

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15172

研究課題名(和文)組織メカニクスを制御する分子ネットワーク動態解析システムの樹立

研究課題名(英文)Analysis of gene regulatory network dynamics governing tissue mechanics

研究代表者

清木 誠 (SEIKI, Makoto)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50226619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写共役因子YAPの活性化は臓器の再生を促進するユニークな機能を持つため、YAPの活性を制御するHippoシグナルの活性動態を解明することは重要である。本研究では、シグナル経路の活性動態を制御する蛋白リン酸化酵素(キナーゼ)の活性動態を生細胞で蛍光蛋白の核への移行で可視化するKTRプローブに着目した。Hippoシグナルの要となるLats kinaseのKTRプローブを22種類作製した。今後、更にKTRプローブに改良を加えて当初の目標を達成する。

研究成果の概要(英文)：Since the transcription co-activator YAP has a unique function to promote regeneration, it is important to reveal the dynamics of Hippo signaling that govern YAP activity. In the present study, we introduced the KTR (Kinase Translocation Reporter) technology and attempted to develop the KTR probe for the Lats kinase that govern the Hippo-signaling. We generated 22 different KTR probes using the sequence of YAP which is the target of Lats kinase. We will continue to further improve the KTR probe to establish the system.

研究分野：発生生化学

キーワード：Hippoシグナル KTR プローブ YAP

1. 研究開始当初の背景

組織の物理的特性の維持(メカノホメオスタシス)は、双方向の制御、すなわち細胞外基質(ECM)の硬さが細胞の分化・増殖を規定し、逆に細胞は自分自身や細胞外基質の硬さを調整することにより行われる(図1上)。

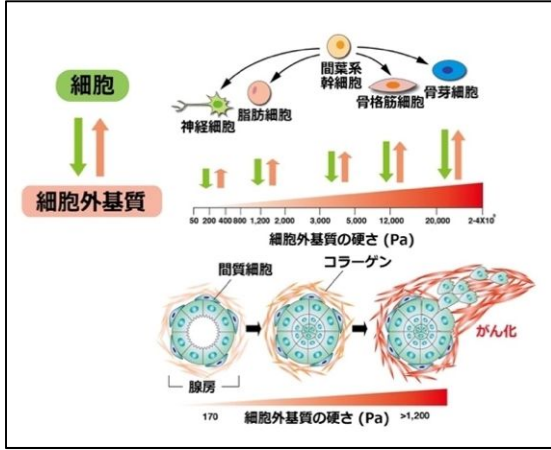


図1 細胞の増殖・分化と組織の物理特性は相互反応により維持される

申請者らは、転写共役因子 YAP が物理特性を双方向に制御するため、メカノホメオスタシスを制御するマスター遺伝子であることを報告した (Porazinski *et al.*, Nature 2015)。それは、臓器の大きさを制御する Hippo シグナルが抑制されると YAP は核に移行し、細胞増殖を促す遺伝子の転写を活性化する細胞張力-F-アクチン重合-Hippo-YAP-細胞増殖の経路(図2 白経路)とは逆に、YAP は ARHGAP18-アクチン重合-組織の張力を介して細胞外基質 ECM の硬さを調整する(図2 黒経路)からである。

YAP の活性化は臓器再生を促進するが、がんの 60% の症例で異常な YAP の活性化が見られる。再生医療・がん治療へ向けて YAP の活性化を適切に制御するためには、YAP 分子ネットワークを構成する分子の動的な分子間相互作用を明らかにし、数理モデルに基づくシステムとしての理解が必須である。

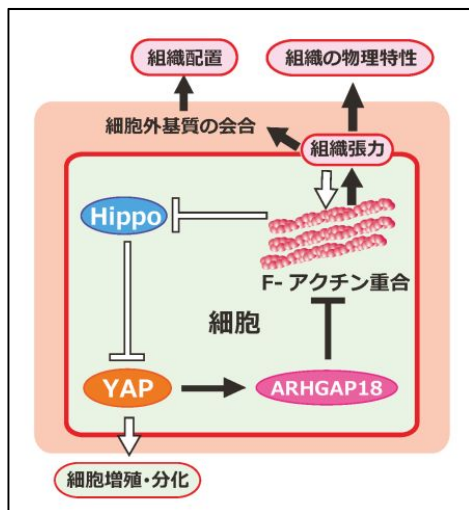


図2 YAP は組織の物理特性と細胞の増殖・分化を制御する

2. 研究の目的

本研究では YAP 分子ネットワークを構成する分子間相互作用の要となる蛋白リン酸化酵素(キナーゼ)の活性動態(図3)を、単一細胞において同時に定量的に解析するシステムを樹立する。

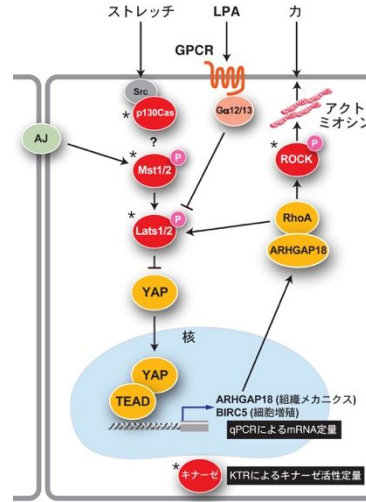


図3 Hippo シグナルの入力(ストレッチ、LPA、力)とリン酸化酵素

3. 研究の方法

最近開発された、合成生物学に基づくプローブを作製し1細胞レベルで複数のキナーゼ活性のダイナミクスを定量的にリアルタイムで解析する画期的な方法を導入する (Regot *et al.*, Cell 2014)。

キナーゼは、認識する基質のドッキング配列に結合しリン酸化する。この基質のドッキング配列(黒)をリン酸化サイトと核移行シグナルと蛍光蛋白を含む人工的なペプチドに融合させて、プローブを作製する(図4上段)。このプローブは、キナーゼによりリン酸化されていないと主に核に局在するが、リン酸化されると細胞質へ移行する(図4下段)。従ってキナーゼ活性は、細胞質/核での蛍光蛋白の比で定量化できる。

4. 研究成果

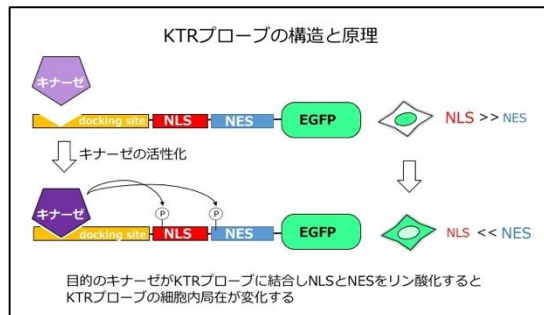


図4 KTR プローブの原理

Lats kinase の KTR プローブの作製を試みた。Lats kinase は、Hippo カスケードの Mst1/2 の下流で働き、基質である YAP の核移行を負に制御する。すなわち YAP はリン酸化

されると分解され、リン酸化されないと核へ移行する (図5)。

実際の Lats-YAP KTR プローブの構築は以下のように行った。Lats キナーゼが KTR プローブの YAP の WW1, WW2 の配列に結合すると、隣の NLS および NES の配列をリン酸化する。これにより NES が優勢になると EGFP が細胞質に局在するようになる仕組みである。

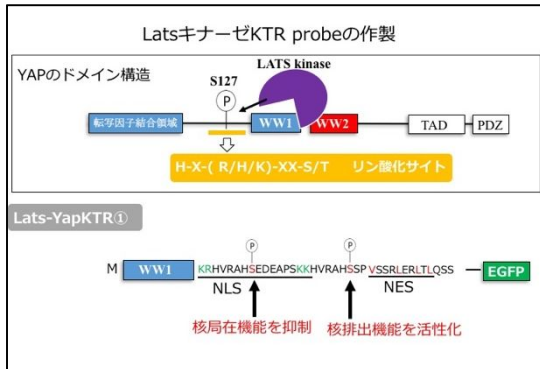


図5 Lats KTR プローブのデザイン

Rock インヒビター-Y27632 を加えて Lats キナーゼを活性化させても、EGFP の細胞質への移行はみられなかった(図6)。

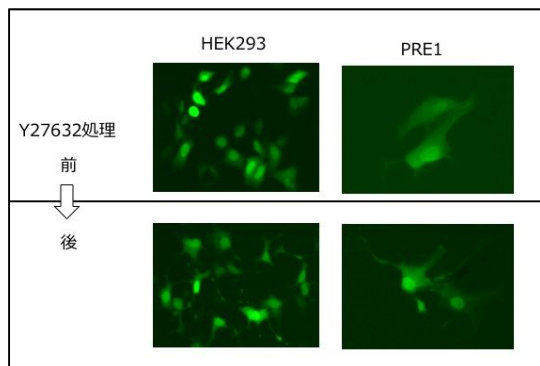


図6 Rock インヒビターによる Lats KTR プローブの細胞内局在の変化

そこで、リン酸化部位の異なったプローブを19種類作製して検定を行ったがEGFPの細胞質への移行は検出できなかった(図7)。

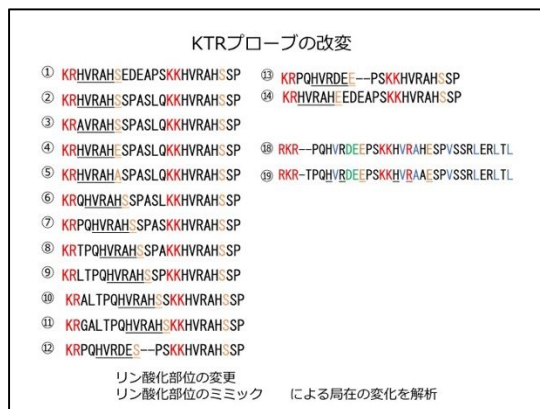


図7 KTR プローブの改変

更に、Lats リン酸化モチーフと NLS の融合による大幅なアミノ酸配列の改変を加えた。あわせて、22種類のさまざまなプローブを作製したが、現在のところ、細胞質への移行は見られていない(図8)。

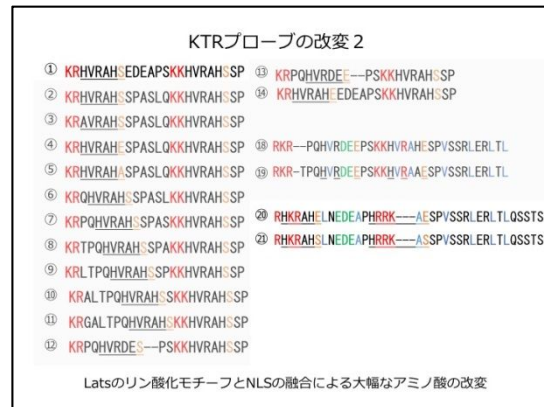


図8 Lats リン酸化モチーフと NLS の融合による大幅なアミノ酸配列の改変

本アプローチのバックアップとして、Latsの標的蛋白であるYAPの抗リン酸化抗体を用いたWestern Blottingにより、Latsのリン酸化能の経時変化を定量化する系は樹立できた。今後、更にKTRプローブに改良を加えて次のステップへの発展を目指す。

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1件)

Asaoka Y, Nishina H, Furutani-Seiki M. YAP is essential for 3D organogenesis withstanding gravity. Dev Growth Differ. 59:52-58. 2017, 査読無し, DOI: 10.1111/dgd.12338

[学会発表](計3件)

EMBO Symposium Organoids, Oct.12, 2016 -Oct.15,2016, Furutani-Seiki, Makoto, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. EMBL, Heidelberg(Germany)

EMBO Symposium Actin in Action, Sept.7, 2016 -Sept.10,2016, Furutani-Seiki, Makoto, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. EMBL, Heidelberg(Germany)

Santa Cruz Developmental Biology Meeting, Aug.13, 2016 -Aug.16,2016, Furutani-Seiki, Makoto, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. UC Santa Cruz(USA).

[図書](計0件)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清木 誠 (SEIKI, Makoto)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50226619

(2) 研究分担者

浅岡 洋一 (ASAOKA, Yoichi)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：10436644

北川 孝雄 (KITAGAWA, Takao)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20614928

古元 礼子 (FURUMOTO, Hiroko)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70311818

(3) 連携研究者

なし