

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370081

研究課題名（和文） 中心体とM期の連動を制御するキナーゼ複合体の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the kinase complex that regulates the connection between the centrosome cycle and M phase.

## 研究代表者

野島 博 (NOJIMA HIROSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：30156195

## 研究成果の概要（和文）：

中心体とM期の連動を制御するキナーゼ複合体である Lats1/2 複合体およびKBG 複合体の機能解析を進め、中心体キナーゼ Aurora A の発した信号を Lats1/2 が仲介し、M 期キナーゼ Aurora B に伝達すること、あるいは中心体にある Chk1 キナーゼの発した信号を Lats2 が仲介し、M 期脱リン酸化酵素である CDC25B へ伝達することで中心体と M 期が連携していることを発見した。一方、中心体に局在する GAK は M 期に標的を持つ脱リン酸化酵素 PP2A B $\gamma$  を制御することでM期と連動する可能性を指摘した。

## 研究成果の概要（英文）：

The roles of the Lats1/2 and KBG complexes that connect centrosome cycle and M phase are analyzed. We found that Lats1/2 kinase links the signal emitted from centrosomal Aurora A to Aurora B kinases and that the signal emitted from centrosomal Chk1 kinase to CDC25, an M phase phosphatase, thereby connecting the centrosomal signal to the M phase regulatory machinery. Moreover, we showed and pointed out that the centrosomal GAK regulates PP2A B $\gamma$  that may control the phosphorylation states of certain M phase targets.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期，中心体，紡錘体形成チェックポイント，LATS2, GAK, Cyclin G, PP2A B $\gamma$ ,リン酸化。

## 1. 研究開始当初の背景

中心体の成熟とM期進行の連動は癌の悪性化の原因である染色体不安定性を制御していることから重要であるという認識は世界中で共有されている。しかし、その詳細な分子制御機構はほとんどわかっていない。

我々は中心体に局在してM期で機能する新

規なキナーゼ GAK と Lats2 を見出し、それらが Mdm2 を介して癌抑制遺伝子の p53 の制御と密接に関わっていることを突き止めた。しかし GAK と Lats2 の中心体とM期進行の連動における分子制御機構は未知まま残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は中心体とM期の連動を制御するキナーゼである我々が世界に先駆けて単離し命名した GAK (およびその結合因子である Cyclin G1, Cyclin G2) と Lata2 (および類似の Lats1) の機能を解明することにある。GAK 複合体と Lats 複合体はともに Mdm2 を介して癌抑制遺伝子の p53 の制御と密接に関わっており、癌の悪性化の原因である染色体不安定性を直接に制御していることから、この成果を悪性度の高い癌の診断・治療に役立てることも目的とする。

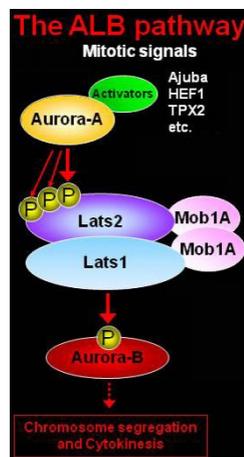
## 3. 研究の方法

- (1) GAK, Cyclin G1, Cyclin G、LATS1, LATS2 ノックアウトマウス系統と由来する MEF を樹立する。
- (2) GAK や Lats1/2 が仲介するシグナル伝達経路を解明し、リン酸化部位特異的な抗体を多数作成する。
- (3) DNA マイクロアレイや miRNA マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を進める。

## 4. 研究成果

### (1) 新規な ALB 経路の発見

中心体キナーゼ Aurora-A によりリン酸化される Lats2 の部位 (Lats2-S83, -S172, -S380 の3箇所) を同定した。これらの部位に対するリン酸化特異的抗体を作製して細胞周期におけるリン酸化時期を調べたところ、いずれも M 期特異的に高度にリン酸化されており、M 期進行において互いに異なる

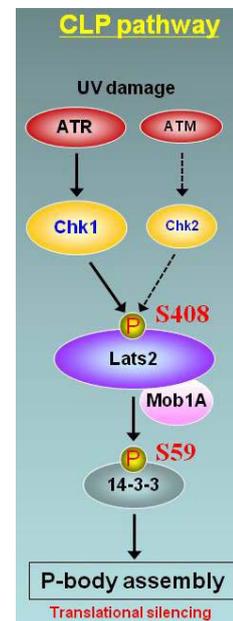


る分裂装置上への局在を示した。

中でも Lats2-S380 は M 期にリン酸化され、M 期中期の染色体上とその周辺および M 期後期のセントラル・スピンドル上に局在した。一方、pS380-Lats2 の一部は染色体分配と細胞質分裂に必要な Aurora B キナーゼと結合・共局在しており、Lats2 が Lats1, Aurora A, Aurora B と結合して Aurora B をリン酸化することを見出した。Lats2-A (非リン酸化変異体) を HeLa 細胞に発現させると多核化、異常核の形成、染色体架橋、小核が観察された。これらの結果から、中心体にある Aurora-A-Lats2 経路が M 期の Aurora-B の制御を介して正確な染色体分配と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「ALB (Aurora-A - Lats1/2 - Aurora-B) 経路」と命名した。

### (2) CLP 経路の発見:

DNA は様々な環境刺激により損傷を受けている。これらの DNA 損傷は染色体不安定性、異常な細胞増殖、癌の悪性化などの原因になり得る。そのため、DNA 損傷応答機構がゲノムの維持および癌の悪性化の阻止に重要な機能を果たしている。我々は癌抑制遺伝子



Lats2 の DNA 損傷応答における機能を解析し、染色体を安定に保つことで染色体不安定化および癌の悪性化を防いでいる制御機構の解明を進めてきた。

我々はまず DNA 損傷後に Lats2-S408

が Chk1 によりリン酸化され、リン酸化された Lats2 は活性化して 14-3-3 の S59 を標的としてリン酸化することを見出した。14-3-3-S59 リン酸化部位特異的なリン酸化抗体を作成して免疫染色解析を行ったところ、miRNA を介した mRNA 分解や翻訳抑制を行っている P (processing)-body に局在した。さらに、この局在は DNA 損傷に依存して強度を増した。さらに、14-3-3 や Lats2 のノックダウンにより GW182 (P-body 足場タンパク質) の P-body 局在が消失した。これらの結果は Chk1-Lats2-14-3-3 軸が新規な DNA 損傷シグナル伝達経路として P-body 形成を制御していることを示している。これを「CLP (Chk1-Lats2-P-Body)経路」と命名した。

### (3) Lats1 ノックアウト (KO) マウスの解析 :

Lats1 KO マウスを作製した。その胚から樹立した Lats1<sup>-/-</sup> MEF は Lats1 の N 末端領域を欠損していることを見出した。この領域はキナーゼドメインとは異なるが Lats1 の局在などの制御領域と予測され、Lats1 の生理的機能に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、中心体制御と Hippo pathway から、癌悪性化における Lats1 の機能を解析した。具体的にはまず、Lats1 KO マウスを用いてその腫瘍形成能を確認した。そこで Lats1<sup>-/-</sup> MEF に癌細胞特有の性質があるか調べ、同時に Hippo pathway の異常について、および Lats1<sup>-/-</sup> 細胞における中心体制御について調べ、野生型やこれまでに報告された Lats2 KO MEF の表現型との差異を比較検討した (投稿準備中)。

また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 (Matsui *et al.* Circ Res, 2008)。また Lats1<sup>-/-</sup>Lats2<sup>-/-</sup>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 (Nishioka *et al.* Dev Cell 2009)。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。

### (4) Lats2 と CDC25B との連携

G2 期から M 期への進行を制御する脱リン酸化酵素である CDC25B は 14-3-3 $\gamma$  S59D (疑似リン酸化変異体) とは強く結合するが、S59A 変異体 (非リン酸化) とは結合しなかった。さらに、14-3-3 $\gamma$  が CDC25B の S230 において結合していることも見出した。Lats-S408 は M 期に中心体に局在することも発見した。この結果は Lats2-S408 が 14-3-3 $\gamma$  をリン酸化して CDC25B の活性を制御することで中心体と M 期を連携していることを強く示唆する。

### (5) KGB 複合体の機能解析

我々は GAK を含む GAK/PP2A B $\gamma$ /Cyclin G 複合体の細胞内での機能に注目して解析を行い以下に列挙する成果を得た。

① GAK が PP2A B $\gamma$  をリン酸化すること、さらにこの反応が *in vitro* において PP2A の脱リン酸化反応を亢進することを見出した。

② 細胞が $\gamma$ 線照射を受けると DNA 損傷部位近傍の H2AX がリン酸化され ( $\gamma$ H2AX)、この修復フォーカスを標的として種々の DNA 損傷修復因子が集結し DNA が修復される。一方 PP2A は  $\gamma$ H2AX を脱リン酸化すること

が知られており、先の反応を終結し修復完了の伝達を担うと考えられる。本研究において、 $\gamma$ 線照射後にリン酸化 PP2A B $\gamma$ 1が修復フォーカスに局在すること、また経時的観察により、修復フォーカスにおける $\gamma$ H2AX および修復関連因子 CHK2 のリン酸化型 (CHK2\_pT68)の集積ピークに遅れてリン酸化型 B $\gamma$ 1の集積が起こることを見出した。さらに、ロックダウン法にて B $\gamma$ の発現を抑制すると、 $\gamma$ 線照射後の $\gamma$ H2AX および CHK2 の脱リン酸化が遅延することを明らかにした。これより、PP2A B $\gamma$ 1が DNA 損傷後の修復完了の伝達に関与していることが示唆された。そこで野生型 PP2A B $\gamma$ およびリン酸化部位 Thr を Ala に置換した非リン酸化変異体、Asp に置換した疑似リン酸化型変異体を U2OS 細胞に導入した安定発現株を用いて、 $\gamma$ H2AX と CHK2\_pT68 の脱リン酸化への寄与を比較した。その結果、野生型と比較して変異体においてもその差は見られなかったことから、B $\gamma$ のリン酸化には何か別の役割があることが考えられた。

③PP2A B $\gamma$ あるいは Cyclin G が寄与する PP2A の脱リン酸化基質は他に Mdm2 および p53 が知られている。 $\gamma$ 線照射後のこれらの脱リン酸化反応に対して、PP2A B $\gamma$ のリン酸化が寄与するかどうかについても調べた。その結果、Mdm2\_pS166 の脱リン酸化に関与する可能性を見出した。

④M 期を制御するコンデンシン II は PP2A B $\gamma$ により脱リン酸化制御される。上記の結果はコンデンシン II を標的として中心体にある GAK が M 期と連携する可能性を示唆する。

#### (6) GAK のキナーゼ活性阻害と間質性肺炎

癌の分子標的薬であるゲフィチニブ (イレッサ™) の阻害標的キナーゼとして EGFR 以外に GAK と RICK (RIP2)が報告された。そこで、

我々は GAK がゲフィチニブの重要な標的分子であり、間質性肺炎という副作用の原因が GAK の阻害に起因するのではないかと考え、GAK のキナーゼドメインをコードする遺伝子領域を欠失させたノックアウトマウス (GAK-kinase dead: GAK-kd)を作成し、その機能解析を行った。その結果、GAK-kd ホモ欠失マウスは出生までは生き延びるものの、出生後間もなく、間質性肺炎に酷似した肺機能不全により死に至るということを見出した。実際、ヘテロ欠失体同士の交配すると、E16.5~E18.5 では、メンデル則に従っていた。しかし、生まれてから 4 週間経った時点では、メンデル則から大きく外れ、ホモ欠失体は一匹も生存していないことが分かった。そこでどの時点でホモ欠失体が死ぬかを知るために、帝王切開によって生まれた新生児の挙動を調べた。具体的には、18.5 日目にプロゲステロンを注射し、19.5 日目に帝王切開を行って胎児を取り出したところ、野生型マウスと比較してホモ欠失体は呼吸を開始しても体全体が黄白色のまま、生後 30 分以内に衰弱し、死亡した。

この原因を調べるために、新生児から肺および肝臓を摘出し固定後 HE 染色を行い、各組織の形態を観察した。野生型では肺において正常な肺胞構造が見られ、肝臓の細胞も密に存在しているのに対して、ホモ欠失体では肺胞構造の乱れと繊維化、肝細胞の脱落や空洞化が見られた。このことから、GAK のリン酸化活性は新生児期の肺・肝組織形成に必要であると言える。

次に、肺におけるウェスタンブロットと免疫染色により解析したところタンパク発現量には変化が見られないものの、サーファクタント A や E-cadherin およびリン酸化 EGFR の肺細胞における分布がホモ欠失体で異常であることが分かった。すなわ

ちWTでは細気管支上皮で強いシグナルが検出されるのに対して、末梢側ではシグナルが減弱し、特に肺胞上皮（肺胞内面を裏打ちする細胞）ではほとんどシグナルが認められない。一方、ホモではシグナルの分布が中枢側（そく）から末梢側までの範囲でかなり一様に見える。肺胞内面を裏打ちする細胞にもかなり強いシグナルが検出され、その細胞は形態的に立方状のものが多くなっている。よって正常な肺の発生（出生時）においては、細気管支上皮から肺胞上皮への分化の過程で、カドヘリンの発現が減弱し、細胞形態が扁平化するとともに、サーファクタントの分泌能が獲得されてガス交換が可能となるが、GAKkd-KO マウスでは、以上のような細気管支上皮から肺胞上皮への分化が障害されているため、出生直後に死亡したと結論した。

## 5. 主な発表論文等

【雑誌論文】（計 18 件）

- (1) Okada N, Yabuta N, Suzuki H, Aylon Y, Oren M, Nojima H. A novel Chk1/2-Lats2-14-3-3 signaling pathway regulates P-body formation in response to UV damage. **J. Cell Sci.** 2011 Jan 1;124(Pt 1):57-67. 【査読あり】
- (2) Okuzaki D, Fukushima T, Tougan T, Ishii T, Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, and Nojima H. Genopal<sup>TM</sup>: a novel hollow fiber array for focused microarray analysis. *DNA Res.*, 2010 Dec;17(6):369-79. 【査読あり】
- (3) Tougan T, Kasama T, Ohtaka A, Okuzaki D, Saito TT, Russell P, Nojima H. The Mek1 phosphorylation cascade plays a role in meiotic recombination of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle.*, 2010 Dec 1;9(23):4688-4702. 【査読あり】
- (4) Funato Y, Terabayashi T, Sakamoto R, Okuzaki D, Ichise H, Nojima H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin Sustains Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling by Retaining a Pool of Inactive Dishevelled Protein. **Curr. Biol.**, 2010 Nov 9;20(21):1945-52. 【査読あり】
- (5) Aylon Y, Ofir-Rosenfeld, Y., Yabuta N, Lap, E, Nojima H, Lu, X. and Oren M. The Lats2 tumor suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1. *Genes Dev.*, 2010 Nov 1;24(21):2420-9. 【査読あり】
- (6) Okuzaki D, Kasama T, Hirata A, Ohtaka A, Kakegawa R, Nojima H. Spo5 phosphorylation is essential for its own timely degradation and for successful meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle.* 2010 Sep 7;9(18):3751-60. 【査読あり】
- (7) Shigehisa A, Okuzaki D, Kasama T, Tohda H, Hirata A, Nojima H. Mug28, a Meiosis-specific Protein of *Schizosaccharomyces pombe*, Regulates Spore Wall Formation. **Mol Biol Cell.** 2010 Jun 15;21(12):1955-67. 【査読あり】
- (8) Aylon Y, Yabuta N, Besserglick H, Buganim Y, Rotter V, Nojima H, Oren M. Silencing of the Lats2 tumor suppressor overrides a p53-dependent oncogenic stress checkpoint and enables mutant H-Ras-driven cell transformation. **Oncogene.** 2009 Dec 17;28(50):4469-79. 【査読あり】
- (9) Shimizu H, Nagamori I, Yabuta N, and Nojima H (2009). GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression. **J Cell Sci.** 2009 Sep 1;122(Pt 17):3145-52. 【査読あり】
- (10) Sato, J., Shimizu, H., Kasama, T., Yabuta, N, Nojima, H. GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane trafficking, localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus. **Genes Cells**, 14, 627-641, 2009. 【査読あり】
- (11) Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N, Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., 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. 【査読あり】 **Dev Cell.** 2009 Mar;16(3):398-410.
- (12) 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.** 2008 Nov 21;103(11):1309-18. 【査読あり】
- (13) Tougan T, Okuzaki D, Nojima H. Chum-RNA allows preparation of a high-quality cDNA library from a single-cell quantity of mRNA without PCR amplification. **Nuc. Acids Res.**, 36(15):e92, 2008. 【査読あり】
- (14) Ohtaka A, Okuzaki D, Nojima H. Mug27 is a meiosis-specific protein kinase that functions in fission yeast meiosis II and sporulation. **J.**

Cell Sci., 121(9), 1547-1558, 2008. 【査読あり】

〔学会発表〕(計 30 件)

- (1) Nojima H, Mukai S, Suzuki H, Okada N, Miura D, Okuzaki D, Yabuta N: Lats1DN/DN MEFs expressing the N-terminal truncated Lats1 protein showed mitotic defects and formed tumors in nude mice. The second workshop on the HIPPO tumor suppressor pathway, November 4, 2010, Rome, Italy

〔図書〕(計 1 件)

- (1) Nojima H, Tougan T. Preparation of a high-quality cDNA library from a single-cell quantity of mRNA using Chum-RNA. In cDNA Libraries (Ed. By L.Chao, Browne J, Wallis JG). Humana Press (Springer Science), pp15-35, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：白血球タンパク質の回収方法および回収装置

発明者：野島博、藪田紀一、奥崎大介

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：K2009-0042

出願年月日：平成 21 年 10 月 26 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 4 件)

名称：ヒト腫瘍関連遺伝子とタンパク質

発明者：渡邊雅文、野島博、玉井克之

権利者：(株) 医学生物学研究所(MBL)

種類：特許

番号：特許第 4567140 号

取得年月日：平成 22 年 8 月 13 日

国内外の別：国内

名称：全身性エリテマトーデス患者血液細胞で発現亢進している遺伝子群、およびその利用

発明者：野島博、恩田弘明、佐伯行彦

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4471803 号

取得年月日：平成 22 年 3 月 12 日

国内外の別：国内

名称：ヒト腫瘍関連遺伝子とタンパク質

発明者：野島博、伊藤彰彦

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4076728 号

取得年月日：平成 20 年 2 月 8 日

国内外の別：国内

名称：コネキシン 26 阻害剤およびそれを用いた癌転移抑制剤

発明者：野島博、伊藤彰彦、北泰行

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4331115 号

取得年月日：平成 21 年 6 月 26 日

国内外の別：国内

名称：癌転移能検査方法、および癌転移抑制薬のスクリーニング方法

発明者：野島博、伊藤彰彦

権利者：(株) 医学生物学研究所(MBL)

種類：特許

番号：特許第 4282163 号

取得年月日：平成 21 年 3 月 27 日

国内外の別：国内

〔その他〕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

野島博 (NOJIMA HIROSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：30156195

(2) 研究分担者

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

奥崎大介 (OKUZAKI DAISUKE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00346131

内藤陽子 (NAITO YOKO)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：10553026

(H21 より研究分担者として参画)

笠間隆志 (KASAMA TAKASHI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：20456932

(H20 まで研究分担者として参画)