155　細胞内膜リン脂質によるYAPの活性化機構の解明	向井　康治朗

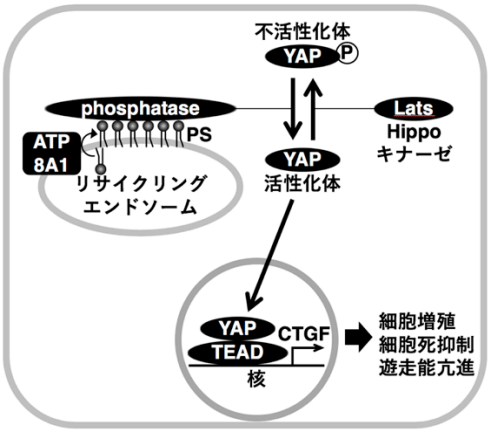
【目的】悪性新生物（癌）は日本人の死亡原因の 30%以上を占めることから分かる通り、癌の治療法を開発することは非常に重要な課題である。Hippo－YAP 経路は器官の大きさを規定するシグナルとして同定された経路であるが、癌においては転写共役因子 YAP の恒常的な活性化が過剰な細胞増殖、細胞死の抑制、浸潤能の亢進を誘導し、癌の悪性化の一因となる。

我々はこれまでに、YAP の活性化がリサイクリングエンドソームに局在する酸性リン脂質ホスファチジルセリンによって制御されることを明らかにしてきた（T. Matsudaira and K. Mukai et al., *Nat Commun*, 2017）。さらに最近、YAP 依存的に増殖する癌細胞の一つである MDA-MB-231 細胞においては、リサイクリングエンドソーム膜の細胞質側のホスファチジルセリン量を制御するタンパク質 ATP8A1 を発現抑制すると、YAP のリン酸化体が増加し、細胞増殖が著しく減弱するという予備的結果を得たが、その分子機構に関しては未解明のままである。そこで本研究では、乳癌細胞においてリサイクリングエンドソーム膜の細胞質側のホスファチジルセリンが Hippo－YAP 経路を制御する分子機構を明らかにすることで、癌細胞に対する新規創薬標的の提案を目指す。

【方法】上述の通り ATP8A1 を発現抑制すると YAP のリン酸化体が増加したので、本研究ではホスファチジルセリン近傍タンパク質として同定された 11 個のセリンホスファターゼファミリー分子に着目した。この 11 遺伝子に関して、The Cancer Genome Atlas にて乳がん患者における発現量と予後の相関解析を行ったところ、PPP1R12A と PP1B においてのみ、高発現の乳がん患者群で予後が悪いという結果が得られた。PPP1R12A と PP1B が含まれる PP1 ファミリーのホスファターゼは、触媒サブユニットと調節サブユニットが複数のモチーフを介して結合し、ヘテロ二量体を形成している。触媒サブユニットには PP1A、PP1B、PP1C の 3 種類のみが存在する一方で、調節サブユニットは 100 種類以上存在し、触媒サブユニットの基質特異性を高めていることが知られている。そこで本研究では、PPP1R12A－PP1B 複合体が YAP の脱リン酸化に寄与するかを、PPP1R12A を MDA-MB-231 細胞で発現抑制し、YAP のリン酸化状態と細胞増殖を評価することで検証した。また、細胞内オルガネラ分布が観察しやすい COS-1 細胞を用いて PPP1R12A と PP1B の細胞内局在も検証した。

【結果】MDA-MB-231 細胞で PPP1R12A を発現抑制したところ、細胞増殖が抑制され、YAP のリン酸化体が蓄積した。さらに、PPP1R12A 及び PP1B はすでに報告のある核や細胞質に加え、リサイクリングエンドソームに局在した。また、酸性リン脂質との相互作用に必要な C 末端側を欠損した PPP1R12A（1～667）はリサイクリングエンドソーム局在を失っていることを見出した。

細部内膜リン脂質による YAP の活性化機構



155. 細胞内膜リン脂質による YAP の活性化機構の解明

向井　康治朗

東北大学 大学院生命科学研究科 細胞小器官疾患学分野

Key words：ホスファチジルセリン，リサイクリングエンドソーム，Hippo－YAP 経路，がん

緒　言

悪性新生物（癌）は日本人の死亡原因の 30%以上を占めることから分かる通り、癌の治療法を開発することは非常に重要な課題である。Hippo－YAP 経路は器官の大きさを規定するシグナルとして同定された経路であるが、癌においては転写共役因子 YAP の恒常的な活性化が過剰な細胞増殖、細胞死の抑制、浸潤能の亢進を誘導し、癌の悪性化の一因となる［1］。

我々はこれまでに、YAP の活性化がリサイクリングエンドソームに局在する酸性リン脂質ホスファチジルセリンによって制御されることを明らかにしてきた［2］。この解析の中で、YAP 依存的に増殖する癌細胞の一つである MDA-MB-231 細胞において、リサイクリングエンドソーム膜の細胞質側のホスファチジルセリンを制御するタンパク質 ATP8A1 を発現抑制すると、YAP のリン酸化体（不活性化体）が増加し、細胞増殖が著しく減弱することを見出していたが、その分子機構に関しては未解明のままであった。そこで本研究では、リサイクリングエンドソーム膜の細胞質側のホスファチジルセリンが Hippo－YAP 経路を制御する分子機構を明らかにし、癌細胞に対する新規創薬ターゲットを提案することを目指した。

方　法

1. ホスファチジルセリン近傍タンパク質として同定されたセリンスレオニンホスファターゼにおける乳がん患者生存解析

上述の通り ATP8A1 を発現抑制すると YAP のリン酸化体が増加したことから、本研究ではホスファチジルセリン近傍タンパク質として同定された 11 個のセリンホスファターゼファミリー分子に着目し、The Cancer Genome Atlas にて乳がん患者における発現量と予後の相関解析を行った。

2. PPP1R12A 発現抑制時の細胞増殖

YAP 依存的に細胞増殖することが知られているトリプルネガティブ悪性乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞を用いて PPP1R12A を発現抑制したのちに、細胞数を定量することで細胞増殖を評価した。PPP1R12A の発現抑制効率はリアルタイム PCR にて PPP1R12A mRNA を定量することで評価した。

3. PPP1R12A 発現抑制時の YAP のリン酸化

MDA-MB-231 細胞に PPP1R12A に対する siRNA をトランスフェクションしたのちに、リン酸化 YAP、YAP、リン酸化 Lats1、Lats1 をウェスタンブロットにて検出した。

4. PPP1R12A の細胞内局在

エンドソームの空間分布が見やすい COS-1 細胞に Myc タグを付加した PPP1R12A を発現させるプラスミドをトランスフェクションしたのちに、細胞を固定して抗 Myc 抗体で染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。また、酸性リン脂質と相互作用することが知られている C 末端領域を欠損させた PPP1R12A（1～667）の細胞内局在も同様の方法で観察した。

結果および考察

1. ホスファチジルセリン近傍タンパク質として同定されたセリンスレオニンホスファターゼにおける乳がん患者生存解析

近接するタンパク質を非特異的にビオチン化する酵素 BirA*と、ホスファチジルセリンに選択的に結合するタンパク質 evectin-2 の PH ドメインをタンデムに繋いだもの（2×PH）を連結したコンストラクト BirA*-2×PH を COS-1 細胞に発現させ、ホスファチジルセリン近傍タンパク質を網羅的に探索した。その結果、セリンスレオニンホスファターゼファミリー分子として、触媒サブユニット（PP1A/PP1B/PP1C、PPM1G）と 8 種類の調節サブユニット（PPP1R8、PPP1R9A、PPP1R10、PPP1R12A、PPP1R13B、PPP1R37、PPP2R1A、PPP2R5D）が同定された。これらのホスファターゼのうち、TCGA で遺伝子発現情報のない PPP1R37 を除いた 11 種類のホスファターゼについて、TCGA データベースをもとに乳がん患者のカプランマイヤー曲線を作成したところ、PPP1R12A と PP1B においてのみ、高発現の乳がん患者群で予後が悪いという結果が得られた（図 1）。このことから PPP1R12A と PP1B は乳がんの悪化を促進する因子である可能性が考えられた。

2. PPP1R12A 発現抑制時の細胞増殖

そこで次に、MDA-MB-231 細胞で siRNA を用いて PPP1R12A を発現抑制したときの細胞増殖を検討した。2 種類の siRNA オリゴを用いて PPP1R12A を発現抑制したが、いずれにおいても PPP1R12A の発現抑制により細胞増殖が顕著に抑制された（図 2A）。さらに、Hippo pathway において YAP のリン酸化を担うキナーゼである Lats1/2 を PPP1R12A と同時に発現抑制したところ、PPP1R12A の発現抑制による細胞増殖の抑制が回復した（図 2B）。これより、PPP1R12A が Hippo pathway に関与して MDA-MB-231 細胞の増殖を正に制御していることが示唆された。

次に、別の種類の乳がん細胞として MCF-7 細胞を用いて、細胞増殖を検討した。MCF-7 細胞はホルモン受容体陽性のルミナル A タイプに分類され、YAP/TAZ の発現が低く、YAP/TAZ を発現抑制しても、細胞増殖が抑制されないことが知られている［3, 4］。MCF-7 細胞においても、RNAi により PPP1R12A の mRNA の十分な発現抑制が確認できた（図 2C）。しかしながら、PPP1R12A を発現抑制しても、MCF-7 細胞の増殖は抑制されなかった（図 2D）。この結果から、YAP 非依存的に増殖する乳がん細胞においては、PPP1R12A が細胞増殖には寄与していない可能性が示唆された

3. PPP1R12A 発現抑制時の YAP のリン酸化

次に、MDA-MB-231 細胞において PPP1R12A が YAP の脱リン酸化に寄与しているか、PPP1R12A の発現抑制により検討した。その結果、PPP1R12A の発現抑制により、Lats1 の全タンパク量に占めるリン酸化 Lats1 の比率は変化しなかった一方で、リン酸化 YAP については YAP の全体量と比較して増加した（図 3）。このことから、MDA-MB-231 細胞において PPP1R12A が YAP の脱リン酸化に関与することで、細胞の増殖を正に制御していることが示された。

4. PPP1R12A の細胞内局在

次に、核近傍のオルガネラ分布が観察しやすい COS-1 細胞にタグ付き PPP1R12A を発現させ、PPP1R12A の細胞内局在を、免疫染色により検証した。先行知見から、PP1R12A の C 末端側 （アミノ酸 668～1,030）が酸性リン脂質と相互作用する可能性が示唆されていたので［5］、PPP1R12 の全長コンストラクトに加え、PPP1R12A（1～667）と PPP1R12A（668～1030）の局在も検証した。その結果、全長 PPP1R12 と PPP1R12A（668～1,030）は、核や細胞質に加えて核近縁部の RE にも局在が観察された。一方、PPP1R12A（1～667）は核にのみ局在した（図 4A）。さらに、PP1B の局在も検証したところ、既知の核局在に加えて、RE 局在も観察され、全長 PPP1R12A と共局在した。一方、興味深いことに、PPP1R12A（1～667）を発現させた細胞では、PPP1R12A（1～667）だけでなく、PP1B も核に局在した（図 4B）。これらの結果から、PPP1R12A の C 末端領域が PP1B をリサイクリングエンドソーム局在にさせるのに必要である可能性が示唆された。

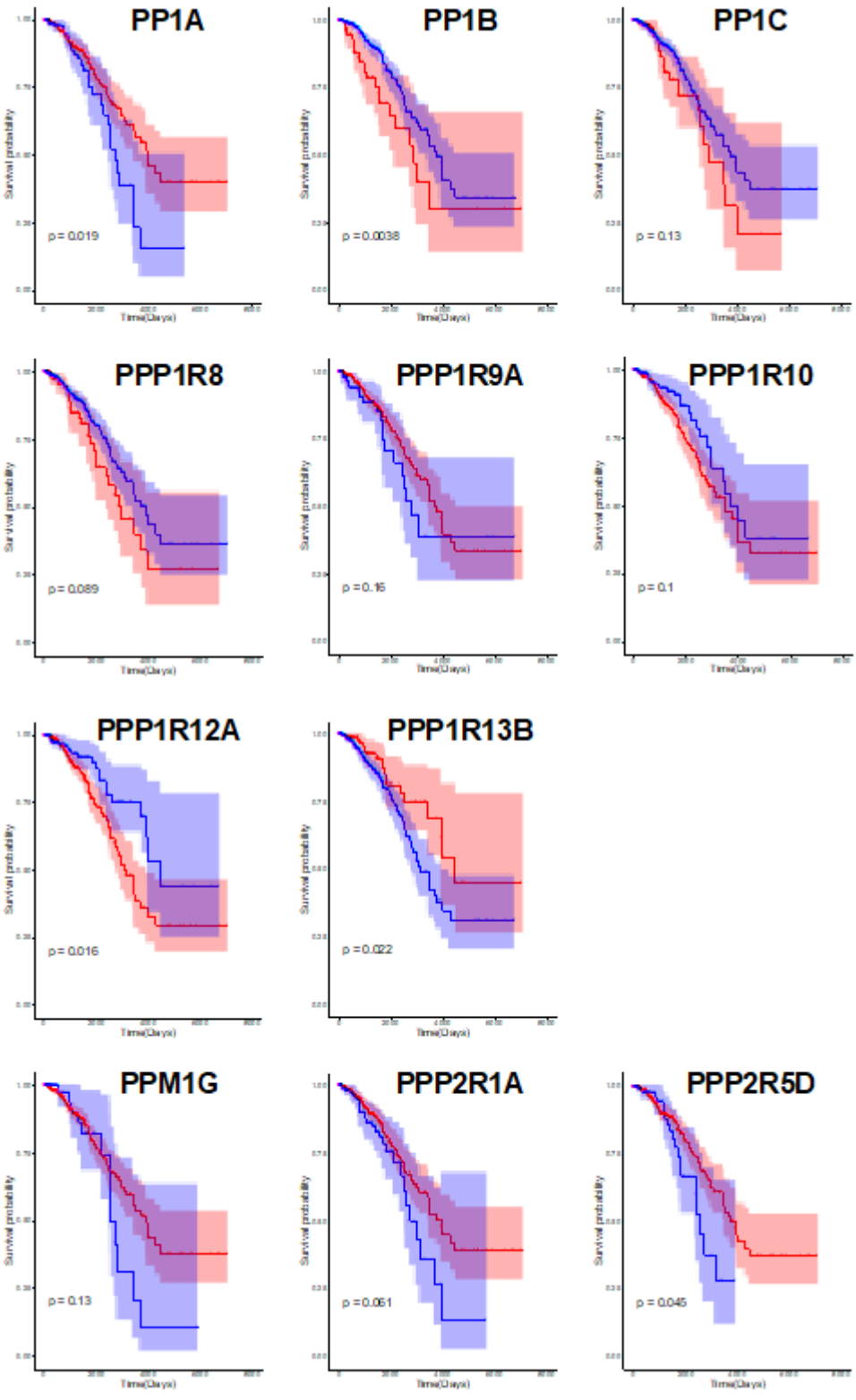


図 1. ホスファチジルセリン近傍セリンスレオニンホスファターゼにおける乳がん患者の生存解析
赤が高発現群、青が低発現群を表す。ホスファチジルセリン近傍セリンスレオニンホスファターゼのうち、PPP1R12A と PP1B は、発現量が高いほど生存率が悪かった。カプランマイヤー曲線を作成したのちに Log-rank test にて有意差検定を行った。

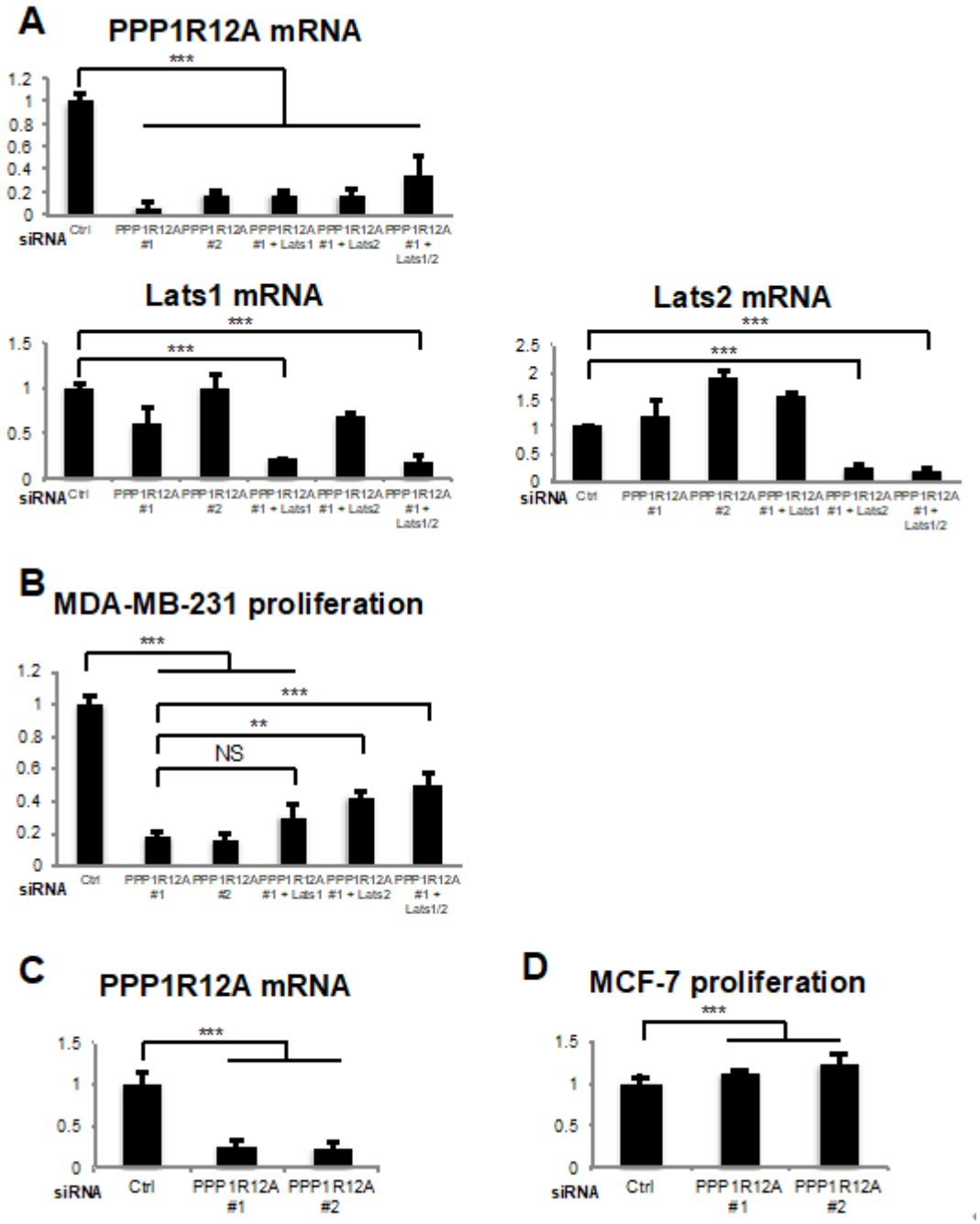


図 2.　PPP1R12A 発現抑制時の乳がん細胞の細胞増殖

A)　MDA-M231 細胞で各遺伝子の発現抑制効率を定量 PCR で評価した。

B)　MDA-M231 細胞において各遺伝子を発現抑制し、1 週間後の時点での細胞数で評価した。

C)　MCF-7 細胞で各遺伝子の発現抑制効率を定量 PCR で評価した。

D)　MCF-7 細胞において各遺伝子を発現抑制した際の細胞増殖を発現抑制後 1 週間の時点での細胞数で評価した。

n＝3、Mean±SD、One-way ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc* test、**p＜0.01、***p＜0.001、NS：not significant。

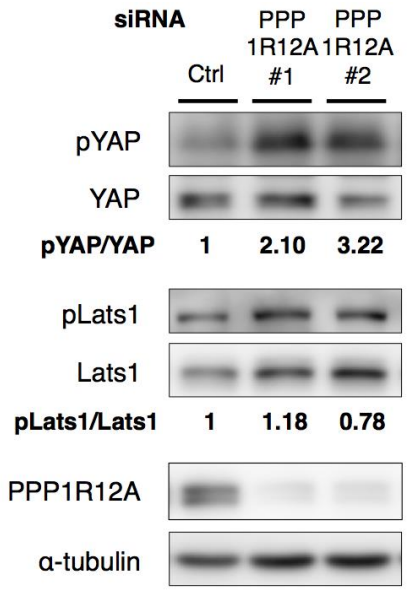


図 3. PPP1R12A 発現抑制時の YAP のリン酸化

MDA-MB231 細胞において PPP1R12A を発現抑制し、YAP 及び Lats1 のリン酸化をウェスタンブロットで評価した。下の数字はバンドを定量。

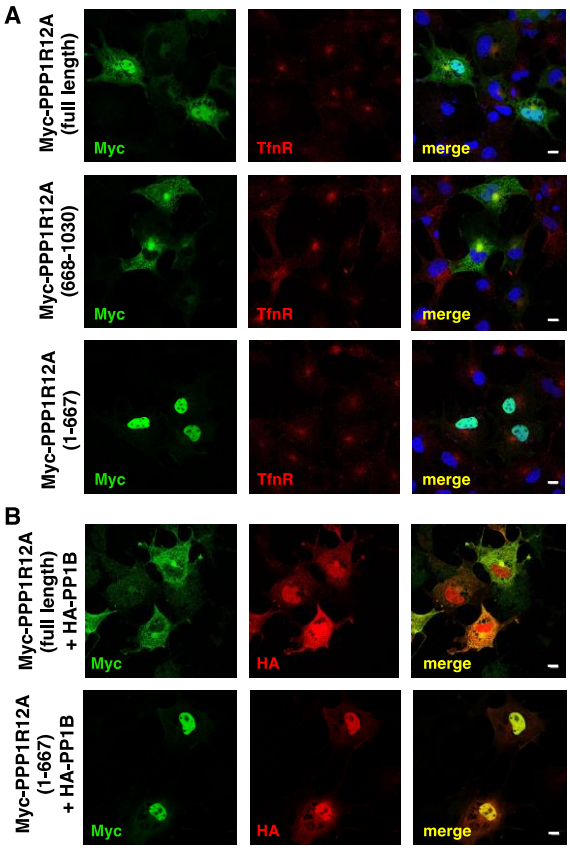


図 4. PPP1R12A と PP1B の細胞内局在

A) COS-1 細胞に Myc-PPP1R12A を強制発現させ、免疫染色を行った。Scale Bar は 10 μm。

B) COS-1 細胞に Myc-PPP1R12A と HA-PP1B を強制発現させ、免疫染色を行った。
Scale Bar は 10 μm。

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研究科衛生化学学研究室の河野望准教授、東京大学大学院医学系研究科の新井洋由客員研究員、早稲田大学理工学術院の仙波憲太郎教授、中山淳助教、東京医科歯科大学の仁科博史教授、コロンビア大学の宮村憲央博士である。

文　献

1) Harvey, K. F., Zhang, X., and Thomas, D. M. The Hippo pathway and human cancer. Nat Rev Cancer. 2013. 13, 246-257. PMID: 23467301 DOI: 10.1038/nrc3458

2) Matsudaira, T., Mukai, K., Noguchi, T., Hasegawa, J., Hatta, T., Iemura, S., Natsume, T., Miyamura, N., Nishina, H., Nakayama, J., Semba, K., Tomita, T., Murata, S., Arai, H., and Taguchi, T. Endosomal phosphatidylserine is critical for the YAP signalling pathway in proliferating cells. Nat Commun. 2017. 8, 651. PMID: 29093443 DOI: 10.1038/s41467-017-01255-3

3) Oku, Y., Nishiya, N., Shito, T., Yamamoto, R., Yamamoto, Y., Oyama, C., and Uehara, Y. Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers. FEBS Open Bio. 2015. 5, 542-549. PMID: 26199863 DOI: 10.1016/j.fob.2015.06.007

4) Mi, W., Lin, Q., Childress, C., Sudol, M., Robishaw, J., Berlot, C. H., Shabahang, M., and Yang, W. Geranylgeranylation signals to the Hippo pathway for breast cancer cell proliferation and migration. Oncogene. 2015. 34, 3095-3106. PMID: 25109332 DOI: 10.1038/onc.2014.251

5) Ito, M., Feng, J., Tsujino, S., Inagaki, N., Inagaki, M., Tanaka, J., Ichikawa, K., Hartshorne, D. J., and Nakano, T. Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. Biochemistry. 1997. 36, 7607-7614. PMID: 9200713 DOI: 10.1021/bi9702647