

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770175

研究課題名（和文） 哺乳動物の M 期脱出および細胞質分裂における Lats2 の役割

研究課題名（英文） Role of Lats2 in mammalian mitotic exit and cytokinesis.

研究代表者

藪田 紀一（YABUTA NORIKAZU）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10343245

研究成果の概要：細胞質分裂の制御異常は遺伝子的に非常に不安定な 4 倍体の形成を引き起こし、癌の悪性化を進行させる。本研究において、我々は独自の手法で単離し命名した癌抑制因子 Lats2 キナーゼが M 期キナーゼ Aurora-A により複数箇所リン酸化されて異なる分裂装置上へ局在し、新たな細胞質分裂のチェックポイント経路を構成していることを発見した。これらの成果は将来的に悪性癌の診断や治療に役立てられるものと期待できる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞質分裂、M 期脱出、Lats2、Lats1、Aurora、キナーゼ、リン酸化、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

我々が単離した *LATS2* 遺伝子は、ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 *lats* (*large tumor suppressor*)/*warts* の哺乳動物ホモログのひとつであり、種間で高度に保存されたセリン・スレオニンキナーゼをコードしている。これまでに我々は、*LATS2* 遺伝子がヒトの第 13 番染色体上（13q11-q12）に位置することを報告している（Yabuta *et al.*, 2000）。この領域は、近傍に癌抑制遺伝子 *RB* と *BRCA2* が位置し、多くの癌患者において LOH（ヘテロ接合性の消失）がみられる臨床的にも重要

な領域である。さらに、我々はオランダのグループとの共同研究において、*LATS2* を標的とする 2 種類のヒトマイクロ RNA（miR-372, -373）が Lats2 の発現を抑制することによって精巣胚細胞腫瘍における新規癌遺伝子として機能していることを発見し *Cell* 誌の表紙を飾った（Voorhoeve *et al.*, 2006）。これらのことから、*LATS2* は極めて重要なヒトの癌抑制遺伝子であることが示唆される。実際、ヒトの癌患者の臨床サンプルの幾つかにおいて Lats の発現が低下していることが報告されている（Takahashi *et al.*, 2005；

Jimenez-Velasco *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006)。

一方で、我々は Lats2 が中心体に局在し、分裂期 (M 期) 制御に重要な役割を果たしている Aurora-A キナーゼにより特定の位置 (Ser83) がリン酸化されることを突き止めている (Toji *et al.*, 2004)。Lats2 蛋白質が M 期、とくに微小管重合阻害剤 (ノコダゾール) 処理により特異的なリン酸化制御を受けていることも明らかにした。さらに、イスラエルのグループとの共同研究では、中心体ストレスにより核内に移行した Lats2 がユビキチンリガーゼの Mdm2 を阻害することによって癌抑制遺伝子産物 p53 を安定化および活性化させる一方で、蓄積した p53 が直接 *LATS2* mRNA の転写誘導を引き起こすことを発見し、このポジティブ・フィードバックが新たな M 期チェックポイント経路「四倍体チェックポイント」として機能していることを報告した (Aylon *et al.*, 2006)。

がんの悪性化を引き起こす染色体不安定性の原因として中心体制御異常に起因する多極スピンドルの形成や不均等な染色体分配、細胞質分裂の異常が挙げられる。Lats2 のアミノ酸一次構造は、出芽酵母の M 期脱出経路 (MEN; Mitotic Exit Network) で主に機能する Dbf2/Dbf20 キナーゼや分裂酵母の SIN (Septation Initiation Network) で機能する Sid2 キナーゼと高い相同性を示す。Dbf2 および Sid2 は SPB (Spindle Pole Body; 酵母の中心体に相当する) に局在し、その変異体は細胞質分裂を阻害することが報告されている。我々は Lats2 の KO マウスを作製し解析する過程で、Lats2 を欠損したマウス胚由来線維芽細胞 (MEF) が中心体の異常増幅と細胞質分裂の異常を引き起こすことを見つけた。この結果は Lats2 が Dbf2 や Sid2 と同様に M 期脱出と細胞質分裂を制御する重要な因子のひとつである可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳動物の M 期脱出および細胞質分裂における Lats2 の役割を明らかにすることにある。M 期脱出の分子機構については酵母や線虫において非常に研究が進んでおり、そのリン酸化カスケードの全貌も明らかになりつつある。すなわち、Separase の活性化と APC/Cdh1 を介して Cyclin B を分解するための Cdc14 フォスファターゼの活性化経路である。しかしながら、高等動物、とりわけ哺乳動物ではこの領域の研究が殆ど進んでおらず、Cdc14 の哺乳動物ホモログ (Cdc14A, Cdc14B) が報告されてはいるものの、このリン酸化カスケードが保存されているか否かも明らかにされていない。そこで、我々は M 期脱出 (M 期終了) と細胞質分裂の

制御機構における Lats2 の役割を明らかにし、哺乳動物における M 期脱出と細胞質分裂を繋ぐ新たなリン酸化シグナルカスケードを同定したいと考えた。M 期脱出のシグナルは細胞質分裂の開始のタイミングと密接に関連しているため、このチェックポイント機構の破綻が異数体 (aneuploid) を作り出すひとつの大きな要因と考えられる。

3. 研究の方法

以下のような方法で本研究を遂行した。

(1) 我々はすでに Aurora-A によるリン酸化部位の一つ (S83) を決定して特異的リン酸化抗体を作製し *in vivo* において M 期特異的にリン酸化されることを確認しているが、Lats2 のリン酸化部位は一カ所ではなく、それらのすべてについて確認し、どれがもっとも重要な生理的意味を持つのかを決定しなくてはならなかった (Toji *et al.*, 2004)。その目的のために、Lats2 蛋白質を分断化してアフィニティー精製により純化してどの断片がリン酸化されるかを *in vitro* kinase assay により調べた。これにより決定した複数箇所のリン酸化部位に相当するリン酸化ペプチドを合成し、これらを抗原として特異的な抗リン酸化抗体を作製した。これらの特異性を *in vitro* kinase assay と Western blot により検定した。

(2) 細胞周期を同調したヒト癌細胞株あるいはチェックポイントを誘導する薬剤で処理した細胞株において上述したリン酸化抗体を用いて、決定したリン酸化部位が細胞周期のいずれのステージにおいて *in vivo* でリン酸化されるかを調べた。さらに、リン酸化抗体を用いた間接蛍光抗体法によりリン酸化された Lats2 が M 期の細胞内でどのような局在をとるのかを調べた。

(3) 各リン酸化部位に単独にアミノ酸を置換した Lats2 変異体およびすべてのリン酸化部位に変異を挿入した変異体を作製し、これらを培養細胞に導入し、培養細胞の細胞周期の進行と形態変化、とりわけ中心体複製・成熟、スピンドルの形成、染色体分配、細胞質分裂における非リン酸化型およびリン酸化ミミック型 Lats2 変異体の影響を観察した。

(4) Lats2 を取り巻くシグナルカスケードの一端を解明するために、免疫沈降法および *in vitro* kinase assay を駆使し Lats2 の結合因子あるいはリン酸化標的の同定を試みた。さらに、siRNA で Lats2 をノックダウンすることにより細胞内局在などの分子挙動に影響を受けた因子を Lats2 の下流に位置する候補因子として探索を行った。

(5) 我々は Lats2 のノックアウト (KO) マウスの胎児由来線維芽 (MEF) 細胞において中心体異常 (中心体の断片化)、染色体分配異常、および細胞質分裂の阻害が引き起こされ

ることを見出した(図1, Yabuta *et al.*, 2007)。そこで、Lats1 単独の KO や Lats1・Lats2 のダブル KO 由来の MEF 細胞における細胞質分裂の異常および中心体・染色体制御異常を探索するために、Lats1 単独の KO マウスを独自に作製し、これと Lats2 単独 KO マウスを交配させてダブル KO (DKO) マウスの作製を行った。

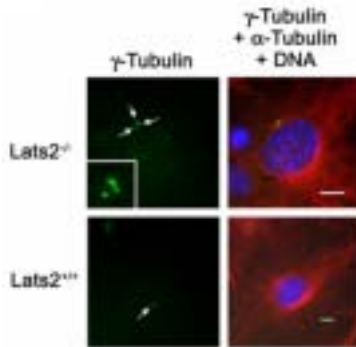


図1: Lats2 欠損による中心体異常

(6) Lats2 の一次構造は出芽酵母の M 期脱出経路 (MEN) で主に機能する Dbf2/Dbf20 キナーゼや分裂酵母の細胞質分裂 (SIN) で機能する Sid2 キナーゼと高い相同性を示すことから、哺乳動物において Lats2 が MEN 因子あるいは SIN 因子のどちらに近い機能を有するのかを調べる必要がある。このため、Lats2 の KO 細胞で観察される表現型を細胞生物学的・生化学的に詳細に調べた。

(7) Lats1 と Lats2 が互いに機能を相補していることを調べるために、Lats1 KO、Lats2 KO および DKO マウスの長期飼育を行い、自然発症性腫瘍の発生を観察した。

(8) 作製した Lats2 KO および DKO マウス由来の胚を用いてマウスの胚発生における Lats2 の役割を病理学的に調べた。

(9) Lats2 のトランスジェニック (TG) マウスを作製し心臓の過形成における Lats2 の役割を調べた。

4. 研究成果

ほぼ研究計画どおり順調に進み以下の示す成果を得た。

(1) Lats2 の N 末端領域に Aurora-A によってリン酸化される全ての部位 (3 箇所) を同定した。これらの部位に対する 3 種類のリン酸化特異的なポリクローナル抗体の作製に成功した。さらに、Lats1 および Lats2 自身に対する特異的なポリクローナル抗体も数種類作製した。これにより非常に優秀な抗 Lats 抗体を揃えることができた。

(2) この精製抗体を用いて、決定した部位の細胞周期におけるリン酸化時期を調べたところ、これらはいずれも M 期特異的に高度にリン酸化されることを見出した。さらに、リン酸化された Lats2 の M 期進行における細胞

内局在を調べたところ、非常に興味深いことに、3 箇所のリン酸化は互いに異なる分裂装置上への局在を示した。つまり、異なるリン酸化部位のリン酸化状態によって Lats2 が核内や中心体、セントラル・スピンドルや中央体に分配されることを見出した。これらの結果は、Aurora-A による複数のリン酸化が Lats2 の多様な局在を制御していることを示唆している。同時に、この結果は一種の蛋白質の局在が異なる部位のリン酸化によって別々の分裂装置上に仕分けされる極めて珍しい現象である。Aurora-A の多彩な機能を解明する上で極めて重要な意義を持つと考えられる。

(3) siRNA により内在性 Lats2 あるいは Lats1 をノックダウンすると細胞質分裂の異常が観察された。同様に、自作した Lats2 欠損細胞 (Lats2^{-/-} MEF) においても細胞質分裂の異常が認められたことから、Lats2 は細胞質分裂の進行に重要な役割を果たしていることが示唆される。細胞質分裂の異常はセントラル・スピンドルや収縮環の制御異常が原因と考えられるので、これらの制御に関連する因子、例えば Chromosome passenger proteins や Centralspindlin 複合体、RhoA GTPase-アクトミオシン経路などの異常が考えられる。そこで、Lats2 による細胞質分裂制御の分子経路を探索するため、細胞質分裂の主要キナーゼである Aurora-B を含む複合体 CPC (Chromosomal Passenger Complex) の細胞内局在を調べたところ、Lats2 ノックダウン細胞において CPC の M 期局在制御が異常になることを発見した。これらの結果から、我々は Aurora-A-Lats2 経路が CPC の局在制御を介して正確な細胞質分裂を行う新たなシグナルカスケードが存在することを提唱し、これを「ALC (Aurora-Lats-CPC) 経路」と命名した。この経路の一部は出芽酵母の M 期脱出経路 (MEN) においても保存されていたことから、ALC 経路は種間で保存されている重要な細胞質分裂/M 期脱出の制御機構である可能性が示唆された。

(4) Lats1^{-/-};Lats2^{-/-} のダブルノックアウト (DKO) マウスを作製したところ、予測どおり胎生致死であった。その原因を詳細に調べた結果、Lats2 と Lats1 が協調して細胞増殖や胚発生に必須な Hippo-Lats 経路を介して着床前の胚発生過程に不可欠な役割を果たしていることを見出した。Lats1;Lats2 の DKO マウスを作製し所持しているのは国内外で我々だけであり、それを使って個体レベルにおける Lats1 と Lats2 の機能相補を世界に先駆けて証明できたことは国内外に強いインパクトを与えることができたと考えられる。

(5) 細胞増殖と器官サイズのコントロールにおける Lats2 の機能を解析するために、Lats2 の TG マウスを作製し心臓の過形成にお

ける Lats2 の役割を調べた結果、Lats2 が心臓の過形成を抑制していることを見出した。(6) Lats キナーゼ群が介在する Hippo - Lats 経路は転写制御因子 Yap をリン酸化することで Yap の核移行を阻害して G0 期 (静止期) 細胞が増殖サイクルへ進入することを抑制している。つまり、Yap のリン酸化状態や細胞内局在の異常が癌化あるいは癌の悪性化へ影響すると考えられる。Lats 両遺伝子がホモで欠失している DK0 (Lats1^{-/-};Lats2^{-/-}) マウスは上述のとおり Hippo-Lats 経路に欠損が生じて胎生致死となったが、ダブルヘテロ欠損 (Lats1^{+/-};Lats2^{+/-}) マウスは無事に生まれた。我々はこれを長期飼育することによって自然発症的な乳癌が発症することを見つけた。この結果は、Lats2 と Lats1 が相補的に乳癌抑制遺伝子として機能していることを示唆している。将来的には Lats DK0 マウスを散発性乳癌の新たなモデルマウスとして使用し新しい乳癌の診断・治療システムの開発への応用も期待できる。

本研究では Lats2 の哺乳動物の M 期脱出および細胞質分裂における役割を明らかにした。これらの成果により、我々は Lats2 および Lats1 の両方の KO マウスおよび DK0 マウスを持っている点、Lats2 を標的とするキナーゼの同定とリン酸化位置の決定およびそのリン酸化抗体まで作製している点、Lats2 が介在する新しいチェックポイント経路を発見している点などで国内外において優位な立場に立っていると思われる。また、我々は国内外の数ヶ所の研究室から共同研究のオファーを受けており、これらのうち幾つかについては共同研究を精力的に進めているので、今後さらなる進展が期待できる。

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 5 件)

Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki EM, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, Sasaki H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* 16, 2009, 398-410. 【査読有り】
Matsui Y, Nakano N, Shao D, Gao S, Luo W, Hong C, Zhai P, Holle E, Yu X, Yabuta N, Tao W, Wagner T, Nojima H, Sadoshima J. Lats2 is a negative regulator of myocyte size in the heart. *Circ. Res.* 103, 2008, 1309-1318. 【査読有り】

Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, Fujimori A, Okuzaki D, Zhao H, Ikawa M, Okabe M, Nojima H. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J. Biol. Chem.* 282, 2007, 19259-19271. 【査読有り】他 2 件。

〔学会発表〕(計 4 件)

藪田紀一、岡田宣宏、野島博：「Lats2 は M 期において Aurora-A キナーゼによってリン酸化されて多様な局在を示す」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同年会 (神戸) 平成 20 年 12 月 9 日

佐藤愛、岡田宣宏、藪田紀一、野島博：「Lats1 と Lats2 キナーゼは相互作用して機能を相補する」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同年会 (神戸) 平成 20 年 12 月 9 日

藪田紀一、岡田宣宏、野島博：「Aurora-A による多様なリン酸化は Lats2 の M 期局在を制御する」第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 平成 20 年 10 月 28 日

藪田紀一、岡田宣宏、野島博：「Aurora-A によるリン酸化は M 期における Lats2 の多様な局在を制御する」第 60 回日本細胞生物学会大会 (横浜) 平成 20 年 6 月 29 日

〔その他〕

所属研究室ホームページ：

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/molgenet/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪田 紀一 (NORIKAZU YABUTA)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：10343245

(2) 研究分担者

該当なし。

(3) 連携研究者

該当なし。