

Title	Structure, Expression, and Chromosome Mapping of LATS 2, a Mammalian Homologue of the Drosophila Tumor Suppressor Gene lats/warts
Author(s)	Yabuta, Norikazu
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169203
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	やぶ た のり かず 数 田 紀 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 2 4 1 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Structure, Expression, and Chromosome Mapping of <i>LATS2</i> , a Mammalian Homologue of the <i>Drosophila</i> Tumor Suppressor Gene <i>lats/warts</i> . (<i>Drosophila</i> 癌抑制遺伝子 <i>lats/warts</i> の哺乳動物ホモログ <i>LATS2</i> の単離と解析)
論文審査委員	(主査) 教授 野島 博 (副査) 教授 杉野 明雄 教授 西宗 義武

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

癌における腫瘍形成は、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化・欠失のような一連の遺伝子変異を伴う複雑な過程を経る。ショウジョウバエの癌抑制遺伝子 *lats* (*large tumor suppressor*) は、ショウジョウバエのモザイク変異体においてその欠損が細胞の異常増殖を引き起こす遺伝子として同定された。Lats 蛋白質は、C末端領域に出芽酵母のM期制御因子 Dbf 2 / Dbf20 と相同性の高いセリン・スレオニンキナーゼを有しているが、その生理的機能においては不明な点が多い。

本研究の目的は、我々が最近新たにクローニングしたショウジョウバエ *lats/warts* 遺伝子の哺乳動物ホモログのひとつである *LATS2* 遺伝子の産物である Lats2 の生理的機能と癌化への関与を解析することである。

【方法ならびに成績】

1. マウスおよびヒト *LATS2* 遺伝子の単離と各組織における発現

サブトラクション法によりマウスの精子形成過程において mRNA の発現が誘導される新規遺伝子として、*Drosophila* の癌抑制遺伝子 *lats/warts* のマウスおよびヒトのホモログ (*MmLATS2*、*HsLATS2*) を単離した。*MmLATS2* (および *HsLATS2*) 遺伝子産物は1043アミノ酸からなり、そのC末端領域にセリン・スレオニンキナーゼを有していた。ホモロジー検索の結果から、キナーゼ・ドメインを含むC末端領域は酵母からヒトまで種間で高度に保存されていたが、N末端領域の保存度は低かった。ノーザン解析により各組織における mRNA の発現を調べたところ、*MmLATS2* の発現はどの組織でも見られたが、とりわけ ovary と testis で高い発現が見られた。これに対して、*HsLATS2* は heart と muscle で高い発現がみられた。

2. Lats2 蛋白質の発現

HsLats2 に対する特異的モノクローナル抗体 (3D10) を作製し、これを用いたウエスタン解析により各種細胞株における Lats2 の発現を検討した。その結果、*HsLats2* はおよそ125kDa の移動度を示し、HeLa 細胞など幾つかの細胞株においてリン酸化によるバンドシフトが確認された。さらに、同調した細胞抽出液を用いて細胞周期における Lats2 の発現とリン酸化シフトを調べた。結果、Lats2 の発現は non-periodical な発現パターンを示した。リン酸化状態は G0 期以外の細胞周期で常にリン酸化されているものの、M期にはさらにリン酸化が顕著になることが観察された。興味深いことに、微小管重合阻害剤であるノコダゾールで処理すると、通常の細胞周期では見られない高リン

酸化シフトが観察された。

3. Lats2 蛋白質の細胞内局在

3 D10 抗体を用いた間接蛍光抗体法により Lats2 の細胞内局在を解析した結果、Lats2 は少なくとも間期において核に局在することがわかった。また、ウエスタン解析においても分画した核画分から塩濃度依存的に Lats2 が溶出されてくることから上記の結果と矛盾しない。さらに、GFP (Green fluorescent protein) - MmLats2 融合蛋白質の部分欠失変異体を用いた細胞内局在性の解析から、この核局在には Lats2 の N 末端領域 (1 - 318 アミノ酸) が少なくとも必要であることを見いだした。

4. キナーゼ・ドメインの機能解析

Lats2 の C 末端領域に存在するキナーゼ・ドメインを昆虫細胞および大腸菌において発現させ、精製した蛋白質を用いて *in vitro* kinase assay により基質の検索を行った。その結果、様々なリン酸化酵素の良い基質となるヒストン H1、H3、ミエリン塩基性蛋白質やカゼインなどの外来性蛋白質に対するリン酸化活性は見られなかった。しかしながら、自己リン酸化活性は存在し、ATP 結合領域に変異を挿入したキナーゼ・ネガティブ変異体の場合、この活性は消失した。また、ホスホアミノ酸解析によりこの自己リン酸化部位がセリン残基であることを明らかにした。

5. LATS2 遺伝子の染色体座位の決定

MmLATS2 遺伝子および HsLATS2 遺伝子の染色体座位がそれぞれマウス第14番染色体上、ヒト第13番染色体上 (13q11-q12) であることを明らかにした。ヒトの場合、この領域の近傍に癌抑制遺伝子 *RB* (13q14)、*BRCA2* (13q12-q13) が位置し、多くの癌患者で LOH が見られる領域であることから、*LATS2* が臨床的にも重要な癌抑制遺伝子である可能性が考えられる。

6. 各種ヒト癌細胞株およびヒト癌組織における LATS2 遺伝子の発現

RT-PCR により22種類の癌細胞株について HsLATS2 の発現を検討した結果、発現が認められない、もしくは顕著に低下している細胞株を胃癌由来から2種類、大腸癌由来から2種類、肺癌由来から3種類、甲状腺未分化癌由来から1種類、骨肉腫由来から1種類同定した。Genomic-PCR により3種類の肺癌由来の細胞株のうち1種類においてはキナーゼ・ドメインの一部にゲノム上の欠失が認められた。さらに、大腸癌などの患者より採取した癌組織数例においても HsLATS2 の発現が認められないことを確認した。

【総括】

ショウジョウバエ *lats/warts* 遺伝子の哺乳動物ホモログ *LATS2* を単離し、その遺伝子産物が核内リン酸化蛋白質であることを明らかにした。Lats2 のリン酸化状態はM期ならびにノコダゾール処理によりそれぞれ特異的なパターンを示すことや、キナーゼ・ドメインが Dbf2 と同源性を示すことから、Lats2 はM期チェックポイント制御において重要な役割を担っていると推察される。さらに、染色体座位が13qに位置することや、多くのヒト癌細胞株および癌患者由来の癌組織において発現が認められないことは、*LATS2* がヒトの癌抑制遺伝子として機能していることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

本研究は、哺乳動物の新たな癌抑制遺伝子として *LATS2* を単離し、その遺伝子産物の細胞周期での役割と臨床サンプルにおける変異を検討したもので、実験の結果以下の事実を見出した。

- (1) Lats2 は自己リン酸化活性を有するセリン・スレオニンキナーゼである。
- (2) Lats2 は核内に局在し、この局在にはN末端側の非キナーゼ領域が関与する。
- (3) Lats2 は微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理により特異的なリン酸化を受けることから、M期チェックポイント制御に関与している可能性がある。
- (4) *LATS2* 遺伝子は、多くの癌患者において欠失が見つけられている第13番染色体長腕 (13q11-q12) に *RB* や *BRCA2* と隣接して座位する。
- (5) 様々なヒト癌細胞株および非遺伝性の癌患者由来の腫瘍組織において高頻度に *LATS2* 遺伝子の (ホモ) 欠失を

PCR 法により検出した。

以上のことから、本研究は *LATS2* が広範囲な一般の癌において重要な癌抑制遺伝子として機能していることを示唆し、ヒトの癌化のメカニズムにおいて細胞周期制御の異常が関与することを強く支持するものである。故に、この仕事は学位の授与に値すると考えられる。