

生体膜リン脂質を介した細胞増殖シグナル伝達メカニズムを解明

1. 発表者：田口 友彦（東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学教室 特任准教授）
新井 洋由（東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学教室 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆細胞の増殖に重要な転写共役因子 YAP が生体膜リン脂質により活性化されることを明らかにしました。
- ◆生体膜を構成する特定のリン脂質の近傍にあるタンパク質を同定する新しい手法を開発し、生体膜が Hippo-YAP シグナルを制御する場となることを初めて明らかにしました。
- ◆生体膜リン脂質を制御するタンパク質が、がん細胞の増殖を抑制する創薬ターゲットとなることが期待されます。

3. 発表概要：

東京大学大学院薬学系研究科の田口特任准教授らは、細胞の増殖を制御する Hippo-YAP シグナル（注1）が生体膜リン脂質による制御を受けることを初めて明らかにしました。

生体膜はリン脂質二重層で構成されていますが、細胞を外界と区別する障壁としての機能以外の役割に関しては不明な点が多く残されています。本研究では特定のリン脂質の近傍にあるタンパク質を同定する新しい手法を開発し、ホスファチジルセリン（注2）というリン脂質の一種ががん細胞の増殖に関わる Hippo-YAP シグナルを制御することを初めて明らかにしました。今後、生体膜リン脂質を制御するタンパク質が、がん細胞の増殖を抑制する新規創薬ターゲットとなることが期待されます。

本研究成果は2017年11月1日(米国東部時間 午前6時)、英国科学雑誌「Nature Communications」で公開されました。

本研究成果は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「リポクオリティ」などの一環として得られました。

4. 発表内容：

生体膜はリン脂質二重層で構成されており、細胞を外界と区別する障壁として機能することが古くから知られています。一方で近年、様々な膜貫通タンパク質や膜表在性タンパク質の局在や機能をリン脂質が制御することが明らかになってきています。リン脂質は、極性頭部や脂肪酸鎖の違いにより数百種類の分子種が存在しますが、細胞内において一様に存在しているわけではなく、それぞれの細胞内小器官ごとに偏って存在していることが分かっています。これまでに本研究グループは、リン脂質の一種であるホスファチジルセリンがリサイクリングエンドソーム（注3）に豊富に存在することを明らかにしてきましたが、その機能に関しては不明な点が多く残されていました。

本研究は、リサイクリングエンドソームにあるホスファチジルセリンの機能を明らかにするために、ホスファチジルセリン近傍タンパク質を同定することから始めました。

ホスファチジルセリンに特異的に結合する *evectin-2* の PH ドメインに、近傍 (~30 nm) タンパク質をビオチン化するタグ (BirA*) をつなげた融合タンパク質を作製しました。この融合タンパク質を細胞内に発現させ、ビオチン化されたタンパク質をアビジンビーズで精製し、

質量分析でホスファチジルセリン近傍タンパク質を同定しました。その結果、細胞増殖を制御するシグナル伝達経路である Hippo-YAP シグナルに関わるタンパク質が多数同定されました。

そこで、Hippo-YAP シグナルの中核分子である転写共役因子（注4） YAP の細胞内局在を観察したところ、これまで報告されていた細胞質及び核に加えてリサイクリングエンドソームにも局在していることが分かりました。リサイクリングエンドソームにおいて細胞質側にホスファチジルセリンをフリップ（注5）する酵素である ATP8A1 の発現抑制や、リサイクリングエンドソーム局在のホスファチジルセリン結合タンパク質である *evectin-2* の発現抑制を行うと YAP の活性化が阻害されました。さらに YAP 依存的に増殖する増殖悪性乳がん細胞（MDA-MB-231 細胞）において、ATP8A1 や *evectin-2* を発現抑制すると細胞増殖が抑制されました。これらの結果からリサイクリングエンドソームのホスファチジルセリンが YAP の活性化に必要であることが明らかとなりました。

次にリサイクリングエンドソームのホスファチジルセリンが Hippo-YAP シグナルを制御するメカニズムを明らかにするために、*evectin-2* に結合するタンパク質を質量分析で解析した結果、Nedd4 E3 リガーゼファミリー（注6）に属する Itch、WWP1、WWP2 を同定しました。YAP は Hippo キナーゼ Lats1 によってリン酸化されることで不活性化することが知られています。*evectin-2* / Nedd4 E3 リガーゼ / Lats1 の関係を解析したところ、*evectin-2* が Nedd4 E3 リガーゼを活性化することで Lats1 のユビキチン化を促進し、Lats1 のプロテアソーム分解を促進することで、YAP の活性化状態を維持していることが明らかとなりました。

これまで生体膜リン脂質は細胞を外界と区別する障壁として機能以上に様々な役割を持つと予想されてきましたが、着目しているリン脂質が影響を及ぼすタンパク質を同定する手法は非常に限られたものしかありませんでした。本研究によって開発したホスファチジルセリン近傍タンパク質の同定方法は他のリン脂質にも応用可能であり、本手法によって生体膜リン脂質の新たな機能が明らかになっていくことが期待されます。

また、リサイクリングエンドソームのホスファチジルセリンを介した YAP 経路の制御機構が、がん細胞の増殖を抑制する新規創薬ターゲットとなることが見込まれます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Nature Communications

論文タイトル：Endosomal phosphatidylserine is critical for the YAP signalling pathway in proliferating cells

著者：Tatsuyuki Matsudaira, Kojiro Mukai, Taishin Noguchi, Junya Hasegawa, Tomohisa Hatta, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Norio Miyamura, Hiroshi Nishina, Jun Nakayama, Kentaro Semba, Takuya Tomita, Shigeo Murata, Hiroyuki Arai*, Tomohiko Taguchi*

6. 問い合わせ先：

東京大学大学院 薬学系研究科 衛生化学教室
特任准教授 田口 友彦（たぐち ともひこ）

Tel: 03-5841-4723

E-mail: tom_taguchi@mol.f.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院 薬学系研究科 衛生化学教室
教授 新井 洋由 (あらい ひろゆき)
Tel: 03-5841-4720
E-mail: harai@mol.f.u-tokyo.ac.jp

8. 用語解説：

(注1) Hippo-YAP シグナル：

細胞の増殖を制御することで器官の大きさを規定するシグナル伝達経路。セリン/スレオニンキナーゼである Mst1/2 と Lats1/2 からなるキナーゼカスケード (Hippo 経路) と、Lats1/2 によってリン酸化される転写共役因子 YAP/TAZ で構成される。リン酸化された YAP は核移行できず、細胞増殖に必要な遺伝子の転写を活性化できない。

(注2) ホスファチジルセリン：

生体膜を構成するリン脂質の一種。極性頭部にセリンを持つグリセロリン脂質。

(注3) リサイクリングエンドソーム：

細胞膜から取り込まれた物質を細胞膜へ送り返すために必要な細胞小器官。近年、ホスファチジルセリンが濃縮して存在していることが明らかにされた。

(注4) 転写共役因子：

YAP は転写活性化ドメインを有するが、DNA 結合ドメインは持たない。核移行した YAP は転写因子 TEAD を介して細胞増殖の促進や細胞死の抑制に関与する遺伝子群の発現を上昇させる。

(注5) フリップ：

生体膜はリン脂質二重層から構成されている。この二重層は、細胞質に面している層 (内層) と細胞小器官の内腔に面している層 (外層) から成る。脂質が外層から内層に移動することをフリップ、内層から外層に移動することをフロップという。

(注6) Nedd4 E3 リガーゼ：

タンパク質にユビキチンを付加する E3 リガーゼの一つ。

9. 添付資料：

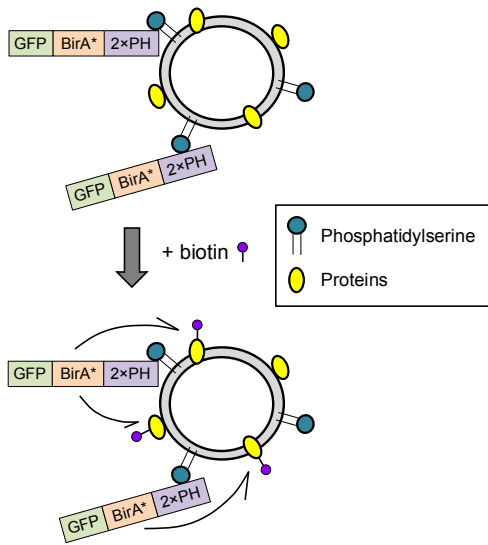


図1 ホスファチジルセリン近傍タンパク質の同定方法

ホスファチジルセリンに特異的に結合する *evectin-2* の PH ドメインをタンデムにしたもの (2xPH) と、近傍 (~30 nm) タンパク質をビオチン化するタグ (BirA*) をつなげた融合タンパク質を細胞質に発現させ、ビオチン化されたタンパク質をアビジンビーズで精製し、質量分析でホスファチジルセリン近傍タンパク質を同定しました。

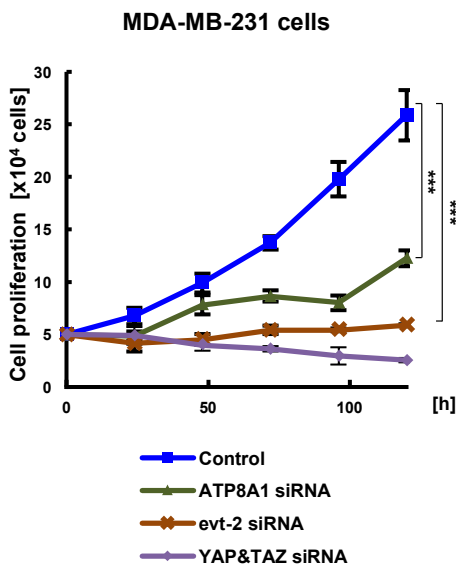


図2 リサイクリングエンドソームのホスファチジルセリンはがん細胞の増殖に必要である

リサイクリングエンドソームにおいて細胞質側にホスファチジルセリンをフリップする酵素 ATP8A1 や、リサイクリングエンドソーム局在のホスファチジルセリン結合タンパク質 *evectin-2* の発現抑制を行うと、悪性乳がん細胞 (MDA-MB-231 細胞) の細胞増殖が劇的に抑制されました。

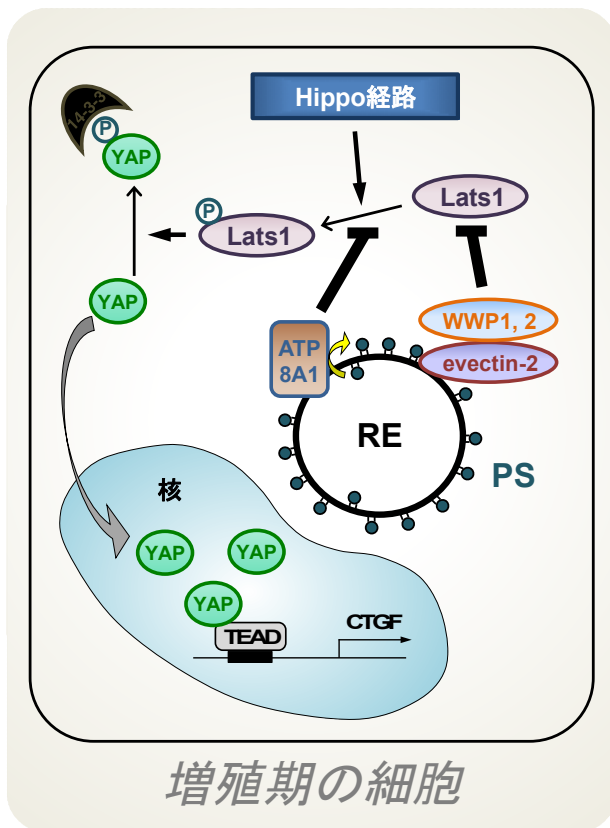


図3 モデル図

リサイクリングエンドソーム (RE) に存在するホスファチジルセリン (PS) フリッパーゼ ATP8A1 は Lats1 の活性化を抑制する。RE に存在する PS 結合タンパク質 eevectin-2 は、Nedd4 E3 リガーゼ (WWP1, WWP2) を活性化し、Lats1 のユビキチン化/分解を促進する。この2つの作用による活性化 Lats1 の減少が、非リン酸化型 YAP を増加させる。非リン酸化型 YAP は核内で転写因子 TEAD を介して CTGF などの細胞増殖に関わる遺伝子の発現を誘導する。