

## 論文内容の要旨

論文題目 新規癌抑制遺伝子産物 LATS2 キナーゼの機能解析

指導教官 山本雅教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月 入学

医学博士課程  
病因・病理学専攻

氏名 阿部芳憲

*lats* 遺伝子はショウジョウバエにおいて、変異により腫瘍形成の原因となる遺伝子としてクローニングされた。ヒトにおいても *lats1* および *lats2* 遺伝子がクローニングされた。ヒト染色体上において *lats1* 遺伝子は 6q に位置し、*lats2* 遺伝子は 13q に位置することが明らかとなっており、この領域では様々な癌においてヘテロ接合性の欠失 (LOH) が見られることという点、そして *lats1* 遺伝子のノックアウトマウスは腫瘍を形成するという点から、LATS ファミリー遺伝子はヒトにおいても癌抑制遺伝子となり得ることが示唆される。その遺伝子産物は C 末端にセリン・スレオニンキナーゼ領域を持つ蛋白質であり、LATS1 キナーゼは M 期において特異的にリン酸化され、LATS2 キナーゼは M 期においてキナーゼ活性の上昇が見られることから、M 期で機能することで細胞増殖制御に関わっている蛋白質であることが考えられる。近年 LATS1 キナーゼは M 期において LIM 蛋白質 Zyxin と結合し、紡錘体や収縮環に局在することや、LATS1 キナーゼの過剰発現が G2-M 期の進行を妨げ、いくつかの癌細胞由来細胞株にアポトーシスを誘導することが報告され、LATS1 キナーゼに関しては、その生理的役割が徐々に明らかになってきた。一方 LATS2 キナーゼについては、その生理機能はほとんど明らかになっていない。LATS キナーゼは他のどのセリン・スレオニンキナーゼファミリーにも属さないことから LATS キナーゼの機能解析は、未だ不明な点の多い M 期進行に関わるシグナル伝達経路およびその異常が引き起こす癌発症のメカニズムの理解に新しい視点を加えられることが期待される。そこで、当研究室で独立にクローニングされた *lats2* 遺伝子の遺伝子産物である、LATS2 キナーゼの生理機能および癌発症との関わりについて明らかにすることを目的として、本研究を行った。

LATS2 キナーゼの生理機能解明の第一歩として、LATS2 キナーゼの活性調節因子や基質分子を特定する目的で、LATS2 キナーゼの中央部分(アミノ酸 376-624 番目: bait A)およびキナーゼドメインを含む C 末端領域(アミノ酸 621-1082 番目: bait B)をベイト、HeLa 細胞の cDNA ライブラリをプレイとして Yeast Two-Hybrid スクリーニングによる LATS2 キナーゼ結合蛋白質の探索を行った。そして LATS2 キナーゼ結合蛋白質として、bait A を用いたスクリーニングで LIM 蛋白質 Juba、ZRP1 を同定し、bait B を用いたスクリーニングで中心体構成蛋白質である Pericentrin B を同定した。酵母内では LATS2 キナーゼの bait と Ajuba、ZRP-1 は本スクリーニングでそれぞれの LIM domain 領域、Pericentrin B はカルモジュリン結合部位を含む C 末端領域の部分蛋白質と結合していた。それぞれの部分蛋白質と LATS2 キナーゼを HEK293T 細胞に発現させ、細胞内での LATS2 キナーゼとの結合能を免疫沈降法により検討した結果、Yeast Two-Hybrid スクリーニングで得られたこれらの部分蛋白質は LATS2 キナーゼと細胞内でも会合した。いくつかの LATS2 キナーゼ結合蛋白質のうち、Ajuba については、Pro-I (G2 期) で同調させたアフリカツメガエル卵への Ajuba 蛋白質のインジェクションにより ERK が活性化され、第一減数分裂への進入を早く完了させるという報告がなされている。このことから Ajuba が体細胞においても G2-M 期進行などへ関与する可能性が考えられた。したがって Yeast Two-Hybrid Screening によって得られた LATS2 キナーゼ結合蛋白質のうち、まず LATS2 キナーゼと Ajuba の M 期における機能解析を行った。

最初に LATS2 キナーゼと Ajuba の結合部位を検討した。LATS2 キナーゼおよび Ajuba の様々な変異体を用意し、それを HEK293T 細胞に発現させて、免疫沈降法により結合部位を検討した結果、LATS2 キナーゼは 376-392 番および 629-644 番の 2 箇所のアミノ酸配列と Ajuba の LIM ドメインで会合することが明らかになった。次に LATS2 キナーゼ、Ajuba に対する特異抗体を用いた免疫染色によって HeLa 細胞におけるそれぞれの蛋白質の細胞内局在を調べた。その結果 LATS2 キナーゼは間期から M 期の telophase まで中心体への局在が観察され、Ajuba は G1 期から S 期前半までは細胞質にのみ局在し、S 期後半から M 期の anaphase まで中心体への局在が観察された。cytokinesis の段階では LATS2 キナーゼ、Ajuba ともに中心体へ局在せず、midbody への局在が観察された。この結果から、LATS2 キナーゼと Ajuba は中心体で会合し、染色体分配などの中心体の機能、および cytokinesis の完了への関与が考えられた。

LATS2 キナーゼは、今までの報告から M 期で活性化されることが明らかになっているため、Ajuba についても細胞周期依存的なリン酸化の有無を検討した。その結果、Taxol により M 期で停止させた HeLa 細胞では内在性 Ajuba のリン酸化が顕著であったことから、Ajuba もまた、M 期において何らかの生理的役割を持つことが考えられた。そこで、LATS2 キナーゼと Ajuba を発現させた HEK293T 細胞を Taxol 処理すること

により、細胞周期を M 期で停止させた時の LATS2 キナーゼと Ajuba の会合の変化を検討した結果、LATS2 キナーゼと Ajuba の会合は M 期に停止させたことにより亢進した。このことから、LATS2 キナーゼと Ajuba は M 期で会合するものと考えられた。

さらに LATS2 キナーゼおよび Ajuba の M 期における生理的役割を明らかにする目的で、HeLa 細胞を用いた RNAi を行った。LATS2 キナーゼおよび Ajuba の発現抑制による M 期への影響を観察するために次の操作を行った。チミジンによる最初の S 期同調完了後に siRNA をトランスフェクションし、その後ヒドロキシウレアによる 2 回目の S 期同調を行った。この操作により、S 期同調後に訪れる最初の M 期で LATS2 キナーゼないし Ajuba の発現が抑制されることになる。LATS2 キナーゼ、もしくは Ajuba の発現が抑制された M 期の細胞は  $\gamma$ -チューブリンおよび  $\alpha$ -チューブリンに対する特異抗体を用いた免疫染色法により観察した。その結果 LATS2 キナーゼ、Ajuba の発現抑制は、共に紡錘体形成異常が原因と思われる細胞分裂の異常を引き起こすことが明らかとなった。一方、LATS2 キナーゼおよび Ajuba を HeLa 細胞に過剰発現させ、中心体の様子および M 期の様子を免疫染色法により観察した結果、間期においては中心体の構造異常が観察された。このことから、LATS2 キナーゼおよび Ajuba は M 期進行において、metaphase 以降の染色体分配時に機能していることが示唆された。

LATS2 キナーゼと Ajuba が会合するという実験結果から、LATS2 キナーゼと Ajuba の会合の意義のひとつとして、LATS2 キナーゼによる Ajuba のリン酸化という可能性が考えられた。そこで、FLAG タグを付加した LATS2 キナーゼと Ajuba を発現させた HEK293T 細胞の lysate から抗 FLAG 抗体により LATS2 キナーゼ-Ajuba 複合体を免疫沈降し、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、Taxol で M 期に止めたときに、Ajuba のリン酸化バンドが検出された。このバンドはキナーゼ活性のない LATS2 変異体と Ajuba の組み合わせでは見られなかった。このことから M 期において、LATS2 キナーゼは Ajuba のリン酸化に関与する可能性が考えられた。これらの結果から、M 期で LATS2 キナーゼは Ajuba と複合体を作ることによって、Ajuba のリン酸化を介して中心体の持つ機能、M 期における染色体分配に関わっていることが考えられた。

本研究では、LATS2 キナーゼ結合蛋白質の生理機能、および LATS2 キナーゼとの関係の解析を通して、LATS2 キナーゼの M 期における機能解析を行った。現在まで、LATS2 キナーゼの生理機能は明らかになっていない。LATS2 結合蛋白質として同定した LIM 蛋白質 Ajuba の M 期での局在および機能も明らかにされていなかった。本研究で LATS2 キナーゼおよび Ajuba の中心体への局在、染色体分配への関与、そして LATS2 キナーゼによる Ajuba のリン酸化が示された。このことは M 期進行制御に新しいモデルを提唱できるという点で、M 期進行の分子メカニズムおよび中心体におけるシグナル伝達経路の解明において重要な位置を占めると考えられる。