

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18399

研究課題名(和文) がん蛋白質SHP2によるParafibromin機能制御の医学生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of the medical/biological roles of the parafibromin functions regulated by SHP2 oncoprotein

研究代表者

高橋 昌史 (TAKAHASHI, Atsushi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：00624496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1)胎生期におけるParafibrominの過剰なチロシン脱リン酸化はマウスに致死性の胚発生異常を引き起こすことが示唆された。脱リン酸化されたParafibrominが形態形成に重要なWnt/Hedgehog/Notch経路を統合制御するシグナル伝達ハブ分子として機能することを報告した。

(2)ロイシンジッパーに機能欠損変異を導入すると、エクソン6がコードするセグメントを分子内に持たないYAPアイソフォームは、セグメントを持つYAPアイソフォームと同様にSHP2と結合できなくなった。YAP-SHP2結合にはエクソン5,7がコードするロイシンジッパーの機能が必須であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：(1) It was suggested that deregulated tyrosine-dephosphorylation of Parafibromin caused lethal defects in embryogenesis of mice. We reported that tyrosine-dephosphorylated form of Parafibromin acts as a coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch signaling pathways, which play crucial roles in morphogenesis.

(2) Loss of function of the leucine-zipper motif lost the SHP2-binding ability of the YAP isoform that possesses the exon 6-encoded -segment. The YAP isoform lacking the -segment was incapable in binding to SHP2, collectively indicated that YAP requires the leucine-zipper motif, which is encoded in the exon 5 and 7, for the complex formation with SHP2.

研究分野：がん生物学、分子腫瘍学、分子生物学

キーワード：Parafibromin チロシン脱リン酸化酵素SHP2 Wntシグナル伝達経路 YAP 選択的スプライシング

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト *HRPT2* 遺伝子がコードする Parafibromin/CDC73 タンパク質は、副甲状腺がんが機能欠損型の変異が報告されるがん抑制活性を持つ核内タンパク質として知られている。我々は一方で、Parafibromin ががんタンパク質として知られるチロシン脱リン酸化酵素 SHP2 によってチロシン脱リン酸化され、チロシン脱リン酸化された Parafibromin が カテニンと複合体を形成することで、発がんに促進的な機能をもつ Wnt/ カテニンシグナル伝達経路を活性化することを哺乳動物の培養細胞を用いた実験系で明らかにしていた (Takahashi et al, Mol Cell 2011)。しかしながら、Parafibromin のチロシンリン酸化状態の制御およびその制御異常が高等脊椎動物個体において医学生物学的にどのような役割を担うのかは今日まで明らかにされていなかった。

(2) 今日まで SHP2 は細胞質で RAS-ERK シグナル伝達経路を活性化するチロシンホスファターゼとして理解されていた。SHP2 の細胞内分布の制御機構を解析したところ、SHP2 が Parafibromin が局在する核内に移行するためには、Hippo シグナル伝達経路の転写共役分子 YAP/TAZ タンパク質と SHP2 の複合体形成が重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、マウス由来 Yap タンパク質の巣ブライスイソフォームを用いた解析から、Yap タンパク質は SHP2 と複合体を形成できるスブライスイソフォームと SHP2 と複合体を形成できないスブライスイソフォームの 2 種に大別できることを報告していた (Tsumumi et al, Dev Cell 2013)。しかしながら、ヒト YAP のスブライスイソフォーム間でもマウス Yap と同様に SHP2 結合性に差異が見られるかは不明であり、YAP/Yap のスプライシングを制御する分子機構およびその生物学的意義は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

(1) SHP2 による Parafibromin 機能制御の生理的役割および発がんへの関与を明らかにする。

SHP2 によりチロシン脱リン酸化された Parafibromin を機能模倣するチロシンリン酸化抵抗型 Parafibromin (Parafibromin^{F290, F293}) をマウス個体、マウス由来腸管上皮オルガノイド、哺乳動物培養細胞およびアフリカツメガエル初期胚などに発現させ、SHP2 が担うチロシンリン酸化状態に依存した Parafibromin の機能転換機構の医学的・生物学的意義を明らかにする。

(2) YAP スブライスイソフォームの構造多様性による Parafibromin 機能制御機構の検討。

ヒト YAP スブライスイソフォーム種間においてもマウス Yap スブライスイソフォーム種間と同様に SHP2 結合能に差異が見られるか検討する。YAP/Yap-SHP2 複合体形成に関わる YAP/Yap 分子内領域ならびに YAP/Yap 選択的スプライシングの制御に関わる分子を同定することを通して、YAP/Yap 遺伝子の選択的スプライシングがどのような分子メカニズムで生じ、どのような機序で SHP2 結合性に関与するかを解明する。YAP/Yap の選択的スプライシングの生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Cre-loxP システムに依存した部位選択的組換え反応によってチロシンリン酸化抵抗型 Parafibromin (Parafibromin^{F290, F293}) を発現するノックインアリルを作製し、遺伝子ターゲティング法を用いて、キメラマウス作出を経て、Parafibromin^{F290, F293} ノックインマウスを得る。Parafibromin^{F290, F293} ノックインマウスにおいて Cre 組換え酵素活性化時すなわち Parafibromin^{F290, F293} 発現時に特異的に見られる表現型を明らかにする。

野生型マウスから小腸クリプトを採取し、腸管上皮幹細胞を分離した後に 3 次元培養を行うことで、腸管上皮オルガノイドを作製する。得られた腸管上皮オルガノイドにレンチウイルス型発現ベクターを感染させ、Parafibromin^{F290, F293} を発現させる。Parafibromin^{F290, F293} の発現に依存した腸管オルガノイドの細胞増殖の変化/異常ならびに形態変化/異常を観察する。

アフリカツメガエル初期胚 (4 細胞期胚 腹側割球) に Parafibromin^{F290, F293} をコードする mRNA を顕微注入する。Wnt/ カテニン経路の異所性活性化時に誘導されることが知られている尾芽胚期における 2 次軸の形成が、Parafibromin^{F290, F293}-mRNA 注入胚において誘導されるか検討をする。

(2) ヒト YAP 遺伝子から発現する 8 種の YAP スブライスイソフォームの発現ベクターを作製し、免疫沈降実験によって各種 YAP アイソフォームの SHP2 結合能を評価する。選択的スプライシングを介したエキソン選択が機能に影響を及ぼすことが推察される YAP/Yap 内ロイシンジッパー部位ならびに WW ドメインに着目し、これらの部位/ドメインの機能欠損型分子の発現時に観察される培養細胞の表現型を各種 YAP アイソフォーム発現時に見られる表現型と比較する。SHP2 との結合性に重要な役割を担う選択的エキソンを特定する。選択的エキソンの周辺塩基配列を解析し、スプライシングエンハンサーおよびスプライシングサイレンサーとしてスブライス制御機能に関わる領域を特定すると同時にスプライシングエンハンサー/サイレンサーに結合する制御分子を同定する。同

定したスプライス制御分子の過剰発現あるいは発現抑制が、YAP/Yap のスプライシングを変化させるか検討するとともに、スプライシング制御分子の細胞内での生物活性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Parafibromin (Parafibromin^{F290, F293}) を発現するノックインマウスを作出した。このノックインマウスと Cre 組換え酵素発現マウスあるいは FLP 組換え酵素発現マウスを交配し、Parafibromin^{F290, F293} ノックインアリルと Cre または FLP を共にもつコンパウンド個体の作出を試みたが、コンパウンドマウスを得ることが出来なかった。この結果から、胎生期における Parafibromin^{F290, F293} の恒常的な発現は、マウスの胚発生に致死性の影響を与えることが示唆された。Parafibromin^{F290, F293} を発現させたマウス生体を得るためには、タモキシフェン誘導型 Cre 組換え酵素を発現するマウスなどを用いた交配実験の実施が有効であると考えられる。

培養細胞を用いて胚発生および形態形成に関わるシグナル伝達経路への Parafibromin の関与を解析した結果、チロシン脱リン酸化された Parafibromin が Wnt 経路 / Hedgehog 経路 / Notch 経路の伝達を統合的に制御するシグナル伝達ハブ分子として機能することを明らかにした (Kikuchi et al, Nat Commun 2016)。Parafibromin のチロシンリン酸化の責任キナーゼとして PTK6 を同定した (Kikuchi et al, Nat Commun 2016)。レンチウイルスベクターを用いて Parafibromin^{F290, F293} を発現するマウス腸管上皮オルガノイドを作製した。Apc 遺伝子のノックダウン処理を行ったオルガノイドなど Wnt 経路を過剰に活性化したオルガノイドに特徴的に観察される増殖過多の表現型は Parafibromin^{F290, F293} の単独発現では誘導されなかった。

アフリカツメガエル初期胚の腹側に Parafibromin^{F290, F293} をコードする mRNA を顕微注入したが、2次胚は形成されなかった。xWnt8 をコードする mRNA 等との共顕微注入など実験系の改善が検討される。Hedgehog シグナル伝達経路 / Notch シグナル伝達経路の活性化状態をモニターできる他の解析系の実施が検討される。

Parafibromin が SHP2 チロシンホスファターゼの基質タンパク質であることを *in vitro* 脱リン酸化試験によって明らかにした (Noda Set al, BBRC 2016)。先天性発達障害 LEOPARD 症候群症例で単離される SHP2 点変異体は、野生型 SHP2 の Parafibromin 脱リン酸化活性と比較して異常な Parafibromin 脱リン酸化活性を示した。LEOPARD 症候群における Parafibromin チロシンリン酸化状態の異常が病変発症にどのように関わるのか、今後の大変興味深い課題である。

(2) マウス-ヒトの種間で保存されているエキソン 6 がコードするアミノ酸領域 (セグメント) を分子内にもつヒト YAP アイソフォームと同領域を持たない YAP アイソフォームでは、SHP2 への結合性およびロイシンジッパーの機能に差異があることを明らかにした。ロイシンジッパーに機能欠損変異を導入すると、セグメントを分子内に持たない YAP アイソフォームは、セグメントを持つ YAP アイソフォームと同様に SHP2 と結合できなくなった。YAP 遺伝子のエキソン 6 のスプライシングに関わる制御分子を探索し、その候補として複数の分子を同定した。現在は、同定したスプライシング制御分子の異所性発現実験および発現阻害実験を実施している。また、選択的エキソンによってコードされる他の YAP 分子内領域として WW ドメインに注目し、WW ドメインの機能欠損変異型 YAP の異所性発現実験によって、YAP-SHP2 結合における WW ドメインの役割を明らかにしたいと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kikuchi I, Takahashi-Kanemitsu A, Sakiyama N, Tang C, Tang Pei-Jung, Noda S, Nakao K, Kassai H, Sato T, Aiba A & Hatakeyama M. Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch pathways. *Nature communications* 7 12887 (2016). 査読あり。DOI: 10.1038/ncomms12887

2. Noda S, Takahashi A, Hayashi T, Tanuma S & Hatakeyama M. Determination of the catalytic activity of LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutants toward parafibromin, a *bona fide* SHP2 substrate involved in Wnt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 1133-1139 (2016). 査読あり。DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.117

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 菊地逸平, 高橋昌史, 畠山昌則. Parafibromin 転写足場タンパク質機能のリン酸化依存的制御 第 75 回 日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6-8 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)。

2. 野田沙織, 高橋昌史, 林剛瑠, 畠山昌則. LEOPARD 症候群由来変異型 SHP2 ホスファターゼの parafibromin に対する触媒活性の同定 第 75 回 日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6-8 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)。

3. 野田沙織,高橋昌史,林剛瑠,田沼靖一,畠山昌則. LEOPARD 症候群特異的変異型 SHP2 の *in vitro* 脱リン酸化試験による触媒活性の解析 日本薬学会 第 136 年会 2016 年 3 月 26-29 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

4. 菊地逸平,高橋昌史,野嶋奈津紀,畠山昌則. Parafibromin acts as a signaling hub that orchestrates the Wnt, Hedgehog and Notch signaling pathways. 第 74 回 日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 8-10 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

〔図書〕(計 1 件)

1. 高橋昌史,畠山昌則 羊土社 実験医学 11 月号 発生・器官形成、がん悪性化に関わる Hippo シグナル 2015 年 6 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋昌史 (TAKAHASHI Atsushi)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00624496

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()