

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700965

研究課題名(和文) SHP2によるparafibrominの脱リン酸化を介した発癌分子機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of the Roles of Dephosphorylated Parafibromin by SHP2 in Oncogenesis

研究代表者

高橋 昌史(Takahashi, Atsushi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00624496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：平成24年度；(1)チロシン脱リン酸化されたParafibrominを機能模倣する( $\beta$ -cateninと複合体を形成し、Wnt経路を活性化する)がん症例由来のParafibromin点変異を同定した。(2)Parafibrominのチロシンリン酸化を亢進する核内チロシンキナーゼを同定した。

平成25年度；(3)SHP2がHippo経路の転写共役分子であるYAPおよびTAZと細胞内で複合体を形成することを見出した。Parafibrominのチロシン脱リン酸化を介してWnt経路の活性化を促進するSHP2の核内集積は、細胞密度依存的に制御を受けるYAP/TAZによって調節されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the 1st fiscal year ended March 2013, (1) We found a cancer-derived point mutant of parafibromin functionally mimicking the tyrosine-dephosphorylated parafibromin, which promotes the Wnt signaling pathway through forming a complex with  $\beta$ -catenin. (2) We identified a nuclear tyrosine kinase that can elevate the tyrosine-phosphorylation of parafibromin.

In the 2nd fiscal year ended March 2014, (3) We found that SHP2 physically interacts with transcriptional co-activators YAP and TAZ, components of the cell-density sensing Hippo signaling pathway. We revealed the YAP/TAZ-dependent regulatory mechanism of the nuclear accumulation of SHP2, which promotes the Wnt signaling pathway through tyrosine-dephosphorylation of parafibromin.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：分子生物学 がん シグナル伝達 タンパク質リン酸化/脱リン酸化 遺伝子発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

SHP2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2) は動物種間で進化的に保存された全身性に発現するチロシンホスファターゼであり、哺乳動物細胞では細胞質および核内に分布する。細胞質において SHP2 は、増殖因子受容体等によって活性化され、RAS-ERK シグナル経路(細胞増殖)の亢進ならびに細胞運動・細胞骨格の制御に関与する。一方で、核内に分布する SHP2 の生物活性は不明とされていた。機能獲得型の *PTPN11* (SHP2 をコードする遺伝子) 変異による SHP2 の異常活性化が、易発がん性の先天性発達障害 Noonan 症候群の過半数の症例で報告されている。さらに、散発性の悪性腫瘍においても機能獲得型 *PTPN11* 変異が単離される事実に加えて、ピロリ菌の慢性感染が引き起こす胃がんの発症に SHP2 の活性化が密接に関わることから、SHP2 は脱制御された活性亢進が発がんを促す「がんタンパク質」として理解されてきた。

我々は、SHP2 の基質分子を網羅的に同定するスクリーニング法を開発し、核内に局在する Parafibromin/Cdc73 を SHP2 の新規基質タンパク質として同定した。Parafibromin は広範な遺伝子発現制御に関わる RNA polymerase II-associated factor (PAF) 複合体の主要構成分子であり、副甲状腺がん症例において機能欠損変異が単離される「がん抑制タンパク質」として報告されている。我々は、SHP2 が Parafibromin 分子内のチロシンリン酸化部位(チロシン 290 番, 293 番, 315 番)を脱リン酸化することを明らかにし、チロシン脱リン酸化された Parafibromin が  $\beta$ -catenin と細胞内で複合体を形成することを見出した。Parafibromin/ $\beta$ -catenin 複合体の形成は、Wnt 経路標的遺伝子の転写活性化に不可欠な役割を担うことが知られており、SHP2 は核内で Parafibromin をチロシン脱リン酸化することで、Wnt 経路標的遺伝子の転写を促進することが示された。Wnt 経路は RAS-ERK 経路と同様に細胞増殖および細胞分化の制御に関わり、多様ながんにおいて脱制御が報告される細胞内シグナル伝達経路である。SHP2 は RAS-ERK 経路に加えて Wnt 経路の脱制御を引き起こすことで発がんを促進することが示唆された。

(1) Parafibromin をコードする *HRPT2* 遺伝子は、副甲状腺がんにおいてナンセンス変異による機能欠損が報告されていることから、副甲状腺における「がん抑制遺伝子」として理解されている。一方で、がんを含めた疾患症例において *HRPT2* のミスセンス変異の存在も報告されているが、それぞれの点変異が Parafibromin の細胞内機能に及ぼす影響は不明なままとされていた。

(2) Parafibromin が持つ Wnt 経路活性化能は、Parafibromin のチロシンリン酸化状態

に依存して厳密に制御されることから、チロシンホスファターゼ SHP2 と拮抗的に働く Parafibromin のチロシンリン酸化を担う核内チロシンキナーゼの重要性が推察される。今日まで我々は、Parafibromin のリン酸化を担うチロシンキナーゼとして Abl の同定に成功している。しかしながら、Abl に加えた他のチロシンキナーゼの Parafibromin リン酸化への寄与は明らかにされていなかった。

(3) Parafibromin は核内に局在するタンパク質であることから、SHP2 による Parafibromin のチロシン脱リン酸化を介した Wnt 経路の活性化には、SHP2 の細胞質から核内への移行が必須な役割を担うと考えられる。SHP2 は、細胞密度が低く細胞増殖が促進される状況では核内に集積する一方で、細胞密度が高く細胞増殖が抑制される状況では、主に細胞質に存在する。このような背景から、SHP2 の細胞内分布の制御には、細胞密度ならびに細胞増殖に関わるシグナル伝達経路の寄与が推察されていたが、その調節機序の本態となる分子機構は明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) SHP2 によりチロシン脱リン酸化された Parafibromin を機能模倣する疾患由来の *HRPT2* 遺伝子変異を探索する。

(2) Parafibromin のチロシンリン酸化を担う核内チロシンキナーゼを同定する。

(3) SHP2 の核内分布を制御する細胞内シグナル伝達系を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) がんを含めた疾患症例で単離された *HRPT2* ミスセンス変異に着目した(Newey et al, *Hum. Mut.*, **31**, 295-307, 2010)。それぞれの変異型 *HRPT2* がコードする Parafibromin 点変異体の cDNA を部位特異的変異導入法によって作製し、得られた cDNA を用いて点変異型 Parafibromin 発現する哺乳動物細胞用ベクターをクローニングした。一連の Parafibromin 点変異体発現ベクターを哺乳動物細胞に遺伝子導入し、野生型 Parafibromin を対照試料として、Parafibromin 点変異体の発現量および細胞内分布を解析した。また、同様に遺伝子導入した細胞から細胞溶解液を作製し、これを用いて免疫沈降実験を行うことで、点変異型 Parafibromin/ $\beta$ -catenin 複合体の形成を解析した。同様に、細胞溶解液を試料としてルシフェラーゼ・レポーター試験を行い、一連の点変異型 Parafibromin の発現による Wnt 経路標的遺伝子の転写活性化を解析した。リン酸化部位のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したチロシンリン酸抵抗型 Parafibromin (非リン酸化状態の Parafibromin を機能模倣する)と同様に、野生型 Parafibromin を上回る

-catenin 結合能および Wnt 経路活性化能を持つ Parafibromin 点変異体を選抜し、機能獲得型の *HRPT2* 変異とした。

(2) Parafibromin は核内に局在することから、核内での分布が報告されているチロシンキナーゼ群を Parafibromin をリン酸化するキナーゼの候補として考えた。候補キナーゼの野生型分子ならびに構成的活性化型改変分子およびキナーゼ活性欠失型改変分子を野生型 Parafibromin あるいはチロシンリン酸化抵抗型 Parafibromin と哺乳動物細胞内に共発現させ、Parafibromin のチロシンリン酸化レベルを定量した。候補キナーゼを異所性に発現した哺乳動物細胞に SHP2 を共発現し、Parafibromin のチロシンリン酸化レベルの変化を解析した。内因性に発現する候補キナーゼの細胞内分布を観察し、核における Parafibromin との細胞内共局在を検討した。RNA 干渉により候補キナーゼの細胞内発現を特異的に抑制した条件で、Parafibromin のチロシンリン酸化レベルの定量、Parafibromin/  $\beta$ -catenin 複合体の形成および Wnt 経路標的遺伝子の転写活性化を検討した。

(3) SHP2 の細胞内分布の制御に関わるシグナル伝達経路の候補として、細胞密度にตอบสนองした細胞増殖の調節を担う Hippo シグナル経路に着目した。細胞密度の変化ならびに Hippo 経路構成分子 (LATS, YAP, TAZ) の機能修飾によって Hippo シグナルがオン/オフとなる実験条件を作製し、それぞれの条件において SHP2 の細胞内分布、および SHP2 による Parafibromin のチロシン脱リン酸化、ならびに SHP2-Parafibromin を介した Wnt 標的遺伝子の転写活性化を解析した。Hippo 経路の転写共役因子 YAP および TAZ は低細胞密度条件下で細胞質から核内に移行することが知られており、YAP/TAZ が SHP2 の核内移行キャリアーとして機能する可能性が考えられた。哺乳動物細胞に SHP2 および YAP/TAZ を異所性に共発現させ、細胞内で SHP2-YAP/TAZ 複合体が形成されるか検討した。各種改変型 SHP2 または改変型 YAP/TAZ を用いた免疫沈降実験を行い、SHP2-YAP/TAZ 複合体形成に不可欠な SHP2 分子内領域および YAP/TAZ 分子内領域を特定した。SHP2-YAP/TAZ 複合体の形成能を欠損した改変型 SHP2 および改変型 YAP/TAZ を哺乳動物細胞内に異所性に発現し、SHP2 の細胞内分布ならびに SHP2-Parafibromin を介した Wnt 標的遺伝子の転写活性化を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) がんを含む疾患症例を由来とする機能未知の *HRPT2* ミスセンス変異を選択した (Newey et al, *Hum. Mut.*, **31**, 295-307, 2010)。それぞれの点変異体をコードする Parafibromin cDNA を作製し、5' 末端に Flag タグ配列を付加した Parafibromin 点

変異体を発現する哺乳動物細胞用ベクター (pcDNA3/Flag-Parafibromin) を作製した。Parafibromin 点変異体発現ベクターをヒト胃上皮由来 AGS 細胞に遺伝子導入した結果、Parafibromin 点変異体の発現量ならびに細胞内分布は、野生型およびチロシンリン酸化抵抗型 Parafibromin と同様だった。Parafibromin 点変異体を HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) に発現させ、細胞溶解液を用いて免疫沈降実験を行った結果、野生型 Parafibromin と比較して著しく強い  $\beta$ -catenin 結合能を持つ Parafibromin 点変異体 (Parafibromin 変異体 X: がん症例由来) を同定した。Parafibromin 点変異体 X を AGS 細胞に異所性に発現させ、転写因子 TCF/LEF に依存した転写の活性化をルシフェラーゼ・レポーター試験によって解析した結果、Parafibromin 点変異体 X はチロシンリン酸化抵抗型 Parafibromin と同様に野生型 Parafibromin よりも強く Wnt 標的遺伝子の転写活性化を誘導した。以上より、チロシン脱リン酸化された Parafibromin を機能模倣し、Wnt 経路の活性化を引き起こす「がん症例由来 Parafibromin 点変異体」を同定することに成功した。

(2) 核内での分布が報告されているチロシンキナーゼ Y の発現ベクターを AGS 細胞に遺伝子導入した。その結果、チロシンキナーゼ Y の発現によって、野生型 Parafibromin のチロシンリン酸化レベルが顕著に亢進した一方で、チロシンリン酸化抵抗型 Parafibromin はチロシンキナーゼ Y 非発現時と同様にチロシンリン酸化は検出されなかった。チロシンキナーゼ Y の構成的活性化型改変分子を同様に発現させると、野生型チロシンキナーゼ Y の発現時と比較して、より強い Parafibromin のチロシンリン酸化の亢進が検出された。一方、キナーゼ活性欠失型の Y 改変分子の発現は、Parafibromin のチロシンリン酸化を亢進しなかった。AGS 細胞にチロシンキナーゼ Y を異所性に発現させることで得られる Parafibromin のチロシンリン酸化の上昇は、構成的活性化型 SHP2 変異体 (SHP2 E76K) の共発現によって減少した。AGS 細胞の蛍光免疫染色を行い、内因性に発現するチロシンキナーゼ Y が Parafibromin と核内で共局在することを示した。AGS 細胞内の内因性に発現するチロシンキナーゼ Y を siRNA 処理によって特異的に発現抑制した結果、Parafibromin のチロシンリン酸化レベルの低下ならびに Parafibromin/  $\beta$ -catenin 複合体形成が増加した。また、チロシンキナーゼ Y を発現抑制した AGS 細胞を試料として同様にルシフェラーゼ・レポーター試験を行った結果、チロシンキナーゼ Y の発現抑制により Wnt 経路標的遺伝子の転写が活性化した。以上より、核内チロシンキナーゼ Y は、Parafibromin のチロシンリン酸化を促進し、Parafibromin/  $\beta$ -catenin 複合体

形成の抑制を介して、Wnt 経路標的遺伝子の転写を抑制することが示唆され、Parafibromin のチロシンリン酸化に関して SHP2 と拮抗的に作用することが示された。

(3) 複数種の哺乳動物細胞 (AGS, A549, COS-7, HeLa, MDCK, MKN28, HEK293T, NIH3T3) を試料として、抗 SHP2 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。いずれの細胞においても、SHP2 は高密度培養条件では細胞質に分布する一方で、低密度培養条件では核内に分布した。低密度培養下の AGS 細胞に、YAP/TAZ をリン酸化する LATS キナーゼを異所性に発現させると、YAP/TAZ および SHP2 の核内分布が抑制された。TAZ 分子内に存在する LATS によるリン酸化部位(セリン 89 番)をアラニン残基に置換した TAZ(リン酸化抵抗型 TAZ : TAZ-SA)を AGS 細胞内に異所性に発現すると、TAZ-SA の核内局在および SHP2 の核内集積が認められた。

HEK293T 細胞に YAP/TAZ ならびに SHP2 を異所性に発現させ、免疫沈降を行った結果、SHP2 が YAP/TAZ と細胞内で複合体を形成することが明らかになった。C 末端尾部を欠失した改変型 SHP2 ならびに WW ドメイン / PDZ 結合部位を欠損した改変型 TAZ では SHP2-TAZ 複合体の形成が減弱した。SHP2 の C 末端尾部ならびに TAZ の WW ドメイン / PDZ 結合部位が、SHP2-YAP/TAZ 複合体の形成を促進することが示された。C 末端尾部欠失型 SHP2 は、野生型 SHP2 とは対照的に、低細胞密度の培養条件においても核内に集積しなかった。

RNA 干渉により AGS 細胞内の YAP/TAZ の発現を抑制すると、低細胞密度の培養条件にも関わらず、SHP2 の核内集積は見られなかった。この AGS 細胞を用いてイムノプロット解析を行い、YAP/TAZ の発現抑制による Parafibromin のチロシンリン酸化レベルの亢進が検出された。SHP2 の異所性発現が引き起こす Wnt 標的遺伝子の転写活性化は、細胞内 YAP/TAZ の発現抑制によって阻害された。また、リン酸化抵抗型 TAZ の異所性発現によって誘導される Wnt 標的遺伝子の転写活性化は、RNA 干渉による SHP2 の発現抑制により阻害された。この Wnt 標的遺伝子の転写活性化の阻害は、RNA 干渉耐性型 SHP2 の一過性発現で阻止された一方で、YAP/TAZ 結合能を欠損した改変型 SHP2 の発現では阻止されなかった。

以上より、細胞密度が低い条件で、SHP2 は Hippo シグナル依存的なリン酸化から逃れた YAP/TAZ と複合体を形成することで、YAP/TAZ を核内移行のキャリアーとして利用する分子機構の存在が示された。Parafibromin のチロシン脱リン酸化を介した Wnt 標的遺伝子の転写活性化は、Hippo シグナル経路に依存して調節される SHP2 の核内移行によって促進されることが明らかになった。

## 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)

堤 良平, マサウディ ムハンマド, 高橋 昌史, 藤井 裕美子, 林 剛瑠, 菊地 逸平, 佐藤 夢子, 平良 真規, 畠山 昌則, YAP and TAZ, Hippo Signaling Targets, Act as a Rheostat for Nuclear SHP2 Function, *Developmental Cell*, 査読有, 26 巻, 2013, 658-665.  
DOI: 10.1016/j.devcel.2013.08.013

[学会発表](計7件)

野田 沙織, 高橋 昌史, 林 剛瑠, 畠山 昌則, LEOPARD 症候群特異的変異型 SHP2 のチロシンホスファターゼ活性解析, 第 6 回 日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会, 2014/02/20-21, 三重大学.  
高橋 昌史, SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver, 第 6 回 日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 2014/02/20-21, 三重大学.

高橋 昌史, 堤 良平, マサウディ ムハンマド, 林 剛瑠, 畠山 昌則, YAP1-mRNA の選択的スプライシングによる SHP2/YAP1 相互作用の制御, がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム, 2014/01/30-31, 一橋記念講堂(学術総合センター).

M.Masoudi, R.Tsutsumi, T.Hayashi, A.Takahashi, M.Hatakeyama, Regulation of SHP2-YAP Interaction by Differential Splicing of YAP mRNA, The 4<sup>th</sup> JCA-AACR Special Joint Conference, 2013/12/16-18, Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort.

S.Noda, A.Takahashi, T.Hayashi, R.Tsutsumi, M.Hatakeyama, Tyrosine Phosphatase Activity of SHP2 Mutants Derived from LEOPARD Syndrome, The 4<sup>th</sup> JCA-AACR Special Joint Conference, 2013/12/16-18, Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort.

野田 沙織, 高橋 昌史, 林 剛瑠, 堤 良平, 畠山 昌則, LEOPARD 症候群由来変異型 SHP2 ホスファターゼの *in vitro* 酵素活性解析, 第 72 回 日本癌学会学術総会, 2013/10/03-05, パシフィコ横浜.

高橋 昌史, 齊藤 康弘, 畠山 昌則, 複数のチロシンキナーゼによる SHP2/parafibromin 依存的 Wnt シグナル活性化の拮抗制御, 第 71 回 日本癌学会学術総会, 2012/09/19-21, 札幌市教育文化会館・ロイトン札幌・さっぽろ芸文館.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 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

### (3) 連携研究者

なし