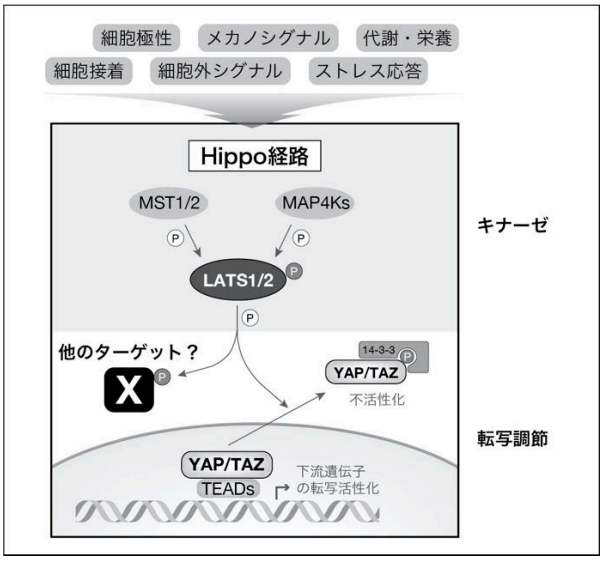
156　Hippoシグナルの新規エフェクター分子の探索	諸石　寿朗

【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目指す。

【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



156. Hippo シグナルの新規エフェクター分子の探索

諸石　寿朗

*熊本大学 大学院生命科学研究部 分子酵素化学分野

Key words：Hippo 経路，LATS キナーゼ，リン酸化プロテオミクス，細胞内小胞輸送，がん

緒　言

Hippo 経路はもともとショウジョウバエの遺伝学的モザイク解析法によって発見されたシグナル伝達経路で、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系として近年盛んに研究されている［1～3］。この経路では、種々の刺激に応じて上流の MST1/2 キナーゼ（MST1/2）または MAP4K キナーゼ（MAP4K1/2/3/4/5/6/7）によって LATS キナーゼ（LATS1/2）がリン酸化され活性化し、下流の標的をさらにリン酸化することによって、様々な生理機能をもたらすと考えられている［4，5］。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、これらは非リン酸化状態（活性型）で核内に局在し、転写因子 TEAD（TEAD1/2/3/4）と複合体を形成し、細胞増殖促進やアポトーシス抑制に働く遺伝子の発現量を正に制御する。一方、YAP／TAZ が LATS キナーゼによってリン酸化されると細胞質に移行し、その下流の転写は抑制される（不活性型）。このようにして Hippo シグナルの活性化は YAP／TAZ のリン酸化による機能抑制を介して細胞増殖停止・細胞死を引き起こすと考えられているが、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 のリン酸化による機能抑制で説明できるとは考え難い。ところが、YAP／TAZ に非依存的な Hippo シグナルの機能に関してはほとんど明らかになっていない。

我々はこれまでの研究において、細胞生物学およびマウス遺伝学の手法を用いて Hippo 経路の制御メカニズムや生物学的意義を明らかにしてきた［6～8］。特に、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［9］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目指す。これまでの Hippo 経路の研究においては、「MST キナーゼ→LATS キナーゼ→YAP／TAZ」という“canonical”Hippo pathway を中心に研究が進んできたが、本研究の遂行によって YAP／TAZ に非依存的な“non-canonical”Hippo pathway の存在を検証し、その生理機能を解明することを目標として研究を行った。

方　法

1. *LATS1/2* 欠損細胞の作出

LATS キナーゼの基質を探索するため、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。

2. SILAC リン酸化プロテオミクス法による LATS キナーゼの新規基質の探索

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た。LATS キナーゼの基質は野生型細胞でのみリン酸化されており、*LATS1/2* 欠損細胞ではリン酸化されていないことが予想されるため、そのようなリン酸化部位が 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。

*現在の所属：熊本大学 大学院生命科学研究部 シグナル・代謝医学講座

3. 基質候補分子の絞り込みと個別解析

プロテオミクス解析によって得られた 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て、実際に LATS キナーゼによってリン酸化されるか確認実験を行った。

4. LATS キナーゼによる新規基質のリン酸化意義解析

LATS キナーゼの新規基質であることが確認された分子に関して、*LATS1/2* 欠損細胞やリン酸化変異体（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を行い、LATS キナーゼ、および Hippo 経路による制御がもつ生物学的意義を検証した。

結果および考察

1. *LATS1/2* 欠損細胞では既知の基質のリン酸化が低下する

LATS1/2 欠損細胞を作出し既知の基質のリン酸化を調べたところ、予想通り、*LATS1/2* 欠損細胞では既知の基質である YAP や AMOT のリン酸化が阻害されていた。一方で、関係のないタンパク質である CREB のリン酸化は変化していなかった（図 1a）。同様の手法により 10 種類以上の細胞で *LATS1/2* 欠損細胞を作出したところ、興味深いことに、LATS キナーゼの欠損による細胞機能（特に細胞増殖）への影響は多くの細胞で共通している（＝細胞増殖を亢進させる）ものの、一部の細胞では逆の作用（＝細胞増殖を抑制する）を示すことが分かった［10］。このことは、LATS キナーゼの分子機能には細胞種による違いがあり、そのため LATS キナーゼの基質も細胞種によって多様性があることが予想された。そこで、異なる 2 種類の細胞を用いて SILAC リン酸化プロテオミクス法による LATS キナーゼの新規基質の探索を試みることとした。

2. SILAC リン酸化プロテオミクス法によって LATS キナーゼの新規基質を同定した

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た（図 1b）。同定された数万個のペプチドのうち、野生型細胞で強くリン酸化されており、*LATS1/2* 欠損細胞ではリン酸化されていないペプチドを抽出し、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（H-x-R-x-x-S/T）に合致するかを調べた。その結果、既知のリン酸化部位を含む数十個の基質が LATS キナーゼの新規基質として同定された。

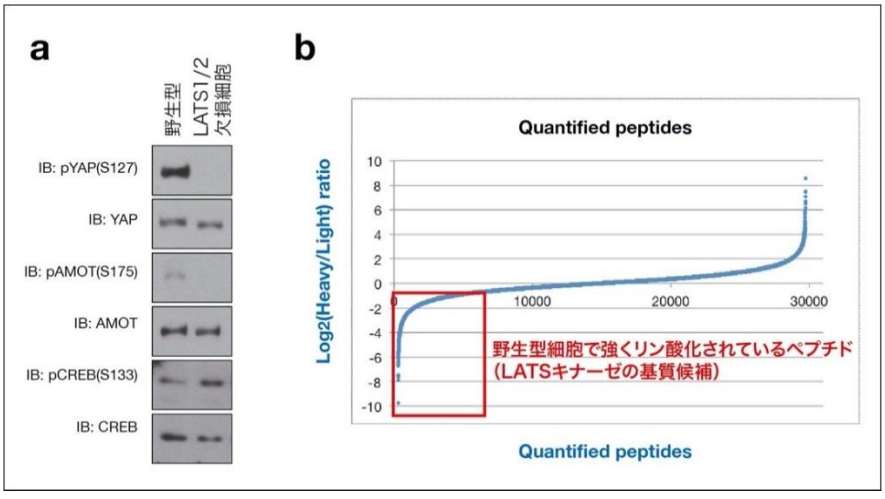


図 1. *LATS1/2* 欠損細胞の作出とリン酸化プロテオミクス解析

a）*LATS1/2* 欠損細胞では既知の基質である YAP や AMOT のリン酸化が阻害される。

b）リン酸化プロテオミクスにより *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を比較した（X 軸：同定されたペプチド、Y 軸：*LATS1/2* 欠損細胞と野生型におけるリン酸化強度の違い）。

3. 基質候補分子の絞り込みと個別解析

プロテオミクス解析によって得られた LATS キナーゼの基質候補分子を用いて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、これらのうち最もリン酸化の変化が大きく、かつ、複数回の実験で同定できた小胞輸送関連タンパク質（論文投稿準備中のため分子名を「X」とする）に焦点を絞り、個別解析を行った。LATS1 キナーゼを用いた *in vitro* kinase assay によりこの新規基質が LATS キナーゼによって直接リン酸化されることが分かった（図 2a）。また、プロテオミクス解析の結果と一致して、*LATS1/2* 欠損細胞ではこの基質のリン酸化が認められなかったことから、小胞輸送関連タンパク質 X は LATS キナーゼの新規基質であることが示された。

4. LATS キナーゼによる新規基質のリン酸化意義解析

LATS1/2 欠損細胞と野生型の細胞を用いて小胞輸送関連タンパク質 X の局在を確認したところ、野生型の細胞では一箇所に集積して観察されるのに対して、*LATS1/2* 欠損細胞では局在が拡散することが分かった（図 2b）。さらに、LATS によるリン酸化部位のアミノ酸を変化させてリン酸化欠損・擬似変異体を作製したところ、LATS キナーゼによってリン酸化されない変異体では *LATS1/2* 欠損細胞と同様に小胞輸送関連タンパク質 X の局在が拡散することが分かった（図 2c）。さらにこの分子が関連する小胞輸送を調べたところ、*LATS1/2* 欠損細胞ではこれらの小胞輸送機能に変化があることが分かった。これらの結果から、Hippo 経路は、LATS キナーゼの新規基質分子である小胞輸送関連タンパク質 X のリン酸化を制御することで、細胞内小胞輸送を調節することが示唆された。今後この分子の解析をさらに進めていくことで、Hippo 経路が制御する生物学、特にがんに対する免疫応答制御の分子メカニズムを解明していきたい。

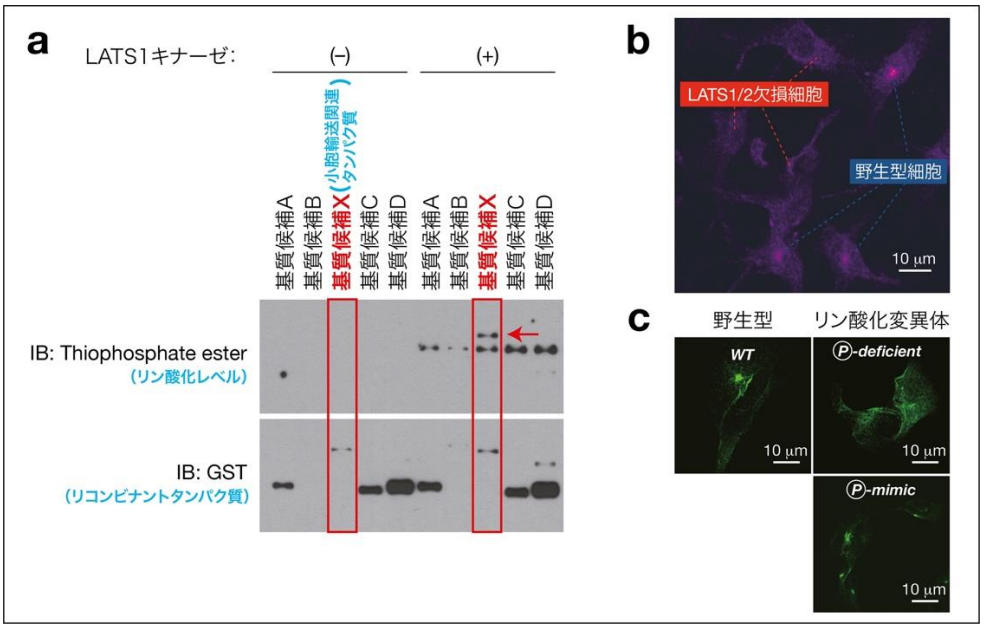


図 2. LATS キナーゼはリン酸化を介して細胞内小胞輸送を制御する

a) LATS1 キナーゼと様々な基質候補のリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* kinase assay。LATS キナーゼによる小胞輸送関連タンパク質 X の直接のリン酸化が認められる。

b) *LATS1/2* 欠損細胞と野生型の細胞における小胞輸送関連タンパク質 X の細胞内局在。

c) 小胞輸送関連タンパク質 X のリン酸化変異体の細胞内局在。

謝　辞

本研究の共同研究者は、米国カリフォルニア大学サンディエゴ校のクンリアン・グァン教授である。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ならびに関係の諸先生方に心より深く感謝申し上げます。

文 献

1) Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. Nat Rev Cancer. 2015;15(2):73-9. Epub 2015/01/17. doi: 10.1038/nrc3876. PubMed PMID: 25592648; PubMed Central PMCID: PMCPMC4562315.

2) Shimoda M, Moroishi T. The Emerging Link between the Hippo Pathway and Non-coding RNA. Biol Pharm Bull. 2020;43(1):1-10. Epub 2020/01/07. doi: 10.1248/bpb.b19-00795. PubMed PMID: 31902912.

3) Yamauchi T, Moroishi T. Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System. Cells. 2019;8(5). Epub 2019/05/06. doi: 10.3390/cells8050398. PubMed PMID: 31052239.

4) Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. Genes Dev. 2016;30(1):1-17. Epub 2016/01/06. doi: 10.1101/gad.274027.115. PubMed PMID: 26728553; PubMed Central PMCID: PMCPMC4701972.

5) Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, Plouffe SW, Hansen CG, Hong AW, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. Nat Commun. 2015;6:8357. Epub 2015/10/06. doi: 10.1038/ncomms9357. PubMed PMID: 26437443; PubMed Central PMCID: PMCPMC4600732.

6) Moroishi T, Park HW, Qin B, Chen Q, Meng Z, Plouffe SW, et al. A YAP／TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. Genes Dev. 2015;29(12):1271-84. Epub 2015/06/26. doi: 10.1101/gad.262816.115. PubMed PMID: 26109050; PubMed Central PMCID: PMCPMC4495398.

7) Lin KC, Moroishi T, Meng Z, Jeong HS, Plouffe SW, Sekido Y, et al. Regulation of Hippo pathway transcription factor TEAD by p38 MAPK-induced cytoplasmic translocation. Nat Cell Biol. 2017;19(8):996-1002. Epub 2017/07/29. doi: 10.1038/ncb3581. PubMed PMID: 28752853; PubMed Central PMCID: PMCPMC5541894.

8) Park HW, Kim YC, Yu B, Moroishi T, Mo JS, Plouffe SW, et al. Alternative Wnt Signaling Activates YAP／TAZ. Cell. 2015;162(4):780-94. Epub 2015/08/16. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.013. PubMed PMID: 26276632; PubMed Central PMCID: PMCPMC4538707.

9) Moroishi T, Hayashi T, Pan WW, Fujita Y, Holt MV, Qin J, et al. The Hippo Pathway Kinases LATS1/2 Suppress Cancer Immunity. Cell. 2016;167(6):1525-39 e17. Epub 2016/12/03. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.005. PubMed PMID: 27912060; PubMed Central PMCID: PMCPMC5512418.

10) Pan WW, Moroishi T, Koo JH, Guan KL. Cell type-dependent function of LATS1/2 in cancer cell growth. Oncogene. 2019;38(14):2595-610. Epub 2018/12/12. doi: 10.1038/s41388-018-0610-8. PubMed PMID: 30531839; PubMed Central PMCID: PMCPMC6450751.