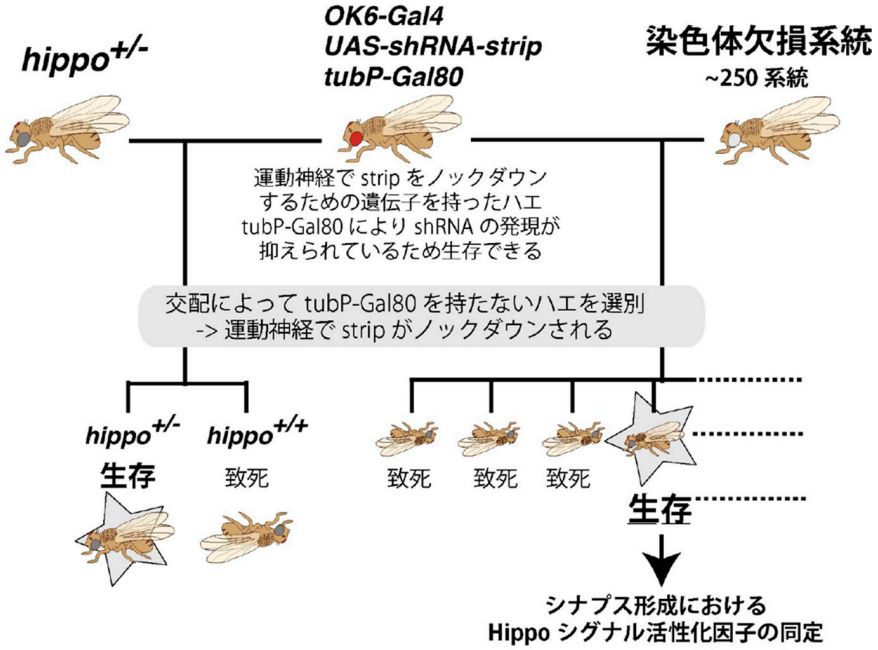
52　がん関連シグナル経路による個体行動制御メカニズム	千原　崇裕

【目的】がん抑制シグナル経路として知られる Hippo シグナル経路は、個体発生やがん形成に重要な役割を果たす。近年、Hippo シグナル経路の構成因子の同定・解析は爆発的に進み、その主要構成因子が続々と単離・解析されてきた。しかし、Hippo シグナル経路に関する研究の殆どは上皮系細胞の増殖・細胞死に関する研究であり、神経細胞における Hippo シグナル経路の機能は殆ど分かっていない。このような状況において私は「Hippo シグナル経路が神経においても機能する可能性」を見出すことに成功していた（Nat Commun 5, 5180, 2014）。具体的には、進化的に保存された Hippo キナーゼ活性の抑制因子 Strip が神経シナプス部位に局在しシナプス形態を制御していることを見出していた。よって本研究では、Hippo シグナル経路による神経機能調節メカニズムの解明を目指した。

【方法】本研究ではモデル生物としてショウジョウバエを用いた。まず、神経系における Hippo シグナル経路に関わる因子の遺伝学的探索を行った（遺伝学的スクリーニング：下図）。更に得られた候補因子に関して遺伝学、個体行動解析を行うことで、神経系における Hippo シグナル経路の作動基盤解明を目指した。

【結果】ショウジョウバエゲノム 77%をカバーするゲノム欠損系統セットを用いた遺伝学的スクリーニングを行うことで、進化的に保存されたアミノ酸トランスポーターHiAT（Hippo-interacting Amino acid Transporter）が hippo シグナルと遺伝学的に強く相互作用することを見出した。これまで数多くの Hippo シグナル経路に関する遺伝学的スクリーニングが行われてきたが、HiAT は発見されていない。これは本スクリーニングを神経系で行った成果であろうと考えられる。また、Hippo キナーゼおよび HiAT は個体活動量に影響を与えることも明らかになった。今後は HiAT の解析を更に進めることにより、神経系における Hippo シグナル経路の生理機能が明らかになると期待される。

神経系における Hippo シグナル経路関連因子の遺伝学的スクリーニング



52. がん関連シグナル経路による個体行動制御メカニズム

千原　崇裕

広島大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 細胞生物学研究室

Key words：Hippo シグナル，神経系，シナプス，個体行動，ショウジョウバエ

緒　言

Hippo シグナル経路は細胞増殖、細胞死、細胞分化を制御し、個体発生、がん形成において重要な役割を果たす[1]。近年、Hippo シグナル経路の構成因子の同定・解析は爆発的に進み、Hippo シグナル経路の主要構成因子が続々と単離・解析されてきた。例えば、hippo（MST1/2）、warts（Lats1/2）などのキナーゼ群、Sarvador（Sav1）などの足場タンパク質、及び転写制御因子として働く Yorki (YAP／TAZ) が同定されている (括弧内は哺乳類オルソログ)。しかし、これらの研究の殆どは、「細胞増殖過程」の Hippo シグナル経路の機能を解析するものであり、神経細胞などの「最終分裂後の細胞」における Hippo シグナル経路の機能は殆ど分かっていないのが現状である。

私は以上のような状況を鑑み、「最終分裂後の細胞：神経細胞のシナプス形成」における Hippo シグナル経路の生理機能解明を試みた。まず、シナプス形成における Hippo シグナル経路に関わる分子群をゲノムワイドに探索する目的で、独自に見出した Strip 分子（Hippo キナーゼ活性抑制因子）を利用した遺伝学的スクリーニングを行った。得られた Hippo シグナル制御因子を解析することにより、生体内における「Strip-Hippo シグナル経路を軸とした神経シナプス制御の分子基盤解明」を目指した。

方法および結果

1. 運動神経における Hippo シグナル経路を構成する因子探索に向けた遺伝学的スクリーニング系の構築

運動神経特異的に *strip* をノックダウンするとショウジョウバエは蛹期致死性を示し、*hippo* のノックダウンによりこの致死性は消失する。従って、この系において *hippo* と同方向に働く遺伝子があるとすれば、その欠損によっても同様に致死性が消失する可能性がある。そこで本研究では「運動神経における *strip* ノックダウンに伴う致死性を抑制することができるか否か」という指標のもとに Strip-Hippo 経路の新規遺伝子の探索を試みた。致死性は解剖等の手間をかけずに判断できるため、大規模なスクリーニングを行うのに適している。

まず運動神経特異的に *strip* をノックダウンすることのできるスターターラインの作成を目指した。しかし、そのような個体は蛹期致死性を示してしまい、系統を維持することができない。よって、致死性を抑えるために、tubulin プロモーターを用いて全身に Gal80 を発現させた。Gal80 は Gal4 に結合し Gal4 の転写活性を抑制する。これによって UAS 以下の *strip-shRNA*（*strip* をノックダウンする short-hairpin RNA）の発現が抑えられ、個体は生存することが可能になる。このスターターラインと別の系統を交配することで、次世代（F1）において運動神経特異的に *strip* をノックダウンした状態を作り出すことができる（図 1）。

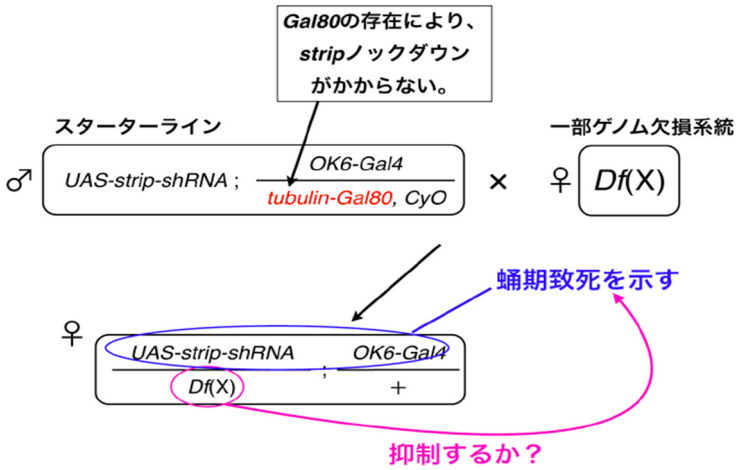


図 1. スターターラインとゲノム欠損系統との交配例

2. 遺伝学的スクリーニングによる HiAT（Hippo-interacting amino acid transporter）の同定

作成したスターターラインを、ゲノムの一部を欠損した系統である Dros Del Core Deletion Kit ショウジョウバエ系統と交配した。Dros Del Core Deletion Kit はショウジョウバエゲノムの一部領域を欠損した系統群であり、205 系統からなる。これを用いることでショウジョウバエゲノムの約 77%について、そのゲノム領域の欠損による影響を評価することができる。スターターラインと Dros Del Core Deletion Kit のショウジョウバエを交配すると、F1 ではゲノムの一部が欠損した遺伝学的背景を持ち、更に運動神経特異的に *strip* がノックダウンされた個体を得ることができる（図 1）。このようにして、スターターラインと Dros Del Core Deletion Kit に含まれる 192 系統（残る 13 継投については系統自身の脆弱性から実施できなかった）とを交配し、*strip* を運動神経特異的にノックダウンした際に生じる蛹期致死性を抑制できる系統を探索した。スクリーニングでは、3 匹以上の生存個体を生じ、かつ 10%以上の生存率を示した 25 系統を、致死性を抑制することのできる系統として判定した。ポジティブコントロールとして *hippo* 遺伝子を含むゲノム領域欠損系統を、ネガティブコントロールとして野生型系統をそれぞれスターターラインと交配し、生存率を測定した（表 1）。

表 1. *strip* ノックダウンによる蛹期致死性を抑制した 25 系統

系統番号： 生存個体数/全個体数 (生存率%)

ポジティブコントロール（*hpo*を含む領域を欠損した系統） 9/10 (生存率 90%)	ネガティブコントロール（*yw*） 0/65 (生存率 0%)
Df(X)294 : 12/10 (120.0%)	*Df*(2R)130 : 13/76.5 (15.7%)
Df(X)189 : 12/14.5(82.8%)	*Df*(X)292 : 4/25.5 (15.7%)
Df(X)214 : 25/31 (80.6%)	*Df*(X)347 : 4/26 (15.4%)
Df(X)173 : 5/11 (45.5%)	*Df*(3L)72 : 3/20 (15.0%)
Df(X)193 : 4/12.5 (32.0%)	*Df*(X)346 : 3/21.5 (14.0%)
Df(X)166 : 7/22 (31.8%)	*Df*(X)485 : 6/43 (14.0%)
Df(X)195 : 4/14.5 (27.6%)	*Df*(3L)424 : 6/44 (13.6%)
Df(X)291 : 3/12.5 (24.0%)	*Df*(2L)201 : 6/44.5 (13.5%)
Df(3L)419 : 3/13 (23.1%)	*Df*(3L)439 : 5/38.5 (13.0%)
Df(3R)453 : 3/11.5 (20.7%)	*Df*(3L)428 : 5/39 (12.8%)
Df(2L)378 : 5/24.5 (20.4%)	*Df*(2L)396 : 3/28.5 (10.5%)
Df(2L)376 : 6/33 (18.2%)	*Df*(3L)436 : 5/47.5 (10.5%)
Df(X)344 : 3/17.5 (17.1%)	

上記 25 系統において *strip* ノックダウン致死性を抑制した責任遺伝子の同定を目指した。比較的広いゲノム領域を欠失した系統に関しては、更に小さなゲノム領域を欠失した系統を用いて候補ゲノム領域の絞り込みを行った。比較的狭いゲノム領域を欠失した系統に関しては、候補領域内に含まれる遺伝子に対する RNAi 系統をスターターラインと交配し、その蛹期致死性を観察した。その結果、運動神経において Hippo シグナル経路と遺伝学的相互作用する可能性の高い 10 個の遺伝子を同定した。そのうち最も効果が強いものとして一種のアミノ酸トランスポーターを同定した。ここでは、このアミノ酸トランスポーターを HiAT（Hippo-interacting Amino acid Transporter）と呼ぶこととする。

3. HiAT は運動神経シナプス形成において、Strip-Hippo シグナル経路と相互作用する

運動神経特異的に *strip* をノックダウンすると、蛹期致死性のみならずシナプスの形成異常も引き起こされる［2］。野生型ではシナプス構造（ブートン）が数珠状に連なっているのに対し、*strip* をノックダウンした神経筋接合部（NMJ：Neuromuscular junction）ではサテライトブートンと呼ばれる、軸から外れた小さなブートンが増加する。HiAT が NMJ ブートン形成における Strip-Hippo シグナル経路に影響を与えるかを確かめる目的で、運動神経特異的に *strip* と *hiat* を同時にノックダウンした。その結果、*hiat* のノックダウンは *strip* ノックダウンによって生じたサテライトブートンの増加を抑制した（図 2）。

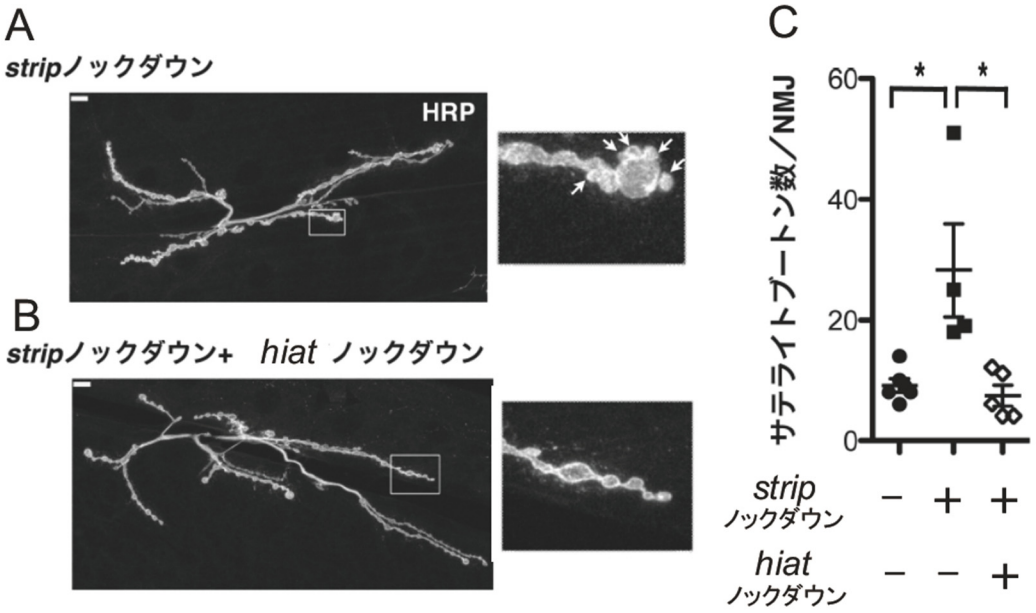


図 2. *strip* ノックダウンによるサテライトブートン数の増加は、*hiat* ノックダウンによって抑制される

A：*strip* ノックダウンによってサテライトブートン（右拡大図内の矢印）の数は増加する。スケールバー：10 μm.

B：*strip* ノックダウンによるサテライトブートン数の増加は、*hiat* ノックダウンによって抑制される。スケールバー：10 μm.

C：サテライトブートン数の定量。*$p < 0.05$，Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple test.

4. Hippo と HiAT は個体活動量の制御に関わる

上記のように神経系において Hippo、HiAT が機能することが分かったので、それら生理機能を調べる目的でサーカディアンリズムに対する影響を調べた。これまで Hippo の抑制因子である *strip* がショウジョウバエサーカディアンリズムの調節に重要な役割を担うことが報告されている［3］。今回、サーカディアンリズムの測定には DAM（*Drosophila* activity monitor）システムを用い、12 時間おきの明暗条件（LD 条件）と恒暗条件（DD 条件）において *hippo*、*hiat* のノックダウン効果を調べた。サーカディアンリズム生成に重要な時計神経で *hippo* もしくは *hiat* をノックした場合、個体のサーカディアンリズムには影響が現れなかった。しかし意外なことに、*hippo* もしくは *hiat* のノックダウンは個体活動量全体を増加させる傾向が観察された。

考　察

本研究により、運動神経特異的な*strip* のノックダウンによるサテライトブートン形成にアミノ酸トランスポーターHiATが関与することが明らかになった。また、*strip* のノックダウンによるサテライトブートンの形成が*hiat* のノックダウンによって抑制されたことから、HiATはStripの下流で働くことと考えられる。更に、個体活動量においてもHippoキナーゼとHiATは同様のシグナル経路で機能することが示唆された。

では、HiATはどのような機構でサテライトブートンや個体活動量を制御しているのであろうか。HiATはそのタンパク質二次構造から、SLC36ファミリーに属するアミノ酸トランスポーターであると推測される。このファミリーには他に8つの遺伝子が含まれており、その内Patheticと言う分子は神経樹状突起の形成に関与する。しかしHiATの機能については、これまで全く報告はない。

通常、アミノ酸トランスポーターはアミノ酸を取り込むことで細胞内のアミノ酸濃度を上昇させる。また細胞内アミノ酸濃度の上昇は、その下流でmTORC2を活性化させる。TORC2はショウジョウバエNMJの成長を抑制すること知られており、もしHiATが細胞内にアミノ酸を取り込むことで細胞内アミノ酸濃度を上昇させているのであれば、HiATノックダウンによってTORC2は不活性化され、NMJの成長は促進されるはずである。しかし本研究では*strip*ノックダウンによるNMJの過剰成長がHiATのノックダウンによって抑制された。これはHiAT下流にTORC2以外の別の経路が存在し、それがサテライトブートンの形成に関与していることを示唆している。今後は、Hippoキナーゼと HiATの生化学的関係を詳細に解析することで、神経系におけるHippoシグナル経路の作動基盤を明らかにしていく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科遺伝学学研究室の三浦正幸教授、佐久間知佐子博士、梅原智輝氏、広島大学大学院理学研究科生物化学専攻の藤井俊幸氏である。

文　献

1) Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. Cell. 2015 Nov 5;163(4): 811–28. PMID: 26544935 DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.044

2) Sakuma C, Saito Y, Umehara T, Kamimura K, Maeda N, Mosca TJ, Miura M, Chihara T. The Strip-Hippo Pathway Regulates Synaptic Terminal Formation by Modulating Actin Organization at the Drosophila Neuromuscular Synapses. Cell Rep. 2016 Aug 30;16(9):2289-97. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27545887 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.066.

3) Andreazza S, Bouleau S, Martin B, Lamouroux A, Ponien P, Papin C, Chelot E, Jacquet E, Rouyer F. Daytime CLOCK Dephosphorylation Is Controlled by STRIPAK Complexes in Drosophila. *Cell Reports.* 2015 May 26;11(8):1266-79. Epub 2015 May 14. PMID: 25981041 DOI: 10.1016/j.celrep.2015.04.033.

4) Lin WY, Williams C, Yan C, Koledachkina T, Luedke K, Dalton J, Bloomsburg S, Morrison N, Duncan KE, Kim CC, Parrish JZ. The SLC36 transporter Pathetic is required for extreme dendrite growth in Drosophila sensory neurons. *Genes Dev.* 2015 Jun 1;29(11):1120-35. doi: 10.1101/gad.259119.115.