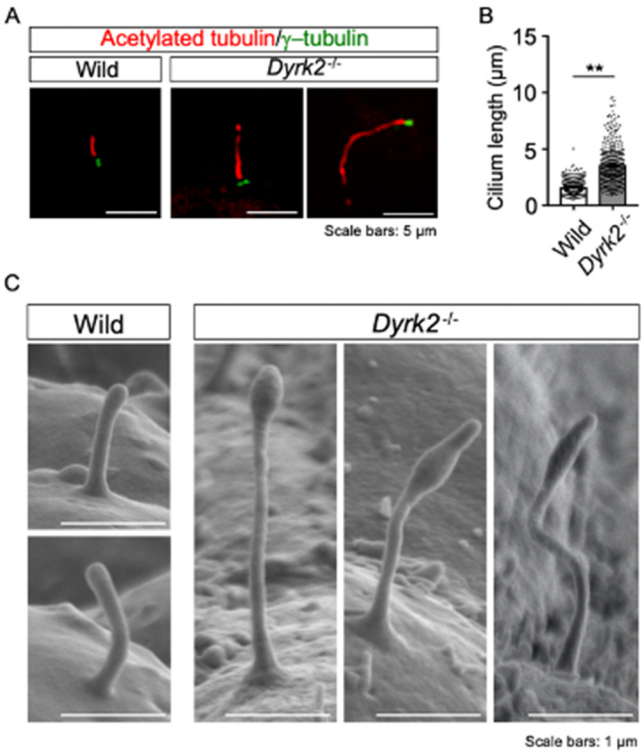


図 4. *Dyrk2* 欠損細胞における一次繊毛の解析

A, B）野生型ならびに *Dyrk2* 欠損細胞における、一次繊毛の蛍光免疫染色像（A）と一次繊毛の長さ V（B）を示す。一次繊毛の軸糸を Acetylated tubulin（赤）、基底小体を g-tubulin（緑）で示す。Means±SEM、n=5、**P<0.01（Student's t-test）。

C）野生型ならびに *Dyrk2* 欠損マウス胎仔（E10.5 日齢）を用いた、一次繊毛の走査型電子顕微鏡観察像。

考　察

本研究では、リン酸化酵素 DYRK2 が新規の一次繊毛制御因子であり、Hedgehog シグナルの活性化に必須の分子であることを哺乳類の個体・細胞レベルで示した。一次繊毛の制御分子は、繊毛研究のモデル生物であるクラミドモナスなどを用いて、精力的に研究されている。興味深いことに、DYRK2 と一次繊毛の関係性は、それらモデル生物においても報告がない。したがって、DYRK2 は新規の一次繊毛制御分子であると結論付けた。現在、一次繊毛制御における DYRK2 のリン酸化基質に関して複数の候補分子を得ている。それら候補分子の中で、一次繊毛制御の中核をなす分子の同定ならびに分子機序解析が急務である。

また、本研究ではマウスとヒトの細胞に関する解析のみであるが、哺乳類に加え、イソギンチャクとウニにおいても、DYRK2 が一次繊毛の制御に関与することが、プレプリントサーバーである bioRxiv に報告された［7］。このことから

も、DYRK2 による、生物種を超えた一次繊毛制御機構の解明と生物学的意義に関して、興味が持たれる。一方で、現時点では、ヒト繊毛病患者の原因として DYRK2 の変異が関与するかは明らかになっていない。ヒト繊毛病患者の原因として DYRK2 遺伝子変異が関与するか、さらなる研究が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学生化学講座のメンバー、神奈川大学理学部生物学科の藤原研先生、帝京大学医学部の中倉敬先生、国立がん研究センターの尾野雅哉先生である。そして、本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より深く感謝申し上げます。

文　献

1） Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Sep;18(9):533-547. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28698599 DOI: 10.1038/nrm.2017.60

2） Mick, DU., Rodrigues, RB., Leib, RD., Adams, CM., Chien, AS., Gygi, SP. & Nachury, MV. Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. Dev. Cell. 2015 Nov 23;35(4):497-512. Epub 2015 Nov 12. PMID: 26585297 DOI: 10.1016/j.devcel.2015.10.015

3） Taira N, Nihira K, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. Mol Cell. 2007 Mar 9;25(5):725-38. PMID: 17349958 DOI: 10.1016/j.molcel.2007.02.007

4） Yoshida S, Aoki K, Fujiwara K, Nakakura T, Kawamura A, Yamada K, Ono M, Yogosawa S, Yoshida K. The novel ciliogenesis regulator DYRK2 governs Hedgehog signaling during mouse embryogenesis. elife. 2020 Aug 6;9:e57381. PMID: 32758357 DOI: 10.7554/eLife.57381

5） Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, Chik KW, Shi XM, Tsui LC, Cheng SH, Joyner AL , Hui C. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. Development. 1997 Jan;124(1):113-23. PMID: 9006072 DOI: 10.1242/dev.124.1.113

6） Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. Nature. 2003 Nov 6;426(6962):83-7. PMID: 14603322 DOI: 10.1038/nature02061

7） Morante N, Sigg MA, Strauskulage L, Raleigh DR, Reiter JF. DYRK2 is a ciliary kinase involved in vertebrate Hedgehog signal transduction. bioRxiv, 2020. DOI: https://doi.org/10.1101/2020.08.31.275511