

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770265
 研究課題名（和文） 着床前胚の位置依存的なHippo経路制御機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of cell position-dependent Hippo-pathway regulatory mechanisms in preimplantation embryos
 研究代表者
 平手 良和 (HIRATE YOSHIKAZU)
 熊本大学・発生医学研究所・助教
 研究者番号：70342839

研究成果の概要（和文）：着床前胚のHippoシグナルは、胚の内側に位置する細胞で強く、外側で弱いという細胞位置によるシグナル強度の差がある。本研究は、接着関連分子 Angiominin によるHippo経路活性化は細胞極性によって抑えられることをつきとめ、これが細胞位置の違いをHippoシグナル強度の違いへと変換する機構であることを明らかにした。これはHippo経路の重要な未解決問題を解くものであり、多くの関連分野の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Hippo signaling in preimplantation embryos exhibits a cell position-dependent difference in strength. Inner and outer cells show strong and weak signaling, respectively. This research clarified the mechanisms of the Hippo pathway activation by an adhesion-associated protein Angiominin and its suppression by cell polarity. This is the machinery which converts cell position into differential strength of Hippo signaling. This research uncovered a key problem of the Hippo pathway regulation, which contributes to the progress of the relevant fields.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化、Hippo経路、細胞接着、Angiominin、カドヘリン、カテニン、マウス、着床前

1. 研究開始当初の背景

初期胚盤胞期の着床前マウス胚は、胚の外側に位置する細胞から栄養外胚葉が作られ、内側に位置するから内部細胞塊が作られる。この細胞位置依存的な細胞分化は半世紀近く前から知られていたが、その制御機構は未解明の問題として残されていた。研究代表者の属する研究チームは、この細胞分化がHippo経路によって制御されていることを突き止

め、位置依存的分化制御の核心に迫る成果を得た (Nishioka et al., Dev. Cell, 2009)。この研究成果から、Hippoシグナルが胚の内側に位置する細胞で強く、外側では弱いこと、そして、このシグナル強度の違いが位置依存的に細胞分化を制御していることが明らかになった。しかしながら、なぜ、そもそも内側と外側とでHippoシグナル強度に違いがあるのかを明らかにすることはできなかった。

本研究は、この位置依存的な Hippo 経路制御機構を明らかにし、位置依存的細胞分化機構の全容解明をめざした。

内側と外側の細胞間で異なる特徴の一つに細胞極性がある。着床前胚の外側細胞は極性を持つのにに対し、内側細胞は極性を持たない。内外での Hippo シグナル強度の違いを作り出す機構を解明するために、研究代表者は細胞極性に着目した。そして、極性破壊実験を行ったところ、外側でも内側と同様に Hippo 経路の強い活性化がみられるようになり、細胞極性による Hippo シグナルの抑制が示唆された。

これと並行して、研究協力者の下野明彦博士は、接着関連分子 Angiomotin (Amot) が Hippo 経路に関与することを示唆する予備的結果を得た。そこで、研究代表者が Amot の着床前胚における働きを調べたところ、Amot が着床前胚の Hippo シグナリングに必要であることを示唆する結果を得ることができた。Hippo 経路が細胞接着によって活性化される時、Amot は必ず細胞接着面に局在することから、Amot は接着情報を Hippo 経路へ伝達し、活性化する分子であると考えられた。

Amot の接着面への局在は強い Hippo シグナリングを示す内側細胞でのみ見られ、外側細胞では見られない。しかし、極性を破壊すると、外側細胞の接着面にも Amot が局在するようになると同時に、外側細胞での Hippo 活性化がみられるようになった。これは、細胞極性による Hippo シグナリングの抑制が Amot の分布制御を介したものであることを示唆している。

これらの予備的結果から、Amot によるシグナル伝達は細胞極性によって抑制されているというモデルを立てることができ、このモデルによって位置依存的な Hippo シグナリング機構を解明できると考えた。

2. 研究の目的

(1) Amot ノックアウトマウスを使い、Amot が Hippo 経路の活性化に必要であることを明らかにする。また、Amot の接着面への局在と Hippo シグナリングとの間に相関があることを明らかにする。

(2) 頂端側と基底面側それぞれの細胞極性制御因子群について過剰発現や機能抑制を行い、Amot の接着面への局在および Hippo シグナリングに与える影響を調べ、細胞極性が Amot によるシグナル伝達を抑制することを明らかにする。

(3) Amot の細胞接着面への局在に必要な機能ドメイン、および、細胞極性による局在制御を受ける際に関与する機能ドメインを調べ、Amot によるシグナル伝達機構の詳細を明らかにする。

(4) 上記項目 3 で明らかにされた機能ドメ

インに結合する分子の探索を行う。この分子は、Amot による Hippo シグナル伝達に関与することが考えられるので、この分子の *in vitro* での結合実験と着床前胚を用いたノックダウン実験を行い、Amot による Hippo シグナル伝達経路(細胞接着→Amot→Hippo 経路)の構成分子であることを示す。

(5) 細胞極性による Amot の接着面からの排除には、Amot を頂端側に運ぶ分子と頂端側で Amot の局在を保持する分子が関わっていると予想する。上記項目 4 で明らかにされる Amot 結合分子の中に、この制御に関わる分子も含まれてくると考えられる。これらの候補分子についてノックダウンを行い、細胞極性による Amot 局在制御が破綻することを示し、極性細胞において Amot が細胞接着面から排除される機構を明らかにする。

以上の研究項目を明らかにすることによって、Amot が細胞接着面への局在し、細胞接着情報が Amot 経由で Hippo 経路へ伝達される機構、および Amot が細胞極性によって接着面から排除される機構を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

着床前胚の Hippo シグナリングに Amot が必要であることを示すには、Amot ノックアウトマウスを用いた解析を行った。Amot の細胞内局在については自前で作製した Amot 抗体を用いた免疫蛍光染色法によって明らかにした。Amot12 のノックダウンは、2 細胞期胚への siAmot12 のインジェクションによって行った。

極性破壊は、Prckz;Prcki ダブルノックアウトマウスの使用、あるいは、2 細胞期胚への Prcki ドミナントネガティブ型 RNA のインジェクション、受精卵への Pard6b shRNA や Par1a/b shRNA インジェクションによるノックダウンによって行った。

Amot の機能ドメインを検討するには、表現型レスキュー実験を行った。レスキュー実験とは、Amot および Amot12 をともに欠損した Hippo シグナリング不全胚 (Amot フリー胚) に、機能ドメイン欠損型 Amot を発現させ、その発現によって Hippo シグナリングが回復するか調べる実験のことである。この方法によって、Hippo シグナリングに必要な機能ドメインを明らかにすることができる。この実験でレスキューが見られた場合、その欠損ドメインは Hippo シグナリングに必要なではないことが示唆され、レスキューが起こらなかった場合、その欠損ドメインは Hippo シグナリングに必要なことが示唆される。

Amot と細胞接着分子および Hippo 経路関連分子との相互作用は、培養細胞を用いた免疫沈降実験によって解析した。

4. 研究成果

着床前胚の Hippo 経路の活性化には Amot とその類似タンパク質である Amotl2 が必要であり、この両者をもとに欠損する胚では、Hippo 経路の活性化が見られないことを明らかにした (図 1)。

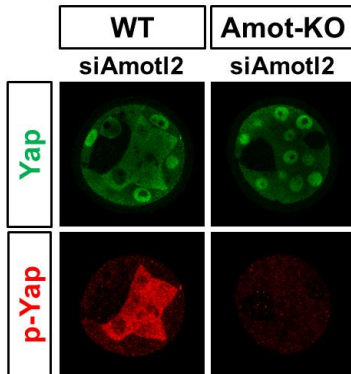


図 1. Amot フリー胚 (Amot-KO; siAmotl2) では、Hippo シグナルが消失し (赤)、Yap は内側でも外側と同じように核局在する (緑)。

内側に位置する細胞では、接着面に局在する接着関連分子 Angiomotin (Amot) が細胞接着依存的に Hippo 経路を活性化するのに対し、外側に位置する細胞では、細胞極性が Amot 分子を接着面から排除することで、細胞接着による Hippo 経路活性化を阻止していることを突き止めた (図 2)。

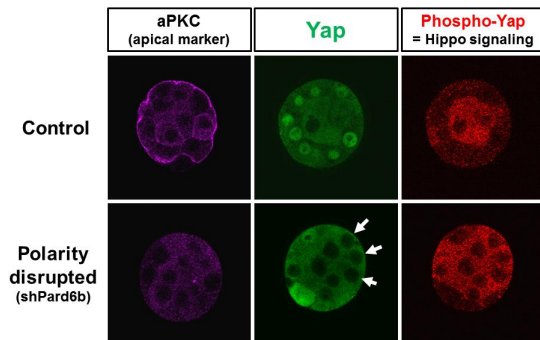


図 2. 極性破壊による外側細胞の Hippo シグナルの上昇 (赤) およびそれに伴う Yap の核からの排除 (緑)。

Amot は接着結合を構成する E-カドヘリン-β カテニン-α カテニン複合体と相互作用し、この相互作用は、Hippo 経路制御因子である Merlin によって促進されることを明らかにした。また、Amot は Hippo 経路の中心的キナーゼである Lats と相互作用することを明らかにした。以上の成果から、カドヘリン-カテニン複合体→Merlin→Amot→Lats という分子間相互作用によって細胞接着情報が Hippo 経路へと伝えられることを明らかにした (図 3、4)。また、この分子間相互作用およびシグナル伝達には Amot のコイルドコイルドメインおよびアミノ末端側の領域が必要であることも明らかにした。

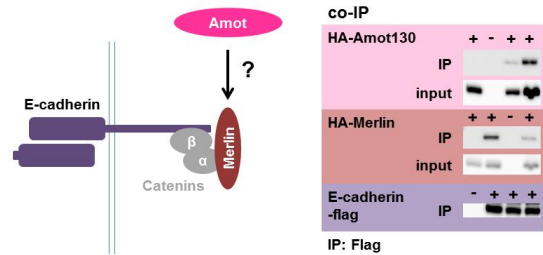


図 3. E-cadherin, Merlin と Amot は相互作用する。

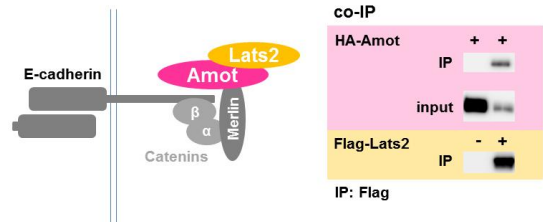


図 4. Amot と Lats2 は相互作用する。

本研究によって得られた成果は、Hippo 経路の重要な未解決問題を解くものであり、着床前胚の位置依存的細胞分化機構の核心を明らかにするだけでなく、Hippo 経路活性化の一般原理の解明へとつながるものである。したがって、本研究の成果は、発生生物学、臓器再生、がん研究など Hippo 経路が関係する多くの分野の発展に寄与することが期待される。

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 3 件)

① Hirate, Y. (他 14 名、1 番目), (2013) Polarity-dependent distribution of angiomotin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.* Vol.23, (in press). 査読有

② Hirate, Y., Cockburn, K., Rossant, J., and Sasaki, H. (2012) Tead4 is constitutively nuclear, while nuclear vs. cytoplasmic Yap distribution is regulated in preimplantation mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E3389-E3390. doi: 10.1073/pnas.1211810109. 査読有

③ 佐々木洋、平手良和 (2011) マウス初期胚発生における Hippo pathway の役割. *細胞工学* Vol. 30, 935-940. 査読無

[学会発表] (計 5 件)

① Hirate, Y. (他 12 名、1 番目), Cell polarity suppresses Hippo signaling

through the regulation of Angiomotin distribution in preimplantation mouse embryos (細胞極性の Angiomotin 分布制御によるマウス着床前胚 Hippo 経路の制御機構) .

The 46th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2013. 5. 30, くにびきメッセ (島根県松江市)

② Hirate, Y. (他 12 名、1 番目) , Position-dependent cell fate specification by cell polarity-controlled Angiomotin distribution.

Mouse Molecular Genetics 2011, 2011. 9. 21, Hinxton, Cambridge, UK.

③ Hirate, Y. (他 15 名、1 番目) , Position-dependent cell fate specification by cell polarity-controlled Angiomotin distribution.

KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine, 2011. 9. 8, 熊本大学 (熊本) .

④ Hirate, Y. (他 15 名、1 番目) , Cell polarity establishes positional difference in Hippo signaling by altering Angiomotin subcellular distribution in preimplantation mouse embryos (細胞極性による Angiomotin の細胞内分布制御がマウス着床前胚の位置依存的な Hippo 経路活性を確立する).

The 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011. 5. 19, 沖縄コンベンションセンター (沖縄)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平手 良和 (HIRATE YOSHIKAZU)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：70342839

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者