

【目的】 Hippo 経路は臓器の発生や大きさの制御、幹細胞や組織再生、また、がんの生物学に重要な役割を担うシグナル伝達経路として近年盛んに研究が行われている。この経路では、種々の刺激に応じて上流のキナーゼ分子群が活性化し、下流の転写調節分子群を制御することによって、様々な生理機能をもたらすと考えられている (図)。Hippo 経路の中心的なキナーゼである LATS キナーゼの標的分子としてよく知られているのは転写コアクチベーターである YAP/TAZ であるが、ノックアウトマウスを用いた解析などから LATS キナーゼは細胞分裂・中心体複製などの細胞周期進行、細胞分化・老化、オートファジーなど様々な場面で働いていると考えられており、これらの機能がすべて YAP/TAZ のリン酸化による制御で説明できるとは考え難い。また、我々は最近の研究で、がん細胞内の Hippo シグナルが宿主のがんに対する免疫応答を抑制していることを発見した[Cell 167: 1525-39 (2016)]が、この機構においては YAP/TAZ の関与は部分的であり、LATS キナーゼの未知の標的によってがん免疫の制御がもたらされている可能性が示唆された。そこで、本研究においては、LATS キナーゼの生理的な基質をリン酸化プロテオミクス解析で網羅的に同定し、LATS キナーゼの下流で Hippo 経路のエフェクターとして働く分子を明らかにすることを旨とする。

【方法】 Hippo 経路の中心キナーゼである *LATS1* および *LATS2* を欠損した細胞を CRISPR 法により作出した。この *LATS1/2* 欠損細胞と野生型の細胞における全タンパク質のリン酸化状態の変化を、SILAC リン酸化プロテオミクス法で網羅的に比較し、そのリン酸化部位が LATS キナーゼのリン酸化コンセンサス配列に合致するかを調べることで、LATS キナーゼの基質を探索した。その結果得られた LATS キナーゼの基質候補分子に関してインフォマティクス解析を行い、個別に研究を進める候補分子を絞り込んだ。この基質候補に対して *in vitro* でのリン酸化反応を用いた確認実験やリン酸化変異体 (リン酸化部位のアラニン置換やアスパラギン置換) 等を用いた機能解析実験によって、LATS によるリン酸化がもつ生物学的意義を検証した。

【結果】 リン酸化プロテオミクス解析の結果、数万個のペプチドが同定され、上述の基準で LATS キナーゼの基質候補分子を絞り込み、既知のリン酸化部位を含む数十個の基質を同定した。これらの分子をジーンオントロジー解析に用いたところ、LATS キナーゼの基質の多くは細胞内小胞輸送に関わることが分かった。そこで、これらのうち特定のタンパク質に焦点を絞りリン酸化変異体等を用いた機能解析実験を進めたところ、LATS キナーゼによるリン酸化によって分子の細胞内局在や機能が変化することが明らかとなった。すなわち、Hippo 経路はこの新規基質分子のリン酸化を制御することで細胞内小胞輸送を調節し、様々な細胞機能を発揮する可能性が示唆された。

Hippo シグナルの概略と本研究のねらい

