

論文の内容の要旨

論文題目 Endosomal phosphatidylserine regulates the YAP signaling pathway

(エンドソーム膜のホスファチジルセリンを介した YAP の活性化機構の解明)

氏名 松平 竜之

動物細胞において、細胞膜および細胞内オルガネラ膜はそれぞれ特有の膜リン脂質組成を有する。この膜環境は、オルガネラ膜の融合・分裂といった動的機能の構造基盤となるのみでなく、各オルガネラの特有の機能発揮に重要な役割を果たす事も報告されてきている。ホスファチジルセリン (PS) は、極性頭部にセリンを有する負電荷のリン脂質であり、細胞内全リン脂質の約 5-10% を占める。PS は細胞膜において、アポトーシス時の貪食の誘起や、PKC などのシグナル伝達分子の活性化に関与している。近年、当研究室における解析から、PS が細胞膜だけでなくリサイクリングエンドソーム (RE) にも豊富に存在することが明らかになった。RE はエンドサイトーシスによって細胞外から取り込まれた物質を細胞膜へ送り返す機能をもつオルガネラとして同定されたが、最近では、RE がゴルジ体への逆行性輸送や、オートファゴソーム膜への輸送にも関与することが報告されており、細胞内で多彩に機能することが明らかになりつつある。しかしながら、RE は生化学的単離が困難なために、RE に局在するタンパク質に関する知見が非常に限られている。加えて、RE における PS の細胞生物学的な機能も未だ十分に解明されていない。

本研究では、RE に PS が濃縮しているという性質を利用し、PS 近傍タンパク質を解析することによって、RE における PS の役割や、RE が関与する新

たな現象の解明を試みた。始めに、大腸菌由来のビオチン化酵素の変異体と PS 特異的プローブを用いて、PS の近傍に位置するタンパク質を網羅的にビオチン化し、質量分析によって解析した。その結果、興味深いことに、小胞輸送に関与する既知の RE 局在分子だけでなく、器官のサイズを規定するシグナル伝達系である Hippo/YAP signaling pathway に関わる分子が数多く同定された。その中には Hippo/YAP signaling pathway の肝となる分子である転写コアクチベーター YAP も同定されており、YAP に着目して解析を進めたところ、低密度培養時、すなわち細胞増殖時に YAP が RE と核に局在することが明らかになった。また、RE に局在する 2 つのタンパク質、PS フリッパーゼ ATP8A1、PS 結合分子 *evectin-2* の発現抑制や、PS プローブの過剰発現などによって、YAP の RE および核局在や下流シグナルが減弱することを見出した。さらに、YAP が RE/PS によって制御される分子メカニズムとして、*evectin-2* 結合分子として同定された Nedd4 family E3 ligases が、*evectin-2* との結合によって活性化され、YAP をリン酸化し抑制する Lats1 を分解することによって、YAP signaling を正に制御することが明らかになった。さらに、ATP8A1/*evectin-2*/Nedd4 family E3 ligases という分子群が、悪性乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞においても、YAP signaling を正に制御し細胞増殖を促進していることを明らかにした。

これまで、YAP の活性化制御は主に細胞膜や細胞質で進行すると考えられていたが、本研究によって、内膜系に位置する RE が YAP signaling の活性化の場として機能することが示唆された。また本研究は、周辺分子を非特異的にビオチン化する酵素と脂質プローブの組み合わせによって、脂質近傍分子を網羅的に同定した初の例であり、この実験系の有用性・汎用性が期待される。