ポイツ・イエーガーズ症候群(Peutz-Jeghers Syndrome:PJS)原因遺伝子LKB1の発見とその機能に関する研究

氏　　　　名	根 津 淳 一
生 年 月 日	
本　　　　籍	山梨県
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博乙第219号
学位授与の日付	平成12年9月29日
学位授与の要件	論文博士（学位規則第4条第2項）
学位授与の題目	Identification and functional characterization of LKB1:the susceptibility gene of Peutz-Jeghers Syndrome (PJS)（ポイツ・イエーガーズ症候群（Peutz-Jeghers Syndrome:PJS）原因遺伝子LKB1の発見とその機能に関する研究）
論文審査委員(主査)	大熊　勝治（薬学部・教授）
論文審査委員(副査)	二階堂　修（薬学部・教授）中西　義信（薬学部・教授） 須田　貴司（がん研・教授）山本　　博（医学部・教授）

学 位 論 文 要 旨

Summary

LKB1 was identified as a novel kinase of unknown function during a systematic screen for novel kinase genes. The chromosomal localization of LKB1 gene was assigned to 19p13.3 where the susceptibility gene of Peutz-Jeghers Syndrome (PJS) was mapped by linkage analysis and comparative genomic hybridization. Mutation analysis of the LKB1 gene in PJS patients resulted in identification of mutations in all PJS patients examined. Therefore LKB1 was considered to be the susceptibility gene of PJS. In order to clarify the molecular mechanism underlying PJS and the physiological function of LKB1, the following functional characterizations were performed. Biochemical analysis revealed that loss of kinase activity as well as the loss of cytoplasmic retention ability of LKB1 were considered to be pathogenic for PJS. The search for the signal transduction pathway in which LKB1 was involved showed that LKB1 suppresses MEK/ERK pathway specifically. By immunohistochemical analysis, it was revealed that LKB1 is preferentially expressed in smooth muscle cells of blood vessel and intestinal muscular layer of mucosa. It was considered that LKB1 contributes to the growth suppression of these types of cells by negatively regulating MEK/ERK pathway. An LKB1 knockout animals are expected to be a useful tool for the characterization of LKB1 function *in vivo* and are now under development.

はじめに

細胞には多数のキナーゼが存在し、様々な細胞内生理機能の制御において重要な役割を果たしていることが良く知られている。未だ同定されていないキナーゼの中から医学的応用上

重要なキナーゼを見出すことを目的に、新規キナーゼの探索とその機能解析に関する研究に着手した。

新規キナーゼの探索 LKB1 遺伝子のクローニング

二通りの異なった方法により新規キナーゼの探索を試みた。まず、各種キナーゼにおいて高度に保存されているアミノ酸配列に対応する縮重（混合）プライマーを用いた RT-PCR（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）法による探索を行ったところ、LKB1 と命名した新規キナーゼ遺伝子を同定することに成功した。さらに、RT-PCR による探索では逃してしまうキナーゼを見出すことを目的に、サブトラクトライブラリーのランダムシークエンシングによる探索も試みた。すなわち、胎児肝臓に特異的に、あるいはより強く発現している遺伝子を濃縮したライブラリーを作製し、ランダムにピックアップしたクローンを順次シークエンシングし、ホモロジー検索を行うことにより新規キナーゼの探索を行った。この方法によっては、VRK1、VRK2、VRK3 と命名したお互いに高い相同性を示す新規キナーゼサブファミリーを同定することに成功した（表 1）。

表 1 本研究によって見出された新規キナーゼ

命名	GenBank Accession	全長（アミノ酸）	染色体マップ	相同性のある既知のキナーゼ
VRK1	AB000449	396	14q32 (D14S265 – AFM063XE7)	ワクシニアウイルス B1R
VRK2	AB000450	508	2p15 – p16 (CHLC.GATA23H01 – D2S357)	ワクシニアウイルス B1R
VRK3	AB031052	474	19q13	ワクシニアウイルス B1R
LKB1	U63333	433	19p13.3	無し

PJS 患者における LKB 1 遺伝子変異の発見

LKB1 は典型的なセリン/スレオニンキナーゼ型のキナーゼドメインを一つ持っており、キナーゼとして機能することが予測された。しかしそれ以外に特徴的なドメイン構造などは存在せず、機能をその構造から予想することは不可能であった。一方、全く独立に行われた研究から、アフリカツメガエル（*Xenopus*）の LKB1 カウンターパート遺伝子（XEEK1）がクローニングされ、報告がなされた。その研究から、*Xenopus* LKB1 は卵母細胞及び未受精の卵に強く発現しているが、受精に伴いその量は速やかに減少することが示された。この知見から、未分化な細胞の分化において LKB1 が何らかの重要な役割を果たしていることが示唆された。

ヒト LKB1 染色体遺伝子は 19 番染色体上の短腕 13.3 領域に存在することが明らかとなった。この領域には PJS の原因遺伝子が存在することが、PJS 患者家系に対する連鎖解析などから示されていた。PJS は常染色体優性遺伝形式で遺伝するヒトの遺伝病であり、胃腸管におけるポリポーシス症と、粘膜や皮膚における色素斑形成を主な症状とする。疫学的な研究から、PJS

患者はまた様々な癌に対する発症リスクが健常人に比較し著しく上昇していることが明らかとなっており、このことから本症候群の原因遺伝子は癌抑制遺伝子様の機能を持つことが推測された（表 2)。*Xenopus* LKB1 についての研究から、LKB1 は細胞の分化調節に対して何らかの関与を持つことが予想されたため、筆者等は LKB1 遺伝子を PJS 原因遺伝子の候補となり得ると考え、ドイツ　マックスプランク研究所の Dieter Jenne 博士等との共同研究として、PJS 患者における LKB1 遺伝子の変異解析を行った。その結果、調べた全ての患者において LKB1 遺伝子の変異が存在することが明らかとなった。さらに他の多数のグループからも同様の報告が相次ぎ、LKB1 遺伝子が PJS の原因遺伝子であることが確証されるに至った。現在までに 60 種類以上の LKB1 遺伝子の変異が PJS 患者において見出されている。これらの大半はフレームシフト、あるいはナンセンス変異により正常よりも短い LKB1 タンパクを産生するタイプ（トランケート型）の変異である（図 1)。

表 2　ポイツ・イエーガーズ症候群 (Peutz-Jeghers Syndrome:PJS)

OMIM	175200
病態	胃腸管における過誤腫性ポリポーシス
	粘膜における色素斑形成
	高発癌（～20 倍？）
	大腸癌、胃癌、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、精巣癌　その他
平均発症年齢	色素斑：（出生 15 日～）10 歳まで
	確定診断：男性 23 歳、女性 26 歳
出現頻度	1 / 8,300～29,000 出生　？
遺伝形式	常染色体優性
原因遺伝子	LKB1（19p13.3)

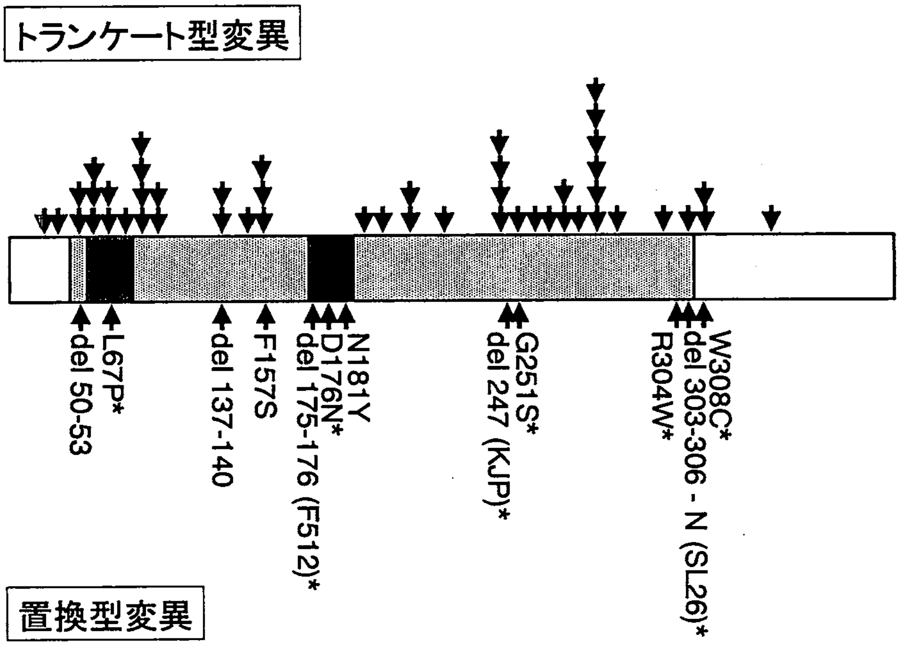

図 1　現在までに報告されている PJS 患者における LKB1 遺伝子変異。中央は LKB1 タンパクの構造を模式的に示したもの。斑点で示した部分はキナーゼドメインをあらわす。濃い灰色で示した部分は、前が推定 ATP 結合部位を、後ろが触媒活性部位をそれぞれ表す。LKB1 タンパク中における各変異の位置を矢印で示した。上はトランケート型の変異、下は置換型変異（数アミノ酸のインフレームでの欠失も含む）の位置をそれぞれ表す。

キナーゼ活性に関する基礎的な解析

LKB1 のキナーゼとしての基本的な性質を調べるため、LKB1 を COS7 細胞にて発現させ、免疫沈降後キナーゼアッセイを行った（図 2 A)。その結果、LKB1 は自己リン酸化能を持つプロテインキナーゼであることが確認された。次にこの自己リン酸化における二価カチオン要求性を調べたところ、LKB1 は Mg^{2+}によってはあまり活性化されず、Mn^{2+}によって強く活性化される性質を持つキナーゼであることが明らかとなった。また、増殖期にある THP1 細胞より内在性の LKB1 を免疫沈降し同様の解析を行ったところ、やはり Mn^{2+}要求性を示すことが確認された（図 2 B)。この結果からはまた、増殖期にある細胞中において、LKB1 のキナーゼ活性は恒常的に活性化状態にあることが示された。

次に、キナーゼ活性を発揮するために必要な最小領域の決定を行ったところ、少なくとも 1-311 アミノ酸残基の領域が必要であることがわかった。PJS において見出されているトランケート型の変異はほとんどがこの領域よりも短いタンパクを生じる変異であるため、それらの変異体はキナーゼ活性を失っているものと考えられた。

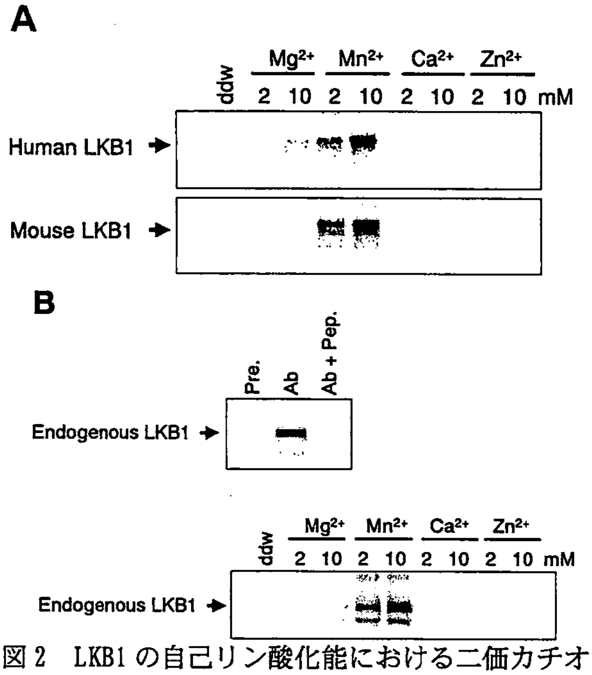

図 2　LKB1 の自己リン酸化能における二価カチオン要求性。A:COS7 細胞にて強制発現させたヒト LKB1、及びマウス LKB1 のキナーゼ活性。B：THP1 細胞から免疫沈降した内在性 LKB1 のキナーゼ活性。上は未免疫血清（Pre.)、抗 LKB1 P3 抗血清（Ab)、及び抗原ペプチド存在下に抗 LKB1 P3 抗血清（Ab + Pep.）でそれぞれ免疫沈降したもの。下は各種二価カチオン存在下における内在性 LKB1 のキナーゼ活性。

LKB1 タンパクの細胞内局在性

次に PJS 患者において見出されているアミノ酸置換型変異体についての解析を行った。アミノ酸置換型変異においてもトランケート型変異の場合と同様に、LKB1 はキナーゼ活性を消失し、それが PJS の発症原因となっていることが単純には予想された。しかし実際にキナーゼ活性を調べたところ、ほとんどの変異体においては確かに活性がほぼ消失しているものの、2 つの変異体においては全く活性が変化していないことが判明した。これらの変異体におい

ては、キナーゼ活性の消失以外の何らかの性質の変化が生じ、LKB1 は本来の機能を発揮できなくなっているものと考えられた。

そこでこれらの変異体における異常を検索したところ、その細胞内局在性が変化していることが見出された。野性型 LKB1 を COS7 細胞に強制発現させると、核とともに細胞質にも一様に分布するが、これらの変異体においては、細胞質への局在が著しく減少しており、核にほぼ特異的に局在していることが明らかとなった。このことから LKB1 がその本来の生理機能を発揮する上で細胞内局在性は重要な意義をもつことが推測された。そこで次に、LKB1 の細胞内局在性を制御する領域の解析を行った。まず核移行に関わる領域のマッピングを試みたところ、N 末側の 1－88 アミノ酸残基の領域に核移行性シグナルが存在することが示された。さらにこれ以外の領域には、LKB1 を細胞質へ保持するように働く能力があることも明らかとなった。この領域の特定も試みたが、この能力には、短いシグナル配列ではなく、広い領域が必要であることが明らかとなった。その必要領域はほぼキナーゼドメインと重なるため、この細胞質への保持能力は、LKB1 がキナーゼドメインを介して細胞質に存在する基質タンパクに結合する能力を反映している可能性がある（図 3)。すなわち、細胞内局在性が変化している変異体は、自己リン酸化能は保持しているものの、基質タンパクに結合しそれをリン酸化する能力を失ってしまったことにより本来の生理機能を発揮できず、PJS の発症原因となっていると考えられる。

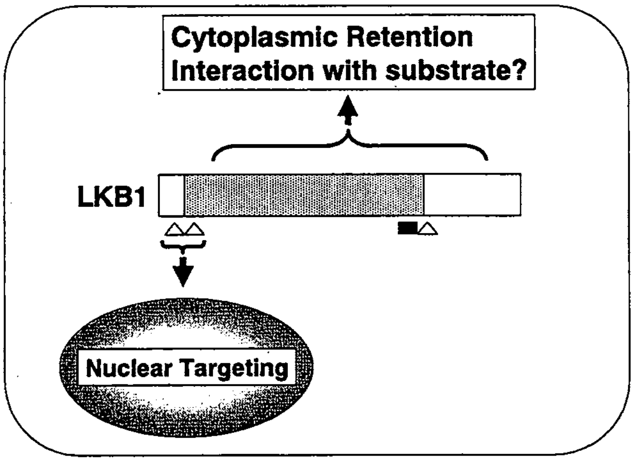

図 3　LKB1 細胞内局在性制御機構のモデル。

MEK/ERK シグナル伝達経路への関与に関する解析

多数のキナーゼがそうであるように、LKB1 もキナーゼとして特定の細胞内シグナル伝達経路に関わっている可能性が考えられる。そこで、様々なレポーター遺伝子を用いた検索により、LKB1 が関与するシグナル伝達経路の特定を試みた。その結果、LKB1 は活性型 K-Ras による血清反応性エレメント（Serum Responsive Element :SRE）の活性化を強く抑制することが明らかとなった。この経路は、Ras により Raf-1 キナーゼが活性化され、それにより MEK1, 2 キナーゼ、ついで ERK1, 2 キナーゼが活性化され、最終的に Elk1 などの転写因子がリン酸化されることにより遺伝子発現が活性化される経路であり、いわゆる Ras/MEK/ERK カスケード

として、主に細胞の増殖調節において非常に重要な役割をしていることが良く知られている。LKB1 はこのシグナル伝達経路のいずれかのステップに対し抑制作用を持つものと考えられた。そこで次に LKB1 が作用するステップの特定を試みたところ、Ras の下流因子である MEK1 よりも下流で作用していることが明らかとなった。この抑制作用はキナーゼ活性依存的であり、PJS 患者において見出されたキナーゼ活性が減弱している変異体は、抑制作用も著しく減弱していることが示された(図 4)。さらに、いくつかの代表的なシグナル伝達経路に対する LKB1 の作用を調べたところ、いずれに対してもほとんど作用を示さず、少なくとも調べた範囲において LKB1 は MEK/ERK 経路に特異的な抑制因子であることが示唆された。MEK/ERK 経路は癌遺伝子である Ras からの増殖性のシグナルを核へ伝達する経路として、癌化において重要な関与をしていることが知られている。PJS 患者においては、遺伝子変異により LKB1 による MEK/ERK 経路の抑制が解除され、ポリープ形成や癌発症率の上昇といった症状が表れるという仮説が考えられた。

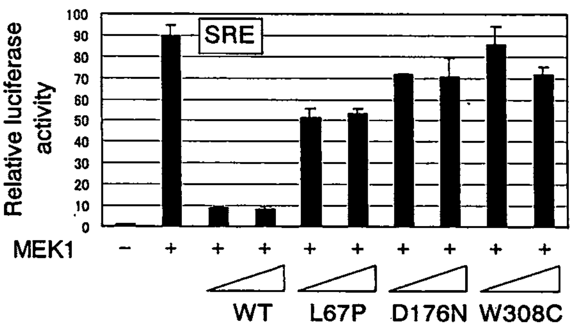

図 4　活性化型 MEK1 による人工的 SRE の活性化に対する野性型（WT)、及び各種 LKB1 変異体（L67P、D176N、W308C）の影響。三角は左から右へかけてトランスフェクションしたプラスミド DNA の量が増えていることを表す。活性化されていない場合のルシフェラーゼ活性を 1 とし、平均 + 標準偏差 (n=3) で表した。

<u>免疫組織染色による解析</u>

LKB1 の組織レベルにおける機能の解明を目指し、LKB1 の組織分布を調べた。ノーザン解析からは、ヒト、マウスとも全ての調べた組織におけるユビキタスな発現があることが示された。次に特異抗体を用いた免疫組織染色によりさらに詳細な局在の検討を行った。その結果、LKB1 は血管平滑筋細胞、及び同じく平滑筋細胞からなる胃腸管の粘膜筋板において強く発現していることが明らかとなった。実際、PJS 患者において生じるポリープは、一般の上皮性細胞を起源とするポリープとは異なり、粘膜筋板の平滑筋細胞が異常増殖することによるポリープであることが知られている。これらのことより、LKB1 は粘膜筋板平滑筋細胞における細胞増殖制御に特に強く関与している可能性が考えられた（図 5)。

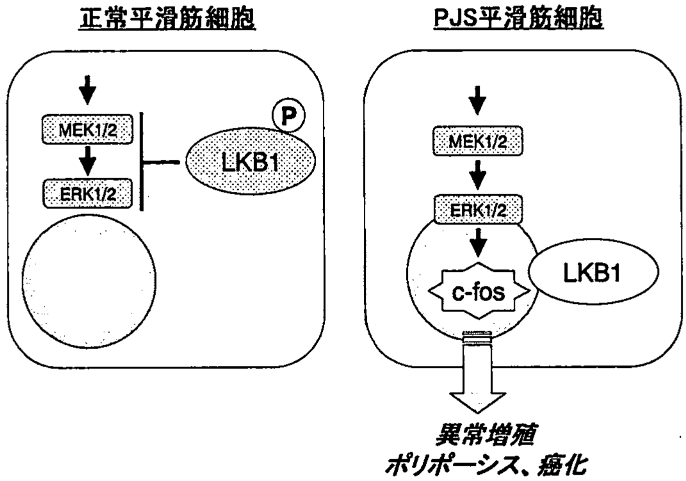

図5　平滑筋細胞における LKB1 の機能。正常の平滑筋細胞（左）では LKB1 による MEK/ERK シグナル伝達経路の抑制により、細胞増殖が抑制されている。PJS 患者の平滑筋細胞（右）では遺伝子変異により LKB1 による抑制が解除され、c-fos などの増殖に必要な遺伝子の発現が増加する。その後さらに遺伝子変異を経て、細胞の異常増殖、ひいてはポリポーシスや癌化が引き起こされると予想される。

まとめ

新規キナーゼ探索によって見出した LKB1 遺伝子は、PJS の原因遺伝子であることが明らかとなった。LKB1 は細胞増殖における重要なシグナル伝達系である MEK/ERK 経路を特異的に抑制する作用を持つことが判明した。LKB1 は血管平滑筋細胞や、胃腸管の平滑筋細胞に強く発現しており、これらの細胞において細胞増殖制御に特に強く関与している可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

当該論文に関し，8月1日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえて，同日の審査委員会において慎重審議を行った結果，次のとおり判定した。

本研究は，医学応用上重要なキナーゼを探索する研究の中から発見された新規キナーゼLKB1に関する機能解析研究である。先ず，LKB1遺伝子が，癌高発症率を伴い胃腸管ポリポーシス症と粘膜・皮膚色素斑形成を主症状とする常染色体優性ヒト遺伝病である，ポイツ・イエーガーズ症候群(Peutz-Jeghers Syndrome：PJS)の原因遺伝子の一つであることを，PJS患者LKB1遺伝子の変異解析と他研究グループの知見との突き合わせを通じて明らかとした。その上で，癌抑制遺伝子として働くと予想される本キナーゼの生化学的特徴を明らかにするとともに，各種欠失変異体の解析からキナーゼ活性発現に必要な最小領域を決定し，PJS患者の大半で見出されるトランケート型変異がキナーゼ活性の消失を起こすことを示した。また，アミノ酸置換型変異体の解析から，LKB1のキナーゼ活性消失とともに細胞質局在性消失もPJSの発症原因になっていることを示し，LKB1のN末側に核移行シグナルが存在する他，キナーゼドメインと重複する広い領域にLKB1を細胞質に保持する機能が存在することを示した。また，LKB1がRas/MEK/ERK経路をMEK1よりも下流で抑制することを，レポーター遺伝子を用いて明らかにし，LKB1がRas/MEK/ERK経路の新たな抑制蛋白質であることを明らかにした。更に，LKB1は，ノーザン解析では広く全ての組織に発現しているが，免疫組織染色では血管平滑筋細胞と胃腸管粘膜筋板平滑筋細胞とに強く発現していることから，特にこれら細胞の増殖抑制にLKB1が強く関与している可能性を示唆した。

以上，LKB1遺伝子を発見しその機能の一端を解明した本研究は，PJSの発症機序解明に止まらず，動脈硬化症等平滑筋細胞の増殖制御機構解明の一助となる可能性を期待させるものであり，広く細胞増殖制御機構と疾患の解明に貢献する業績である。よって，その内容は博士(薬学)論文に値すると判定する。