

論文内容の要旨

論文題目 Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子 LKB1 の機能解析 (Functional characterization of the Peutz-Jeghers Syndrome gene LKB1)

氏名 瀬戸川 健

セリン/スレオニン キナーゼ LKB1 遺伝子は Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子として第 19 番染色体から単離された。Peutz-Jeghers 症候群は消化管の過誤腫性ポリープ、口唇、口腔内、手足の裏などの色素斑、高い癌の発症率を特徴とする遺伝性の難治性疾患である。また、肺癌などの散発性腫瘍でも LKB1 の変異が見出されることから、LKB1 は癌抑制遺伝子の一種と考えられている。

LKB1 を癌細胞に過剰発現させると細胞周期を G1 期に停止させて増殖を抑制することが報告された。多くの Peutz-Jeghers 症候群の患者にキナーゼ活性を失った LKB1 変異体が見られ、これらの多くは G1 期停止能を示さないことが報告されている。このことから LKB1 が失活し G1 期停止能を失うことで Peutz-Jeghers 症候群が発症する可能性が考えられる。

このため LKB1 による G1 期停止の分子機構を探るべく研究が行なわれてきた。LKB1 を細胞質に局在させ、キナーゼ活性を上昇させる STRAD α が単離され、RNAi により STRAD α の発現を抑制すると LKB1 の G1 期停止能の低下が見られた。また、クロマチンのリモデリングに関与する SWI-SNF 複合体の構成因子 Brg1 と LKB1 は結合し、Brg1 による細胞周期の停止に LKB1 が必要であると報告されている。さらに LKB1 を過剰発現させると細胞周期の停止に関わる CDK インヒビター-p21 の発現が上昇することが複数のグループから報告されている。この p21 の発現の上昇は LKB1 による G1 期停止を説明する上で重要な現象と考えられている。しかし、その詳細な機構は未だに明らかになっていない。

本研究は LKB1 と相互作用する因子を単離、解析することにより、LKB1 欠損による癌発生の分子機構を解明することを目的としている。本研究室で yeast two-hybrid screening によ

り LKB1 と相互作用する因子として LMO4 を単離した。LMO4 は様々な転写因子と結合して、転写活性を制御することが報告されている。そこで LMO ファミリーとの結合が知られている転写因子 GATA に注目し解析を行なった。その結果、LKB1 はキナーゼ活性依存的に GATA による転写を活性化した。さらに LKB1、LMO4 転写因子複合体が p21^{waf1/cip} の転写を活性化させることを示した。また、TAP (Tandem Affinity Purification) 法により新規 LKB1 結合タンパク質 FKBP38 (FK506-binding protein 38) を単離した。FKBP38 がアポトーシスを抑制する Bcl-2 と相互作用するタンパク質であることに注目し、解析を行った。

第一章 LKB1、LMO4、GATA-6、Ldb1 転写因子複合体による p21 の発現制御

LKB1 の機能を探るために LKB1 と相互作用する因子の単離を目的として yeast two-hybrid screening を本研究室で行ったところ LMO4 (LIM domain only one4) が単離された。LMO4 は LMO ファミリーの一員として知られている。LMO ファミリーは zinc finger から成る LIM ドメインを持ち、様々な転写因子と相互作用し複合体を形成し、転写を制御していることが報告されている。LMO ファミリーとの結合が知られている転写因子 GATA に注目した。GATA ファミリーは 6 種類のメンバーから成り、標的遺伝子のプロモーター領域に結合して転写活性化を引き起こすことが知られている。そこで、LKB1、LMO4、GATA-6 が複合体を形成する可能性を検討した。その結果、LKB1、LMO4、GATA-6、LDB1 は複合体を形成することが示唆された。

LKB1 が GATA による転写に与える影響を検討すると、LKB1 は GATA 応答配列を活性化し、GATA-6 が存在するとさらに活性化することが明らかになった。この活性化は LKB1 のキナーゼ活性に依存する。さらに Peutz-Jeghers 症候群で見られる LKB1 変異体は GATA 応答配列を活性化しなかった。従って、細胞内で LKB1 と GATA-6 が機能的に相互作用している可能性が高いと考えられた。

LKB1 が過剰発現した細胞は細胞周期を G1 期に停止し、この時 p21 の発現が上昇することがいくつかの論文で報告されている。p21 は細胞周期を G1 期で停止するのに重要な分子として知られている。また、GATA-6 も p21 の発現を上昇させることが報告されている。これらの事実から、LKB1、LMO4、GATA-6 が相互作用して p21 の転写を制御している可能性が考えられた。そこでルシフェラーゼアッセイを行い、p21 の転写に及ぼす影響を調べた。その結果、LMO4、GATA-6、LDB1 (以下 LMO4 転写因子複合体と表記) は p21 のプロモーターを活性化することが明らかになった。LKB1 は p21 のプロモーターを活性化し、LMO4 転写因子複合体の効果をさらに高める。一方、キナーゼ活性を持たない LKB1 K78I と Peutz-Jeghers 症候群で見られる LKB1 変異体は LMO4 転写因子複合体が存在していても、p21 のプロモーターを活性化しなかった。以上の結果から、LKB1、LMO4 転写因子複合体を同時に遺伝子導入した時に最も強い p21 のプロモーターの活性化が見られることが明らかとなった。

この結果を確認するために、LKB1、LMO4 転写因子複合体が p21 の mRNA、タンパク質の量に与える影響を検討した。LKB1、LMO4、GATA-6、LDB1 を同時に遺伝子導入した時に p21 の mRNA 量およびタンパク質量が最大になることが明らかになった。以上の結果から、LKB1、LMO4 転写因子複合体は p21 の転写を正に制御して G1 期停止に関与することが示唆された。

第二章 LKB1 と FKBP38 によるアポトーシスの制御機構

TAP (Tandem Affinity Purification) 法により新規 LKB1 結合タンパク質 FKBP38 (FK506-binding protein 38) を単離した。FKBP38 は免疫抑制薬 FK506 と結合する FKBP ファミリーの一員として知られており、抗アポトーシス分子 Bcl-2 や Bcl-XL をミトコンドリアに局在させアポトーシスを制御することが報告されている。LKB1 は FKBP38 と相互作用することでアポトーシスを制御していると考え実験を行った。

LKB1、LKB1 K78I と FKBP38 との結合を免疫沈降法で検討した結果、LKB1、LKB1 K78I と FKBP38 の共沈が確認された。GST-pull down assay を行い、LKB1 と FKBP38 が直接結合していることが示唆された。また、Peutz-Jeghers 症候群で見られる LKB1 変異体と FKBP38 が結合するか免疫沈降を行った。その結果、Peutz-Jeghers 症候群で見られる LKB1 変異体と FKBP38 の共沈を確認した。

FKBP38 は Bcl-2 と結合することが報告されている。そこで LKB1、FKBP38、Bcl-2 が複合体を形成する可能性を検討するために免疫沈降を行った。その結果、LKB1 は FKBP38 を介して Bcl-2 と複合体を形成している可能性が示唆された。

LKB1 は細胞内で主に核に、一部は細胞質に局在している。FKBP38 は Bcl-2、Bcl-XL をミトコンドリアに局在させることが報告されている。そこで LKB1 の局在に FKBP38 が与える影響を細胞染色で検討した。LKB1 のみを発現させた場合は主に核に局在したが、FKBP38 と共発現させるとミトコンドリアで FKBP38 と共局在しているのが観察された。同様に LKB1 K78I も FKBP38 と共発現させると局在が核からミトコンドリアへと変化した。したがって、FKBP38 が LKB1 の核からミトコンドリアへの局在が変化するのに関与する考えられる

FKBP38 は A23187 によるアポトーシスを抑制することが報告されている。そこで LKB1、FKBP38 が A23187 によるアポトーシスに及ぼす影響を検討した。その結果、LKB1 を発現させるとアポトーシスの抑制が観察されたが、LKB1 K78I ではアポトーシスの抑制は見られなかった。さらに LKB1 と FKBP38 を共発現させると LKB1 によるアポトーシスの抑制が見られなくなった。HeLa 細胞に FKBP38 に対する shRNA と LKB1 を導入後、A23187 で刺激した。その結果、FKBP38 の発現を抑制すると LKB1 によるアポトーシスの抑制が促進された。以上の結果から、LKB1 はキナーゼ活性依存的に A23187 によるアポトーシスを抑制し、LKB1 によるアポトーシス抑制は FKBP38 によって阻害されることが示唆された。