

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440112

研究課題名(和文) AmotとLatsの双方向制御によるHippo経路活性化機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of the reciprocal interactions between Amot and Lats in activation of the Hippo pathway

研究代表者

平手 良和 (Hirate, Yoshikazu)

東京医科歯科大学・実験動物センター・講師

研究者番号：70342839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路は多細胞システムの構築と調和において重要な役割を担っている細胞シグナル経路であるが、マウス着床前胚におけるHippo経路制御機構についてはまだ不明な点が多い。本研究では、細胞接着関連分子であるAngiomotin (Amot) とHippo経路の中心的キナーゼであるLatsとの相互作用に注目して解析を行った。AmotはLatsによるリン酸化コンセンサス配列を持ち、この配列が実際にLatsによるリン酸化を受けることを明らかにした。リン酸化Amotはアドヘレンスジャンクションに局在し、Latsと相互作用することでHippo経路を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The Hippo signaling pathway regulates a number of cellular events, including the control of cell fates in preimplantation mouse embryos. The inner and outer cells of the embryo show high and low levels of Hippo signaling, respectively. This position-dependent Hippo signaling promotes the specification of distinct cell fates. The junction-associated scaffold protein Angiomotin (Amot) plays a key role in this mechanism. At the adherens junctions of the inner cells, Amot activates the Hippo pathway by recruiting and activating the protein kinase large tumor suppressor (Lats). In contrast, Amot at the apical membrane of the outer cells suppresses Hippo signaling by interacting with F-actin. The phosphorylation of Amot inhibits its interaction with F-actin and activates Hippo signaling. We propose that Amot acts as a molecular switch for the Hippo pathway and links F-actin with Lats activity.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生・分化 シグナル伝達 細胞間コミュニケーション Hippo経路 細胞極性 非対称分裂 Angiomotin
in Lats

1. 研究開始当初の背景

個体の発生において組織・器官が正しく形成されるには、細胞間のコミュニケーションが重要である。Hippo 経路は比較的最近になって発見された経路であるが、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしており、器官サイズの制御や発がんにも関わることから、近年、重点的に研究が進められている。研究代表者が所属する研究グループでは、着床前マウス胚において Hippo 経路は細胞分化を制御していることを明らかにしてきた (Nishioka et al. *Mech. Dev.* 2008; Nishioka et al. *Dev. Cell*, 2009; Hirate et al. *PNAS*, 2012)。

平成 23~24 年度に研究代表者が実施した科研費・若手研究(B)では、着床前マウス胚における Hippo 経路制御機構の解明に取り組み、細胞接着関連因子である Angiomotin (Amot) と Angiomotin-like 2 (Amotl2) が着床前胚の Hippo 経路活性化に必須の分子であることを明らかにした。Amot による Hippo 経路制御は培養細胞を用いた研究でも報告されていることから、着床前胚だけで見られる特殊なものではなく、Hippo 経路活性化の普遍的な機構であると考えられる。

Amot は、3 つの PY モチーフ、コイルドコイルドメイン、C 末端の PDZ 結合モチーフからなるタンパク質であり、着床前マウス胚では、細胞間接着に関わる接着結合 (adherens junction) に局在する。着床前の胚盤胞期マウス胚を用いて Amot による Hippo 経路活性化を解析したところ、これらの機能ドメインのうち、活性化にはコイルドコイルドメインが必須であること、また、カドヘリン・カテニン複合体との相互作用には Amot の N 末端側領域が関与していることを突き止めた。そこで、Amot の N 末端側が接着結合への局在に重要であると考え、その配列を詳細に調べたところ、N 末端側に Hippo 経路の主要キナーゼである Lats の標的コンセンサス配列が存在することを見出した。リン酸化 Amot の接着結合への局在と、Lats との相互作用による Lats 活性化 (= Hippo 経路活性化) を解明することで、カドヘリン・カテニン複合体 Amot Lats へと至る Hippo 活性化機構を明らかにできると確信し、本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究は、Amot と Lats による双方向の制御が細胞間接着による Hippo 経路活性化の分子基盤であることを明らかにすることを目的として実施された。

(1) Lats による Amot リン酸化の解明

Amot のアミノ酸配列中に、Lats キナーゼの標的となりうるアミノ酸配列を見いだした。しかし、このアミノ酸部位が実際に Lats によるリン酸化を受けていることを示す証拠はない。そこで、リン酸化 Amot 特異的抗体

を作製するなどして、Lats による Amot リン酸化を明らかにする。

(2) Amot リン酸化による接着結合への局在促進を明らかにする

Merlin は Hippo 経路活性化に関わる FERM ドメインタンパク質である。予備的免疫沈降実験の結果、Amot は Merlin 存在下でカドヘリン・カテニン融合タンパク質 (カドヘリン・カテニン複合体に相当) と相互作用することが示唆された。しかしながら、この実験系では Amot と非リン酸化型 Amot 間でカドヘリン・カテニン融合タンパク質との結合能に明瞭な差は見られなかった。この結果から、この実験系には Amot リン酸化による接着結合への局在促進に必要な因子が欠如していることが示唆された。この因子の候補として、F-アクチンや ZO-1 が考えられる。ZO-1 は極性細胞では密着結合 (Tight junction) に局在することが知られている。しかし、内側細胞のような無極性細胞では接着結合の一部に局在する。Amot は ZO-1 陽性の接着結合に多くみられることから、ZO-1 は Amot リン酸化による局在促進因子の有力候補と考えられる。これらの分子との相互作用を検証し、Amot リン酸化による接着結合への局在促進機構を明らかにする。

(3) リン酸化 Amot による Lats の細胞膜局在化を介した Hippo 経路活性化を明らかにする

Amot はリン酸化されることで効率よく Lats と結合できるようになると予想される。また、Lats の活性化については、Lats を強制的に細胞膜に局在させることで強く活性化されることが報告されている (Hergovich, A., et al. *BBRC*, 2006)。したがって、リン酸化 Amot は Lats と結合することで Lats を細胞膜にリクルートし、これを活性化するという仮説を立てることができる。Lats を活性化するというのは、Hippo 経路を活性化することと同じ意味である。本研究項目ではこの仮説を立証することで、リン酸化 Amot による Hippo 経路活性化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Lats による Amot リン酸化

Amot の 176 番目のセリン残基 (Amot-S176) に対してリン酸化特異的抗体を作成し、ウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色により Amot-S176 のリン酸化状態を調べる。

培養細胞で Amot と Lats2 あるいは Lats2 のキナーゼネガティブ型を共発現させ、Amot の Lats によるリン酸化を調べる。

(2) Amot リン酸化による接着結合への局在促進

リン酸化 Amot 抗体を用いて着床前胚の免疫蛍光染色を行い、リン酸化 Amot の局在を

調べる。

(3) リン酸化 Amot による Lats の細胞膜局在化を介した Hippo 経路活性化

Amot と Lats の相互作用を免疫沈降実験によって調べる。

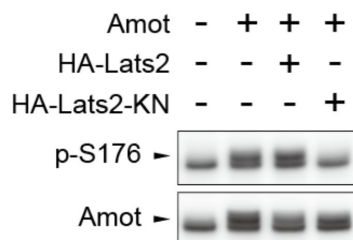
(4) 培養細胞を用いて Amot と相互作用する分子の解析や Amot と F-アクチンとの結合を調べた。

4. 研究成果

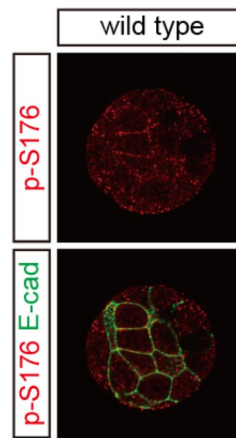
(1) Amot の 176 番目のセリン残基 (S176) は Lats によるリン酸化のコンセンサス配列 (HxRxxS) と一致していることが分かった。このコンセンサス配列は Amot11, Amot12 にも存在する。

	S176
consensus	HxRxxS
Amot	LRDLKQGHVRSLSERLMQMS
Amot11	LKELKQGHVRSLSERIMQLS
Amot12	LRELRHGHVRSLSERLLQLS
	::::*****::*::*

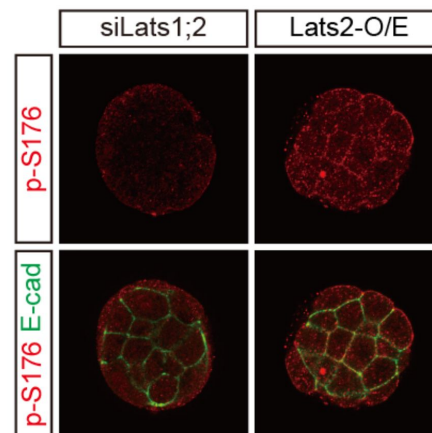
(2) リン酸化 Amot-S176 を特異的に認識する抗体を作製した。この抗体を用いて培養細胞で発現させた Amot のウェスタンブロットを行うと、Lats2 を共発現させるときにシグナルが強くなり、逆に Lats2 キナーゼネガティブ (Lats2-KN) を共発現させることでシグナルが消失することを明らかにした。このことから、Amot-S176 は Lats によるリン酸化を受けることが分かった。



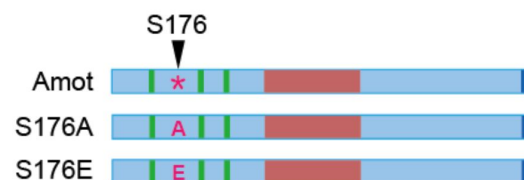
(3) リン酸化 Amot-S176 特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、リン酸化 Amot-S176 は内側細胞の細胞膜に局在していることが分かった。培養細胞を用いた免疫沈降実験で Amot がカテニンを介して E-カドヘリンと相互作用していたことから、細胞膜の Amot は接着結合 (アドヘレンスジャンクション) に局在していると思われる。

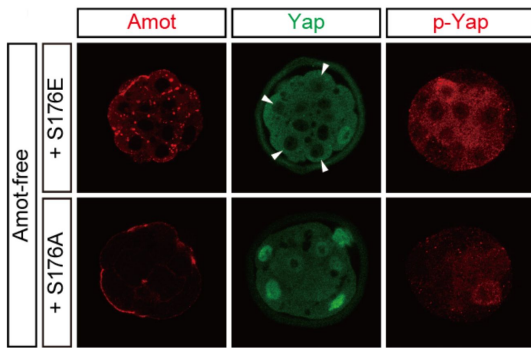


(4) 内側細胞の細胞膜に局在していたリン酸化 Amot は Lats1, Lats2 を siRNA でダブルノックダウンすることにより消失した。逆に、Lats2 を過剰発現 (O/E) させると内側細胞に加え、外側細胞の細胞膜にもリン酸化 Amot が検出されるようになった。このことから、着床前胚の Amot は Lats1, Lats2 によってリン酸化されていることが分かった。

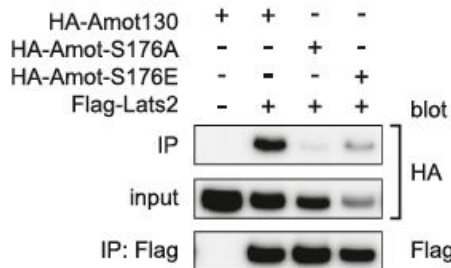


(5) Amot のリン酸化の役割を明らかにするために、S176 にリン酸化模倣型 (S176E) あるいは非リン酸化型 (S176A) の変異を導入し着床前胚で発現させたところ、リン酸化模倣型は Hippo 経路を構成的に活性化すること、逆に非リン酸化型は Hippo 経路活性化能を持たないことが分かった。この結果から、S176 は Amot による Hippo 経路活性化において決定的に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

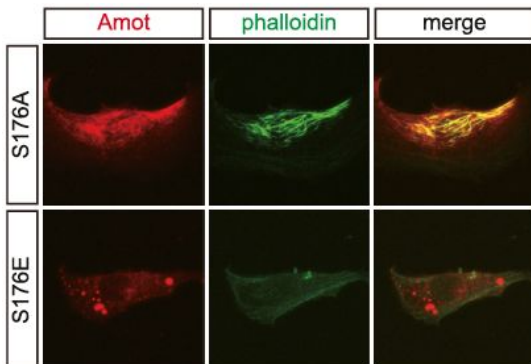




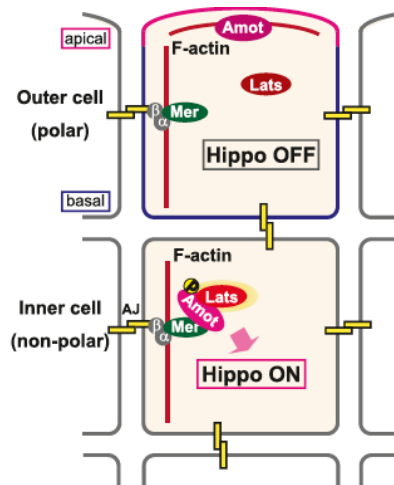
(6) Amot はリン酸化型になることで Lats との相互作用が強化される。



(7) 非リン酸化型 Amot は F-アクチンに結合するが、リン酸化模倣型は結合しない。



(8) 以上の結果から、着床前胚における Amot-Lats 相互作用による Hippo 経路機構について下図のように明らかにすることができた。



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 4 件)

Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Kiyonari, H., Niwa, H., and Sasaki, H. (2015)

Par-aPKC-dependent and -independent mechanisms cooperatively control cell polarity, Hippo signaling, and cell positioning in 16-cell stage mouse embryos.

Dev. Growth Differ. 57, 544-556, 査読有
DOI: 10.1111/dgd.12235

Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R. A., Sasaki, H., and Ralston, A. (2014)

HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst.

PLoS Genetics, 10, e1004618, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pgen.1004618

Hirate, Y. and Sasaki, H. (2014)

The role of angiotensin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development

Tissue Barriers, 2, e28127, 査読有
DOI: 10.4161/tisb.28127

Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, S., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A., and Sasaki, H. (2013)

Polarity-dependent distribution of angiotensin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos.

Curr. Biol. 23, 1181-1194. 査読有
DOI: 10.1016/j.cub.2013.05.014

〔学会発表〕(計 5 件)

平手良和,

マウス着床前胚の細胞分化制御における Hippo 経路と細胞極性の役割 (Role of the Hippo Pathway and Cell Polarity in Cell Fate Control in Preimplantation Mouse Embryos)

第 108 回日本繁殖生物学会大会シンポジウム、2015.9.20, 宮崎市民プラザ (宮崎)

平手良和,

Hippo 経路による着床前胚細胞分化の制御

第 28 回モロシヌス研究会、2014.6.28, 伊豆
修善寺 ホテル滝亭 (静岡)

平手良和、平原志乃、井上健一、鈴木厚、
Vernadeth B. Alarcon、秋本和憲、平井孝明、
千田和広、大野茂男、Yusuke Marikawa、中
尾和貴、下野明彦、佐々木洋、
マウス着床前胚の細胞分化は Angiomotin リ
ン酸化による Hippo 経路の活性化によって制
御されている

第 61 回実験動物学会総会、2014.5.17, 札幌
コンベンションセンター (札幌)

平手良和、平原志乃、井上健一、鈴木厚、
Vernadeth B. Alarcon、秋本和憲、平井孝明、
千田和広、大野茂男、Yusuke Marikawa、中
尾和貴、下野明彦、佐々木洋、
細胞極性と Hippo 経路によって制御される着
床前胚の細胞分化のしくみ
第 3 回日本マーモセット研究会、2013.12.12,
九州大学 (福岡)

Hirate, Y., Hirahara, S., Suzuki, A.,
Alarcon, V., Yoshihama, Y., Akimoto, K.,
Hirai, T., Hara, T., Chida, K., Ohno, S.,
Marikawa, Y., Shimono, A., and Sasaki, H.,
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 Biologist,
2013.5.30, くにびきメッセ (松江)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/system_control/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平手 良和 (HIRATE YOSHIKAZU)

東京医科歯科大学・実験動物センター・講
師

研究者番号：70342839

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

佐々木 洋 (SASAKI HIROSHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：10211939