

v-Srcによるがん化に抵抗する  
LATS2のキナーゼ活性非依存機能の解析

2020 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】 生化学分野

池内正剛





本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また本論文は、一部、未発表のデータも含んでいる。

1. Masayoshi Ikeuchi, Ryuzaburo Yuki, Youhei Saito, Yuji Nakayama. The tumor suppressor LATS2 reduces v-Src-induced membrane blebs in a kinase activity-independent manner. *FASEB J.*, **2021**, 35, e21242. [第 1-3 章]
2. Masayoshi Ikeuchi, Yasunori Fukumoto, Takuya Honda, Takahisa Kuga, Youhei Saito, Naoto Yamaguchi, Yuji Nakayama. v-Src causes chromosome bridges in a caffeine-sensitive manner by generating DNA damage. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, 17, 871. [第 3 章]

# 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程： 薬学専攻博士課程

氏名（英字名）： 池内正剛（Masayoshi Ikeuchi）

学位論文題目： v-Srcによるがん化に抵抗するLATS2のキナーゼ活性非依存機能の解析

## 序章

日本における死因の第1位はがんであり、罹患数の多い大腸がんや乳がんではc-Srcチロシンキナーゼの活性亢進や過剰発現が知られている。ラウス肉腫ウイルスから発見されたがん遺伝子産物v-Srcはc-Srcの活性異常亢進型であり、増殖促進や足場非依存的増殖能の獲得により細胞をがん化する。しかし、v-Srcの細胞増殖抑制効果も報告され、v-Srcによる細胞がん化機構の全貌が解明されたわけではない。Hippo経路は、正常細胞の過剰増殖を抑制するシグナル伝達経路であり、細胞間の接着などによりLATS1/2キナーゼが活性化し転写共役因子YAPをリン酸化して細胞増殖を抑制する。このHippo経路の破綻は自律性増殖につながり、SrcはPI3K経路の活性化やYAPのリン酸化などを介してこの経路を抑制するが、未解明の機構も示唆されている。しかし、v-Srcによる細胞増殖の抑制は、SrcによるHippo経路の抑制が細胞増殖に直結しないことを示している。そこで、v-Srcによる細胞がん化機構の解明を目指し、LATS2に対する作用を介したHippo経路の破綻と、惹起される細胞応答を解析した。

## 第1章 v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下とキナーゼ活性に依存しない機能

v-SrcがHippo経路を抑制する複数の機構が報告されており、LATS2の翻訳後修飾の関与を調べた。EGFP-LATS2、V5-LATS2、EGFP-LATS1（アイソフォーム2）、内在性LATS2のv-Src発現細胞からの免疫沈降により、LATS2のチロシンリン酸化の亢進を見出した。NIH3T3細胞において、v-SrcはLATS2を特異的にモビリティシフトさせた。また、*in vitro*キナーゼアッセイにおいて、v-Srcやc-SrcによるLATS2のリン酸化が観察され、*in vitro*でc-Srcによりリン酸化されたLATS2によるYAPのリン酸化が低下した。よって、c-Src/v-SrcによるLATS2のチロシンリン酸化がLATS2のキナーゼ活性を低下させることが明らかになった。

LATS2のキナーゼ活性に依存しない機能が報告されている。そこで、v-Src発現細胞でLATS2をノックダウンすると、v-Srcにおいて観察された細胞膜の突出（ブレブ）が増加し、野生型LATS2のみならず、キナーゼ不活性型LATS2の再発現はこのブレブ形成を抑制した。すなわち、v-Src発現細胞で、LATS2はキナーゼ活性に依存せず細胞膜の剛性維持に関わることが示唆された。興味深いことに、v-Src発現やHT29細胞の内在性c-Srcの活性化によりLATS2の発現レベルが上昇し、この上昇はYAPノックダウンにより抑制された。LATS2のmRNAレベルはv-Src発現により上昇したが、LATS1は変化しなかった。一方、プロテアソーム阻害、オートファジー阻害ではこのような発現上昇は観察されなかった。よって、v-SrcによるHippo経路の抑制がYAPの転写活性抑制を解除し、その結果、YAPを介した転写亢進に依存してLATS2の発現レベルが上昇することが明らかになった。これらの結果は、v-SrcはHippo経路の中心的なキナーゼであるLATS2のキナーゼ活性を抑制するが、LATS2はYAP依存的な転写亢進により過剰発現し、キナーゼ活性に依存せずにv-Srcによるブレブ形成を抑制することを示している。

## 第2章 Merlinとの結合に依存したLATS2のブレブ形成抑制

Hippo経路の活性化において、LATS2はERMファミリータンパク質のMerlinと結合して細胞膜へ運ばれる。Merlinは、細胞膜とアクチン骨格を架橋する働きを持ち、LATS2と同様にMerlinのノックダウンもv-Srcによるブレブ形成を亢進させた。MerlinはLATS2には依存せず細胞膜に局在したが、LATS2はMerlin非導入細胞では細胞膜に局在せず、膜局在したMerlinと共局在した。v-Src発現により、細胞膜上で外因性のMerlinとLATS2の共局在が促進したが、Merlin結合部位を欠く変異体LATS2は共局在を示さず、再発現してもLATS2ノックダウンによるブレブ形成亢進を抑制しなかった。Merlin Ser518のリン酸化はMerlinを他分子と相互作用しない不活性型にするが、v-Src発現細胞ではそのリン酸化が減少し、Merlinと共沈降するLATS2の量が増加した。ERMファミリーに属するezrinも細胞膜とアクチン骨格を架橋してブレブを退縮させるが、Merlin同様、ezrinのノックダウンもv-Srcによるブレブ形成を亢進させた。これらの結果から、v-Srcはブレブ形成を引き起こすが、同時に細胞膜において形成促進したLATS2-Merlin複合体が細胞膜-アクチン骨格架橋を強固にしてブレブ形成を抑制することが示唆された。

## 第3章 v-Srcにより惹起されるDNA損傷応答

LATS2 はがん抑制遺伝子として知られている。LATS2 のノックダウンによるブレブ形成促進は、LATS2 が v-Src によるブレブ形成を抑制することを示している。ブレブ形成の原因がアポトーシス誘導であれば、v-Src による細胞死をがん抑制遺伝子産物である LATS2 が抑制することになる。しかし、LATS2 ノックダウンでは v-Src による生存細胞数減少は影響を受けず、アポトーシスの指標である活性型 caspase-3 も検出されなかった。一方、v-Src は DNA 損傷などにより誘発される染色体架橋形成を誘導した。v-Src 発現細胞で DNA 損傷の指標である  $\gamma$ H2AX が Src 活性に依存して検出され、ATM/ATR 経路の下流で Chk1/Chk2 キナーゼの活性化を誘導した。よって、v-Src 発現により誘導される DNA 損傷が、ATM/ATR 経路の活性化を介して細胞周期停止を誘導することが示唆され、v-Src 発現細胞で観察される増殖抑制に DNA 損傷応答の関与が推定された。

## 総括

本研究は、v-Src が LATS2 をリン酸化して不活性化し Hippo 経路を破綻させること、さらに、LATS2 のキナーゼ活性に依存せず LATS2-Merlin 複合体が v-Src によるブレブ形成を抑制することを明らかにした。ブレブの拡張と退縮は浸潤・転移に関与するため、LATS2 は Hippo 経路が破綻してもキナーゼ活性非依存的にがん抑制に働くと考えられる。よって、v-Src は様々なシグナル経路を活性化するが、細胞はブレブ形成の抑制や DNA 損傷応答により、v-Src による浸潤・転移、形質転換を阻止する。しかし、v-Src は DNA 損傷の蓄積や染色体分配異常を引き起こし、その結果獲得された遺伝的多様性を示す細胞集団から自律性増殖を獲得した細胞が選択されて増殖し、がん細胞が生まれると推測している。本研究は、Src の活性亢進や過剰発現を伴う細胞のがん化に新しい知見を提供し、がんの新規の治療戦略に繋がる可能性を持つ。

# 目次

序論	1
本論	
第1章 v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下とキナーゼ活性に依存しない機能	
1-1 緒言	7
1-2 実験方法	8
1-2-1 材料	8
1-2-2 v-Srcの誘導発現	10
1-2-3 Gateway組換えクローニングテクノロジーを用いたプラスミドDNAの作製	10
1-2-4 LATS2のTyr655とTyr879への変異導入	12
1-2-5 V5-LATS2-WTと-S872AのウイルスベクターpLX301への組換え	13
1-2-6 短鎖ヘアピンRNA (shRNA) 発現プラスミドDNAの作製	15
1-2-7 プラスミドDNAの一過性導入	15
1-2-8 細胞へのsmall interfering RNA (siRNA) の導入	16
1-2-9 レンチウイルスを用いた安定発現株の樹立	16
1-2-10 免疫蛍光染色法	17
1-2-11 ウェスタンブロッティング解析	17
1-2-12 Phos-tag SDS-ポリアクリルアミド電気泳動	18
1-2-13 免疫沈降法	18
1-2-14 各種タンパク質の精製方法	19
1-2-15 <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ	20
1-2-16 定量的リアルタイムPCR	21
1-2-17 ブレブ形成率の評価	22
1-2-18 統計解析	22
1-3 実験結果	23
1-3-1 v-SrcによるLATS2キナーゼ活性の抑制	23
1-3-2 LATS2のキナーゼ活性非依存的機能	27
1-3-3 YAPを介した、v-SrcによるLATS2の発現量増加	31
1-4 考察	36
1-5 小括	38
第2章 Merlinとの結合に依存したLATS2のブレブ形成抑制	
2-1 緒言	39
2-2 実験方法	40
2-2-1 材料	40
2-2-2 v-Srcの誘導発現	40
2-2-3 V5-LATS2 Δ71-88発現プラスミドの作製	40
2-2-4 レンチウイルスによる安定発現株の樹立	42

2-2-5	細胞へのsiRNAの導入	42
2-2-6	プラスミドDNAの一過性導入	42
2-2-7	ウエスタンブロッティング解析	42
2-2-8	免疫沈降法	42
2-2-9	免疫蛍光染色法	43
2-2-10	内在性Merlinの細胞膜局在の評価	43
2-2-11	ブレブ形成率の評価	43
2-2-12	Merlin-FLAGとV5-LATS2の共局在の評価	43
2-2-13	統計解析	44
2-3	実験結果	45
2-3-1	v-Srcにより誘発されるブレブの形成機構	45
2-3-2	v-SrcによるLATS2-Merlin複合体の細胞膜局在促進	46
2-3-3	Merlinとの結合に依存したLATS2のv-Src誘導性ブレブの抑制	49
2-4	考察	51
2-5	小括	53
<b>第3章 v-Srcにより惹起されるDNA損傷応答</b>		
3-1	緒言	54
3-2	実験方法	55
3-2-1	材料	55
3-2-2	v-Srcの誘導発現	56
3-2-3	細胞へのsiRNAの導入	56
3-2-4	免疫蛍光染色法	56
3-2-5	ウエスタンブロッティング解析	56
3-2-6	アドリマイシン処理によるアポトーシスの誘導	56
3-2-7	Water Soluble Tetrazorium-8 (WST-8) を用いた細胞生存率の評価	56
3-2-8	Operettaを用いた蛍光シグナルの定量解析	57
3-2-9	染色体架橋の評価	57
3-2-10	ブレブ形成率の評価	57
3-2-11	統計解析	57
3-3	実験結果	58
3-3-1	v-Srcにより誘導されるブレブ形成細胞はアポトーシスの特徴を示さない	58
3-3-2	v-SrcによるDNA損傷応答の誘導	59
3-3-3	v-SrcによるDNA損傷応答経路の活性化	64
3-4	考察	66
3-5	小括	68
総括		69
引用文献		73
謝辞		81
補足データ		82

## 略語表

Ala	Alanine
AMOT	angiomotin
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BSA	bovine serum albumin
Cbp	Csk-binding protein
CDK	cyclin-dependent kinase
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
COX-2	cyclooxygenase-2
Csk	C-terminal Src kinase
CTGF	connective tissue growth factor
Ctrl	control
Cyr61	cysteine-rich angiogenic inducer 61
Dox	Doxycycline
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ERM	ezrin-radixin-moesin
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FERM	four-point-one ezrin radixin moesin
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathione S-transferase
HA	hemagglutinin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HR	homologous recombination
IF	immunofluorescence staining
IP	immunoprecipitation
KAP1	Kruppel-associated Box (KRAB)-associated co-repressor
LATS	large tumor suppressor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Merlin	moesin-ezrin-radixin-like protein
MOB	Mps one binder
MMP	matrix metalloproteinase
MST	mammalian Ste20-like kinase

NHEJ	non-homologous end joining
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAK	p21-activated kinase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEI	polyethylenimine
Phe	Phenylalanine
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
ROCK	Rho-associated protein kinase
SA	Serine to Alanine
SAV1	Salvador homolog 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	Serine
SFK	Src family kinase
SH	Src homology
siRNA	small interfering RNA
TAOK	TAO kinase
TAZ	transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TEAD	TEA domain transcription factor
Thr	Threonine
TTBS	tween tris buffered saline
Tyr	Tyrosine
VEGF	vascular endothelial growth factor
WB	Western Blotting
WST-8	water soluble tetrazorium-8
WT	wild-type
YAP	Yes-associated protein
YF	Tyrosine to Phenylalanine
$\gamma$ H2AX	phospho-histone H2A.X (Ser139)

## 序論

日本において、がんは1981年以降38年間連続で死因の第1位であり、罹患数の多い大腸がんや乳がんではがん原遺伝子産物であるc-Srcの活性亢進や過剰発現が知られている<sup>1-4</sup>。c-Srcは、増殖因子などからの細胞外シグナルを様々な下流の細胞内シグナル経路へと伝え、そのシグナルの亢進は、種々のシグナルを活性化し、がん形質に特徴的な表現型を発現させる。そのため、c-Srcを標的とした抗がん剤は幅広い種類のがんに適応できる可能性を秘めており、がん治療薬の標的として注目されている。

非受容体型チロシンキナーゼであるc-Srcは、c-Src、Lck、Lyn、Blk、Hck、Fyn、Fgr、Yesの8種類のタンパク質を含むSrcファミリーキナーゼ（SFKs）の1つである<sup>5,6</sup>。その構造は、N末端側からSrc homology (SH) 4ドメイン、Src ユニークドメイン、SH3ドメイン、SH2ドメイン、リンカー領域、キナーゼドメイン、C末端ドメインで構成されている（図Ⅰ）<sup>7</sup>。c-SrcはN末端のメチオニンが除去されミリスチン酸による脂質修飾を受ける（図Ⅰ：以下に示すc-Src/v-Srcのアミノ酸番号はN末端のメチオニンを1番目としたときの番号を示す）。脂質修飾を受けたc-Srcは、膜タンパク質、スフィンゴ脂質、コレステロールに富んだ膜領域（ラフト）と非ラフト領域の両方に分布する<sup>5,6,8</sup>。c-Srcのチロシンキナーゼ活性は分子内結合によって緻密に制御されている。ラフト領域に存在するCsk-binding protein (Cbp) にC-terminal Src kinase (Csk) が結合し、c-SrcのC末端ドメインに存在する530番目のチロシン残基 (Tyr530) がCskによってリン酸化されると、このリン酸化されたチロシン残基に分子内のSH2ドメインが結合し、さらにリンカー領域がSH3ドメインに結合することで不活性型の構造になる（図ⅡA）<sup>7,8</sup>。一方、上皮成長因子 (EGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) などのリガンドが受容体に結合すると、受容体の自己リン酸化されたチロシン残基にc-SrcのSH2ドメインが結合し（図ⅡB）<sup>4,9</sup>、さらに、c-Srcのキナーゼドメインに存在するTyr419が自己リン酸化されるとc-Srcは活性型になる（図ⅡB）<sup>9</sup>。同様に、細胞接着分子であるインテグリンに細胞外マトリックスが結合するとfocal adhesion kinase (FAK) の自己リン酸化が起り、そのリン酸化されたチロシン残基にc-SrcのSH2ドメインが結合してc-Srcが活性化する<sup>4,9</sup>。このように、細胞は、EGFやVEGFなどのリガンド刺激、細胞外基質との結合などによる細胞外からの刺激に応答してc-Srcを活性化し、Srcシグナルによるphosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt経路、MEK/ERK経路などの亢進を介して細胞の生存、増殖を制御している。しかし、c-Src活性化変異、Cbpの発現量低下、EGFRの活性型変異や発現量増加が大腸がんなどから見つかっており<sup>8,10,11</sup>、c-Srcの異常な活性化は細胞をがん化へと導く。

ラウス肉腫ウイルスから同定されたSrc遺伝子 (v-src) は、初めて発見されたがん遺伝子であり、v-srcの相同遺伝子としてニワトリの正常細胞からc-srcが同定された<sup>12</sup>。c-SrcのC末端ドメインには不活性型への変換に必要なチロシン残基（ヒト:Tyr530, ニワトリ:Tyr527）が存在する一方、v-SrcのC末端ドメインには存在しないため、常に活性化状態にある（図ⅡC）<sup>13</sup>。そのため、c-Srcの活性異常亢進型であるv-Srcは、Srcの研究に広く用いられている。v-Srcは、STAT3やc-Mycの活性化、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路の活性化による増殖亢進、PI3K/Aktシグナル経路の活性化による生存亢進を引き起こす（図Ⅲ）<sup>13,14</sup>。さら



に、v-SrcはE-カドヘリンのタンパク質レベルの減少と細胞間接着の減少<sup>15-17</sup>や、p190 Rho-GAPの活性化によるRhoAの不活化を介したアクチンストレスファイバーの消失を引き起こし、遊走を促進する(図Ⅲ)<sup>13,18</sup>。また、多くの細胞は細胞外マトリックス (ECM) を足場にして増殖しており、足場を除くとG1期に停止して死に至るが、v-SrcによるSTAT3の活性化は足場の無い条件下でも増殖できる能力(足場非依存的増殖能)を獲得させる<sup>13,19</sup>。このように、v-Srcは、様々なシグナル経路を活性化し、細胞をがん化させる。その一方で、ニワトリのSrcのTyr527をPheに置換した活性異常亢進型c-Srcの発現による増殖抑制、v-Src発現による増殖抑制、v-Srcによるp53に依存しないアポトーシス誘導が報告されている<sup>20-22</sup>。つまり、v-Srcが細胞増殖に与える影響に関しては相反する報告があり、v-Srcによる細胞がん化機構の全貌は未だ解明されていない。

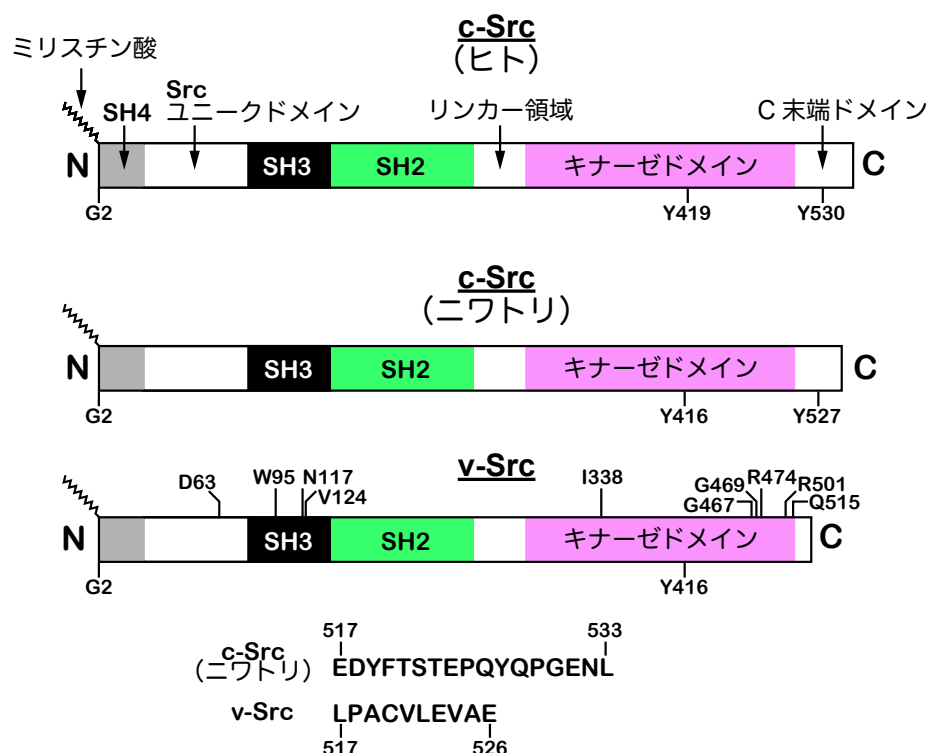
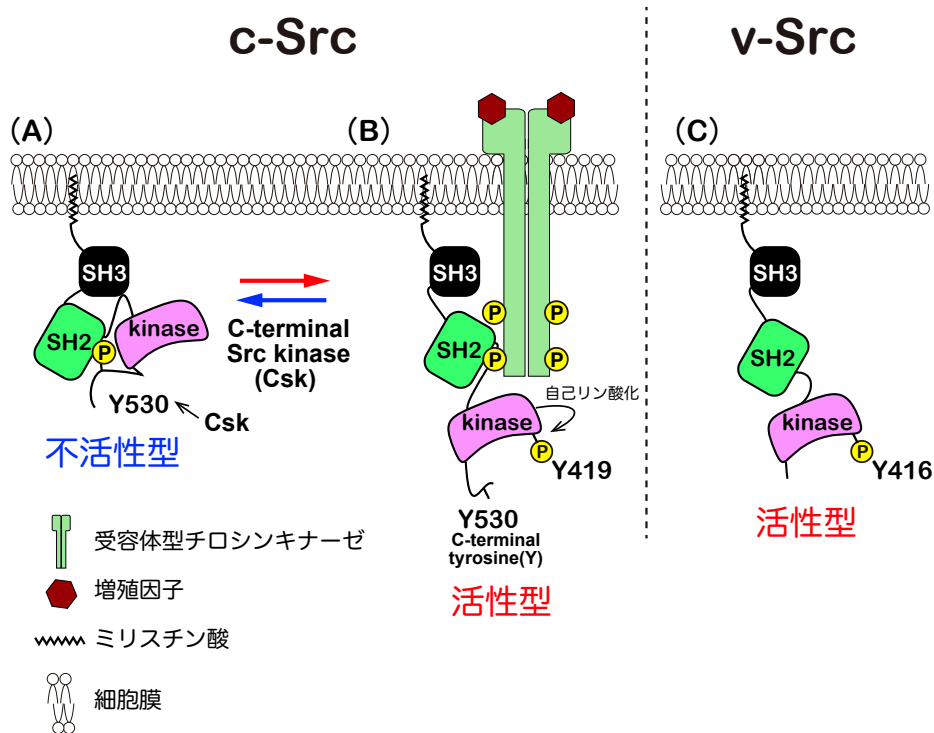


図 I. c-Srcとv-Srcの1次構造

c-Src、v-SrcのN末端のメチオニンが外れ、N末端から2番目のグリシン (Gly2: G2) にミリスチン酸が付加したときの1次構造を示す。c-Src (ヒト) は536アミノ酸、c-Src (ニワトリ) は533アミノ酸、v-Srcは526アミノ酸からなる。c-Srcとv-Srcは、それぞれN末端側からSH4ドメイン、Srcユニークドメイン、SH3ドメイン、SH2ドメイン、リンカー領域、キナーゼドメイン、C末端ドメインを持つ。v-SrcはC末端側の配列を一部欠いており、不活性型の制御に必要なチロシン残基 (Tyr530) が存在しない。v-Srcとc-Src (ニワトリ) のアミノ酸を比較するとv-Srcには変異が存在する<sup>23</sup>。変異しているアミノ酸をv-Srcの1次構造の上に示す。また、c-Src (ニワトリ) とv-Srcの517番目以降のアミノ酸配列を下に示す。アミノ酸番号は、N末端のメチオニンを1番目とした時の番号で示す。

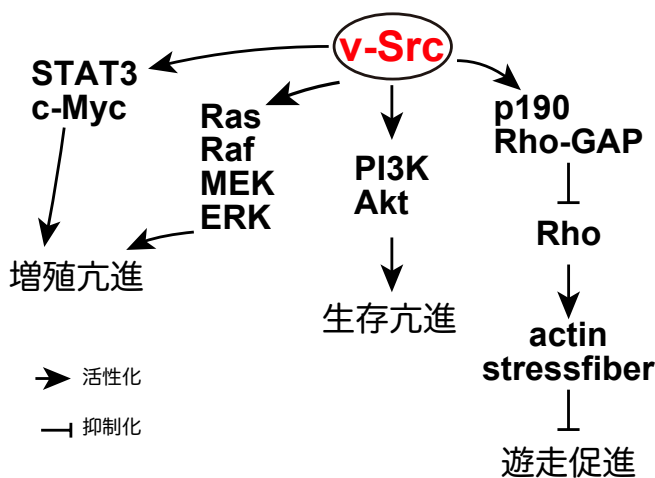
# 非受容体型チロシンキナーゼ



図Ⅱ. c-Srcとv-Srcの活性化制御モデル

c-Src、v-SrcのN末端のメチオニンが外れてミリスチン酸が付加し、c-Src、v-Srcは細胞膜に係留する。

(A) c-Srcは、C末端ドメインに存在するTyr530がCskによってリン酸化されると、リン酸化されたTyr530がSH2ドメインに結合し、SH2とキナーゼドメインの間のリンカー領域がSH3ドメインに結合して不活性型になる。(B) 受容体型チロシンキナーゼに増殖因子が結合し自己リン酸化すると、そのリン酸化されたチロシン残基がc-SrcのSH2に結合しc-Srcを開いた構造にする。その後、c-Srcのキナーゼドメインに存在するTyr419が自己リン酸化されて活性型になる。(C) v-SrcはC末端ドメインが短く、不活性型の制御に必要なチロシン残基を持たないため、不活性型の構造になれず常に活性型である。図の番号は、N末端のメチオニンを1番目とした時のアミノ酸番号を示す。



図Ⅲ. v-Srcが細胞に与える影響とそのシグナル伝達経路

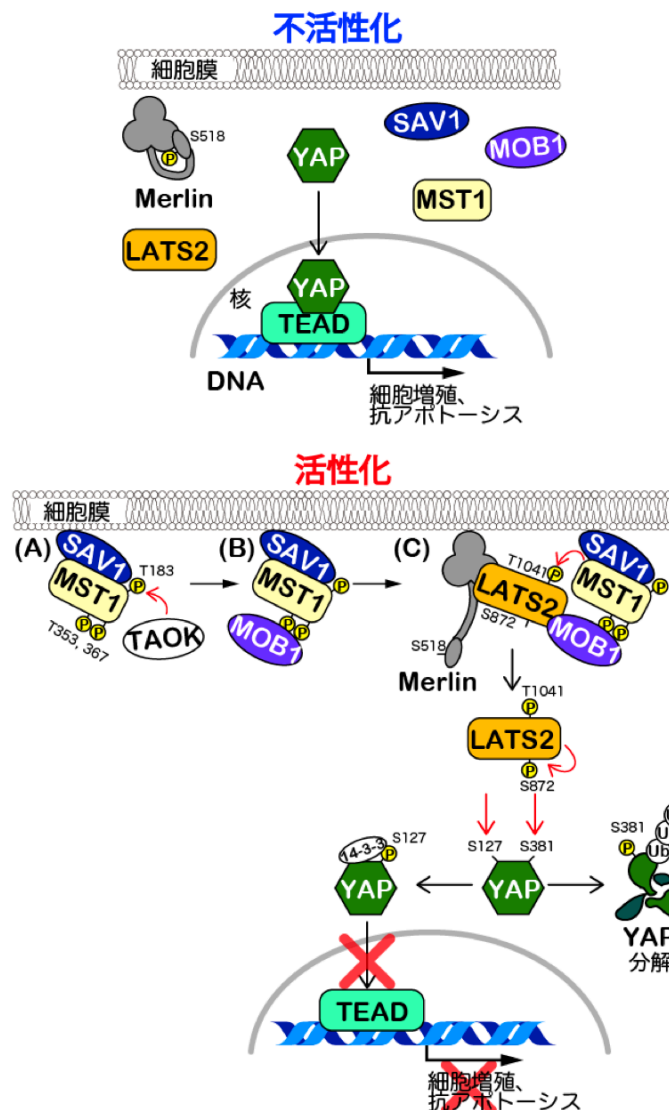
v-Srcは、様々な経路を介して、細胞増殖亢進、生存亢進、遊走促進を引き起こす。

がんの特徴には、自律性増殖、浸潤・転移、悪液質の3つが挙げられ、その中でも、自律性増殖は、良性がん・悪性がん両方に共通する特徴である。通常、細胞増殖は厳密に制御されており、細胞同士が接触するまで細胞密度が高くなると細胞増殖は停止し、培養細胞レベルでは単層状態で止まる。このような細胞増殖抑制機構を接触阻害と言い、Hippo経路が関与する<sup>24</sup>。細胞の過剰増殖を抑制するHippo経路は、細胞間接着、細胞外基質の硬度や細胞剛性などの機械的刺激を感知して活性化し、臓器の大きさ、組織の恒常性、細胞の分化などを制御する。一方、Hippo経路の破綻は自律性増殖能の獲得につながり、培養細胞レベルでは細胞同士が接触しても増殖し続け、単層状態を超えて多層状態になる。つまり、生体内でのHippo経路破綻は腫瘍形成につながる。

細胞密度が低い状態ではHippo経路は抑制され、転写共役因子Yes-associated protein (YAP) またはそのパラログであるtranscriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) の転写因子TEA domain transcription factor (TEAD) への結合が、connective tissue growth factor (CTGF)、cysteine-rich angiogenic inducer 61 (Cyr61) などの増殖関連因子や、cyclooxygenase-2 (COX-2)、Survivinなどのアポトーシス抑制因子の発現を促進する(図IV上)<sup>25-28</sup>。一方、細胞密度が高い状態ではHippo経路は活性化し、がん抑制遺伝子large tumor suppressor kinase 1/2 (LATS1/2)、mammalian Ste20-like kinase 1/2 (MST1/2) とそのアダプタータンパク質であるSalvador homolog 1 (SAV1)、Mps one binder 1 (MOB1)、および、moesin-ezrin-radixin-like protein (Merlin) によるシグナル経路がYAPを介した転写の亢進を抑制する(図IV下)<sup>28,29</sup>。

細胞が、細胞内外からHippo経路を活性化する刺激を感知すると、活性型MST1がThr353とThr367を自己リン酸化する。そして、MST1がSAV1と複合体を形成して細胞膜に局在し、自己リン酸化したMST1のスレオニン残基にMOB1が結合する<sup>30</sup>。p21-activated kinases (PAK) やprotein kinase A (PKA) によってリン酸化され得るSer518が脱リン酸化されたMerlinとLATS2が複合体を形成し細胞膜に局在すると、SAV1-MST1-MOB1複合体とLATS2-Merlin複合体が細胞膜に局在し、LATS2-Merlin複合体のLATS2がMOB1を介してSAV1-MST1-MOB1複合体に結合する。MST1によってLATS2 (Thr1041) がリン酸化され、活性化ループの自己リン酸化(Ser872) によりLATS2は完全な活性型になる。このLATS2は、YAPに存在する複数のセリン残基をリン酸化し<sup>31</sup>、Ser127がリン酸化されたYAPは、細胞質アダプタータンパク質である14-3-3と結合することで細胞質に保持される。Ser381がリン酸化されたYAPはユビキチンプロテアソーム系によって分解される。つまり、LATS2によるYAPのリン酸化は、YAPの核移行阻害や分解を引き起こすことで、YAPを介した転写亢進を阻害する。

# Hippo 経路



図IV. Hippo経路活性化の制御機構

(上図) 細胞密度が低くHippo経路が不活性な状態では、YAPがTEADに結合する。YAP/TEADによる転写が亢進すると、細胞増殖関連因子やアポトーシス抑制因子の発現が促進する。この時Merlinは、Ser518のリン酸化によりN末端側のFERM (four-point-one ezrin radixin moesin) ドメインとC末端ドメインが結合し完全に閉じた構造をとっている。

(下図) 細胞過密が高いときなどにHippo経路は活性する。(A) 詳細な機構は明らかになっていないが、まず初めにTAOK (TAO kinase) の活性化が起こる<sup>29,32</sup>。TAOKによりThr183がリン酸化された活性型MST1は、リンカー領域に存在するThr353、Thr367を自己リン酸化する。このMST1とSAV1は複合体を形成し、細胞膜上に局在する。(B) MOB1がリン酸化されたMST1のThr353、Thr367に結合し、細胞膜上にSAV1-MST1-MOB1複合体が形成する。(C) LATS2はSer518のリン酸化が外れたMerlinとの結合により細胞膜上へ運ばれる。Merlin-LATS2複合体のLATS2はMOB1を介してSAV1-MST1-MOB1複合体に結合し、LATS2のThr1041がMST1によりリン酸化される。リン酸化されたLATS2は、Ser872を自己リン酸化することで完全な活性型へと変化し、YAP (Ser61, Ser109, Ser127, Ser164, Ser381) をリン酸化する。リン酸化されたYAPは、14-3-3による細胞質保持やユビキチンプロテアソームによるタンパク質分解により核内に移行できなくなり、YAP/TEADによる転写は起こらず細胞増殖の亢進が抑制される。(MST1とMST2、LATS2とLATS1はそれぞれ同様の働きをする)

大腸がんや乳がんなどを含む多くの固形がんで YAP/TAZ を介した転写が亢進しており、YAP/TAZ を介した転写の亢進が大部分の固形がんのがん化やがんの成長に関与している<sup>33,34</sup>。さらに、がん細胞における YAP/TAZ を介した転写亢進は、細胞の増殖、生存、浸潤、遊走、転移を促し、化学療法、放射線治療、免疫療法に対する治療抵抗性に繋がる<sup>33,34</sup>。しかし、YAP の上流にある SAV1、MST1/2、LATS1/2 の変異は、ヒトのがんでほとんど観察されず<sup>35</sup>、がん組織で YAP の転写亢進が起こる機構は完全にはわかっていない。YAP の上流分子の変異に依存せず、YAP を介した転写が亢進する原因の 1 つに Src の活性化がある。Src は、PI3K 経路の活性化を介した LATS2 のキナーゼ活性抑制 (図VA) や、YAP (Tyr341, Tyr 357, Tyr 394) のリン酸化 (図VB) などを通して YAP による転写調節を亢進させ、腫瘍形成や転移などを促す<sup>36,37</sup>。しかしながら、v-Src による LATS2 の翻訳後修飾が LATS2 のキナーゼ活性を抑制する可能性を見出した<sup>38</sup>ことから (図VC)、Src による Hippo 経路の抑制機構が完全に分かったわけではなく、さらに解析する必要がある。

上述の様に v-Src による細胞増殖抑制が報告されていることは、Src による Hippo 経路の破綻が細胞増殖には直結しないことを示している。このことから、細胞は v-Src により活性化されるがん化シグナルに抵抗するため、細胞応答を惹起し v-Src による細胞がん化・がん悪性化を抑制するように働くと考えている。そこで本研究では、v-Src による Hippo 経路抑制機構を探索するために、Hippo 経路の中心的なキナーゼである LATS2 への v-Src の影響を解析した。さらに、v-Src により活性化される増殖シグナルや生存シグナルに対して細胞が抵抗する方法を見出すため、v-Src により惹起される細胞応答を解析した。本研究は、これらの解析結果から v-Src による細胞がん化機構を解明することを目指した。

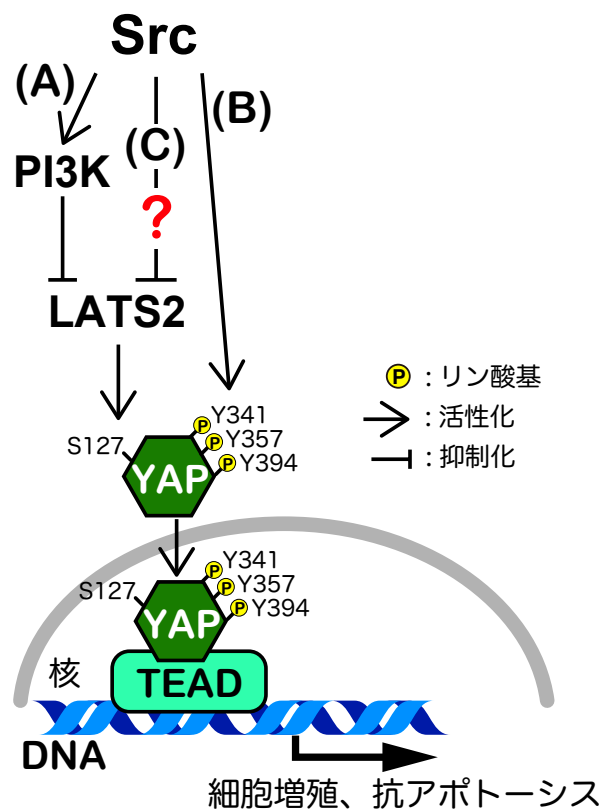


図 V. これまでに報告されている Src が Hippo 経路に与える影響

(A) Src による PI3K の活性化が、LATS2 のキナーゼ活性を低下させ YAP の核移行抑制を解除する。(B) Src が YAP (Tyr341, Tyr357, Tyr394) をリン酸化し、YAP の核局在化を促す。(C) Src による LATS2 の翻訳後修飾が LATS2 のキナーゼ活性を低下させる可能性 (本論文で検証)。

# 第1章 v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下とキナーゼ活性に依存しない機能

## 1-1 緒言

MAPKシグナル経路など、細胞増殖を促進するシグナルのv-Srcによる活性化が細胞増殖を亢進するという報告がある<sup>4,14</sup>一方で、Srcの異常活性化が細胞増殖抑制を起こす報告もある<sup>4,20</sup>。すなわち、Srcの異常活性化が細胞増殖に与える影響には相反する報告があり、Srcによる細胞のがん化機構の解明にはさらなる研究が必要である。

Hippo経路は過剰な細胞増殖を抑制する経路であり、活性化したHippo経路では、LATS2がYAPのSer127をリン酸化することでYAPの細胞質局在が保持されて細胞増殖関連遺伝子の発現が抑制される<sup>29</sup>。v-Src発現細胞ではYAP (Ser127)のリン酸化の低下が報告されており、その原因としてLATS2のキナーゼ活性の低下が示唆されている<sup>38</sup>。しかし、v-Srcによるどの基質のチロシンリン酸化が関与するのか、また、なぜLATS2のキナーゼ活性が低下するのかなど、詳細は明らかになっていない。興味深いことに、ウエスタンブロッティング解析によりv-Src発現下でLATS2のモビリティシフトが観察されている<sup>38</sup>。これはv-SrcによりLATS2の翻訳後修飾が変化することを示唆する。翻訳後修飾にはタンパク質のリン酸化、ユビキチン化、糖鎖修飾、脂質修飾などがあり、チロシンキナーゼであるv-SrcによるLATS2の直接的なチロシンリン酸化修飾がLATS2のキナーゼ活性低下に寄与するのではないかという仮説を立てた。そこで、第1章では、v-SrcによりLATS2が直接リン酸化されるのか、さらに、v-Srcによるリン酸化を受けたLATS2のキナーゼ活性は変化するのか、*in vitro*キナーゼアッセイを用いて解析した。

## 1-2 実験方法

### 1-2-1 材料

#### 1) 細胞

本章では、千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学的研究室（千葉大学 山口直人先生）で樹立された HeLa S3/v-Src clone 1-A 細胞、HCT116/v-Src clone 66 細胞、NIH3T3/v-Src clone 4-B 細胞（以下、HeLa S3/v-Src 細胞、HCT116/v-Src 細胞、NIH3T3/v-Src 細胞）の他に HT29 細胞、Lenti-X 293T 細胞、新たに樹立した細胞株（1-2-9 に詳細を記載）を用いた。各クローン細胞は、ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa S3 細胞（国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク、大阪）、ヒト直腸がん由来細胞株 HCT116 細胞（千葉大学 朝長毅先生より譲渡）、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞（千葉大学 五十嵐一衛先生より譲渡）を親株にして樹立された<sup>20</sup>。ヒト結腸腺がん由来細胞株 HT29 細胞は（ECACC 91072201, European Collection of Authenticated Cell Cultures, Public Health England, Salisbury, UK）より購入し、Lenti-X 293T 細胞は Clontech Laboratories（Mountain View, CA, USA）より購入した。

これらの細胞は、37℃、5% CO<sub>2</sub> の環境下、2 mM L(+)-グルタミン（072-00523, 富士フイルム和光純薬、大阪）、20 mM HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid] (pH 7.4) (346-08235, 同仁化学研究所、熊本)、5% FBS (fetal bovine serum, FBSUSDA500-S, AusGeneX, QLD, Australia) を含むダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」②（05919, 日水製薬株式会社、東京）を用いて培養した。

#### 2) プラスミド DNA

本章で使用したプラスミド DNA の情報を以下に示す。

- ・ pEGFP-C1<sup>39</sup>およびpcDNA4/TO/c-Src-HA<sup>40</sup>は、千葉大学 山口直人先生から譲渡していただいた。
- ・ GST-YAP2 (Addgene plasmid #24637) は、Dr. Kunliang Guanから譲渡していただいた。
- ・ pLX301 (Addgene plasmid #25895) は、Dr. David Root から譲渡していただいた<sup>41</sup>。
- ・ pENTR4-no-ccDB (686-1) (Addgene plasmid #17424) は、Dr. Eric Campeau と Dr. Paul Kaufman より譲渡していただいた<sup>42</sup>。
- ・ pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev は、理化学研究所バイオリソース研究センター（茨城）三好浩之先生から譲渡していただいた。
- ・ pLKO.1-blast (Addgene plasmid #26655) は、Dr. Keith Mostovから譲渡していただいた<sup>43</sup>。
- ・ pDONR201-LATS2 (FLJ94979AAAF)、pDONR201-LATS1 (FLJ80591AAAF) は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 Biological Resource Center (NBRC)（東京）より購入した。
- ・ pEZYegfp (Addgene plasmid #18671) は、Dr. Yu-Zhu Zhangより譲渡していただいた<sup>44</sup>。
- ・ MSCV-N-Flag-HA-IRES-PURO (Addgene plasmid #41033) は、Dr. Wade Harperより譲渡していただいた<sup>45</sup>。

- ・ pcDNA<sup>TM</sup>3.1/nV5-DEST (12290010) は、(Invitrogen) より購入した。

### 3) 試薬

プロテアソーム阻害剤 MG132 (3175-v, 株式会社ペプチド研究所, 大阪)、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (037-20991, 富士フイルム和光純薬)、オートファジー阻害剤バフィロマイシン A1 (B-1080, LC Laboratories, Woburn, MA, USA) は、ジメチルスルホキシドに溶解した。

### 4) 抗体

本章で使用した 1 次抗体と 2 次抗体の製品情報、ウエスタンブロット (WB) または免疫染色 (IF) で用いた希釈倍率を以下に示す。

#### 1 次抗体

##### ラビットポリクローナル抗体：

- ・ 抗 LATS2 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、HPA049037、Atlas Antibodies (Stockholm, Sweden)
- ・ 抗 phospho-YAP Ser127 抗体: 500 倍希釈 (WB)、#4911、Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
- ・ 抗 LATS1/2 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、A300-479A、Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA)
- ・ 抗 phospho-Src (Tyr416) 抗体: 1000–2000 倍希釈 (WB)、#2101、Cell Signaling Technology

##### ラビットモノクローナル抗体：

- ・ 抗 phospho-LATS (LATS1 Thr1079/LATS2 Thr1041) 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、#8654、clone D57D3、Cell Signaling Technology
- ・ 抗 phospho-tyrosine 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、#8954、Cell Signaling Technology

##### マウスモノクローナル抗体：

- ・ 抗 YAP 抗体: 500 倍希釈 (WB)、sc-101199、clone 63.7、Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
- ・ 抗 Src 抗体: 200–500 倍希釈 (WB)、05-184、clone GD11、Merck Millipore (Darmstadt, Germany)
- ・ 抗 V5 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、M215-3、clone OZA3、Medical and Biological Laboratories (愛知, 日本)
- ・ 抗 green fluorescent protein (GFP) 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、G6795、clone GSN24、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- ・ 抗 phospho-tyrosine 抗体: 100–400 倍希釈 (IF/WB)、17-502、clone 4G10、Merck Millipore
- ・ 抗 hemagglutinin (HA) 抗体: 500–1000 倍希釈 (WB)、M180、clone TANA2、Medical and Biological Laboratories
- ・ 抗 GFP 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、sc-9996、clone B-2、Santa Cruz Biotechnology



ラットモノクローナル抗体：

- ・ 抗 $\alpha$ -tubulin 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、MCA78G、clone YOL1/34、Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

## 2 次抗体

ウエスタンブロットに使用した、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体：

全て、Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) より購入した。

- ・ ロバ抗マウス IgG 抗体: 8000 倍希釈、715-035-151
- ・ ロバ抗ラビット IgG 抗体: 8000 倍希釈、711-035-152
- ・ ロバ抗ラット IgG 抗体: 8000 倍希釈、712-035-153
- ・ ヤギ抗マウス IgG 軽鎖特異的抗体: 8000 倍希釈、115-035-174
- ・ マウス抗ラビット IgG 軽鎖特異的抗体: 8000 倍希釈、211-032-171

蛍光免疫染色に使用した抗体：

全て、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した。

- ・ Alexa Fluor 555 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体: 800 倍希釈、A31572
- ・ Alexa Fluor 555 標識ロバ抗マウス IgG 抗体: 800 倍希釈、A31570
- ・ Alexa Fluor 647 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体: 800 倍希釈、A31573
- ・ Alexa Fluor 647 標識ロバ抗マウス IgG 抗体: 800 倍希釈、A31571
- ・ Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体: 800 倍希釈、A21206

### **1-2-2 v-Src の誘導発現**

v-Src の発現は細胞接着を減弱して細胞を培養ディッシュから剥がれやすくするため、解析する内容に合わせて v-Src の発現量を調節する必要がある。しかし、これまでの研究では、v-Src 遺伝子の一過性導入や、v-Src の温度感受性変異株が用いられており<sup>14,46</sup>、この方法では v-Src の発現量と発現時間の調節が困難である。そこで本研究では、ドキシサイクリン (Doxycycline: Dox) の添加により v-Src が誘導発現される細胞株<sup>20</sup>を用いた。この細胞株は、Dox の濃度や処理時間に依存して v-Src 発現レベルが変動するため、解析する内容に合わせて適切に v-Src の発現量を調節することができる。

HeLa S3/v-Src 細胞、HCT116/v-Src 細胞および NIH3T3/v-Src 細胞に Dox (D-9891, Sigma-Aldrich) を 0.1 ng/mL–1.0  $\mu$ g/mL の濃度で処理し、v-Src を誘導発現させた。Dox は、滅菌水に溶解し–30°Cで保存した。

### **1-2-3 Gateway 組換えクローニングテクノロジーを用いたプラスミド DNA の作製**

アミノ末端にエピトープタグの付いた LATS2 を細胞に発現させるため、Gateway テクノロジー (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて 3 種類のプラスミド DNA を作製した。エントリークローンとして pDONR201-LATS2、デスティネーションベクターとして pEZYegfp、MSCV-N-Flag-HA-IRES-PURO、pcDNA<sup>TM</sup>3.1/nV5-DEST の 3 種類を用いた。エントリークローンとデスティネーションベクターのプラスミド DNA をそれぞれ 40 fmol 相当用意し、そこへ

5×LR クロナーゼバッファーと LR クロナーゼ酵素 (56488, Invitrogen) を 2 µL ずつ混合し、混合液 10 µL を調製した。混合液を 25°Cの水浴中で約 12 時間インキュベートして、プロテイナーゼ K を 0.5 µL 加え、ブロックインキュベーターで 10 分間 (37°C) 反応させて、LR クロナーゼ酵素を失活させた。LR 反応後の DNA に TE バッファーを 10 µL、100%エタノール 50 µL、3 M 酢酸ナトリウム 2 µL を加え、沈殿した DNA を 70%エタノール 100 µL で洗浄して水で溶解した。溶解した DNA をエレクトロポレーション法で大腸菌 DH5α 株に導入し、予め 37°Cに温めておいた SOC 培地 1 mL を加えて 37°Cで 1 時間振盪培養した。その後、培養した菌液を 25 µg/mL カナマイシンまたは 100 µg/mL アンピシリン含有 LB プレートに塗り広げ、12–15 時間、37°Cで培養した。培養後、形成したコロニーをピックアップして 25 µg/mL カナマイシンまたは 100 µg/mL アンピシリンを含む液体 LB 培地に植菌した。約 12 時間培養後、プラスミド DNA を精製し、制限酵素処理をした後に電気泳動を行い、目的の組換えプラスミド DNA であることを確認した。作製した組換えプラスミド DNA (pEZYegfp-LATS2, MSCV-N-Flag-HA-IRES-PURO LATS2, pcDNA3.1/nV5-LATS2) は、それぞれアミノ末端に enhanced green fluorescent protein (EGFP) 、Flag-HA または V5 が融合した LATS2 を発現する。同様に、NBRC より購入したエントリークローン pDONR201-LATS1 と pEZYegfp デスティネーションベクターを LR 反応し、制限酵素処理をした後に電気泳動を行い目的の組換えプラスミド DNA であることを確認した。作製した pEZYegfp-LATS1 は、アミノ末端に EGFP が融合した LATS1 (アイソフォーム 2) を発現する。Gateway クローニング後、エントリークローンとデスティネーションベクターの組換え領域 (attB1 領域と attB2 領域) に変異が導入されていないことを DNA シークエンス解析により確認した。使用したオリゴ DNA [ユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京) より購入] の情報を表 1-1 に示す。

**表1-1 各プラスミドDNAのattB1/attB2領域のDNAシーケンス解析に使用したオリゴDNA**

プラスミド名	領域	オリゴDNA
pEZYegfp-LATS2	attB1領域	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'
	attB2領域	5'-ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGG-3'
MSCV-N-Flag-HA-IRES-PURO LATS2	attB1領域	5'-AGCCCTCACTCCTTCTCTAG-3'
	attB2領域	5'-GCCAAAAGACGGCAATATGG-3'
pcDNA3.1/nV5-LATS2	attB1領域	5'-AATGGGCGGTAGGCGTGTAC-3'
	attB2領域	5'-CAGAATAGAATGACACCTAC-3'
pEZYegfp-LATS1	attB1領域	5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'
	attB2領域	5'-ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGG-3'

#### 1-2-4 LATS2 の Tyr655 と Tyr879 への変異導入

LATS2 の 655 番目と 879 番目の 2 つのチロシン (Tyr) 残基をフェニルアラニン (Phe) に置換したプラスミド DNA を作製した。Tyr655 の Phe への置換と同時に AgeI 制限酵素によって切断されるサイレント変異を導入するオリゴ DNA を設計した。pcDNA3.1/nV5-LATS2 (40 ng) を鋳型とし、KOD-plus-Neo DNA ポリメラーゼ (東洋紡, 大阪)、KOD plus NEO バッファー (東洋紡)、0.2 mM dNTP mix (東洋紡)、1.5 mM MgSO<sub>4</sub>、0.6 μM オリゴ DNA を含む反応液 25 μL を調製した。PCR (polymerase chain reaction) を、前熱変性 94°C で 2 分、熱変性を 98°C で 10 秒、アニーリングと伸長反応を 68°C で 4 分 23 秒の条件で 40 サイクル行った。PCR 産物に制限酵素 DpnI (1235A, Takara Bio, 滋賀) を加え、37°C で 1 時間以上インキュベートし、鋳型プラスミド DNA を消化した。-80°C で保存していた大腸菌 JM109 株を氷上で溶かし、PCR 産物を加えて氷中で 20 分間静置後、42°C で 1 分間熱ショックを与え、直ちに氷中に戻し、2-3 分後予め 37°C に温めておいた SOC 培地を加え、37°C で穏やかに振盪培養して大腸菌 JM109 株にプラスミド DNA を導入した (ケミカルトランスフォーメーション)。1 時間後、菌液を 100 μg/mL アンピシリン含有 LB プレートに塗り広げ、37°C で約 12 時間培養した。形成したコロニーをピックアップして 100 μg/mL アンピシリンを含む液体 LB 培地に植菌し約 12 時間培養後、菌液から DNA を精製し、AgeI で制限酵素処理後、電気泳動で目的のプラスミド DNA であることを確認した。続いて、作製した pcDNA3.1/nV5-LATS2 Tyr655Phe プラスミド DNA を鋳型として 879 番目の Tyr を Phe に置換するオリゴ DNA を用いて、先ほどと同じ手順で Phe に置換した。その後作製したプラスミド DNA を JM109 大腸菌株に導入して、37°C で約 12 時間培養後プラスミド DNA を精製した (LATS2-YYFF 変異体)。作製した変異体プラスミド DNA に目的の変異が導入されていることと、目的以外の変異が導入されていないことをシーケンス解析により確認した。変異の導入に使用したオリゴ DNA を表 1-2、シーケンス解析に使用したオリゴ DNA の情報を表 1-3 に示す。オリゴ DNA は全てユーロフィンジェノミクス株式会社より購入し、シーケンス解析は日本ジーンウィズ株式会社 (埼玉) に依頼した。

表 1-2 pcDNA3.1/nV5-LATS2 Y655F/Y879F 変異体作製に使用したオリゴ DNA

導入変異		オリゴDNA	
LATS2	Y655F	Sense	5'-CTAAT <b>T</b> CAAC <b>C</b> GGTTAAAGAGGGCC-3'
		Antisense	5'-AACC <b>C</b> GTT <b>GAA</b> ATTAGACTCTTTCTGG-3'
	Y879F	Sense	5'-CAAAC <b>T</b> TCATCGCACCCGAGGTGCTC-3'
		Antisense	5'-CGAT <b>GAA</b> GTTTGGAGTCCCCACCAGTG-3'

赤文字が Tyr 残基を Phe に置換するための変異部位、下線部青文字が AgeI 制限酵素により切断されるようにサイレント変異を導入した部位

表 1-3 pcDNA3.1/nV5-LATS2 Y655F/Y879F のシーケンス解析に使用したオリゴ DNA

No.	オリゴDNA
1	5'-CGTATGTTCCCATAGTAACGCC-3'
2	5'-TGCAAGAGATTCGTGAGGGG-3'
3	5'-TACGTGGACTACCTTTTCCC-3'
4	5'-TTGGACGCCAAGGAGGAGC-3'
5	5'-ATGGACTACATCCCTGGTGG-3'
6	5'-TTCAGCGCCATTGACTTCTCC-3'
7	5'-GATCAGACTGAAGGCTGCCAG-3'
8	5'-AGTGGACTCTTGTTCCAAAC-3'
9	5'-AGGATCTCCTGTCATCTCAC-3'
10	5'-TAGAGCTTGCGTAATCATG-3'
11	5'-CAGAGTCTTGAAGTGGTGG-3'
12	5'-ATCACTCATGGTTATGGCAG-3'

#### 1-2-5 V5-LATS2-WT と-S872A のウイルスベクターpLX301 への組換え

pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2 と pLX301 の組み換えを Gateway クローニングで行い、pLX301-V5-LATS2 を作製した。初めに pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2 を作製するため pcDNA3.1/nV5-LATS2 の V5-LATS2 領域を pENTR4-no-ccDB(686-1)に組み込んだ。そのために PCR を用いて pcDNA3.1/nV5-LATS2 に制限酵素サイト (XhoI と XbaI) を導入した。使用したオリゴ DNA を表 1-4 に示す。1-2-4 と同量の試薬を加え PCR を行った (前熱変性を 94℃で 2 分, 熱変性を 98℃で 10 秒, アニーリングを 66℃で 30 秒, 伸長反応を 68℃で 2 分を行い, 前熱変性以外を 40 サイクル)。XhoI (1094A, Takara Bio) と XbaI (1093A, Takara Bio) で制限酵素処理した PCR 産物を、1%低融点ゲル (317-01182, 株式会社ニッポンジーン, 東京) で電気泳動し目的のバンドを切り出し精製した。同様に pENTR4-no-ccDB(686-1)を XhoI と XbaI で制限酵素処理後、1%低融点ゲルで電気泳動し、目的のバンドを切り出し精製した。pcDNA3.1/nV5-LATS2 (10 fmol) と pENTR4-no-ccDB(686-1) (25 fmol) に、Ligation mix (#6023, Takara Bio) を加えて 16℃で 1 時間反応させ、ライゲーションした。ライゲーションしたサンプルを大腸菌 JM109 株にケミカルトランスフォーメーションし、菌液を 25 µg/mL カナマイシン含有 LB プレートに塗り拡げて 37℃で約 12 時間培養した。形成したコロニーをピックアップして 25 µg/mL カナマイシンを含む液体 LB 培地に植菌し、約 12 時間培養後、菌液からプラスミド DNA を精製した。精製したプラスミド DNA を制限酵素処理して電気泳動し、目的のプラスミド DNA (pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2-WT) であることを確認した。

キナーゼ活性不活性型 LATS2 を作製するため、pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2-WT を鋳型にして PCR で Ser872 を Ala に置換した。使用したプライマーのオリゴ DNA を表 1-5 に示す。1-2-4 と同量の試薬を加え PCR を行った (前熱変性を 94℃で 2 分, 熱変性を 98℃で 10 秒, アニーリングと伸長反応を 68℃で 2 分 51 秒を行い, 前熱変性以外を 40 サイクル)。鋳型のプラスミド DNA を制限酵素 DpnI で消化し、大腸菌 JM109 株にケミカルトランスフォーメーションして 25 µg/mL カナマイシン含有 LB プレートに塗り拡げ、37℃で約 12 時間培養した。形

成したコロニーをピックアップして 25 µg/mL カナマイシンを含む液体 LB 培地に植菌し約 12 時間培養後、菌液からプラスミド DNA 精製した。

次に pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2-WT または-S872A と pLX301 の Gateway クローニング組換えを 1-2-3 と同様に行った。組換えたプラスミド DNA を大腸菌 JM109 株にケミカルトランスフォーメーションし、100 µg/mL アンピシリン含有 LB プレートに塗り拡げ、37°C で約 12 時間培養した。形成したコロニーから精製したプラスミド DNA を制限酵素処理し、電気泳動して目的のプラスミド DNA (pLX301-V5-LATS2-WT, -S872A) であることを確認した。Gateway クローニング後、pLX301-V5-LATS2-WT、-S872A の attB1/attB2 領域とオープンリーディングフレームに変異が導入されていないことを DNA シークエンス解析により確認した。使用したオリゴ DNA (表 1-6) は全てユーロフィンジェノミクス株式会社より購入し、シークエンス解析は日本ジーンウィズ株式会社に依頼した。

表 1-4 XhoI と XbaI の制限酵素サイトの導入に使用したオリゴ DNA

制限酵素	オリゴDNA	
XhoI	Forward	5'-CCGCTCGAGATGGGTAAGCCTATCCCTA-3'
XbaI	Reverse	5'-TGCTCTAGACACGTACACAGGCTGGCAG-3'

表 1-5 pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2-Ser872Ala 作製に使用したオリゴ DNA

導入変異		オリゴDNA	
LATS2	S872A	Sense	5'-GCACATGCACTGGTGGGGACTCC-3'
		Antisense	5'-CCACCAGTGCATGTGCCAGGC-3'

赤文字が Ser 残基を Ala に置換するための変異部位

表 1-6 pLX301-V5-LATS2-WT、-S872A のシークエンス解析に使用したオリゴ DNA

No.	オリゴDNA
1	5'-TGGCACCAAAATCAACGGG-3'
2	5'-TCTGCAGCTGCAGAAGTGAAC-3'
3	5'-GAACAGCCTCAACGTGGAC-3'
4	5'-GAGCAGCACGTGGAGAATG-3'
5	5'-GATCAGACTGAAGGCTGCCAG-3'
6	5'-AAGACCCTAGAGCAGAGGG-3'

### 1-2-6 短鎖ヘアピン RNA (shRNA) 発現プラスミド DNA の作製

マウス LATS2 の 3'非翻訳領域を標的にした shRNA 用オリゴ DNA を 95℃で 5 分加熱処理し、室温に戻るまで静置してオリゴ DNA をアニーリングした。pLKO.1-blast を EcoRI (R3101S, NEB, Ipswich, MA, USA) と AgeI (R3552S, NEB) で制限酵素処理し、1%低融点ゲルで電気泳動後、目的のバンドを切り出して精製した。精製した pLKO.1-blast の EcoRI–AgeI 部位に、アニーリングした DNA 断片を 1-2-5 に記載している方法でライゲーションし、大腸菌株 JM109 にケミカルトランスフォーメーション後、37℃で約 12 時間振盪培養し pLKO.1-blast-shLATS2 を精製した。同じ手順で、非標的 shRNA (pLKO.1-blast-shScramble) を作製した。pLKO.1-blast-shLATS2 と-shScramble の作製に使用したオリゴ DNA を表 1-7 に示す。pLKO.1-blast に目的のオリゴ DNA が挿入していることを DNA シークエンス解析で確認した。シークエンス解析には 5'-CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA-3' のプライマーを用いた。使用したオリゴ DNA は全てユーロフィンジェノミクス株式会社より購入した。

表 1-7 shLATS2 と shScramble の作製に使用したオリゴ DNA

ターゲット	オリゴDNA	
shLATS2	Sense	5'-CCGGCCGTCGATTACTTCACTGAACTCGAGTTCAAGTGAAGTAATCGACGGTTTTTG-3'
	Antisense	5'-AATTCAAAAACCGTCGATTACTTCACTGAACTCGAGTTCAAGTGAAGTAATCGACGG-3'
shScramble	Sense	5'-CCGGCCTAAGGTAAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTG-3'
	Antisense	5'-AATTCAAAAACCTAAGGTAAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG-3'

### 1-2-7 プラスミド DNA の一過性導入

以下、ディッシュ 1 枚あたりの試薬の量を記載する。

HeLa S3/v-Src 細胞を 6 cm ディッシュに播種し一晩培養した。Opti-MEM (31985, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) 293  $\mu$ L に Lipofectamine 2000 reagent (52887, Thermo Fisher Scientific) を 8.79  $\mu$ L 加え、これとは別に、Opti-MEM 293  $\mu$ L にプラスミド DNA を 2.637  $\mu$ g 加えて、5 分間室温で静置した。その後、これら 2 種類の液を混合し 20 分間室温で静置してプラスミド DNA 導入液を調製した。20 分間静置している間に、6 cm ディッシュの培養液を予め 37℃に温めておいた培養液 4 mL に交換し、プラスミド DNA 導入液を加え穏やかにディッシュを揺すり、培養液とプラスミド DNA 導入液を混和しインキュベーターで培養した。6 時間後、37℃の培養液 5 mL に交換し、インキュベーターで再び培養した。

Lenti-X 293T 細胞を 6 cm ディッシュに播種し一晩培養した。Opti-MEM 500  $\mu$ L に polyethylenimine “MAX” (Polysciences, Warrington, PA, USA) を 20  $\mu$ g を加え、これとは別に Opti-MEM 500  $\mu$ L にプラスミド DNA を 10  $\mu$ g 加え、5 分間室温で静置した。その後、これら 2 種類の液を混合し 30 分間室温で静置し、培養液を除いた Lenti-X 293T 細胞に穏やかに加えインキュベーターで培養した。

### 1-2-8 細胞への small interfering RNA (siRNA) の導入

以下、24 ウェルプレートでの 1 ウェルあたりの試薬量を記載する。

HeLa S3/v-Src 細胞、HT29 細胞、HeLa S3/v-Src/LATS2-WT または-S872A 細胞を 24 ウェルプレートに播種し一晩培養した。Opti-MEM 25  $\mu$ L に Lipofectamine 2000 reagent を 1  $\mu$ L 加え、これとは別に、Opti-MEM 25  $\mu$ L に siRNA を 20、30 または 40 pmol 加え、5 分間室温で静置した。その後、これら 2 種類の液を混合し 20 分間室温で静置して siRNA 導入液を調製した。20 分間静置している間に、培養液を予め 37°C に温めておいた培養液 400  $\mu$ L に交換し、siRNA 導入液を加えてプレートを穏やかに揺すり、培養液と siRNA 導入液を混和した。6 時間後に 37°C の培養液 500  $\mu$ L に交換し再び培養した。siRNA 導入液を加えてから 24 時間または 72 時間後にウェスタンブロットや免疫染色を行った。MilliporeSigma (Burlington, MA, USA) より購入した siRNA の製品情報や配列を以下に示す。

ネガティブコントロール siRNA (siCtrl) : SIC-001

siLATS2 #1: SASI\_Hs01\_00158803

siLATS2 #2: SASI\_Hs01\_00158804

siLATS2 #3 (3 非翻訳領域) : 5'-CCGUCGAUUACUUCACUUGAA-3'

siCsk: SASI\_Hs01\_00328637

siYAP: SASI\_Mm01\_00022140

### 1-2-9 レンチウイルスを用いた安定発現株の樹立

Lenti-X 293T 細胞を 3.5 cm ディッシュに均一に播種し、細胞密度が 8 割程度の時にプラスミド DNA の導入を行った。Opti-MEM 250  $\mu$ L に PEI-MAX (polyethylenimine “MAX”) を 7.4  $\mu$ g 加え、これとは別に、Opti-MEM 250  $\mu$ L に 1.7  $\mu$ g のプラスミド DNA (pLX301-V5-LATS2-WT, -S872A または pLKO.1-blast-shLATS2, -shScramble) とパッケージングプラスミド DNA (pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev それぞれ 1  $\mu$ g) を加えて混合し、5 分間室温で静置した。これら 2 種類の液を混合して 20–30 分間室温で静置し、プラスミド DNA 導入液を調製した。20 分間静置している間に、培養液を予め 37°C に温めておいた培養液 1.5 mL に交換し、プラスミド DNA 導入液を加えてディッシュを穏やかに揺すり、培養液とプラスミド DNA 導入液を混和した。18 時間後、ディッシュの培養液を除去し 37°C の培養液 2 mL を加えた。37°C で 48 時間培養後、上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過してレンチウイルス含有溶液とした。3.5 cm ディッシュに播種して一晩培養した HeLa S3/v-Src 細胞または NIH3T3/v-Src 細胞の培養液を除き、80  $\mu$ g/mL のポリブレン (107689-10G, Sigma-Aldrich) を 200  $\mu$ L 加えて 37°C で 1–2 分培養し、レンチウイルス含有溶液約 2 mL を加えて 37°C で培養し、24 時間後に培養液を交換 (37°C, 2 mL) レインキュベーターで再び培養した。翌日から薬剤を含む培地に交換し、約 1 週間セクションして細胞株を樹立した。HeLa S3/v-Src-V5-LATS2-WT と -S872A 細胞株の樹立には 1  $\mu$ g/mL ピューロマイシン (StressMarq Biosciences Inc., Victoria, BC, Canada) 含有培地、NIH3T3/v-Src-shLATS2 と -shScramble 細胞株の樹立には 3  $\mu$ g/mL ブラストサイジン S (KK-400, 科研製薬, 東京) 含有培地を使用した。

### 1-2-10 免疫蛍光染色法

丸型カバーガラス (1254580, fisher scientific, Waltham, MA, USA) を入れた 24 ウェルプレートに細胞を播種した。細胞の培地を除いた後、37°Cに予め温めておいた 0.90  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (06731-05, ナカライテスク, 京都) と 0.49  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$  (20909-42, ナカライテスク) を含むリン酸緩衝生理食塩水[PBS(+)]で細胞を 1 度洗った。固定は、37°Cに温めた 4%ホルムアルデヒド (26126-54, ナカライテスク) 含有 PBS(-)、または PTEMF [4%ホルムアルデヒド、2 mM PIPES (pH6.8) (28104-16, ナカライテスク) 、0.2% Triton X-100、10 mM EGTA、1 mM  $\text{MgCl}_2$ ] を用いて 20 分間、室温で行った。固定後の細胞を PBS(-)で 3 回洗い、3% BSA (Bovine Serum Albumin, 富士フイルム和光純薬) と 0.1% サポニン含有 PBS(-)を用いてブロッキングと透過処理を 30 分間、室温で行った。1 次抗体と 2 次抗体を 3% BSA と 0.1%サポニン含有 PBS(-)で希釈し、1 時間、室温で反応させた。1 次抗体反応後、細胞を 0.1 %サポニン含有 PBS(-)で 3 回洗い、続いて 2 次抗体の反応後、0.1 %サポニン含有 PBS(-)で 2 回、PBS(-)で 1 回洗った。サンプルに封入剤を滴下しカバーガラスで封入後、マニキュアでカバーガラスを固定した。DNA は 1  $\mu\text{M}$  ヘキスト 33342 (MilliporeSigma) 、F-アクチンはアクチン染色 488 ファロイジン (cytoskeleton, #PHDG1, Denver, CO, USA) を 2 次抗体希釈液に混合して染色した。蛍光画像は、10 $\times$ 0.30 NA、40 $\times$ 0.75 NA の対物レンズと 60 $\times$ 1.42 NA、100 $\times$ 1.40 NA の油浸対物レンズを装備した倒立型リサーチ顕微鏡 IX83 (オリンパス, 東京) を用いて取得した。蛍光ミラーユニットは、ヘキスト 33342 の蛍光取得に U-FUNA (励起フィルター360–370 nm、吸収フィルター420–460 nm)、Alexa Fluor 488 の蛍光取得に U-FBNA (励起フィルター470–495 nm、吸収フィルター510–550 nm) 、Alexa Fluor 555 の蛍光取得に U-FRFP (励起フィルター535–555 nm、吸収フィルター570–625 nm) 、Alexa Fluor 647 の蛍光取得に U-DM3-CY5 (励起フィルター600–650 nm、吸収フィルター670–740 nm) を使用した。適切な蛍光画像を取得するためにランプ出力、露光時間を、比較するサンプル間で一定にした。蛍光画像は、ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) と Illustrator CC ソフトウェア (Adobe, San Jose, CA, USA) で編集した。

### 1-2-11 ウェスタンブロッティング解析

細胞を37°Cに予め温めておいたPBS(-)またはPBS(+)で1度洗った後、氷上で冷やした、プロテアーゼ阻害剤とホスファターゼ阻害剤を含むSDS (Sodium dodecyl sulfate) サンプルバッファ [10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アプロチニン (富士フイルム和光純薬) 、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ペプスタチン A (株式会社ペプチド研究所) 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ロイペプチン (ナカライテスク) 、2.5 mM EGTA-KOH (Sigma-Aldrich) 、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF, ナカライテスク) 、20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 (MilliporeSigma) 、50 mM フッ化ナトリウム (Wako) 、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム (Wako) ]を加え、直ちに氷水上に24ウェルプレートを移し細胞を溶解した。細胞溶解物を100°Cで5分間熱処理し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) を行いタンパク質を分離した。分離したタンパク質を、100%メタノールで親水処理してトランスファーバッファで平衡化したポリフッ化ビニリデンメンブレン (BSP0161, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) にタンク式転写装置 (NA-1510, 日本エイドー株式会社, 東京) を用いて転写した。転写したメンブレンをBlocking One (03953-95, ナカライテスク) で30–40分間振盪し、トリス緩衝生理食塩水 (以下, TTBS) に5% Blocking One、0.1% Tween 20、0.1%ア



ジ化ナトリウム (31233-41, ナカライテスク) を加えた溶液で1次抗体を希釈し、室温で1-2時間または4°Cで一晩、メンブレンと反応させた。メンブレンをTTBSで洗い、TTBSに5% Blocking Oneを加えた溶液で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識2次抗体を、室温で1時間、メンブレンに反応させた。反応後、メンブレンをTTBSで洗い、化学発光検出試薬と反応させた。化学発光検出試薬にはChemi Lumi One L (#07880, ナカライテスク)、Chemi Lumi-One Ultra (#11644, ナカライテスク) または Clarity (1700-5061, Bio-Rad) を使用し、各種タンパク質の化学発光シグナルはimage analyzer ChemiDoc XRSplus (Bio-Rad) で検出した。また、各種タンパク質の化学発光シグナル強度は、Image Lab ソフトウェア (Bio-Rad) またはImageJ (National Institutes of Health) を用いて解析した。

### 1-2-12 Phos-tag SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

HeLa S3/v-*Src*細胞の培地を除いた後、37°Cに温めたPBS(-)で細胞を1度洗い、SDSサンプルバッファーで細胞を溶解し、100°Cで5分間、加熱した。20  $\mu$ M Phos-tag (AAL-107, 株式会社ナード研究所, 兵庫) と40  $\mu$ M  $Mn^{2+}$  (21211-32, ナカライテスク) を含むポリアクリルアミドゲルでタンパク質の分離を行った。電気泳動したゲルを5 mM EDTAを含むトランスファーバッファーで洗い、最後にEDTAを含まないトランスファーバッファーで10分間平衡化した。その後、ウェスタンブロッティング解析と同じ手順でタンパク質のブロッティングを行い、各種タンパク質のシグナルを検出した。

### 1-2-13 免疫沈降法

HeLa S3/v-*Src*細胞を6 cmディッシュに播種した。過剰発現させたタンパク質を免疫沈降する場合は、細胞密度が7-8割のときプラスミドDNAを導入し一晩培養した。細胞の培養液を除き37°Cに温めたPBS(-)で細胞を洗い、ディッシュに37°Cの0.1% EDTA含有PBS(-)を1 mL加え、37°Cでインキュベートした。10-15分間後、ピペッティングを行いながら細胞をディッシュから剥がし、チューブに回収してswing man (アズワン, 大阪) で1分間遠心して細胞を集めた。集めた細胞をPBS(-)で1回洗い、再びswing manで1分間遠心し細胞を沈殿させた。上清を捨て、沈殿した細胞に氷上で冷やしたTriton X-100細胞溶解液 [0.2%または1% Triton X-100、20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸、126 mM フッ化ナトリウム、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム、1 mM PMSF、10  $\mu$ g/mL アプロチニン、4  $\mu$ g/mL ペプスタチン A、10  $\mu$ g/mL ロイペプチン、2.5 mM EGTA-KOH (pH8.0)、50 mM HEPES-NaOH (pH7.4)、4 mM EDTA-NaOH (pH7.4)、10% グリセロール] を加え、氷中で15分間静置した。4°Cで10分間遠心 (15000 rpm) し、その上清を抗LATS1/2、抗LATS2または抗V5抗体 (1  $\mu$ g/サンプル) の結合したプロテインGセファロースビーズ (10  $\mu$ L/サンプル, 17-0618-01, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) と4°Cで3時間以上反応させた。反応後のビーズを0.1% Triton X-100溶液 (0.1% Triton X-100, 20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸, 10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム) で4回洗い、SDSサンプルバッファーを加えて100°Cで3分間加熱し、ビーズからタンパク質と抗体を溶出した。ネガティブコントロールとして、ラビット由来アイソタイプコントロールIgG抗体 (2729S, Cell Signaling Technology) やマウス由来アイソタイプコントロールIgG抗体 (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology) を使用した。

## 1-2-14 各種タンパク質の精製方法

### 1) GST-YAP2

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を融合したYAP2 (GST-YAP2) を大腸菌 BL21株に導入し、600 nm における吸光度 (OD600) が0.5になるまで37°Cで振盪培養した。OD600が0.5になった時点で0.5 mM イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド (099-02534, Wako) を加え、30°Cで30分間、水浴で振盪培養した。培養した菌液を5分間遠心 (2000 rpm) し、沈殿した菌を-80°Cで凍結させた。-80°Cから凍結融解した菌に氷中で冷やしたPBS(-)を加えて大腸菌を洗い、1分間遠心 (8000 rpm) し、氷中で冷やしたPBS(-)、0.4 mg/mL リゾチーム (120-02674, Wako) 、0.84 mM PMSF、21.1  $\mu$ g/mL アプロチニン、8.4  $\mu$ g/mL ペプスタチン A、21.1  $\mu$ g/ml ロイペプチン、5.3 mM EGTA-KOHを加えて氷中で30分間静置した。その後、0.67 mM PMSF、16.9  $\mu$ g/mL アプロチニン、6.7  $\mu$ g/mL ペプスタチン A、16.9  $\mu$ g/ml ロイペプチン、4.2 mM EGTA-KOH、1 % Triton X-100、3.4  $\mu$ g  $Mg^{2+}$ 、20 UのDNase I (2270A, Takara Bio) 、4  $\mu$ g/ml RNase A (R4875, Sigma-Aldrich) を追加して氷中で10分間静置して大腸菌を溶菌した。10分間遠心 (15000 rpm) し、上清 (以下GST-YAP2菌液) を回収した。

グルタチオンセファロース4Bビーズ (17-0756-01, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) を0.01% Triton X-100含有PBS(-)で3回洗い、そのビーズをGST-YAP2菌液、1% Triton X-100、0.88 mM PMSF、20  $\mu$ g/mL アプロチニン、8  $\mu$ g/mL ペプスタチン A、20  $\mu$ g/mL ロイペプチン、5 mM EGTA-KOH (pH8.0) と4°Cで1時間以上インキュベートした。反応後のビーズを1% Triton X-100、50 mM Tris (pH7.5)、150 mM 塩化ナトリウムを含むPBS(-)で3回洗った。洗ったビーズを100 mM 還元型グルタチオン (17050, ナカライテスク) 、1% Triton X-100、50 mM Tris (pH7.5)、150 mM 塩化ナトリウムを含むPBS(-)と10分間室温で反応させ、GST-YAP2をグルタチオンセファロース4Bビーズから溶出し、精製GST-YAP2を得た。

### 2) HAタグ融合タンパク質

pcDNA4/TO/c-*Src*-HA またはMSCV-N-Flag-HA-LATS2-IRES-PUROプラスミドDNAをLenti-X 293T細胞に導入し、免疫沈降法と同様に1% Triton X-100溶液で細胞を溶解した後、4°Cで10分間遠心 (15000 rpm) し細胞溶解液を調製した。0.1% Triton X-100溶液 [0.1% Triton X-100, 100 mM フッ化ナトリウム, 50 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 4 mM EDTA-NaOH (pH7.4), 10%グリセロール]で洗った抗HA抗体結合磁気ビーズ (#88836, Thermo Fisher Scientific) と細胞溶解液を室温で30分間インキュベートした。反応後のビーズを1% Triton X-100、150 mM 塩化ナトリウム含有PBS(-)で3回洗った後、2 mg/mL HA-ペプチド、1% Triton X-100、150 mM 塩化ナトリウム含有PBS(-)溶液を加えて37°Cの水浴で10分間反応させHAタグ融合タンパク質をビーズから溶出した。

### 3) EGFPタグ融合タンパク質

pEZYegfp-LATS2またはEGFP-C1プラスミドDNAをLenti-X 293T細胞に導入し、免疫沈降法と同様に1% Triton X-100細胞溶解液で細胞を溶解した後、4°Cで10分間遠心 (15000

rpm) して細胞溶解液を調製した。0.1% Triton X-100溶液 [0.1% Triton X-100, 100 mM フッ化ナトリウム, 50 mM HEPES-NaOH (pH7.4), 4 mM EDTA-NaOH (pH7.4), 10%グリセロール] で洗った、抗GFP抗体結合磁気ビーズ (D153-11, Medical and Biological Laboratories) と細胞溶解液を4°Cで1時間インキュベートした。反応後のビーズを0.1% Triton X-100溶液で4回洗い、磁気ビーズを1% Triton X-100含有100 mM グリシン塩酸塩 (pH2.0) (17109-64, ナカライテスク) と混合してEGFPタグ融合タンパク質を溶出させた。5分後、直ちに1 M Tris-HCl (pH8.5) を適量加えて中性に戻し、精製EGFPタグ融合タンパク質を得た。

### 1-2-15 *in vitro* キナーゼアッセイ

キナーゼと基質の混合液に各種ホスファターゼ阻害剤、1 mM ATP (08886-51, ナカライテスク)、5 mM Mg<sup>2+</sup>を加え、30°Cの水浴で2分に1回サンプルをタッピングし、ビーズと溶液を混和した。反応物にSDSサンプルバッファーを加えて100°Cで3分間加熱し、以後ウエスタンブロッティングと同じ手順で解析した。

キナーゼ、基質ごとに異なる条件を以下に示した。

#### 1) LATS2のキナーゼ活性評価

HeLa S3/v-Src細胞を、0.1 µg/mL Dox含有または非含有培養液で12時間培養した。免疫沈降法と同様に1% Triton X-100細胞溶解液で細胞を溶解した後、4°Cで10分間遠心 (15000 rpm) し、細胞溶解液を調製した。抗LATS2抗体 (Atlas Antibodies; 0.5 µg/サンプル) を結合したプロテインGセファロースビーズに細胞溶解液を加え、4°Cで3時間以上インキュベートした。インキュベートしたビーズを精製GST-YAP2と、20 mM β-グリセロリン酸、50 mM フッ化ナトリウム、10 µg/mL アプロチニン、4 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン、2.5 mM EGTA-KOH (pH8.0) を含む溶液中で混合しキナーゼアッセイを行った。

#### 2) v-Srcまたはc-SrcによるLATS2のリン酸化の評価

HeLa S3/v-Src細胞を0.1 µg/mL Dox含有培養液で12時間培養し、免疫沈降法と同様に1% Triton X-100細胞溶解液で細胞を溶解し、4°Cで10分間遠心 (15000 rpm) して細胞溶解液を調製した。抗Src (0.5 µg/サンプル) またはマウス由来アイソタイプコントロールIgG抗体 (0.5 µg/サンプル) を結合したプロテインGセファロースビーズと細胞溶解液を4°Cで3時間インキュベートした。インキュベートしたビーズを精製EGFPタグ融合タンパク質 (EGFP-LATS2あるいはEGFP-C1) と、10 µg/mL アプロチニン、4 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン、2.5 mM EGTA-KOH (pH8.0)、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウムを含む溶液中で混合しキナーゼアッセイを行った。

c-Srcの場合は1-2-14の方法で精製した、c-Src-HAとFlag-HA-LATS2を、10 µg/mL アプロチニン、4 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン、2.5 mM EGTA-KOH (pH8.0)、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウムを含む溶液中で混合しキナーゼアッセイを行った。

### 3) c-Srcによってリン酸化されたLATS2のキナーゼ活性の評価

Lenti-X 293T細胞にpcDNATM3.1/nV5-LATS2を導入して一晩培養し、ピペッティングを行って細胞をディッシュから剥がした。チューブに回収した細胞をswing manで1分間遠心し、沈殿した細胞に1% Triton X-100を加えて細胞溶解液を調製した。抗V5抗体を結合させたプロテインGセファロースビーズに細胞溶解液を加え、4℃で3時間以上インキュベートしてV5-LATS2を精製した。精製したV5-LATS2とc-Src-HAを、10 µg/mL アプロチニン、4 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン、2.5 mM EGTA-KOH (pH8.0)、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウムを含む溶液中で混合しキナーゼアッセイを行った。その後swing manで1分間遠心して上清とビーズに分けた。上清にはSDSサンプルバッファーを加えて100℃で5分間加熱した。LATS2吸着ビーズには、精製GST-YAP2を加え、V5-LATS2とc-Src-HAのキナーゼアッセイと同じ条件で再びキナーゼアッセイを行った。

### 4) LATS2 Ser872Ala変異体のキナーゼ活性評価

1-2-7と同じ方法で、Lenti-X 293T細胞にpLX301-V5-LATS2-WTまたはpLX301-V5-LATS2-S872Aを導入した。プラスミドDNAを導入した細胞を1-2-13と同様に1% Triton X-100で溶解し、抗V5抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降法で集めたV5-LATS2-WTまたは-S872Aと精製GST-YAP2を、10 mM β-グリセロリン酸、50 mM フッ化ナトリウム、10 µg/mL アプロチニン、4 µg/mL ペプスタチン A、10 µg/mL ロイペプチン、2.5 mM EGTA-KOH (pH8.0)、5 mM Mn<sup>2+</sup>を含む溶液中で混合しキナーゼアッセイを行った。

## 1-2-16 定量的リアルタイムPCR

HeLa S3/v-Src細胞を96ウェルプレートに5000細胞ずつ播種し、一晩培養した。以下、1ウェルあたりの試薬の量を示す。Opti-MEM 5 µLにLipofectamine 2000 reagentを0.2 µL、これとは別に、Opti-MEM 5 µLに8 pmolのsiYAPを加え、5分静置した。その後、これら2種類の液を混合し20分間室温で静置し、siRNA導入液を調製した。その間に、培養液を37℃に温めておいた培養液80 µLに交換し、siRNA導入液を加えてプレートを穏やかに揺すり、培養液とsiRNA導入液を混和し培養した。6時間後に培養液を交換 (37℃, 100 µL) し再び培養した。siRNA導入液を加えてから12時間後に0.1 µg/mL Dox含有培地 (37℃, 100 µL) に交換し、さらに12時間培養した。Lysis solution (4383656F2, Invitrogen) 49.5 µLとDNase I (4383666F2, Invitrogen) 0.5 µLの混合液をPBS(+) 100µLで洗った細胞に加え、5回ピペッティングして室温で静置した。5分後直ちに5 µLのstop solution (4383660F2, Invitrogen) を加え、5回ピペッティングして混和し2分間室温で静置後、細胞溶解液をマイクロチューブに回収した。RNaseフリー水 (#9012, Takara Bio) 12.5 µL、細胞溶解液 10 µL、2×Fast Advanced RT Buffer 25 µL、20×Fast Advanced RT Enzyme Mix 2.5 µLを加えて混合した。サーマルサイクラー (Gene Technologies G-Storm 482) を用いて逆転写反応を37℃で30分間行いmRNAからcDNAを作製した後、逆転写酵素の不活化を95℃で5分間行った。MicroAmp™ 96ウェルプレート (N8010560, Thermo Fisher Scientific) にTaqMan™ Fast Advanced Master Mix 5 µL、TaqManプローブ 0.5 µL、RNaseフリー水 2.5 µLを入れ、そこへcDNA 2 µLを加えた。QuantStudio 1 リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher) を用いて、UDGの活性化を50℃で2分、DNAポリメラーゼの活性化を95℃で20秒、その後、

95℃で1秒間の熱変性と60℃で20秒間のアニーリングおよび伸長反応を40サイクル行った。*ACTB*の発現量を内部標準に使い、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いてサンプル間の各遺伝子の発現量を比較した。TaqManプローブ（FAM-MGB）は全てThermo Fisher Scientificから購入し、製品情報を以下に示す。

LATS2 (*LATS2*, Hs01059009\_m1)

LATS1 (*LATS1*, Hs01125524\_m1)

CTGF (*CTGF*, Hs00170014\_m1)

$\beta$ -actin (*ACTB*, Hs01060665\_g1)

### 1-2-17 ブレブ形成率の評価

HeLa S3/v-Src、HeLa S3/v-Src-V5-LATS2-WTまたはHeLa S3/v-Src-V5-LATS2-SA細胞に、siLATS2 #1、siLATS2 #2、siLATS2 #3またはsiCtrlを処理して、DNA、チロシンリン酸化タンパク質、F-アクチンを染色した。ブレブ形成の有無は、F-アクチンの染色画像と位相差画像を観察して判断した。v-Src発現細胞のブレブ形成率は、チロシンリン酸化がv-Src非発現細胞より亢進している細胞中でブレブを形成している細胞の割合を示す。NIH3T3/v-Src-shScramble、NIH3T3/v-Src-shLATS2細胞においても同様の方法でブレブ形成率を算出した。HeLa S3/v-Src-V5-LATS2-WTとHeLa S3/v-Src-V5-LATS2-SA細胞のブレブ形成率は、抗LATS2抗体（#703621, Invitrogen）による染色でHeLa S3細胞と比較してLATS2の蛍光強度が強い細胞のみを母集団として算出した。

### 1-2-18 統計解析

統計解析には、Rのグラフィカルユーザーインターフェース（version 3.6.1, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）であるEZR（自治医科大学附属さいたま医療センター，埼玉）を使用した<sup>47</sup>。2群間の有意差検定は、F検定で2つのデータの分散が等しいか検定した後、スチューデントの*t*検定（両側）を用いて行った。多群間の有意差検定は、バートレット検定で各データの分散が等しいか検定した後、一元配置分散分析を行い、Tukeyの多重比較検定を用いて行った。*p*値が0.05以下の場合、有意に差があると判断した。詳細は各図の説明に記載した。

### 1-3 実験結果

#### 1-3-1 v-SrcによるLATS2キナーゼ活性の抑制

v-SrcがLATS2によるYAPのリン酸化を抑制する可能性が報告されたことから<sup>38</sup>、v-Src発現細胞のLATS2のキナーゼ活性をLATS2の基質であるYAP Ser127のリン酸化で評価した。ヒト子宮頸がん由来HeLa S3/v-Src細胞株は、Dox処理によりv-Srcが誘導発現する。この細胞に0.1 µg/mLのDoxを12時間処理すると、v-Srcが誘導発現し、YAP Ser127のリン酸化は低下した（図1-1 A）。そこでLATS2のキナーゼ活性を評価するため、Dox処理細胞と無処理細胞から免疫沈降法（IP: immunoprecipitation）により精製したLATS2と、大腸菌から精製したGST-YAP2を用い、*in vitro*キナーゼアッセイを行った。その結果、Dox処理の無い細胞から精製したLATS2とGST-YAP2を反応させた場合ATP-Mg<sup>2+</sup>存在下でYAP Ser127のリン酸化が観察された（図1-1 B）が、v-Srcを発現したDox処理細胞から精製したLATS2とGST-YAP2の反応では観察されなかった（図1-1 B）。これらの結果より、v-SrcはLATS2のキナーゼ活性を低下させることが示唆された。

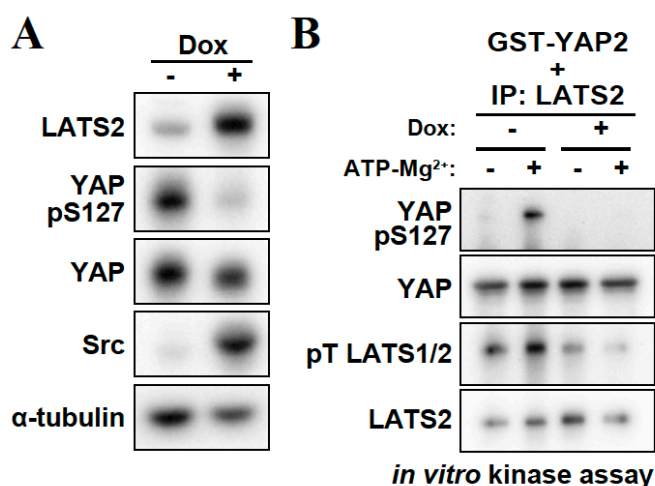


図1-1. v-Src発現はLATS2のキナーゼ活性を低下させる

HeLa S3/v-Src細胞に0.1 µg/mL Doxを12時間処理した。(A) 全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。(B) Dox処理細胞と無処理細胞から抗LATS2抗体 (Atlas Antibodies) を用いた免疫沈降法によりLATS2を精製した。精製したGST-YAP2と免疫沈降法で集めたLATS2を1 mM ATPと5 mM Mg<sup>2+</sup>の存在下または非存在下で30分間30℃の水浴中で反応させた。反応終了後、SDSサンプルバッファーを加えて作製した溶解液を図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 1より引用。

v-Src発現時にLATS2のモビリティシフトが観察された（図1-1 A）ことから、リン酸化タンパク質の検出に用いられるPhos-tagゲル<sup>48</sup>を用いウェスタンブロット解析すると、通常のゲル以上のモビリティシフトがv-Src発現時に観察された（図1-2 A）。この結果は、LATS2のリン酸化の亢進を示している。v-Srcによる間接的なLATS2のリン酸化亢進も考えられるが、v-SrcがLATS2を直接チロシンリン酸化すると仮説を立て検証した。

まず、Dox処理細胞と無処理細胞から外因性または内在性のLATS2を免疫沈降してLATS2のチロシンリン酸化レベルを比較した。HeLa S3/v-Src細胞にV5-LATS2発現プラスミドを導入し、抗V5抗体を用いて免疫沈降すると、LATS2のチロシンリン酸化が検出された（図1-2 B）。また、抗LATS2抗体を用いた内在性LATS2の免疫沈降においても同様の結果が観察された（図1-2 C）。さらに、HeLa S3/v-Src細胞にEGFP-LATS1（アイソフォーム2）あるいはEGFP-LATS2発現プラスミドを導入し、抗LATS1/2抗体を用いて免疫沈降した。抗LATS1/2抗体はLATS1及

びLATS2の両方を免疫沈降することが可能だが、内在性のLATS2のバンドよりも高分子側に検出されるバンドがあり、抗GFP抗体で検出されたことからEGFPが融合したLATS2（EGFP-LATS2）であると判断した。Dox処理によりEGFP-LATS2のチロシンリン酸化が強く検出された（図1-2 D, 左）。EGFP-LATS1を導入した細胞でもチロシンリン酸化レベルが亢進したように見えるが、抗LATS1/2及び抗GFP抗体で検出されるバンドの増強は、免疫沈降されたEGFP融合LATS1の量が均一ではないことを示す。この沈降量を考慮すると、EGFP-LATS1のチロシンリン酸化は顕著ではなかった（図1-2 D, 右）。以上の結果から、v-Src発現がLATS2のチロシンリン酸化を亢進することが明らかになった。

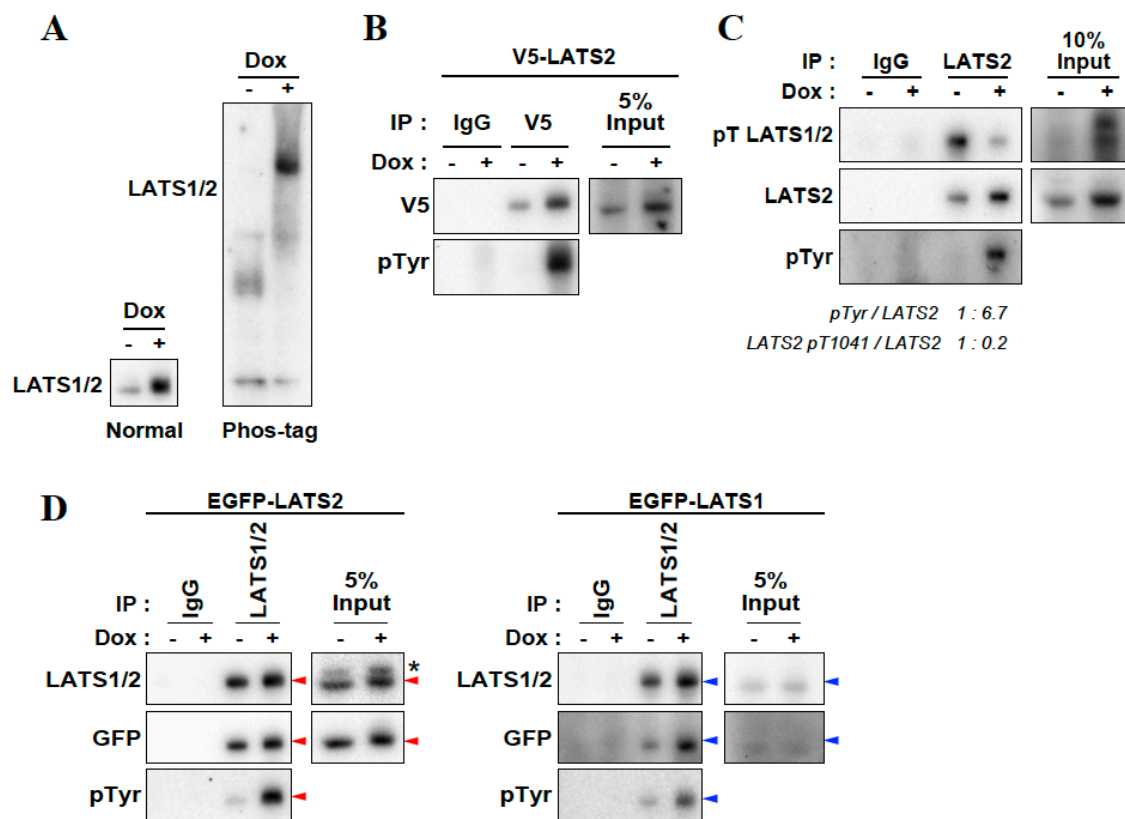


図1-2. v-Src発現がLATS2のチロシンリン酸化を亢進する

(A–D) HeLa S3/v-Src細胞にV5-LATS2 (B)、EGFP-LATS2またはEGFP-LATS1 (D) の発現プラスミドを導入し、12時間後に0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Doxを含む培養液に交換して、さらに12時間培養した。(A) 全細胞溶解液を20  $\mu\text{M}$  Phos-tagと40  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$ を含むポリアクリルアミドゲルで分離し、抗LATS1/2抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。(B–D) 0.2–1% Triton X-100を含む溶液で全細胞を溶解し、溶解液と抗V5抗体 (B)、抗LATS2抗体 (Atlas Antibodies) (C) または抗LATS1/2抗体 (D) を反応させて免疫沈降した。ネガティブコントロールとしてマウスまたはラビットアイソタイプコントロールIgG抗体を用いた。細胞抽出液 (5%または10% input) と免疫沈降物を、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。赤色のアローヘッドはEGFP-LATS2、青色のアローヘッドはEGFP-LATS1をそれぞれ示す。アスタリスクは非特異的なバンドを示す。チロシンリン酸化とリン酸化LATS2 Thr1041のシグナル強度の、全LATS2に対する比を算出し (C) に示す。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 1より引用。



次に、v-Src発現細胞におけるLATS2のチロシンリン酸化の亢進が、v-Srcによる直接的なリン酸化が検証した。Dox処理細胞から免疫沈降により精製したv-Srcと、Lenti-X 293T細胞から精製したEGFP融合LATS2を用いて*in vitro*キナーゼアッセイを行い、LATS2のチロシンリン酸化レベルを比較した。ATP-Mg<sup>2+</sup>の存在下で、コントロールIgG抗体の免疫沈降物とEGFP-LATS2の反応に比べ、抗Src抗体の免疫沈降物とEGFP-LATS2を反応させたときに、LATS2のチロシンリン酸化が強く検出された(図1-3 A)。一方、免疫沈降したv-SrcとEGFPを反応させても、EGFPのチロシンリン酸化は亢進しなかった(図1-3 B)。v-Srcと同様に、精製したc-Src-HAとHA-FLAG-LATS2を反応させると、LATS2に対するチロシンリン酸化シグナルの比は有意に増加し、HA-FLAG-LATS2のチロシンリン酸化亢進を示した(図1-4)。これらの結果は、v-Srcおよびc-Srcは、LATS2のチロシン残基を直接リン酸化することを示している。

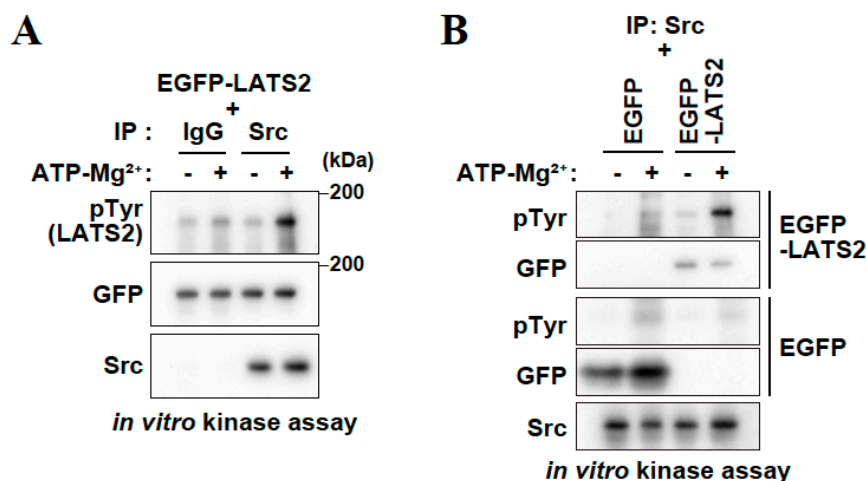


図1-3. v-SrcはLATS2を直接リン酸化する

HeLa S3/v-Src 細胞に 0.1 µg/mLのDoxを12時間処理し、抗Src抗体またはマウスアイソタイプコントロールIgG抗体を用いて細胞溶解液から免疫沈降した。EGFPまたはEGFP-LATS2を導入したLenti-X 293T細胞の細胞溶解液から、実験方法1-2-14に記載した方法を用いてEGFPとEGFP-LATS2を精製した。*in vitro*キナーゼアッセイを行い、反応物にSDSサンプルバッファを加えて図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

(A) 抗Src抗体またはマウスアイソタイプコントロールIgG抗体の免疫沈降物と精製したEGFP-LATS2の*in vitro*キナーゼアッセイを行った。(B) 抗Src抗体の免疫沈降物と、精製したEGFP-LATS2またはEGFPの*in vitro*キナーゼアッセイを行った。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 2より引用。

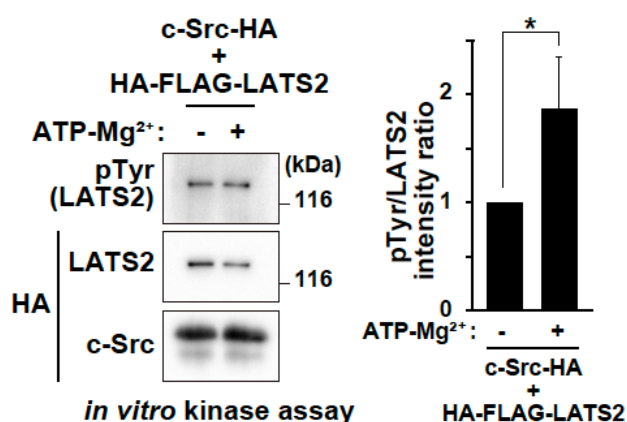


図1-4. c-SrcはLATS2を直接リン酸化する

1-2-14に記載した方法で、精製c-Src-HAとHA-FLAG-LATS2を精製した。これらを1 mM ATPと5 mM Mg<sup>2+</sup>存在下または非存在下で30分間30℃の水浴中で反応させた。反応物にSDSサンプルバッファを加え、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。独立した3回の実験からLATS2に対するLATS2のチロシンリン酸化レベルの比の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した。Student's *t*-testで*p*値を求めた (\**p* < 0.05)。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 2より引用。



SrcによるLATS2の直接的なリン酸化が、LATS2のキナーゼ活性を低下させるかどうかを調べるため、2段階の*in vitro*キナーゼアッセイを行った(図1-5)。はじめに、ビーズに結合したV5-LATS2とc-Src-HA溶液を、ATP-Mg<sup>2+</sup>存在下または非存在下で反応させた。反応後、ビーズに結合したV5-LATS2を、ATP-Mg<sup>2+</sup>存在下または非存在下でGST-YAP2溶液と反応させた。ATP-Mg<sup>2+</sup>非存在下でc-Src-HAと反応させたV5-LATS2を、ATP-Mg<sup>2+</sup>存在下でGST-YAP2と反応させるとYAP Ser127は強くリン酸化された(図1-5 レーン9と10を比較)。しかしこのリン酸化は、ATP-Mg<sup>2+</sup>の存在下でc-Src-HAと反応させたV5-LATS2をGST-YAP2と反応させると減少した(図1-5 レーン10と12を比較)。これらの結果より、c-SrcによるLATS2の直接的なリン酸化がLATS2のキナーゼ活性を低下させることが示唆された。

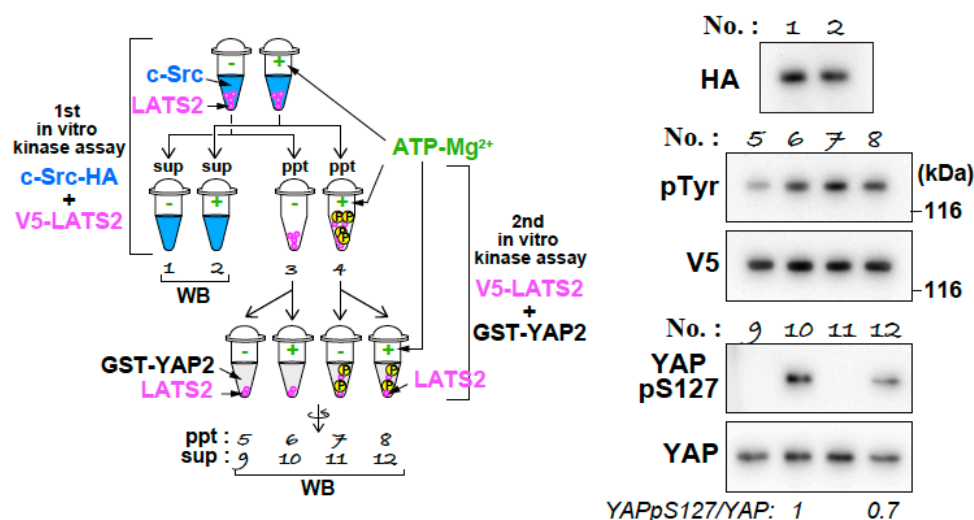


図1-5. c-SrcによるLATS2の直接的なリン酸化は、LATS2のキナーゼ活性を抑制する

2段階の*in vitro*キナーゼアッセイの概略図を示す。第1段階として、1-2-14に記載した方法で精製したc-Src-HAとビーズに結合したV5-LATS2を、1 mM ATPと5 mM Mg<sup>2+</sup>存在下または非存在下で、30分間30℃の水浴中で反応させた。反応したサンプルを上清と沈殿物に分離し、c-Src-HAを含む上清を番号1、2と標識し、沈殿物を番号3、4と標識した。第2段階として、1 mM ATPと5 mM Mg<sup>2+</sup>の存在下または非存在下で、V5-LATS2沈殿物と、精製したGST-YAP2を30分間30℃の水浴中で反応させた。それぞれを反応させたサンプルを沈殿物と上清に分け、沈殿物を番号5-8、上清を番号9-12と標識した。沈殿物と上清にSDSサンプルバッファーを加え、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。全YAPに対するYAP pS127のシグナル強度比をプロットの下に示す。

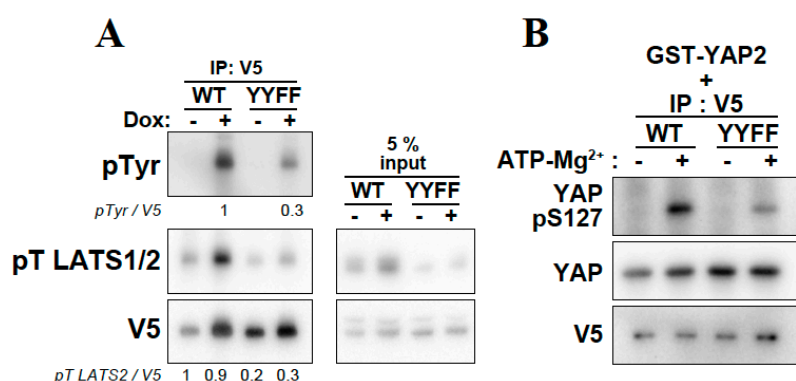
FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 2より引用。

ここまで、Srcによって直接リン酸化されたLATS2のキナーゼ活性が低下することを明らかにしてきたが、LATS2のどのチロシン残基がリン酸化されるかは分かっていない。LATS1はSrcによってリン酸化されることが報告されている<sup>49</sup>。LATS1とLATS2のアミノ酸配列の相同性が高い<sup>50</sup>ため、Srcによってリン酸化されるLATS1のTyr692とTyr916に相同するLATS2のTyr655とTyr879に着目し、これら2つのチロシン残基のv-Srcによるリン酸化について解析した。

LATS2のTyr655とTyr879をフェニルアラニンに置換したV5-LATS2-YYFFプラスミドDNAを作製し、野生型のV5-LATS2 (V5-LATS2-WT) とV5-LATS2-YYFF変異体発現プラスミドDNAをHeLa S3/v-Src細胞に導入した。Dox処理 (v-Src発現) 細胞、及び無処理 (非発現) 細胞からV5-LATS2-WTまたはV5-LATS2-YYFFを免疫沈降し、それぞれのチロシンリン酸化レベルを比較した。v-Src発現時に観察されたV5-LATS2-WTのチロシンリン酸化がV5-LATS2-YYFFで

は顕著に低下した（図1-6 A）。これらの結果から、LATS2のTyr655または／およびTyr879がv-Srcによってリン酸化される主要なアミノ酸残基であることが示唆された。

これらのリン酸化がSrcによるLATS2のキナーゼ活性抑制の原因であるか調べるため、まず、V5-LATS2-WTと-YYFFがv-Src非発現時に同程度のキナーゼ活性を示すか調べた。Dox無処理（v-Src非発現）細胞からV5-LATS2-WTまたはV5-LATS2-YYFFを免疫沈降し、GST-YAP2を基質に用いて*in vitro*キナーゼアッセイを行った。その結果、予想外なことに、V5-LATS2-WTとの反応により観察されたYAP (Ser127)のリン酸化レベルがV5-LATS2-YYFFとの反応では顕著に低下した（図1-6 B）。この結果は、V5-LATS2-YYFFのキナーゼ活性が-WTよりも低下していることを示す。また、Tyr655とTyr879の変異は、LATS2の活性化に重要なMST1/2リン酸化サイトであるThr1041のリン酸化をv-Srcの発現に関わらず減少させた（図1-6 A）。すなわち、Tyr655とTyr879のフェニルアラニンへの置換が、MST1/2によるLATS2のリン酸化を阻害し、LATS2を活性化させないことを示す。よって、MST1/2によりリン酸化され活性化した条件において、LATS2のキナーゼ活性にこれらの変異が与える影響を評価することができなかった。



**図1-6. v-SrcはLATS2のTyr655または／およびTyr879をリン酸化する**

HeLa S3/v-Src細胞にV5-LATS2-WTまたはV5-LATS2-YYFF (Tyr655Phe, Tyr879Phe)の発現プラスミドDNAを導入した。培養細胞を1% Triton X-100細胞溶解液で溶解し、抗V5抗体を用いて免疫沈降した。(A) プラスミドDNAを導入してから12時間後に、0.1 μg/mL Doxを含む培養液

に交換してさらに12時間培養した。細胞抽出液（5% input）と免疫沈降物を図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。V5に対するチロシンリン酸化タンパク質またはLATS2 pT1041のシグナル強度比をプロットの下に示す。FASEB J. 2021, 35, e21242. Supplemental Figure S2より引用。(B) Dox無処理細胞から免疫沈降したV5-LATS2-WTまたはV5-LATS2-YYFFと、精製したGST-YAP2を1 mM ATPと5 mM Mg<sup>2+</sup>存在下または非存在下で反応させた。反応物にSDSサンプルバッファーを加え、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。

### 1-3-2 LATS2のキナーゼ活性非依存的機能

LATS2が、キナーゼ活性に依存してHippo経路、DNA損傷応答、細胞分裂などに働くことや、キナーゼ活性に依存せずにapoptosis signal-regulating kinase 1、β-cateninの足場タンパク質になることが報告されている<sup>29,51-54</sup>。そこで、v-Src発現細胞にキナーゼ活性が抑制されたLATS2が存在する意義を探索するため、siRNA処理によりLATS2をノックダウンした。細胞膜の突出であるブレブは、アポトーシスや細胞遊走などの際に観察される現象であるが、Dox処理により細胞膜が突出した（ブレブ形成）細胞が増加し、LATS2のノックダウンによりさらに増加した（図1-7 A-C）。標的配列の異なる2種類のsiRNAを用いてLATS2をノックダウンしても同様な結果が観察された（図1-7 B, C）。この結果は、v-Srcにより誘導されるブレブ形成をLATS2ノックダウンが増加させる効果がsiRNAのオフターゲット効果ではないことを示す。

LATS2のノックダウン単独ではブレブが形成しないことは、v-Srcの発現がブレブ形成の引き金になっている可能性がある。LATS2 siRNA処理はDox処理細胞のSrcの発現量を増加させたが（図1-7C）、LATS2 siRNA処理とコントロールsiRNA（siCtrl: siControl）処理の間でチロシンリン酸化レベルに変化はなく（図1-8）、LATS2ノックダウンによるブレブ形成の増加がSrcのキナーゼ活性亢進によるものではないことを確認した。

HeLa S3/v-Src細胞以外の細胞においても、v-Srcによるブレブ形成がLATS2ノックダウンにより増加するのか、v-Srcの誘導発現が可能なマウス線維芽細胞株NIH3T3細胞（NIH3T3/v-Src）を用いて解析した。まず、shLATS2を恒常的に発現する細胞株を樹立し、LATS2のノックダウンがLATS1の発現量には影響を与えていないことを確認した（図1-9A）。v-Srcを発現すると、HeLa S3/v-Src細胞と同様にブレブが形成し、LATS2のノックダウンにより増加した（図1-9A-C）。従って、LATS2はv-Srcが誘導するブレブ形成を抑制する働きがあること、さらに、その働きが細胞種に依存しないことが示唆された。

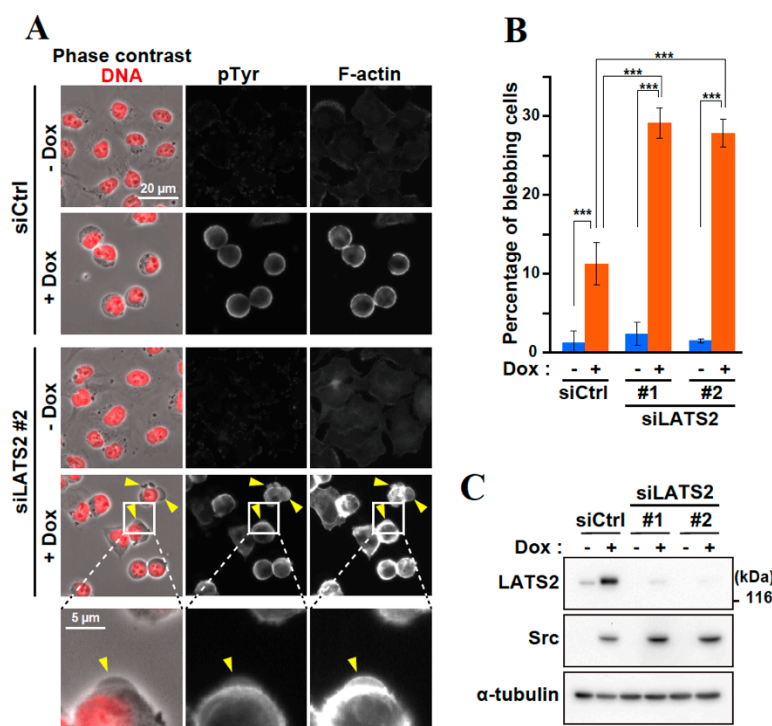


図1-7. LATS2ノックダウンはv-Srcによるブレブ形成を増加させる

HeLa S3/v-Src細胞に30 pmolのsiLATS2（siLATS2 #1、siLATS2 #2、siLATS2 #3）またはsiControl（siCtrl）を12時間処理し、その後、0.1 μg/mL Doxで12時間培養した。（A）細胞をPTEMFで固定した。リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質、F-アクチン（ファロイジン）、およびDNA（赤）と位相差画像を統合した画像を示す。アローヘッドは、細胞膜のブレブを示す。スケールバーは、20 μmまたは5 μm（拡大画像）。（B）独立した3回の実験からブレブを示す細胞の割合の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した（n ≥ 433）。Tukeyの多重比較検定でp値を求めた（\*\*\*p < 0.001）。（C）全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 3より引用。

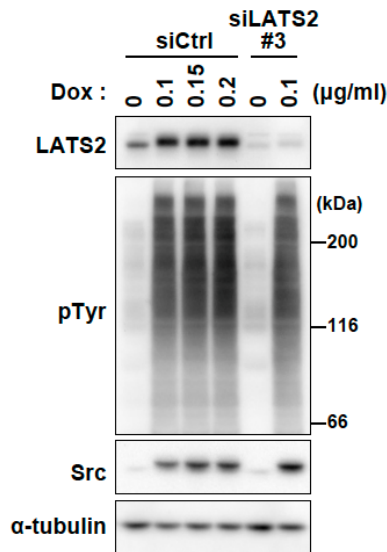


図1-8. LATS2ノックダウンによるSrc発現増加はチロシンリン酸化を亢進させない

HeLa S3/v-Src細胞に30 pmolのsiLATS2 #3またはsiCtrlを12時間処理し、その後、図に示す濃度のDoxで12時間培養した。全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。

FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 3より引用。

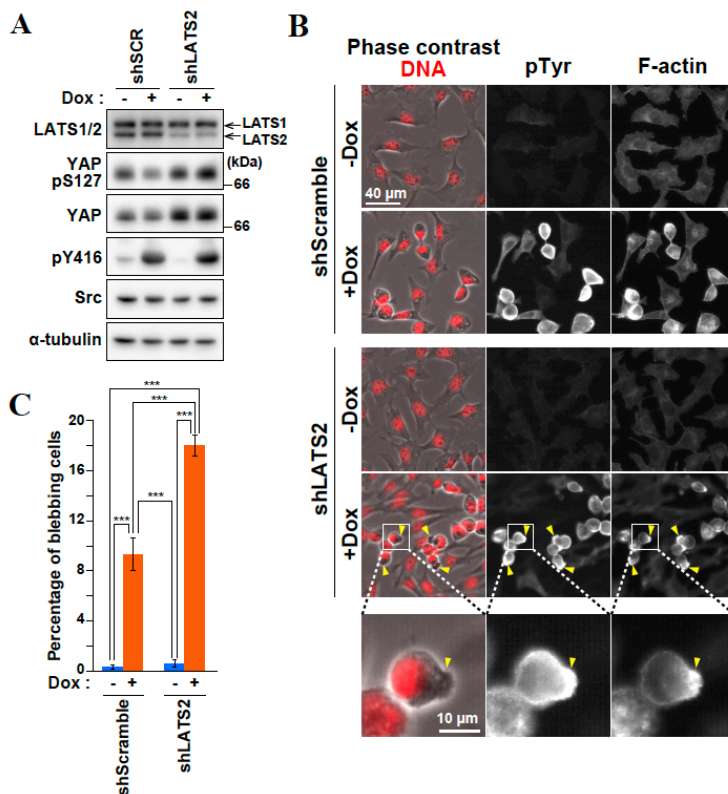


図1-9. NIH3T3/v-Src細胞におけるLATS2ノックダウンはv-Srcによるプレブ形成を増加させる

NIH3T3/v-Src細胞由来のLATS2恒常的ノックダウン細胞 (NIH3T3/v-Src shLATS2, shLATS2) とそのコントロール細胞 (NIH3T3/v-Src shScramble, shSCR) を0.1 ng/mL Doxで18時間培養した。(A) 全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。(B) 細胞を4%ホルムアルデヒドで固定し染色した。リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質、F-アクチン (ファロイジン)、および、DNA (赤) と位相差画像を統合した画像を示す。実線で囲んだ領域の拡大画像を下に示す。アローヘッドは、細胞膜のプレブを指す。スケールバーは、40 μmまたは10 μm (拡大画像)。

(C) 独立した3回以上の実験からプレブを示す細胞の割合の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した (n≥400)。Tukeyの多重比較検定でp値を求めた (\*\*\*p<0.001)。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 4より引用。

ここまで、v-Srcが誘導するプレブ形成をLATS2が抑制することを示した。この働きがLATS2のキナーゼ活性に依存するか調べるために、野生型 (V5-LATS2-WT, WT) とキナーゼ活性不活性型LATS2 (V5-LATS2-S872A, SA)<sup>55,56</sup>の恒常発現細胞株を樹立した (図1-10 A)。まず、作製した変異体がキナーゼ活性不活性型であるかを*in vitro*キナーゼアッセイを用いて確認した。その結果、V5-LATS2-WTによりGST-YAP2のSer127のリン酸化が検出されたが、V5-LATS2-S872Aとの反応では検出されなかった (図1-10 B)。このことから、V5-LATS2-S872Aがキナーゼ活性不活性型であることが確認された。続いて、3'非翻訳領域を標的とするsiRNA



(siLATS2 #3) が外因性のLATS2のみをノックダウンするかを解析した。LATS2のオープンリーディングフレームを標的としたLATS2 siRNA (siLATS2 #1) 処理は内在性LATS2 (図1-7 C, #1) と外因性V5-LATS2-S872A (図1-11A, #1) の発現量を減少させたが、 siLATS2 #3は、内在性LATS2を減少させ (図1-11 B, None)、3'非翻訳領域を含まない外因性LATS2 (V5-LATS2-WTとV5-LATS2-S872A) の発現量には影響を与えなかった (図1-11 A, B, #3)。このことから、siLATS2 #3が内在性LATS2の発現のみを減少させることが確認された。

次に、LATS2-S872Aのブレブ形成への影響を調べた。親株であるHeLa S3/v-Src細胞にv-Srcを発現させsiLATS2 #3を用いて内在性のLATS2をノックダウンするとブレブ細胞が22%観察され、V5-LATS2-WTやV5-LATS2-SA細胞ではsiLATS2 #3で処理してもブレブ形成細胞は10%未満であり、これらの再発現により内在性LATS2のノックダウンによるブレブ形成の増加が抑制された (図1-12)。これらの結果から、LATS2はキナーゼ活性非依存的にv-Srcが誘導するブレブを抑制することを明らかにした。

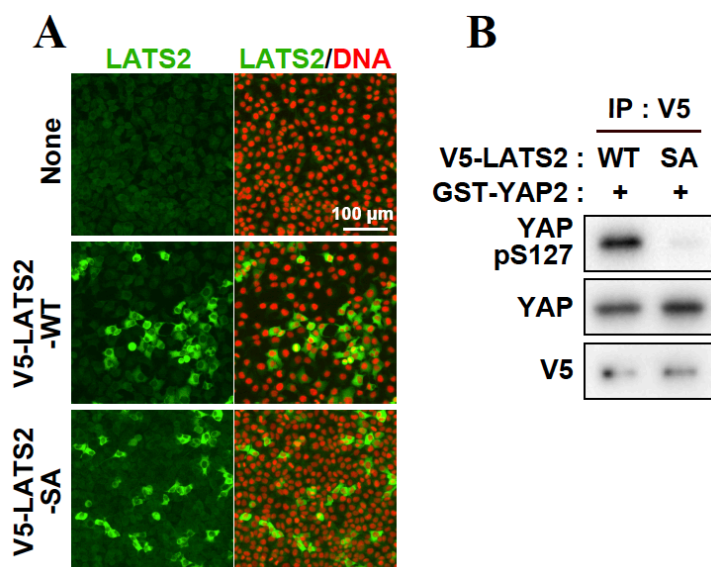


図 1-10. V5-LATS2-WT と V5-LATS2-S872Aを恒常発現する細胞株の樹立

(A) 親株であるHeLa S3/v-Src細胞と樹立したV5-LATS2-WT細胞、V5-LATS2-SA細胞を4%ホルムアルデヒドで固定した。それぞれの細胞のLATS2 (緑)、およびDNA (赤) とLATS2を統合した画像を示す。スケールバーは、100  $\mu$ m。 (B) V5-LATS2-WTあるいはV5-LATS2-SAの発現プラスミドDNAをLenti-X 293T細胞に導入し、抗V5抗体を用いてV5-LATS2-WTとV5-LATS2-SAを免疫沈降した。沈殿物と精製したGST-YAP2を1 mM ATP、5 mM  $Mn^{2+}$ 、5 mM  $Mg^{2+}$ 存在下、30°Cで30分間反応させた。反応物にSDSサンプルバッファーを加えて、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。

FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 5より引用。

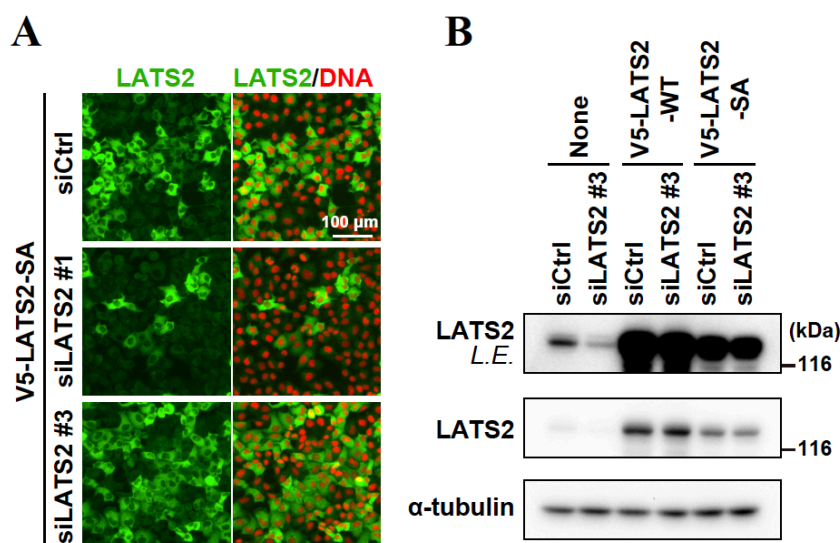
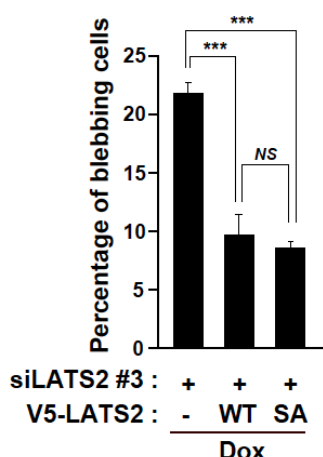


図1-11. LATS2の3'非翻訳領域を標的としたsiRNAは内在性LATS2のみをノックダウンする

親株のHeLa S3/v-Src細胞とV5-LATS2-WT細胞、V5-LATS2-SA細胞に30 pmolのsiLATS2 #1、siLATS2 #3またはsiControlを24時間処理した。 (A) 親株である、HeLa S3/v-Src細胞とV5-LATS2-WT細胞、V5-LATS2-SA細胞を4%ホルムアルデヒドで固定した。LATS2 (緑)、およびDNA (赤) とLATS2を統合した画像を示す。スケールバーは、100  $\mu$ m。 (B)

全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。L.E.は、long exposureを意味する。

*FASEB J.* **2021**, 35, e21242. Figure 5より引用。



**図1-12. LATS2はキナーゼ活性非依存的にv-Srcによるブレブ形成を抑制する**

親株のHeLa S3/v-Src細胞、V5-LATS2-WT細胞、V5-LATS2-SA細胞に30 pmolのsiLATS2 #3を12時間処理し、その後0.1  $\mu$ g/mL Doxを含む培養液で12時間培養した。独立した3回以上の実験からブレブを示す細胞の割合の平均値 $\pm$ SDsを算出し、その結果をグラフに示した ( $n \geq 400$ )。Tukeyの多重比較検定で $p$ 値を求めた (\*\* $p < 0.001$ )。NSはnot significantを意味する。*FASEB J.* **2021**, 35, e21242. Figure 5より引用。

### 1-3-3 YAPを介した、v-SrcによるLATS2の発現量増加

ここまで、v-SrcによってLATS2のキナーゼ活性が低下すること (1-3-1)、LATS2はキナーゼ活性に依存せずにv-Srcによるブレブ形成を抑制すること (1-3-2) を明らかにした。興味深いことに、v-Src発現細胞ではLATS2の発現量が大幅に増加していた (図1-1 A)。v-Srcによるブレブ形成の抑制には、このLATS2の発現量の増大が影響する可能性がある。そこで、v-Src発現細胞においてLATS2の発現量増加が起こる機序を解析した。

Dox処理は、様々なタンパク質のチロシンリン酸化の亢進と共にLATS1/2の発現量を増加させた (図1-13 A)。さらに、LATS2の発現量はv-Srcの発現量増加に伴って経時的に増加した (図1-13 B)。その際、経時的にチロシンリン酸化レベルが亢進し細胞が浮遊することを確認した (図1-13 C)。一方、HeLa S3/v-Src細胞の親株であるHeLa S3細胞に0.1  $\mu$ g/mL Doxを12時間処理してもLATS2の発現量増加は観察されず (図1-13 D)、v-Srcにより誘導される現象であることを確認した。

LATS2の発現量は、YAPを介した転写調節によって一部制御されている<sup>31,57</sup>。YAPのSer127のリン酸化は14-3-3との結合によるYAPの細胞質保持を介してYAPの転写調節機能を抑制する<sup>29,58</sup>。反対に、v-Src発現によるYAP (Ser127)のリン酸化低下 (図1-1 A) は、YAPを介した転写が活性化していることを示唆している。実際、Dox処理によりYAPの標的遺伝子<sup>28,29,31,57</sup>であるconnective tissue growth factor (CTGF) とcysteine-rich angiogenin inducer 61 (Cyr61) の発現量は増加しており (図1-14 A)、v-SrcによりYAPを介した転写が亢進することが示唆された。そこで、v-SrcによるLATS2の発現量増加にYAPが関与しているか調べるため、Dox処理細胞においてsiRNAでYAPをノックダウンした。予想通り、Dox処理により増加したLATS2の発現量がYAPのノックダウンにより減少した (図1-14 B)。さらに、定量的PCRを用いてmRNA量を評価すると、Dox処理によりLATS2とCTGFのmRNA量が増加し、その増加がYAPのノックダウンで減少した (図1-14 C, D)。一方、LATS1 mRNA量はv-Srcの発現やYAPのノックダウ

ンにより変化しなかった (図1-14 C)。これらのことから、v-Srcにより誘導されるLATS2の発現量増加はYAPに依存的な転写活性化を介していることが示唆された。

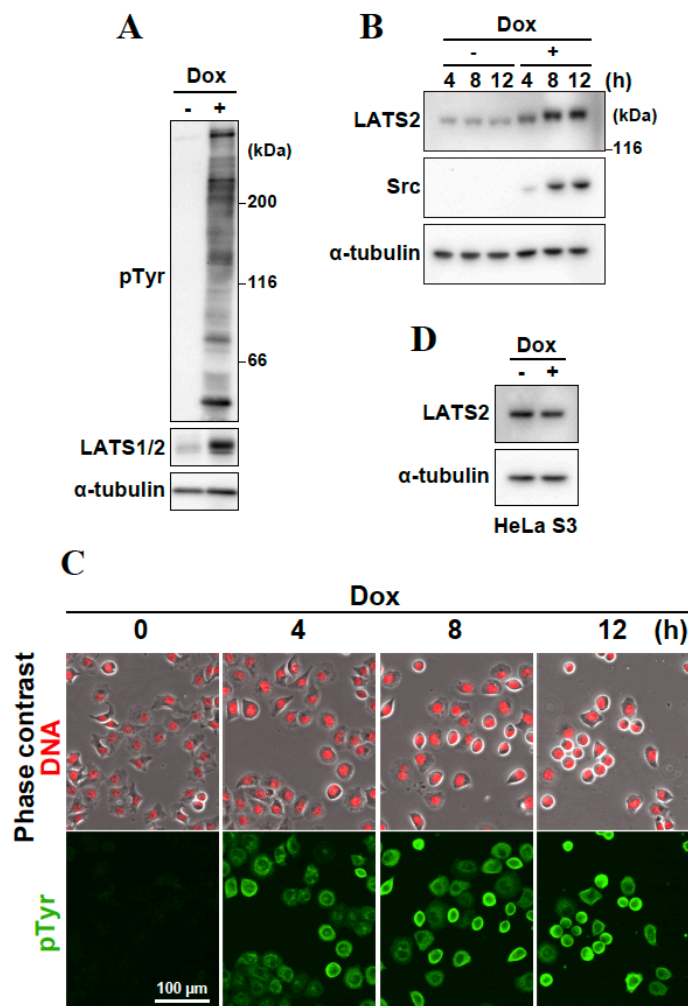


図1-13. v-SrcはLATS2の発現量を増加させる

HeLa S3/v-Src細胞 (A–C)、HeLa S3細胞 (D) に0.1 μg/mL Doxを12時間 (A, D)、または図に示す時間 (B, C) 処理した。(A, B, D) 全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。(C) 細胞を4%ホルムアルデヒドで固定し染色した。リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質 (緑)、および、DNA (赤) と位相差像を統合した画像を示す。スケールバーは100 μm。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 7より引用し、一部改変。

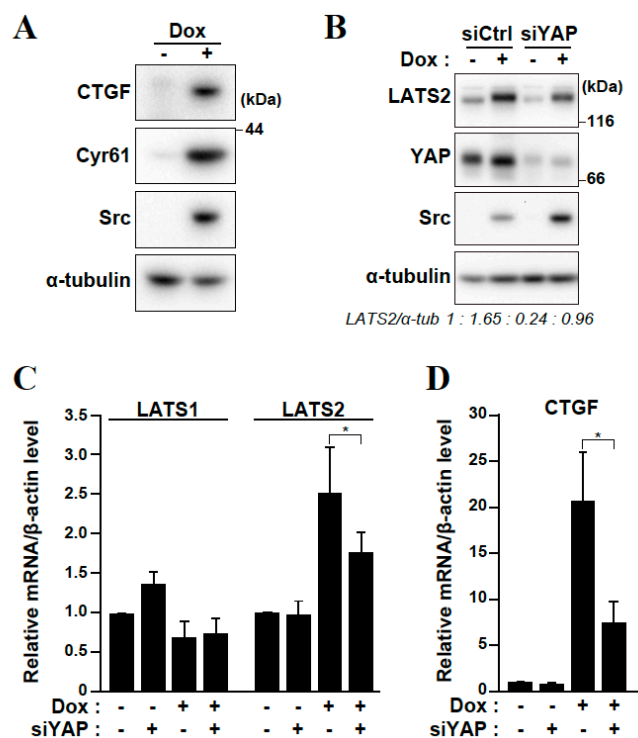


図1-14. v-SrcによるYAPを介した転写亢進がLATS2の発現量を増加させる

HeLa S3/v-Src細胞に0.1 μg/mL Doxを12時間処理した。(A) 全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。(B–D) Doxを加える12時間前に40 pmol siYAPまたはsiCtrlを処理した。(B) 全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。α-チューブリンに対するLATS2のシグナル強度比をプロットの下に示す。(C, D) LATS1、LATS2、CTGFのmRNA量をリアルタイムPCRで評価した。β-アクチンの発現量を用いて目的遺伝子の発現量のmRNA量を補正し、相対定量した。DoxとsiYAPを処理していないサンプルの発現量を1とし、それぞれのサンプルの発現量を相対比にした。独立した3回以上の実験から相対比の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した。Student's *t*-testで*p*値を求めた (\**p* < 0.05)。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 7より引用。

LATS2の発現量は、YAPを介した転写調節以外にもE3ユビキチンリガーゼITCHによるユビキチン化を介したユビキチンプロテアソーム系のタンパク質分解によっても制御されている<sup>59</sup>。そのため、v-SrcによるLATS2の発現量増加がプロテアソーム系などタンパク質分解系の抑制による可能性も考えられる。そこで、ユビキチンプロテアソーム経路やオートファジー経路を各種阻害剤で阻害し、LATS2の発現量に与える影響を調べた。プロテアソーム阻害剤であるMG132を4、8、12時間処理したDox無処理細胞のLATS2の発現量をDox処理細胞のLATS2と比較した。ユビキチンプロテアソーム経路で分解されるCyclin B1とp53の発現量がMG132処理により増加し、様々なタンパク質のユビキチン化も亢進したが、LATS2の発現量は変化しなかった(図1-15 A)。同様に、HeLa S3細胞にオートファジー阻害剤であるバフィロマイシンA1を4または6時間処理しても、LATS2の発現量は変化しなかった(図1-15 B)。さらに、タンパク質合成系を抑制しv-Src発現下でのLATS2の安定性を評価した。HeLa S3/v-Src細胞に0.1 μg/mL Doxを8時間処理した後にシクロヘキシミドを添加してタンパク質の合成を阻害し、経時的に発現量を調べたところ、v-Src非発現細胞にシクロヘキシミドを処理したときと同様にLATS2の発現量が減少した(図1-16)。これらの結果から、v-SrcによるLATS2発現量の増加にユビキチンプロテアソーム経路とオートファジー経路の抑制が関与していないこと、さらに、v-SrcはLATS2を安定化させず、LATS2発現量の増加に寄与しないことが示唆された。



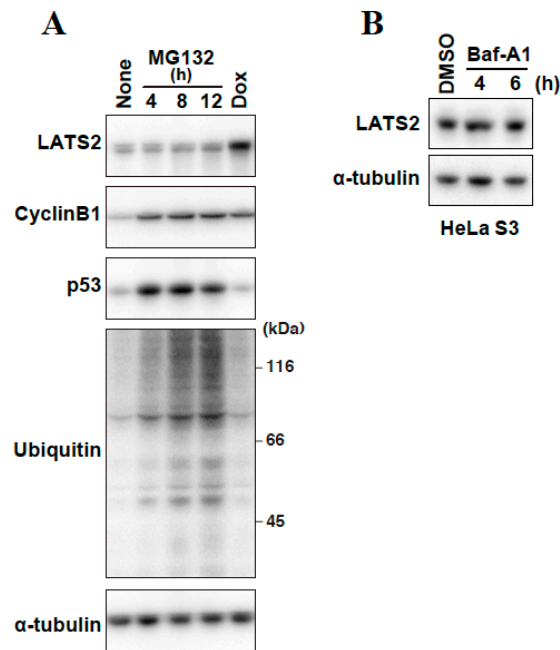


図1-15. タンパク質分解系の抑制はLATS2の発現量に影響を与えない

(A) HeLa S3/v-Src細胞に0.1  $\mu\text{g/mL}$  Doxを12時間、または10  $\mu\text{M}$  MG132を4、8、12時間処理した。全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。(B) HeLa S3細胞にバフィロマイシンA1 (Baf-A1) を4または6時間処理して、全細胞を回収した。図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 7より引用。

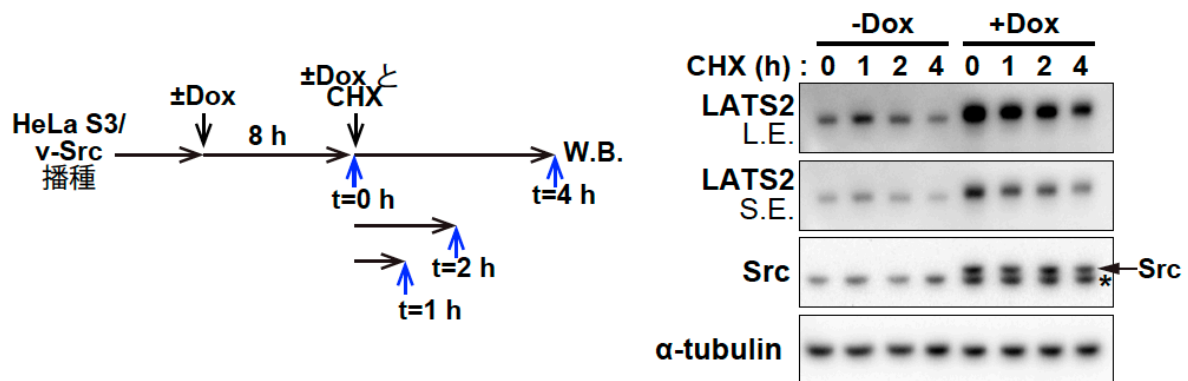


図1-16. v-Src発現細胞でLATS2の安定性は変化しない

HeLa S3/v-Src細胞を0.1  $\mu\text{g/mL}$  Dox含有または非含有の培地で8時間培養し、v-Src発現によるLATS2の発現量増加を誘導した。100  $\mu\text{g/mL}$ のシクロヘキシミド (CHX) を処理し、その0、1、2、4時間後 (t=0, 1, 2, 4 h) に全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。アスタリスクは、 $\alpha$ -チューブリンのバンドを示す。L.E.は、long exposureを意味する。

ここまで、HeLa S3/v-Src細胞でv-SrcによりLATS2の発現量が増加することを示してきたが、他の細胞株でもSrc活性依存的なLATS2の発現量増加が起こるか解析した。v-Srcを誘導発現可能なヒト直腸がん由来HCT116細胞株 (HCT116/v-Src)、およびNIH3T3/v-Src細胞にv-Srcを誘導発現させ、抗LATS1/2抗体を用いて発現量を調べた結果、HCT116/v-Src細胞では抗LATS1/2抗体で検出されるバンドが増強し、NIH3T3/v-Src細胞ではLATS2のバンドが増強した (図1-17 A, B)。さらに、c-Srcの発現量が高いヒト大腸上皮がん由来HT29細胞<sup>60</sup>で、Srcの活性を抑制するCskをノックダウンすると、Srcの活性化を示すSrc (Tyr416)のリン酸化と様々なタンパク質のチロシンリン酸化の亢進と共にLATS2の発現量も増加した (図1-17 C)。これらの結果か

ら、v-SrcによるLATS2の発現量増加はがん種や動物種に依存しないことに加え、c-Srcの活性化によってもLATS2の発現量が増加することが示唆された。

以上のことから、v-SrcによりLATS2特異的に発現量が増加し、この発現量増加はLATS2の分解抑制や安定性向上ではなく、YAPを介した転写活性化によって起こることが明らかになった。さらに、LATS2の発現量増加はv-Srcに特有の細胞応答ではなく、Cskの発現量低下などの生理的条件に近いSrc活性化でも起こることが示唆された。

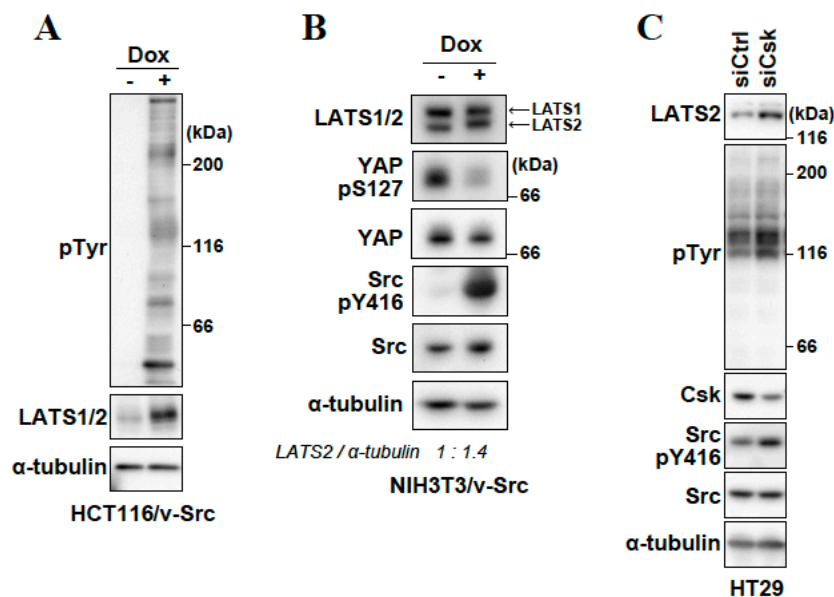


図1-17. Src活性亢進により、様々な細胞種でLATS2の発現量が増加する

(A, B) HCT116/v-Src細胞またはNIH3T3/v-Src細胞に0.1  $\mu\text{g/mL}$  Doxを12時間処理した。全細胞を回収し、図に示す抗体でウエスタンブロット法により解析した。 $\alpha$ -tubulinに対するLATS2のシグナル強度比を(B)のプロットの下に示す。(C) HT29細胞に40 pmolのsiCskまたはsiCtrlを導入し、48時間培養した。全細胞を回収し、図に示す抗体でウエスタンブロット法により解析した。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 7より引用、一部改変。

## 1-4 考察

本章では、v-SrcによるLATS2の直接的なリン酸化がLATS2のキナーゼ活性を低下させることを明らかにし、LATS2のキナーゼ活性が低下する新たな機構を見出した。LATS1とLATS2のアミノ酸配列は類似しており、キナーゼドメインのアミノ酸配列は85%相同している<sup>50</sup>。Srcによりリン酸化されるLATS1のTyr692 (KESNYIRLK) とTyr916 (GTPNYIAPE) のアミノ配列<sup>49</sup>がLATS2のTyr655 (KESNYNRLK) とTyr879 (GTPNYIAPE) に保存されていることから、v-Srcの基質として、これらのチロシン残基に着目した。LATS1/2はMerlinによって細胞膜上へと運ばれ<sup>28,29</sup>、MOBを介してMST/MOB/LATS1/2複合体を形成する。その後、MSTによりLATS1 Thr1071、LATS2 Thr1041がリン酸化され、さらに自己リン酸化することでLATS1/2は完全に活性化する<sup>29</sup>。そのため、LATS1/2のMOBへの結合はLATS1/2の活性化に必須である。LATS1のTyr692はMOB結合ドメインにあり、Tyr692をグルタミン酸に置換した擬似リン酸化LATS1はMOB1との結合が低下し、MSTによるLATS1 Thr1079のリン酸化低下によりキナーゼ活性が低下する<sup>49</sup>。v-Srcの発現がLATS2 Thr1041のリン酸化を低下させる(図1-2 C) ことから、LATS2 Tyr655のv-Srcによるリン酸化が、LATS1と同様にMOBとの結合を低下させLATS2のキナーゼ活性を抑制する可能性が考えられる。

しかし、v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下がMOBとLATS2の結合低下による作用だけであれば、MOBやMSTによる影響が無い条件でSrcによるLATS2のキナーゼ活性低下は観察されない。ところが、c-Srcにより直接リン酸化されたLATS2を用いた*in vitro*キナーゼアッセイでは、LATS2のキナーゼ活性低下が示唆された(図1-5)。この結果は、v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下にMOBとLATS2の結合低下以外の作用が存在することを示す。Srcによりリン酸化されるLATS1のTyr916はキナーゼドメインにあり、Tyr916がリン酸化されると基質結合部位が変形し、基質との結合が阻害されることが報告されている<sup>49</sup>。このことから、v-SrcによるLATS2 Tyr879のリン酸化が基質結合部位を変形させ、基質との結合を阻害することでLATS2のキナーゼ活性が低下した可能性が考えられる。

v-Srcによりリン酸化されるLATS2のTyr655とTyr879をフェニルアラニンに置換した変異体(LATS2-YYFF)は顕著なキナーゼ活性低下を示すが、v-Src発現の有無にかかわらずLATS2のThr1041のリン酸化が著しく低下することを見出した(図1-6 A)。この結果は、Tyr655とTyr879のチロシン残基が有している水酸基がLATS2の正常な活性維持に必要である可能性を示しており、2ヶ所の変異がLATS2のキナーゼ活性に与える影響を評価することはできなかった。我々の発表論文に遅れて、Srcの活性化によるLATS2のチロシンリン酸化亢進とYAPの核局在化が報告された<sup>61</sup>。Jiangらは、我々と同じくSrcによるLATS2のTyr655とTyr879のリン酸化がLATS2のキナーゼ活性を低下させると予想し、これらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換したLATS2変異体を用いてLATS2の活性を評価した。Srcが活性化した細胞にこのLATS2変異体を導入してもYAPの核局在化に変化はなく、JiangらはSrcによるLATS2のリン酸化はLATS2のキナーゼ活性には影響しないと結論付けた。しかし、上述の通り、この変異体が上流のMST1/2によるリン酸化を受けず活性化しないとすると、Jiangらの結論に疑問が生じる。また、LATS2のTyr655、Tyr879のチロシン残基に相当するLATS1のTyr692、Tyr916をグルタミン酸に置換して、これらのリン酸化がLATS1のキナーゼ活性に与える影響を調べた

論文がある<sup>49</sup>。しかし、LATS2のTyr655、Tyr879の水酸基がMST1/2からのリン酸化に必要であることを考慮すると、LATS1のTyr692とTyr916のグルタミン酸への置換がMST1/2によるリン酸化を阻害している可能性もある。では、どのような実験を行えばv-SrcによるLATS2のTyr655とTyr879のリン酸化がLATS2のキナーゼ活性に与える影響を評価できるだろうか。これら2つ以外の35個のチロシン残基がv-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下に関与しないことを明らかにすれば、つまり、LATS2のTyr655とTyr879以外のチロシン残基を全てフェニルアラニンに置換したLATS2とYAPの*in vitro*キナーゼアッセイを行うことでv-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下へのTyr655とTyr879の関与を評価することができる。しかしながら、35箇所に変異を入れることは現実的ではない。他には、Tyr655とTyr879をそれぞれ単独でフェニルアラニンに置換すると、LATS2-YYFFで観察されたThr1041のリン酸化低下を引き起こさず、それぞれのフェニルアラニンへの置換がLATS2のキナーゼ活性に与える影響を評価できる可能性がある。また、Tyr655をフェニルアラニンに置換したLATS2を大腸菌から精製し、v-Srcと*in vitro*で反応させ、そのLATS2とMOBの結合を調べることでTyr655のv-Srcによるリン酸化がLATS2とMOBとの結合に与える影響を評価できる。また、Tyr879をフェニルアラニンに置換したLATS2を大腸菌から精製し、図1-5と同様の方法で2段階の*in vitro*キナーゼアッセイを行うことで、基質結合部位に存在するTyr879のv-Srcによるリン酸化がLATS2のキナーゼ活性に与える影響を評価できると考えられる。今後、上述した方法を用いて、v-SrcによるLATS2のTyr655とTyr879のリン酸化がLATS2のキナーゼ活性に与える影響を明らかにする必要がある。

細胞膜の突出（ブレブ）はアポトーシス、細胞遊走、浸潤などに関与することが報告されている<sup>62,63</sup>。細胞は間葉系遊走や、ブレブ形成の拡張と退縮を利用したアメーバ様遊走を行うことが知られており、ブレブの関与する遊走が、がん細胞の浸潤に寄与することが報告されている<sup>62</sup>。Src、Fyn、Yes、LckなどのSFKに共通するSH4ドメインの発現がアポトーシスに関与しないブレブ形成を誘導することが報告されており、Src阻害剤PP1およびSU6656処理はブレブ形成を減弱し、細胞の浸潤を抑制する<sup>64</sup>。このことから、SH4ドメインを介して細胞膜に係留したSFKは、キナーゼ活性依存的にブレブを引き起こし細胞の浸潤を促すことが示唆された<sup>64</sup>。他にも、Rho-associated protein kinase（ROCK）のブレブ形成への関与も報告されている。p53欠損はRhoA-ROCKシグナル経路の活性化を介してブレブを誘発し、細胞の遊走、浸潤を促進させることが報告されている<sup>65</sup>。p53の発現レベルはE3ユビキチンリガーゼMdm2によって制御され、Mdm2の活性はLATS2によるリン酸化によって抑制される<sup>66</sup>。本章では、v-Srcやc-SrcによってLATS2のキナーゼ活性が低下することを明らかにしており、LATS2によるMdm2のリン酸化の低下はMdm2を活性化し、ユビキチン化の促進によってp53の分解を誘導し、ブレブ形成を引き起こす可能性がある。実際、v-Srcがp53の発現を低下させることが報告されており<sup>38</sup>、v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下を介したp53の発現低下がROCK活性化を通じてブレブを誘発する可能性がある。

## 1-5 小括

本章では、v-Srcやc-SrcによりLATS2がリン酸化され（図1-18 ①）、リン酸化される主要なチロシン残基がTyr655とTyr879であること、そしてリン酸化されたLATS2のキナーゼ活性が低下することを見出した（図1-18 ②）。さらに、v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下は、YAPを介した転写活性化を誘導し（図1-18 ③）LATS2の発現量を増加させ（図1-18 ④）、増加したLATS2がキナーゼ活性に依存せずv-Srcによるブレブを抑制することを明らかにした。

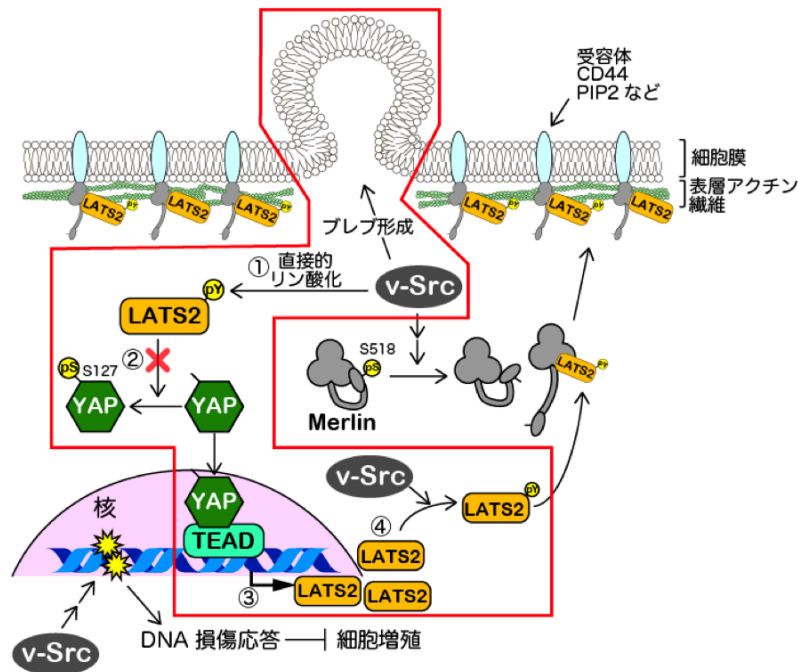


図1-18. 第1章のまとめ

本研究結果より予想されるモデルを示す。第1章で明らかにした部分を赤枠内に示す。詳細は、本文参照。

## 第2章 Merlinとの結合に依存したLATS2のブレブ形成抑制

### 2-1 緒言

第1章で、LATS2がキナーゼ活性非依存的にv-Srcによるブレブ形成を抑制することが示唆された。LATS2のキナーゼ活性が、Hippo経路、DNA損傷修復経路などに関与する<sup>29,51</sup>一方で、LATS2がキナーゼ活性非依存的に足場タンパク質として働くことも報告されている<sup>53,54</sup>。このことから、LATS2がキナーゼ活性非依存的に単体または他のタンパク質との相互作用を介して細胞膜の剛性維持に関与し、ブレブ形成を抑制すると考えた。細胞膜は、細胞の一番外側にある脂質二重層で、細胞内部と外界を隔てる障壁であり、細胞膜の剛性は細胞の運動性、細胞分裂、エンドサイトーシスなど様々な細胞機能に関与する<sup>62,63,67,68</sup>。リンカータンパク質を介した表層アクチン繊維と細胞膜の結合が細胞膜の剛性を制御しており、局所的な細胞膜と表層アクチンの架橋の低下や表層アクチン繊維の崩壊が細胞膜の剛性を低下させてブレブの形成を誘発する<sup>62,69</sup>。局所的なアクトミオシンの収縮力により表層アクチンが細胞膜から乖離することでもブレブが形成する<sup>70</sup>。また、がん細胞が一方向にブレブの拡張と退縮を繰り返すことで重心移動を行い、細胞外マトリックスの網目をすり抜け浸潤・遊走することが報告されており<sup>62</sup>、ブレブの制御機構解明はがん転移研究において重要な課題の一つである。

Hippo経路に関与するMerlinはERM (ezrin, radixin, moesin) ファミリータンパク質であり、細胞膜とアクチン骨格を架橋する働きをもつ<sup>71</sup>。Hippo経路活性時にLATS2はMerlinと結合して細胞膜へ運ばれるため<sup>28,29</sup>、LATS2-Merlin複合体による細胞膜と表層アクチンの架橋形成がv-Srcによるブレブを抑制すると考えた。そこで本章では、v-Srcによるブレブ形成へのLATS2-Merlin複合体の関与を解析した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 材料

#### 1) 細胞

本章では、第1章で用いた細胞に加えて新たに樹立した HeLa S3/v-Src-V5-LATS2  $\Delta$ 71-88 細胞株（詳細は、2-2-4 に記載）を使用した。培養条件は、全ての細胞共通で第1章と同じである。

#### 2) プラスミド DNA

第1章に加えて本章から使用したプラスミド DNA の情報を以下に示す。

- ・ pcDNA3.1<sup>+</sup>/C-(K)DYK ベクターに Merlin (Neurofibromin 2; トランスクリプションバリエント 1, OHu18888) を組み込んだプラスミド DNA（以下、pcDNA3.1<sup>+</sup>/Merlin-FLAG）を GenScreipt (Piscataway, NJ, USA) より購入。

#### 3) 抗体

第1章に加えて本章から使用した1次抗体の製品情報、WB または IF で用いた希釈倍率を以下に示す。2次抗体は、第1章と同じ製品を同じ希釈倍率で使用した。

#### 1次抗体

##### ラビットポリクローナル抗体：

- ・ 抗 phospho-Merlin (Ser518) 抗体：1000 倍希釈 (WB)、#9163、Cell Signaling Technology

##### ラビットモノクローナル抗体：

- ・ 抗 Merlin 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、50 倍希釈 (IF)、#12888、D3S3W、Cell Signaling Technology

##### マウスモノクローナル抗体：

- ・ 抗 FLAG 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、800 倍希釈 (IF)、F3165、M2、Sigma-Aldrich
- ・ 抗 Ezrin 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、sc-58758、clone3C12、Santa Cruz Biotechnology

### 2-2-2 v-Src の誘導発現

第1章と同じ方法で、v-Src を誘導発現させた。

### 2-2-3 V5-LATS2 $\Delta$ 71-88 発現プラスミドの作製

PCR を用いて Merlin 結合部位（アミノ酸 71-88）を欠く変異体 LATS2 プラスミド DNA（pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2  $\Delta$ 71-88）を作製した。作製に使用したオリゴ DNA を表 2-1 に示す。第1章で作製した pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2-WT（40 ng）を鋳型に用い、KOD-plus-Neo DNA ポリメラーゼ、KOD plus NEO バッファー、0.2 mM dNTP mix、1.5 mM MgSO<sub>4</sub>、0.15  $\mu$ M プライマーを含む反応液 25  $\mu$ L を調製した。前熱変性を 94°C で 2 分、熱変性を 98°C で 10 秒、アニーリングを 75°C で 30 秒、伸長反応を 68°C で 3 分 3 秒行い、前熱変性以外を 35 サイクル行った。PCR 産物を制限酵素 Dpn I で処理して鋳型の DNA を消化し、T4 Polynucleotide

Kinase（東洋紡）と ligation mix（#6023, Takara）を加えて 16℃で 1 時間インキュベートしてセルフライゲーションした。反応液を大腸菌 JM109 株にケミカルトランスフォーメーションし、菌液を 25 µg/mL カナマイシン含有 LB プレートに塗り拡げて 37℃で約 12 時間培養した。形成したコロニーをピックアップして 25 µg/mL カナマイシン含有 LB 液体培地に植菌し、約 12 時間培養後、プラスミド DNA を精製してシーケンス解析し、精製したプラスミド DNA が pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2 Δ71-88 であることを確認した。シーケンス解析に使用したオリゴ DNA を表 2-2 No.1 に示す。pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2Δ71-88 とデスティネーションベクター（pLX301）をそれぞれ 25 fmol 相当用意し、第 1 章（1-2-3）と同じ手順で Gateway クローニングを行った。Gateway クローニング後のプラスミド DNA を大腸菌 JM109 株にケミカルトランスフォーメーションし、100 µg/mL アンピシリン含有 LB プレートに塗り拡げ、37℃で約 12 時間培養した。形成したコロニーをピックアップして 100 µg/mL アンピシリン含有 LB 液体培地に植菌し約 12 時間培養後、プラスミド DNA を精製して制限酵素処理し、電気泳動を行い、目的のプラスミド DNA（pLX301-V5-LATS2Δ71-88）であることを確認した。また、pLX301-V5-LATS2Δ71-88 の attB1/attB2 領域とオープンリーディングフレームに目的でない変異が導入されていないことを DNA シーケンス解析により確認した。シーケンス解析に使用したオリゴ DNA を表 2-2 No.2-6 に示す。使用したオリゴ DNA は全てユーロフィンジエノミクス株式会社より購入し、シーケンス解析は日本ジーンウィズ株式会社に依頼した。

**表 2-1 pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2 Δ71-88 作製用オリゴ DNA**

		オリゴDNA	
LATS2	Δ71-88	Sense	5'-AATGAATCGGGCACCTCTGCAGCTGCAGAAAGTGAAC-3'
		Antisense	5'-GAACTTTGGGGTGGCTCTCATCTGCTGCTGCTG-3'

**表 2-2 pENTR4-no-ccDB-V5-LATS2 Δ71-88 または pLX301-V5-LATS2 Δ71-88 のシーケンス解析に使用したオリゴ DNA**

No.	オリゴDNA
1	5'-TGCAAGAGATTCGTGAGGGG-3'
2	5'-AATGGGCGGTAGGCGTGTAC-3'
3	5'-TACGTGGACTACCTTTTCCC-3'
4	5'-TTGGACGCCAAGGAGGAGC-3'
5	5'-ATGGACTACATCCCTGGTGG-3'
6	5'-TTCAGCGCCATTGACTTCTCC-3'



#### 2-2-4 レンチウイルスによる安定発現株の樹立

Lenti X-293T 細胞を 3.5 cm ディッシュに、細胞密度が 8 割程度になる様に均一に播種した。Opti-MEM 250  $\mu$ L に PEI-MAX を 7.4  $\mu$ g 加え、これとは別に、Opti-MEM 250  $\mu$ L に 1.7  $\mu$ g の pLX301-V5-LATS2  $\Delta$ 71-88 とパッケージングプラスミド DNA (pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev、それぞれ 1  $\mu$ g) を加え、5 分間室温で静置した。これ以降第 1 章 (1-2-7) と同様の手順でレンチウイルス含有溶液を作製した。3.5 cm ディッシュに播種して一晩置いた HeLa S3/v-Src 細胞の培養液を除き、80  $\mu$ g/mL のポリブレンを 200  $\mu$ L 加え 37°C で 1–2 分培養し、ろ過したレンチウイルス含有溶液約 2 mL を加えて 37°C で培養、24 時間後に 37°C に温めておいた培養液 2 mL に交換した。翌日から、2  $\mu$ g/mL ピューロマイシン含有培地に交換して約 1 週間セクションし、HeLa S3/v-Src-V5-LATS2  $\Delta$ 71-88 細胞株を樹立した (以下、V5-LATS2  $\Delta$ 71-88 細胞)。

#### 2-2-5 細胞への siRNA の導入

第 1 章 (1-2-9) と同じ試薬、手法を用い、siRNA を HeLa S3/v-Src 細胞または HeLa S3/v-Src-V5-LATS2 $\Delta$ 71-88 細胞に導入した。細胞に siRNA を 20–40 pmol 導入して 24–72 時間後、ウェスタンブロッティングや免疫染色を行った。本章で新たに使用した siRNA の情報を以下に示す。MilliporeSigma より購入した。

siNF2 (Merlin) : SASI\_Hs01\_00188860

siEzrin : SASI\_Hs02\_00335540

#### 2-2-6 プラスミド DNA の一過性導入

以下、24 ウェルプレート 1 ウェルあたりの試薬の量を記載する。

丸型カバーガラスを入れた 24 ウェルプレートに HeLa S3/v-Src 細胞または V5-LATS2 $\Delta$ 71-88 細胞を播種し、一晩培養した。Opti-MEM 25  $\mu$ L に Lipofectamine 2000 reagent を 0.6  $\mu$ L 加え、これとは別に、Opti-MEM 25  $\mu$ L に pcDNA3.1<sup>+</sup>/Merlin-FLAG を 0.3  $\mu$ g 加えて、5 分間室温で静置した。その後、この 2 種類の液を混合し、20 分間、室温で静置してプラスミド DNA 導入液を調製した。20 分静置している間に、ウェルの培養液を予め 37°C に温めておいた培養液 400  $\mu$ L に交換し、そこへプラスミド DNA 導入液を加え、培養液とプラスミド DNA 導入液を混和してインキュベーターで培養した。6 時間後に培養液を交換 (37°C、500  $\mu$ L) しインキュベーターで再び培養した。

#### 2-2-7 ウェスタンブロッティング解析

HeLa S3/v-Src細胞、V5-LATS2-WT細胞、V5-LATS2 $\Delta$ 71-88細胞を第1章と同様の方法で解析した。

#### 2-2-8 免疫沈降法

V5-LATS2-WT細胞を6 cmディッシュに播種し、一晩培養した。以下、ディッシュあたりの試薬の量を記載する。Opti-MEM 250  $\mu$ LにLipofectamine 2000 reagentを3  $\mu$ L加え、これとは別に、Opti-MEM 250  $\mu$ LにpcDNA3.1<sup>+</sup>/Merlin-FLAGを1.5  $\mu$ g加えて、5分間室温で静置した。その

後、この2種類の液を混合して20分間室温で静置し、プラスミドDNA導入液を調製した。20分静置している間にディッシュの培養液を予め37°Cに温めておいた培養液4 mLに交換し、プラスミドDNA導入液を加え、培養液とプラスミドDNA導入液を混和した。インキュベーターで6時間培養した後に培養液を交換（37°C, 5 mL）し、インキュベーターで再び培養した。プラスミドDNA導入液を加えた12時間後から、0.1 µg/mL Doxを細胞に加えさらに12時間培養した。第1章（1-2-13）と同様の方法で、細胞をディッシュから剥がして1% Triton X-100で細胞を溶解した。抗FLAG抗体（1 µg/サンプル）を結合したプロテインGセファロースビーズと細胞溶解液を4°Cで3時間以上回転混和した。その後、第1章（1-2-13）と同様の方法でビーズを洗い、SDSサンプルバッファーを加えて100°Cで3分間加熱した。ネガティブコントロールとして、第1章と同じマウス由来アイソタイプコントロールIgG抗体を使用した。

## 2-2-9 免疫蛍光染色法

丸型カバーガラスを入れた24ウェルプレートに細胞を播種した。内在性のMerlinを染色する場合、37°Cに温めておいたPBS(+)で細胞を洗った後、メタノール（-30°C, 10分）で固定した。0.1%サポニン含有PBS(-)で1度洗い、PBS(-)で2度洗った後は、第1章（1-2-10）と同じ手順で細胞を染色した。内在性Merlin以外の染色は1-2-10と同じ方法で行い、第1章と同様に細胞の観察、画像の編集を行った。

## 2-2-10 内在性Merlinの細胞膜局在の評価

siCtrl、siLATS2 #1、siMerlinをHeLa S3/v-Src細胞に処理し、0.1 µg/mL Doxを含む培養液で12時間培養した。その後、抗Merlin抗体を用いて内在性Merlinを染色した。倒立型リサーチ顕微鏡IX83により各サンプルそれぞれ20個以上の細胞の画像を取得した。位相差画像から細胞膜を判断し、Image Jソフトウェアを用いて計測した内在性Merlinの細胞膜上の蛍光シグナル強度の平均値とバックグラウンドの平均値の差を計算し、細胞膜の面積を乗算した。

## 2-2-11 ブレブ形成率の評価

HeLa S3/v-Src細胞にsiMerlinまたはsiEzrinを処理して、DNA、リン酸化チロシン残基を持つタンパク質、F-アクチン（ファロイジン）を蛍光免疫染色した。ブレブ形成の有無は、位相差画像とF-アクチン（ファロイジン）の染色画像を基に判断した。v-Src発現細胞のブレブ形成率は、チロシンリン酸化がv-Src非発現細胞より亢進している細胞中でブレブを形成している細胞の割合を示す。また、V5-LATS2 Δ71-88細胞とHeLa S3/v-Src細胞のブレブ形成率を比較する場合は、上記に加えてLATS2を蛍光免疫染色し、LATS2Δ71-88を発現している細胞中でブレブを形成している細胞の割合を算出した。

## 2-2-12 Merlin-FLAGとV5-LATS2の共局在の評価

V5-LATS2-WT細胞またはV5-LATS2Δ71-88細胞に2-2-6に記載した方法でMerlin-FLAG発現プラスミドを導入し、V5-LATS2、Merlin-FLAG、DNAを染色した細胞の染色画像を倒立型リサーチ顕微鏡IX83で撮影した。Image Jソフトウェアを用い、核の上を通過するように染色画像上に線を引き、線上のMerlin-FLAG、V5-LATS2、DNAの蛍光シグナル強度をそれぞれ測定

した。測定した数値をExcel (Microsoft, Redmond, WA, USA) でグラフ上にプロットし、それぞれの測定した数値を1つのグラフに統合した。Merlin-FLAGとV5-LATS2の蛍光シグナル強度のピークがグラフ中で同じ位置に観察された場合、Merlin-FLAGとV5-LATS2が共局在していると判断した。

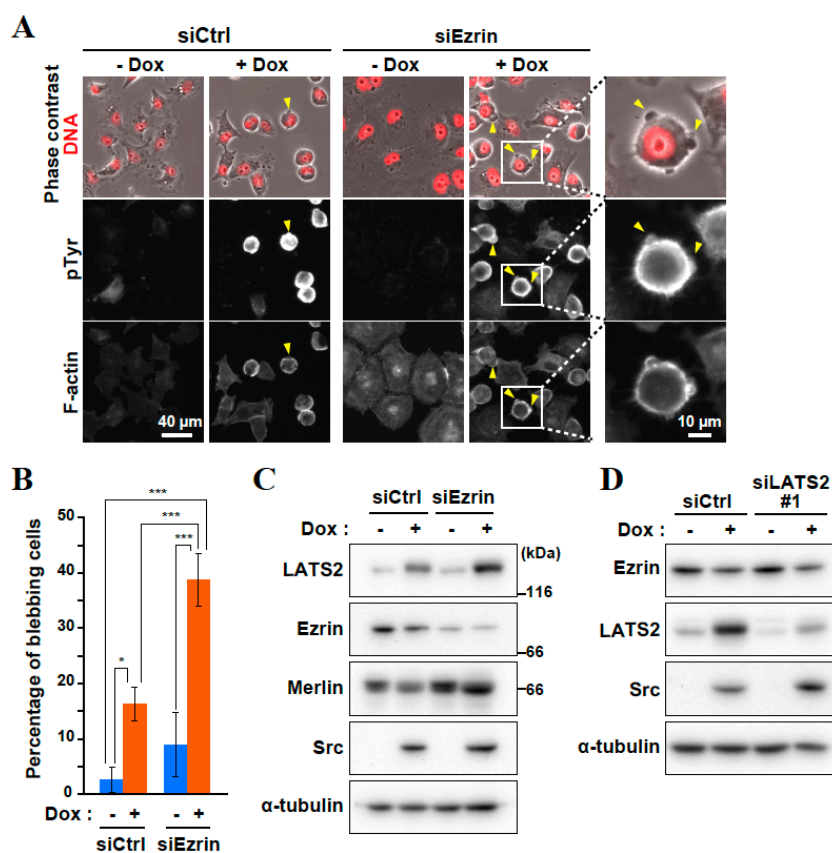
### 2-2-13 統計解析

EZRを用い、第1章と同様の手法で分散分析と有意差検定を行った。細胞膜上Merlinの蛍光強度の有意差検定には、Steel-Dwass多重比較検定を用いた。詳細は各図の説明に記載した。 $p$ 値が0.05以下の場合、有意に差があると判断した。

## 2-3 実験結果

### 2-3-1 v-Srcにより誘発されるブレブの形成機構

細胞膜と表層アクチンの架橋が局所的に減弱すると細胞膜のブレブが形成し<sup>62,69,70</sup>、その後、拡張したブレブの細胞膜にERM (ezrin, radixin, moesin) ファミリータンパク質のEzrinが集積する。そのEzrinを足場としてアクチンが結合し、RhoA-ROCKシグナルによりアクチンが収縮するとブレブが退縮する<sup>62</sup>。v-Srcによるブレブ形成の誘導は、細胞膜と表層アクチンの架橋減弱によるものか、または、退縮の阻害によるものか調べるため、v-Src発現細胞からEzrinをノックダウンした。v-Srcがブレブの退縮を阻害するのであれば、同じくブレブの退縮に関与するEzrinをノックダウンしてもブレブ形成細胞の割合は増加しないと考えられる。しかし、v-Srcによるブレブ形成がEzrinのノックダウンにより有意に増加した(図2-1 A-C)ことから、細胞膜と表層アクチンの架橋減弱が原因であることが示唆された。予想外に、v-Srcの発現はEzrinの発現量をわずかに減少させた(図2-1 C)ため、この減少がv-Srcのブレブ形成効果に一部関与している可能性がある。一方、LATS2ノックダウンはEzrinの発現レベルに影響を与えず(図2-1 D)、LATS2ノックダウンによるブレブ形成の増加にEzrinの発現レベルの低下は関与しないことがわかった。



**図2-1. Ezrin ノックダウンはv-Srcによるブレブ形成を増加させる**

HeLa S3/v-Src 細胞に 20 pmol siEzrin (A-C)、30 pmol siLATS2 #1 (D) または siCtrl を導入した。siRNA を導入してから 60 時間後 (A-C) または 12 時間後 (D) から、細胞を 0.1  $\mu$ g/mL Dox を含む培養液で 12 時間培養した。(A) 細胞を 4% ホルムアルデヒドで固定し染色した。チロシンリン酸化タンパク質、F-アクチン (ファロイジン)、および DNA (赤) と位相差画像を統合した画像を示す。実線で囲んだ領域の拡大画像を右側に示す。アローヘッドは細胞膜の突出を指す。スケールバーは、40  $\mu$ m または 10  $\mu$ m (拡大画像)。

(B) 独立した 3 つの実験からブレブを示す細胞の割合の平均値  $\pm$  SDs を算出し、その結果をグラフに示した ( $n \geq 297$ )。Tukey の多重比較検定で  $p$  値を求めた ( $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ )。 (C, D) 全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 6 より引用。

### 2-3-2 v-SrcによるLATS2-Merlin複合体の細胞膜局在促進

ERMファミリータンパク質に属するMerlinにも、Ezrinと同様、細胞膜と表層アクチンを架橋する働きがあり<sup>71</sup>、Hippo経路活性時、LATS2はMerlinと結合して細胞膜へ運ばれる<sup>28,29</sup>。そこで、Merlinのノックダウンが、v-Srcによるブレブ形成に影響するか調べた。Merlinのノックダウンは、LATS2のノックダウンと同様、v-Srcによるブレブ形成を増加させた(図2-2 A-C)。MerlinノックダウンはLATS2の発現量に影響を与えなかったため(図2-2 C右)、Merlinノックダウンによるブレブ形成増加がLATS2発現量低下を原因とする可能性は否定された。

Merlinが細胞膜と表層アクチンを架橋するのであれば、Merlinは細胞膜近傍に局在することになる。HeLa S3/v-Src細胞にMerlin-FLAG発現プラスミドを導入しMerlinの局在を調べた。Merlinは、v-Src非発現細胞では主に細胞質に散在し、部分的な細胞膜への局在も観察された(図2-3 -Dox)。対して、v-Src発現細胞では主に細胞膜に局在した(図2-3 +Dox)。v-Src発現細胞下でのMerlinの細胞膜局在にLATS2が関与するか調べるため、v-Src発現細胞からLATS2をノックダウンして内在性Merlinを蛍光免疫染色し、細胞膜上のMerlinの蛍光シグナル強度を測定した。内在性Merlinはv-Src発現下で細胞膜局在を示し、LATS2ノックダウンはこの細胞膜局在に影響しなかった(図2-4)。Merlinノックダウンにより細胞膜上のMerlinの蛍光シグナル強度が著しく低下したことは、内在性Merlinを特異的に検出できていることを示す。これらの結果は、v-Src発現細胞のMerlinの細胞膜局在がLATS2に依存しないことを示唆する。

次に、LATS2の局在がMerlinに依存するか、V5-LATS2-WT細胞にMerlin-FLAG発現プラスミドを導入した。v-Srcを発現せずMerlin-FLAGが導入された細胞ではLATS2は主に細胞質に局在した(図2-5 -Dox, a, ①)。また、一部のMerlin-FLAGが細胞膜局在を示した場合は、その部分にLATS2が共局在し、蛍光シグナル強度のピークが重なった(図2-5 -Dox, a, ②)。v-Src発現によりMerlin-FLAGは主に細胞膜局在を示し、LATS2との共局在が促進した(図2-5 +Dox, c)。一方、Merlin-FLAG非導入細胞でのLATS2は、v-Src発現の有無に関わらず細胞膜局在を示さなかった(図2-5 -Dox, bと+Dox, d)。これらの結果は、LATS2の細胞膜局在がMerlinに依存することを示唆する。

LATS1がMerlin S518D(擬似リン酸化体)よりもMerlin S518A(擬似非リン酸化体)と結合しやすいことが報告されており<sup>28</sup>、v-Src発現細胞においてMerlin Ser518のリン酸化が低下したこと(図2-2 C左)は、v-Src発現細胞ではLATS2がMerlinと結合しやすい状態であることを示唆する。そこで、V5-LATS2-WT細胞にMerlin-FLAG発現プラスミドを導入し抗FLAG抗体で免疫沈降すると、Merlin-FLAGと共沈降するLATS2の量がv-Src発現により増加した(図2-6)。また、v-Src発現下でMerlin Ser518のリン酸化が低下した(図2-6)。

以上のことから、v-SrcによりLATS2-Merlin複合体の形成が促進し、この複合体が細胞膜に局在することが明らかになった。

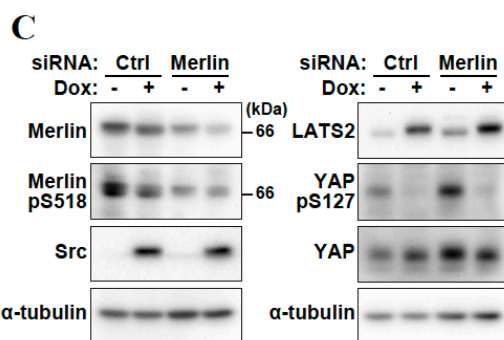
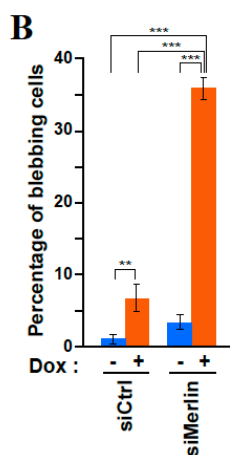
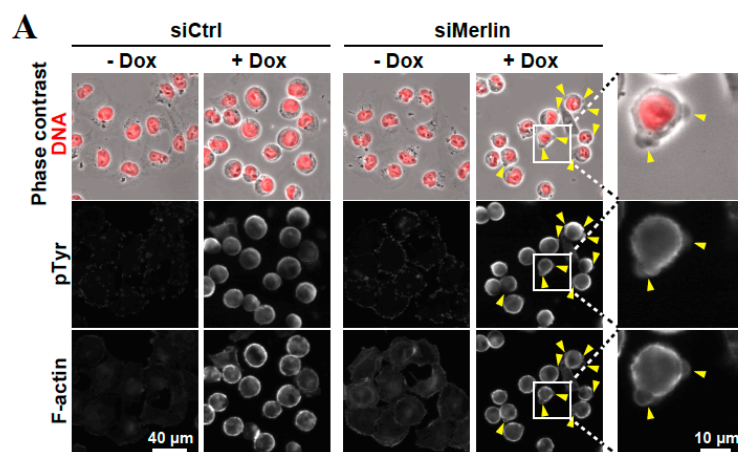


図2-2. Merlinのノックダウンはv-Srcによるブレブ形成を増加させる

HeLa S3/v-Src 細胞に 40 pmol siMerlinまたはsiCtrlを導入し、12時間後に培養液を0.1 μg/mL Dox含有培養液に交換し、さらに12時間培養した。(A) 細胞を4%ホルムアルデヒドで固定した。リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質、F-アクチン (ファロイジン)、および、DNA (赤) と位相差画像を統合した画像を示す。実線で囲んだ領域の拡大画像を右に示す。アローヘッドは細胞膜のブレブを指す。スケールバーは、40 μmまたは10 μm (拡大画像)。

(B) 独立した3つの実験からブレブを示す細胞の割合の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した (n≥490)。Tukeyの多重比較検定でp値を求めた (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)。(C) 全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 8より引用。

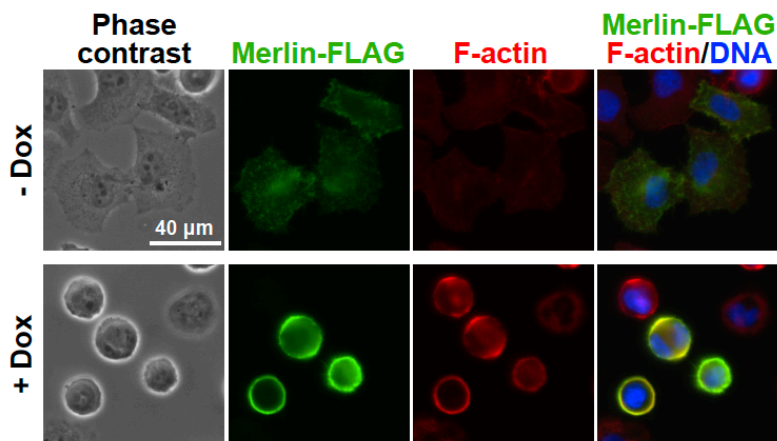


図2-3. v-SrcはMerlinの細胞膜局在を促す

HeLa S3/v-Src細胞にMerlin-FLAGを導入し、12時間後に培養液を0.1 μg/mL Dox含有培養液に交換し、さらに12時間培養した。位相差画像、Merlin-FLAG (緑)、F-アクチン (赤; ファロイジン)、および、DNA (青) とMerlin-FLAG、F-アクチンを統合した画像を示す。スケールバーは40 μmを示す。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 8より引用し、一部改変。

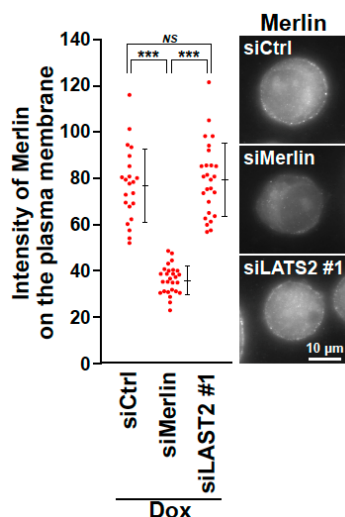


図2-4. v-Src発現下のMerlinの細胞膜局在はLATS2に依存しない

HeLa S3/v-Src細胞に30 pmol siLATS2 #1、40 pmol siMerlinまたはsiCtrlを導入し、12時間後に培養液を0.1  $\mu$ g/mL Dox含有培養液に交換し、さらに12時間培養した。細胞は100%メタノールを用いて固定した。細胞膜上のMerlinの蛍光強度を測定した。データは平均値 $\pm$ SDsを表し ( $n \geq 22$ )、ステュードント's t検定により $p$ 値を算出した。(\*\* $p < 0.01$ )。NSはnot significantを意味する。代表的な画像を右に示す。スケールバーは10  $\mu$ m。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 8より引用。

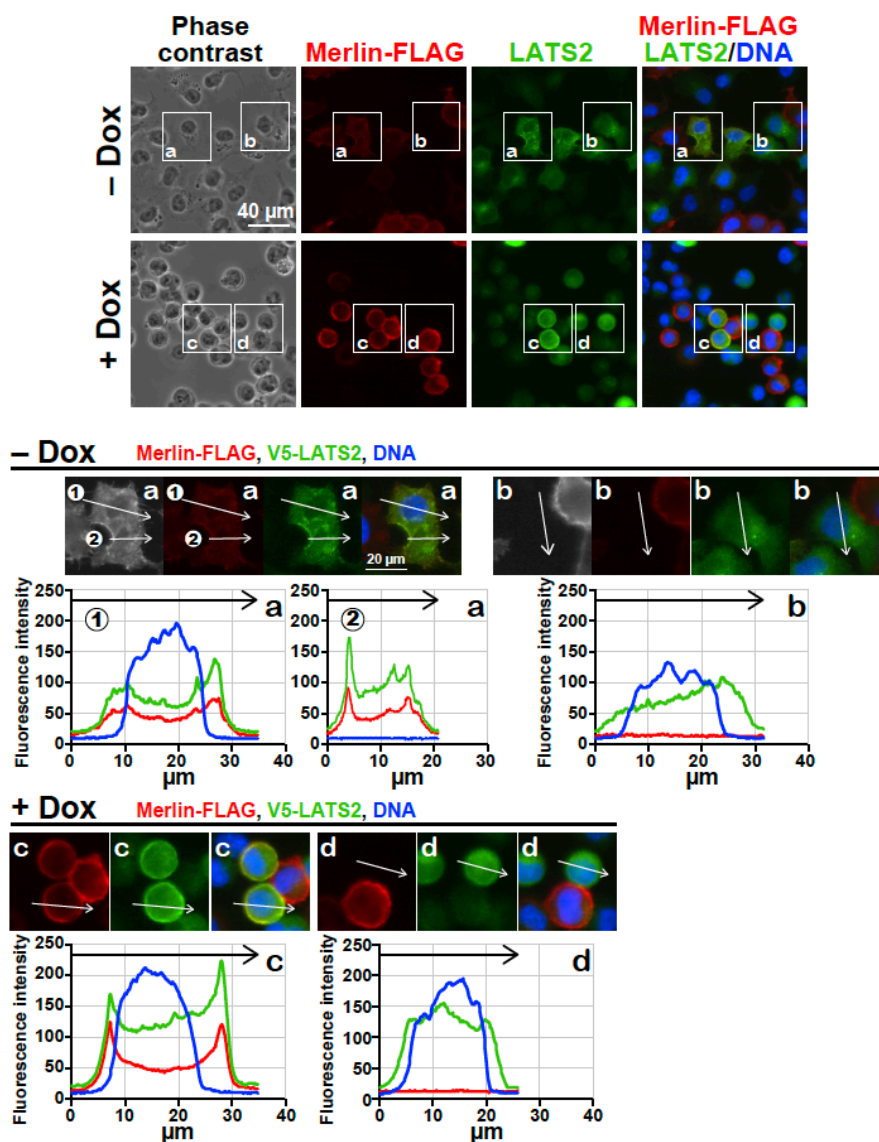
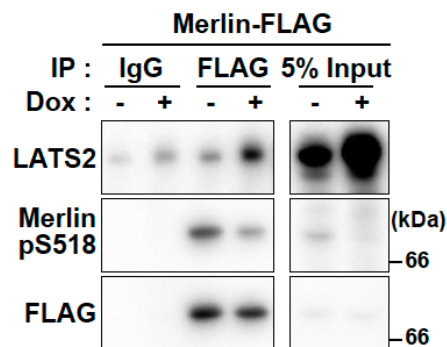


図2-5.

v-SrcによりLATS2はMerlinと細胞膜上で共局在する

V5-LATS2-WT発現細胞にMerlin-FLAGを導入し、12時間後に培養液を0.1  $\mu$ g/mL Dox含有培養液に交換し、さらに12時間培養した。位相差画像、Merlin-FLAG (赤)、V5-LATS2 (緑)、およびDNA (青)、Merlin-FLAGとV5-LATS2を統合した画像を示す。領域a～領域dの拡大画像を下に示す。拡大画像の矢印上のMerlin-FLAG、V5-LATS2、DNAの蛍光強度をそれぞれ測定し、その測定値をグラフに統合した。①は主に細胞質に局在するMerlin-FLAG、②は細胞膜に局在するMerlin-FLAG。スケールバーは、40  $\mu$ mまたは20  $\mu$ m (拡大画像)。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 9より引用し、一部改変。





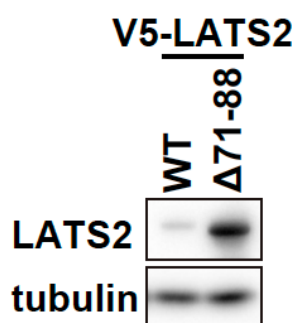
**図2-6. v-SrcはMerlinとLATS2の共沈降を増加させる**  
V5-LATS2-WT細胞にMerlin-FLAG発現プラスミドを導入し、12時間後、培養液を0.1 µg/mL Dox含有培養液に交換し、さらに12時間培養した。1% Triton X-100で全細胞を溶解し、得られた細胞溶解液と抗FLAG抗体を反応させて免疫沈降を行った。ネガティブコントロールとして、マウスアイソタイプコントロールIgG抗体を用いた。細胞抽出液（5% input）と免疫沈降物を図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。  
*FASEB J.* 2021, 35, e21242. Figure 8より引用。

### 2-3-3 Merlinとの結合に依存したLATS2のv-Src誘導性ブレブの抑制

ここまで、LATS2、Merlinそれぞれのノックダウンでv-Srcによるブレブ形成が増加し、v-Src発現がLATS2-Merlin複合体の形成を促進させることを見出した。さらに、v-Src発現細胞においてLATS2、Merlinが細胞膜近傍で共局在した。これらのことから、LATS2とMerlinが同じ経路で働いて細胞膜と表層アクチンの架橋に関わりv-Srcによるブレブ形成を抑制すると推定し、LATS2とMerlinの結合が必要か解析した。

まず、Merlin結合部位（アミノ酸配列：71-88）<sup>72</sup>を欠く変異体LATS2を恒常発現するHeLa S3/v-Src細胞株を樹立（V5-LATS2Δ71-88）した。LATS2Δ71-88の発現をウェスタンブロット解析により確認し（図2-7）、V5-LATS2Δ71-88細胞にMerlin-FLAG発現プラスミドを導入して、V5-LATS2の局在を調べた。その結果、V5-LATS2-WT細胞で観察されたMerlin-FLAGとLATS2の細胞膜上での共局在（図2-5 +Dox, cと図2-8 V5-LATS2, a）が、V5-LATS2Δ71-88細胞では観察されなかった（図2-8 V5-LATS2Δ71-88, c）。次に、v-Src発現V5-LATS2Δ71-88細胞に、3'非翻訳領域に標的配列を持つsiLATS2 #3を処理して内在性のLATS2のみをノックダウンし、v-Srcによるブレブ形成を抑制するか調べた。親株であるHeLa S3/v-Src細胞のLATS2ノックダウンはv-Srcによるブレブを増加させ（図2-9 None）、その増加を野生型LATS2の再発現は抑制した（図1-12）が、V5-LATS2 Δ 71-88は抑制しなかった（図2-9 V5-LATS2Δ71-88）。

以上の結果より、v-Srcはブレブ形成を引き起こすが、同時に形成が促進したLATS2-Merlin複合体が細胞膜に局在し、細胞膜-表層アクチンの架橋を強固にしてブレブ形成を抑制することが示唆された。



**図2-7. Merlin結合部位を欠く変異体LATS2発現細胞株の樹立**  
V5-LATS2-WT細胞またはV5-LATS2Δ71-88細胞の全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法により解析した。  
*FASEB J.* 2021, 35, e21242. Figure 9より引用。



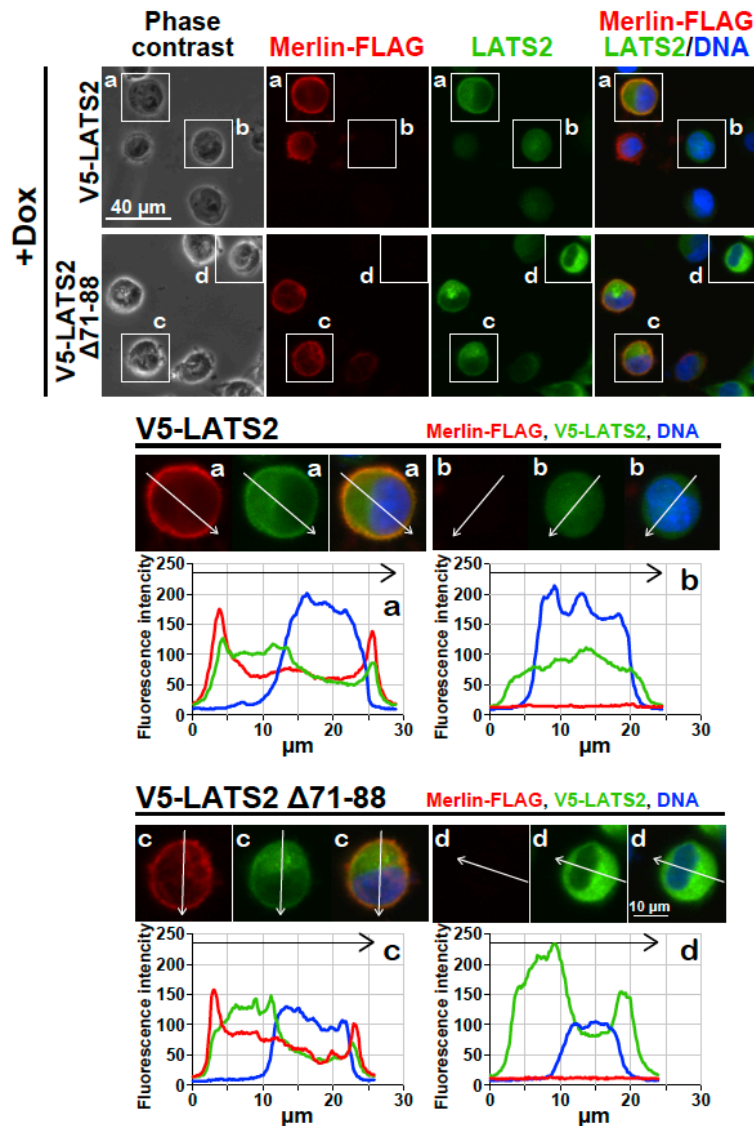


図2-8.

v-Src発現下のLATS2の細胞膜局在はMerlinとの結合に依存する

V5-LATS2-WTまたは- $\Delta 71-88$ 発現細胞にMerlin-FLAG発現プラスミドを導入し、12時間後に培養液を0.1  $\mu\text{g/mL}$  Doxを含む培養液に交換し、さらに12時間培養した。位相差画像、Merlin-FLAG (赤)、V5-LATS2 (緑)、および、DNA (青)、Merlin-FLAGさらにV5-LATS2を統合した画像を示す。領域a ~ 領域d の拡大画像を下に示す。矢印上のMerlin-FLAG、V5-LATS2、DNAの蛍光強度をそれぞれ測定し、その測定値を統一した。スケールバーは40  $\mu\text{m}$ または10  $\mu\text{m}$  (拡大画像)。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 9より引用し、一部改変。

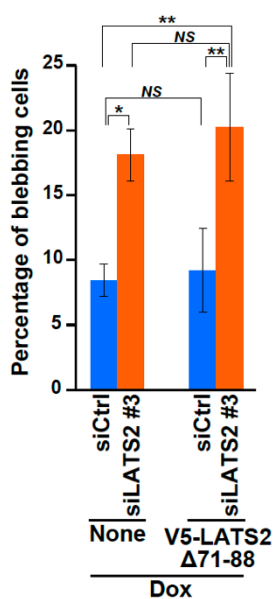


図2-9. Merlin結合部位を欠くLATS2変異体はv-Srcによるブレブを抑制しない

親株HeLa S3/v-Src細胞とV5-LATS2 $\Delta 71-88$ 細胞に、30 pmolのsiLATS2 #3またはsiCtrlを導入した。12時間後に、培養液を0.1  $\mu\text{g/mL}$  Doxを含む培養液に交換し12時間培養した。独立した3つ以上の実験からブレブを示す細胞の割合の平均値 $\pm$ SDsを算出し、その結果をグラフに示した ( $n \geq 401$ )。Tukeyの多重比較検定で $p$ 値を算出した (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。NSはnot significantを意味する。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 9より引用。

## 2-4 考察

第2章では、v-SrcがLATS2-Merlin複合体形成を促進（図2-6）し、細胞膜に局在するこの複合体（図2-5）が細胞膜と表層アクチン繊維の架橋を強めv-Srcによるブループ形成を抑制することが示唆された。では、v-Src発現細胞でどのようにしてLATS2-Merlinの複合体形成が促進したのだろうか。Merlinは、C末端ドメインのSer518がリン酸化されていない状態で、分子内結合のない開いた構造（open conformation）か、N末端側のFERMドメインとC末端ドメインの分子内結合により半開構造（semi-open conformation）をとり（図2-10 b）、Ser518がPAKやPKAによってリン酸化されると、この結合が安定化し完全に閉じた構造（closed conformation）をとり（図2-10 a）、他分子と相互作用しない<sup>73-75</sup>。従って、Ser518のリン酸化はMerlinを不活性型にする。LATS1/2は、Ser518が脱リン酸化したMerlinのFERMドメインと結合でき、FERMドメインへの結合において、LATS1/2とMerlinのC末端ドメインは競合する<sup>73</sup>。これらを考慮すると、v-Src発現下でLATS2とMerlinが複合体を形成するためには、MerlinのSer518の脱リン酸化が必要で、LATS2の発現量増加はLATS2のMerlinへの結合を促進すると推定される。インテグリンβ/PAKシグナルはMerlin (Ser518)をリン酸化し<sup>74</sup>、Srcはこのシグナルを阻害する<sup>76</sup>。よって、v-Src発現細胞でMerlin (Ser518)のリン酸化が低下した（図2-2 C左と図2-6）原因として、v-Srcによるインテグリンβ/PAKシグナルの低下が推定される。さらに、第1章で述べたように、v-SrcはYAPの転写亢進を介してLATS2の発現量を増加させる（図1-14）ため、v-Src発現下ではMerlinのFERMドメインはC末端ドメインよりもLATS2と結合しやすく、LATS2-Merlin複合体形成が促進すると考えられる。v-SrcはLATS2をリン酸化するが、そのリン酸化がMerlinとの複合体形成に与える影響は不明である。しかし、v-Src非発現細胞でも細胞膜局在を示すMerlinとLATS2が共局在を示したことから（図2-5 -Dox, a, ②）、v-SrcによるLATS2のリン酸化はLATS2-Merlin複合体形成に必須ではないことが示唆される。

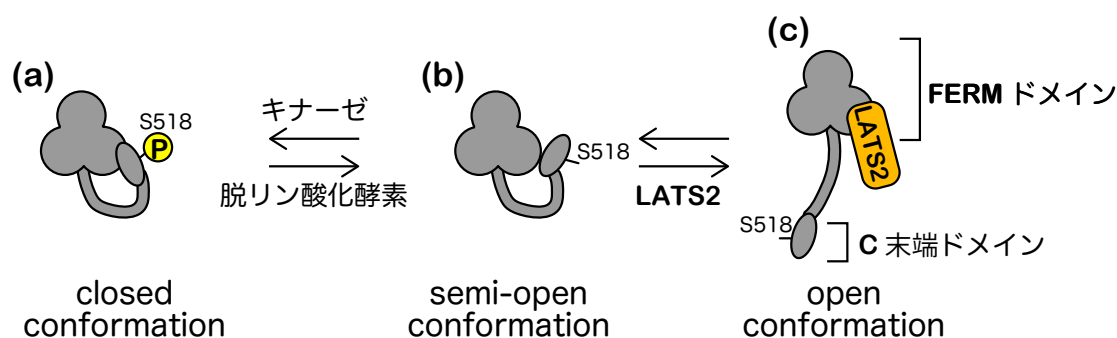


図2-10. Merlinは3種類のコンフォメーションをとる

MerlinはFERMドメインとC末端ドメインの結合によりsemi-open conformation (b) を取り、Merlin C末端のSer518がp21-activated kinases (PAK)、protein kinase A (PKA) などによってリン酸化されるとclosed conformation (a) に変化する。このリン酸化は、MYPT-1-PP1脱リン酸化酵素によって脱リン酸化する。semi-open conformationのFERMドメインへの結合において、LATS2とMerlinのC末端ドメインが競合するため、過剰発現したLATS2はFERMドメインに結合し、Merlinはopen conformationに変化すると推定される (c)。

Merlin-LATS2複合体がブレブ抑制に寄与することが示唆されたことから、この複合体は細胞膜と表層アクチン繊維を架橋する機能を持つ可能性が考えられる。Merlinのアクチン繊維との結合には、Merlinがどのコンフォメーションをとっているかが重要である。Merlinには2種類の主要なアイソフォームが存在し、アイソフォーム1は閉じた構造をとれるのに対してアイソフォーム2はC末端ドメインのアミノ酸が一部、欠損・変異しており閉じた構造をとれない<sup>77</sup>。*in vitro*のアクチン共沈降実験では、アイソフォーム2がアクチンと共沈降した<sup>77</sup>。この結果は、Merlinが閉じた構造よりも開いた構造でアクチン細胞骨格に結合しやすいことを示唆している。上述のように、MerlinとLATS2の結合が競合し、v-Src発現により増加したLATS2がMerlinを半開構造から開いた構造に変化させる。MerlinのFERMドメインは、F1、F2、F3領域で構成されており、LATS1/2結合領域はF2領域に存在しアクチン結合部位はF1とF3領域にある<sup>74,78,79</sup>。LATS2と結合し開いた構造のMerlinは、FERMドメインのF1やF3領域でアクチン骨格に結合し、細胞膜と表層アクチンを架橋してv-Srcによるブレブを抑制すると推定される。結晶構造解析において、F2領域に結合したLATS1/2は、アクチン結合部位のF1とF3領域に重なっておらず<sup>73</sup>、この仮説を支持する。

ブレブ形成を抑制するLATS2-Merlin複合体は、他の分子を含む可能性もある。Angiomotin (AMOT) はMerlinの上流の活性化因子であり、Merlin C末端ドメインへのAMOTの結合はMerlinを開いた構造に安定化させLATS1/2の結合を促進させる<sup>73</sup>。通常アクチン骨格に結合するAMOTは、LATS1/2によりリン酸化されるとアクチン骨格から解離し<sup>80</sup>、Merlinと結合してLATS1/2を活性化させ、さらに他のAMOT分子のリン酸化を促進してHippo経路の正のフィードバック機構を形成する<sup>73</sup>。v-Src発現細胞では、v-Srcによる直接的なリン酸化と上流のキナーゼからのリン酸化低下により、LATS2キナーゼ活性が低下する。従って、アクチン細胞骨格からAMOTを解離させるリン酸化は起こらない。しかし、v-Srcはストレスファイバーを消失させるためv-Src発現細胞内に遊離したAMOTが増加し、これがLATS2-Merlin複合体に結合すると考えられる。LATS2によりリン酸化されていないAMOTはアクチン骨格と結合する能力を保持しており、その結果、LATS2-Merlin複合体はAMOTを介して細胞膜と表層アクチンを架橋させ細胞膜の剛性維持に関与する可能性も考えられる。

## 2-5 小括

本章では、以下のことを明らかにした。v-SrcはMerlinの細胞膜局在を誘導し、Merlinに依存してLATS2も細胞膜に局在してLATS2-Merlin複合体形成が促進する。この複合体形成の増加には、v-SrcシグナルによるMerlin Ser518のリン酸化低下（図2-11 ①）とLATS2の発現レベル上昇（図2-11 ②）が関与し、この複合体は細胞膜に局在（図2-11 ③）して、v-Srcが誘導するブレブ形成を抑制することが示唆された。

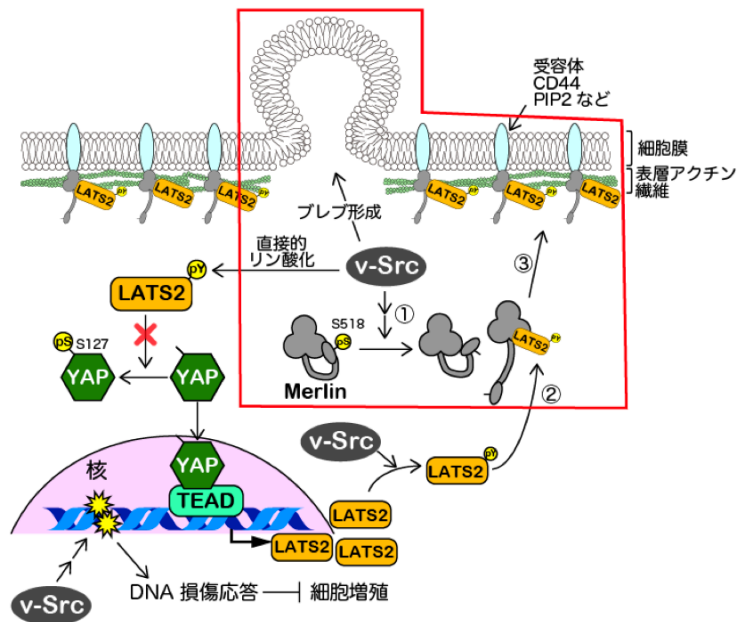


図2-11. 第2章のまとめ

本研究結果より予想されるモデルを示す。第2章で明らかにした部分を赤枠内に示す。詳細は、本文参照。

## 第3章 v-Srcにより惹起されるDNA損傷応答

### 3-1 緒言

Hippo経路の活性化は過剰な細胞増殖を抑制する。v-SrcによるHippo経路の破綻は、YAPの下流に存在する細胞増殖関連分子CTGFおよびCyr61の発現量を増加(図1-14 A) させるため、v-SrcはMAPKカスケードの活性化などに加えて、Hippo経路の破綻も介して増殖を亢進すると考えられる。しかしながら、細胞増殖の亢進を述べた多くの報告に加えて細胞増殖抑制を述べた報告もあることから<sup>13,14,21,22,46</sup>、v-Srcシグナルに抵抗する細胞応答により、v-Srcが発現しても細胞が直ちに細胞増殖を促進するわけではなく、Srcシグナルにより惹起される細胞応答が細胞増殖の抑制に寄与することが考えられる。第1章ではアポトーシスに特徴的な表現型であるブレブ<sup>63</sup>がv-Src発現細胞で観察されたことを述べた。よって、v-Srcによる細胞増殖抑制の原因がアポトーシスである可能性がある。その場合、LATS2ノックダウンによるブレブ形成の増加は、v-Srcにより誘導されるブレブをLATS2が抑制することを示す。即ち、LATS2はがん抑制遺伝子としての機能とは反対に、がん細胞の生存に寄与する機能を持つことになる。そこで第3章では、v-Srcによるブレブ形成の誘導とアポトーシスの関係に着目し、v-Srcにより細胞増殖抑制が起こる原因を探索した。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 材料

#### 1) 細胞

本章では、第 1、2 章と同様に、HeLa S3/v-Src 細胞および HCT116/v-Src 細胞を用いた。これらの細胞は、第 1 章（1-2-1）に記載した方法で培養した。

#### 2) 試薬

アドリマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、ブレオマイシン (日本化薬, 東京)、カフェイン (Wako) は滅菌水に溶解して使用した。PP2 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) はジメチルスルホキシドに溶解した。

#### 3) 抗体

第 1、2 章に加えて本章で使用した 1 次抗体、2 次抗体の製品情報と希釈倍率を以下に示す。1 次抗体には、WB または IF で用いたそれぞれの希釈倍率を示す。

#### 1 次抗体

##### ラビットモノクローナル抗体：

- ・ 抗 phospho-histone H2A.X (Ser139) ( $\gamma$ H2AX) 抗体: 500 倍希釈 (WB)、400 倍希釈 (IF)、#2577、Cell Signaling Technology
- ・ 抗 phospho-Chk1 (Ser345) 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、clone 133D3、#2348、Cell Signaling Technology

##### ラビットポリクローナル抗体：

- ・ 抗 cleaved caspase-3 抗体: 500 倍希釈 (IF)、#9661、Cell Signaling Technology
- ・ 抗 phospho-KAP1 (Ser824) 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、A300-767A、Bethyl Laboratories
- ・ 抗 phospho-Chk2 (Thr68) 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、#2661、Cell Signaling Technology
- ・ 抗 G3PDH 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、2275-PC-100、Trevigen (Gaithersburg, MD, USA)

##### マウスモノクローナル抗体：

- ・ 抗 Actin 抗体: 2000 倍希釈 (WB)、A4700、clone AC-40、Sigma-Aldrich
- ・ 抗 Chk1 抗体: 800 倍希釈 (WB)、sc-8408、clone G-4、Santa Cruz Biotechnology
- ・ 抗 Chk2 抗体: 1000 倍希釈 (WB)、K0088-3S、clone DCS-273、Medical and Biological Laboratories

#### 2 次抗体

##### ウエスタンブロットに使用した、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体：

- ・ ロバ抗ラビット IgG 抗体: 2000–4000 倍希釈、sc-2077、Santa Cruz Biotechnology
- ・ ニワトリ抗ラット IgG 抗体: 2000–4000 倍希釈、sc-2964、Santa Cruz Biotechnology
- ・ ロバ抗ヤギ IgG 抗体: 2000–4000 倍希釈、sc-2056、Santa Cruz Biotechnology
- ・ ウマ抗マウス IgG 抗体: 4000 倍希釈、#7076、Cell Signaling Technology

免疫蛍光染色に使用した抗体：

- Alexa Fluor 488 標識ロバ抗マウス IgG 抗体: 200–800 倍希釈、A21202、Thermo Fisher Scientific

### 3-2-2 v-Src の誘導発現

第1章 (1-2-2) と同じ方法で行なった。

### 3-2-3 細胞への siRNA の導入

第1章 (1-2-8) と同じ方法で行なった。

### 3-2-4 免疫蛍光染色法

角型カバーガラス (C218181/C022221, 松浪硝子工業, 大阪) を敷いた 3.5 cm ディッシュに HCT116/v-Src 細胞を播種し、一晚培養した。ディッシュの培地を除いた後、37°C に予め温めた PBS(+) で細胞を 1 回洗った。細胞を、37°C に温めた 4%ホルムアルデヒド含有 PBS(-) を用い、20 分間、室温で固定した。固定した細胞を、第1章 (1-2-10) と同じ手順で染色した。

$\gamma$ H2AX とリン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質を共染色する場合は、37°C の PBS(+) で洗った後に以下の手順で固定した。氷冷した 20%メタノールと 4%ホルムアルデヒドを含む PBS(-) を用いて、20 分間、室温で固定後、洗浄液 [10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム (Wako) および 10 mM Hepes を含む PBS(-)] で 3 回洗い、100%メタノールで、1 分間、-30°C でインキュベートした。固定後の細胞を洗浄液で 3 回洗った後、第1章 (1-2-10) と同じ手順で細胞を染色した。細胞の観察、画像の編集は第1章と同じ方法で行った。

### 3-2-5 ウェスタンブロッティング解析

ディッシュの培養液を除いた後、37°C に温めた PBS(-) で細胞を 1 回洗った。SDS サンプルバッファーまたはホスファターゼ含有 SDS サンプルバッファー [50 mM フッ化ナトリウム (Wako)、20 mM  $\beta$ -グリセロリン酸 (MilliporeSigma)、10 mM オルトバナジン(V)酸ナトリウム (Wako)] を用いて細胞を溶解した。細胞溶解物は第1章 (1-2-11) と同じ方法で解析した。

### 3-2-6 アドリアマイシン処理によるアポトーシスの誘導

24 ウェルプレートに播種した HeLa S3/v-Src 細胞に 2  $\mu$ M アドリアマイシン (富士フィルム和光純薬) を添加し、37°C で 24 時間培養した。

### 3-2-7 Water Soluble Tetrazolium-8 (WST-8) を用いた細胞生存率の評価

HeLa S3/v-Src 細胞を 96 ウェルプレートに播種し (8000 細胞/ウェル)、一晚培養した。以下、1 ウェルあたりの試薬量を示す。Opti-MEM 13  $\mu$ L に Lipofectamine 2000 reagent を 0.2  $\mu$ L 加え、これとは別に、Opti-MEM 13  $\mu$ L に siCtrl または siLATS2 #2 を 6 pmol 加えた。5 分後、これら 2 種類の液を混合して、20 分間、室温で静置し、siRNA 導入液を調製した。96 ウェルプレートの培養液を除去し、予め 37°C に温めておいた培地 80  $\mu$ L に交換した。siRNA 導入液を培養液に添加し、培養液と siRNA 導入液を混和した。37°C で 6 時間培養後、予め 37°C に温

めておいた培養液 100  $\mu$ L に交換し、さらに 6 時間後、1 ng/mL Dox 含有培養液 100  $\mu$ L (37°C) に交換した。12 時間後、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) の WST-8 溶液 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] を 10  $\mu$ L 加え、37°C で 2 時間培養した。生成した水溶性ホルマザン色素の 450 nm の吸光度を iMark マイクロプレートリーダー (168-1130JA, Bio-Rad) で測定した。

### 3-2-8 Operetta を用いた蛍光シグナルの定量解析

3-2-4 に記載した方法で免疫蛍光染色した細胞をハイコンテンツイメージングシステム (Operetta, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて撮影した。蛍光シグナルの定量解析には、Harmony ソフトウェア (PerkinElmer) を用いた。ヒストン H2AX (H2AX) のリン酸化レベルを評価する場合、染色した  $\gamma$ H2AX と核を Harmony ソフトウェアに認識させて、核内の  $\gamma$ H2AX フォーカスの数、面積と蛍光シグナル強度の平均を自動解析した。チロシンリン酸化レベルを評価する場合は、染色した DNA とチロシンリン酸化を Harmony ソフトウェアに認識させて、細胞内のチロシンリン酸化をもつタンパク質の蛍光シグナル強度の平均を自動解析した。

### 3-2-9 染色体架橋の評価

染色体の架橋形成を評価するために次の手順で DNA を染色した。細胞は、37°C に温めた 4%ホルムアルデヒド含有 PBS(-)を用いて固定した。固定した細胞を PBS(-)で 3 回、0.1%サポニン含有 PBS(-)で 1 回洗い、0.1%サポニン含有 PBS(-)で希釈した 1  $\mu$ M ヘキスト 33342 を室温で遮光しながら 10 分間処理した。その後、0.1%サポニン含有 PBS(-)で 2 回、PBS(-) で 1 回洗い、1-2-6 と同様にカバーガラスをスライドガラスに固定した。染色した DNA と位相差画像から分裂期後期・終期の細胞を判定し、これらの細胞に染色体架橋が形成されているか DNA を観察して判断した。分裂期後期・終期の細胞の中で染色体架橋を形成している細胞の割合を染色体架橋形成率として算出した。

### 3-2-10 ブレブ形成率の評価

第 1 章 (1-2-17) と同じ方法で行なった。

### 3-2-11 統計解析

EZRまたはMicrosoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いて、第1章と同様の手法で 2 群間、および多群間の分散分析と有意差検定を行った。 $p$ 値が0.05以下の場合、有意に差があると判断した。



### 3-3 実験結果

#### 3-3-1 v-Srcにより誘導されるブレブ形成細胞はアポトーシスの特徴を示さない

第1章および第2章において、v-Srcにより誘導されるブレブ形成がLATS2ノックダウンにより増加することを明らかにした。ブレブはアポトーシスに特徴的な表現型であり<sup>63</sup>、v-Srcによる細胞増殖抑制が報告されていることから<sup>20</sup>、v-Srcにより誘導されるブレブ形成の原因がアポトーシスである可能性を考えた。そこで、細胞増殖アッセイキットを用いて細胞生存率を評価した。HeLa S3/v-Src細胞に1 ng/mL Doxを12時間処理すると細胞生存率は減少したが、v-Src発現細胞でLATS2をノックダウンしても、v-Srcによる細胞生存率減少をさらに減少させることはなかった（図3-1 A）。ここで用いた低濃度のDox（1 ng/mL）処理によってもブレブが形成し、LATS2ノックダウンにより増加する傾向にあり（図3-1 B）、この結果は、ここでのブレブ形成は細胞生存とは関係がないことを示唆している。アポトーシスの指標であるcleaved caspase-3（活性型caspase-3）を免疫蛍光染色すると、ポジティブコントロールであるアドリマイシン処理細胞において観察されたのに対して、Dox処理や、さらにLATS2をノックダウンしてブレブを形成した細胞ではcleaved caspase-3シグナルは観察されなかった（図3-2）。アドリマイシン処理細胞を抗cleaved caspase-3抗体を反応させずに2次抗体のみ反応させると蛍光シグナルは検出されず、アドリマイシン処理細胞で観察されたcleaved caspase-3の蛍光シグナルは特異的であることを確認した。これらの結果は、v-Srcによるブレブ形成がアポトーシスに起因しないことを示唆している。

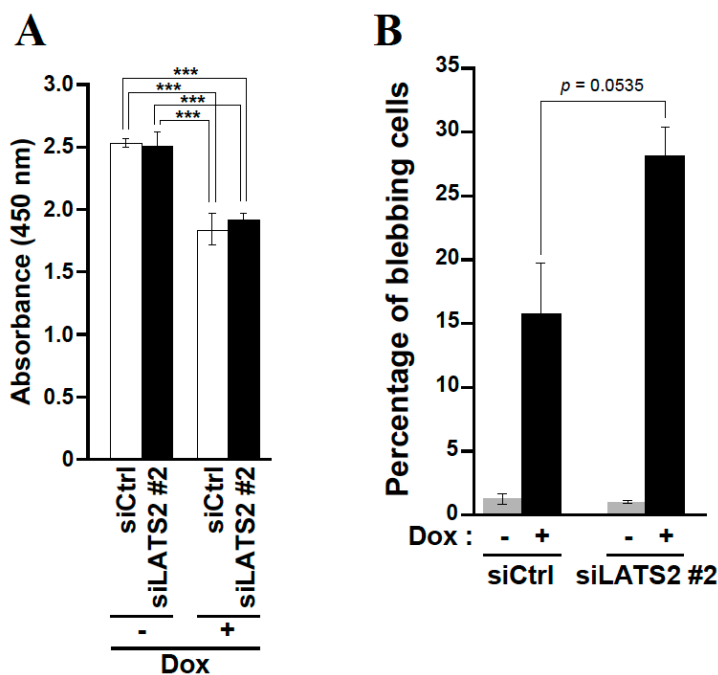


図3-1. LATS2ノックダウンは細胞生存率に影響を与えない

HeLa S3/v-Src細胞に6 pmol (A) または30 pmol (B) のsiLATS2 #2またはsiCtrlを導入し、12時間後に1 ng/mL Dox含有培養液に交換後、さらに12時間培養した。(A) WST-8を添加し450 nmの吸光度を測定して細胞生存率を評価した。独立した3回の実験から450 nmの吸光度の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した。Tukeyの多重比較検定で $p$ 値を求めた (\*\* $p < 0.001$ )。FASEB J. 2021, 35, e21242. Figure 3より引用。(B) 独立した3回の実験からブレブ形成細胞の割合の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した ( $n \geq 502$ )。Dox処理時のsiCtrlとsiLATS2 #2の有意差検定をStudent's  $t$ -testで行った。

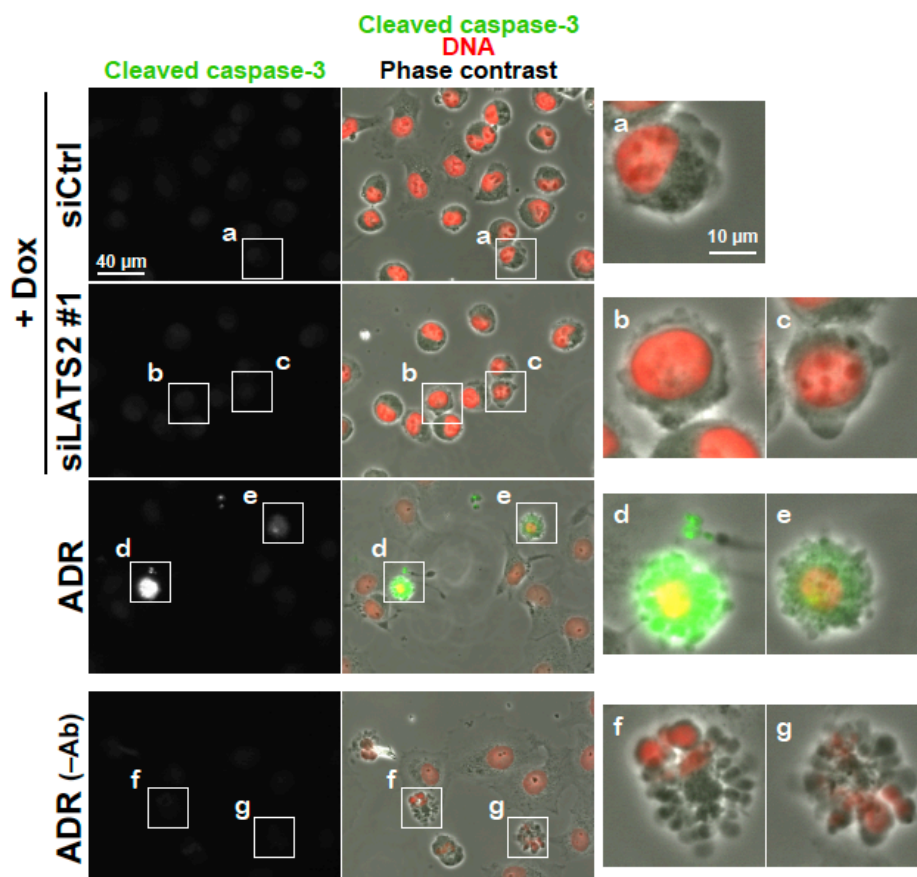


図3-2. v-Src発現下のプレブ形成細胞でcleaved caspase-3の蛍光シグナルは観察されない

HeLa S3/v-Src細胞に30 pmolのsiLATS2 #1またはsiCtrlを導入し、12時間後に0.1  $\mu\text{g/mL}$  Dox含有培養液に交換後、さらに12時間培養した。アポトーシス誘導のポジティブコントロールとして、アドリアマイシン (2  $\mu\text{M}$ ) を24時間処理し、1次抗体あり (ADR)、1次抗体なし [ADR-(Ab)] の2つの方法で固定した細胞を染色した。cleaved caspase-3、cleaved caspase-3 (緑) とDNA (赤) および位相差画像を統合した画像を示す。実線で囲んだ領域a～領域gの拡大画像を右に示す。スケールバーは、40  $\mu\text{m}$  または10  $\mu\text{m}$  (拡大画像)。FASEB J. 2021, 35, e21242. Supplemental Figure S1より引用。

### 3-3-2 v-SrcによるDNA損傷応答の誘導

図3-1 Aにおいて、これまでの報告と同様に、v-Srcによる細胞増殖抑制が観察されたことは<sup>20</sup>、v-Src発現下でHippo経路が破綻しているにもかかわらず細胞増殖が抑制されていることを示す。そこで、v-Srcが増殖抑制を引き起こす原因を探索した。v-Srcが増殖抑制に与える影響を調べるには、v-Srcを長期間発現させる必要がある。しかし高濃度のDox (0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) を処理した細胞は、24時間後には培養ディッシュから剥がれてしまう。そこで、低濃度のDoxを細胞に処理し、v-Srcを3日間誘導発現させた。HCT116/v-Src細胞、HeLa S3/v-Src細胞、NIH3T3/v-Src細胞にv-Srcを誘導発現させると、v-Srcの発現によりHCT116/v-Src細胞で染色体架橋形成が観察された (図3-3)。そこで、染色体架橋形成と細胞増殖抑制の関係に着目し、以後の実験

にはHCT116/v-Src細胞を用いた。Doxを3日間処理してv-Srcを誘導発現し、DNAとリン酸化チロシン残基を持つタンパク質を染色すると、これまでの報告<sup>20</sup>と同様に、v-Src発現細胞に特徴的なタンパク質のチロシンリン酸化の亢進と細胞の浮遊化がDox処理濃度依存的に観察された（図3-4 A）。ウエスタンブロッティングにおいてもDox処理濃度依存的なSrcの発現量増加とタンパク質のチロシンリン酸化亢進が観察された（図3-4 B）。分裂期後期および終期に着目して細胞の様子を観察したところ、Dox処理により染色体架橋を持つ細胞が有意に増加した（図3-5）。

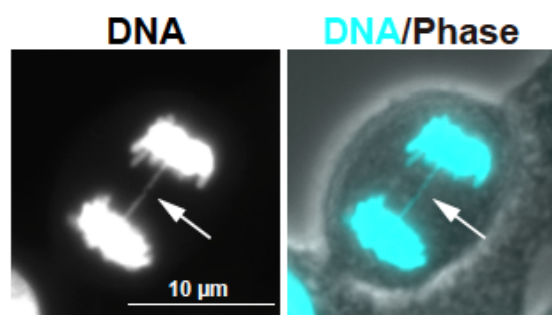


図3-3. 染色体架橋形成細胞

HCT116/v-Src細胞を4%ホルムアルデヒドで固定し、ヘキスト染色した。DNA、またはDNA（シアン）と位相差画像を統合した画像を示す。矢印は染色体架橋を指す。スケールバーは10  $\mu$ m。 *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 871., Figure 1より引用。

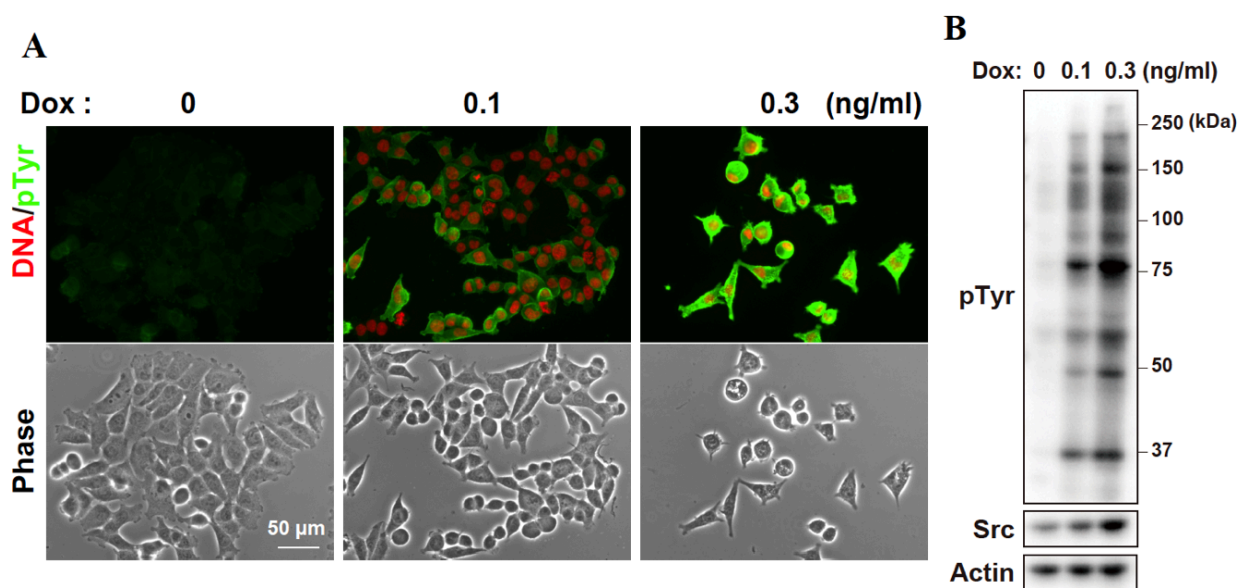


図3-4. v-Src誘導発現株におけるv-Src発現および細胞内チロシンリン酸化の亢進

HCT116/v-Src細胞に図に示した濃度のDoxを加え、3日間培養した。（A）細胞を4%ホルムアルデヒドで固定した。位相差画像、リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質（緑）とDNA（赤）を統合した画像を示す。スケールバーは50  $\mu$ m（B）全細胞を回収し、図に示す抗体でウエスタンブロット解析した。 *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 871., Figure 1より引用。

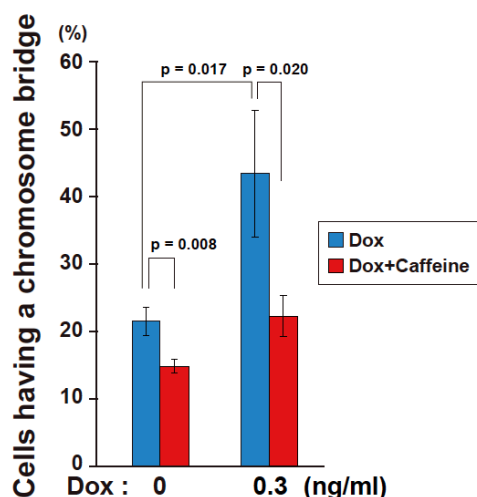


図3-5. v-Srcによる染色体架橋形成はカフェイン処理により低下する

HCT116/v-Src細胞を0.3 ng/mL Doxを含む培養液で3日間培養し固定または回収した。2 mM カフェインは、細胞を固定または回収する24時間前に添加した。固定後の細胞をヘキスト染色し、分裂期の後期・終期に染色体架橋形成を持つ細胞の割合を求めた。独立した3回の実験から染色体架橋の割合の平均値±SDsを算出し、その結果をグラフに示した。p値はStudent's *t*-testで算出した。

*Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 871. Figure 4より引用。

染色体架橋は、DNA損傷、テロメアの機能不全、相同組換えなどによって形成することが報告されている<sup>81-83</sup>。がん遺伝子RasV12 (活性型Ras) やがん原遺伝子産物c-Mycの発現がDNA損傷を引き起こすこと<sup>84-86</sup>から、同じくがん遺伝子であるv-Srcの発現でもDNA損傷が誘導されると考えた。そこで、DNA損傷の指標であるリン酸化ヒストンH2AX ( $\gamma$ H2AX) を免疫蛍光染色して、DNA損傷の有無を調べた。その結果、Dox処理細胞の核内には、Dox非処理細胞よりも強い $\gamma$ H2AXフォーカスの蛍光シグナルが観察された (図3-6 i, ii)。ハイコンテンツイメージングシステム (Operetta) を用いて、核内の $\gamma$ H2AXフォーカスの数と面積を測定すると、 $\gamma$ H2AXフォーカスの数と面積共に、Dox処理により高値へと移動した (図3-7)。WBでも同様に、Dox処理 (0.3 ng/mL) やポジティブコントロールとして用いたアドリアマイシン (ADR) を処理した細胞において $\gamma$ H2AXが増加した (図3-8)。これらの結果は、v-SrcがDNA損傷を誘導することを示唆する。

次に、v-Src 発現による  $\gamma$ H2AX の増加が v-Src のキナーゼ活性に依存するか、Src キナーゼ阻害剤 PP2 を用いて調べた。リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質と  $\gamma$ H2AX を免疫蛍光染色し、それぞれの蛍光シグナル強度をハイコンテンツイメージングシステムで定量解析した。その結果、タンパク質チロシンリン酸化を示す蛍光シグナルと  $\gamma$ H2AX の蛍光シグナル強度が PP2 処理により低下した細胞が観察され (図 3-6 c)、定量解析した結果も同様だった (図 3-9 A, B)。これらの結果は、v-Src のキナーゼ活性に依存して DNA 損傷が増加することを示唆している。

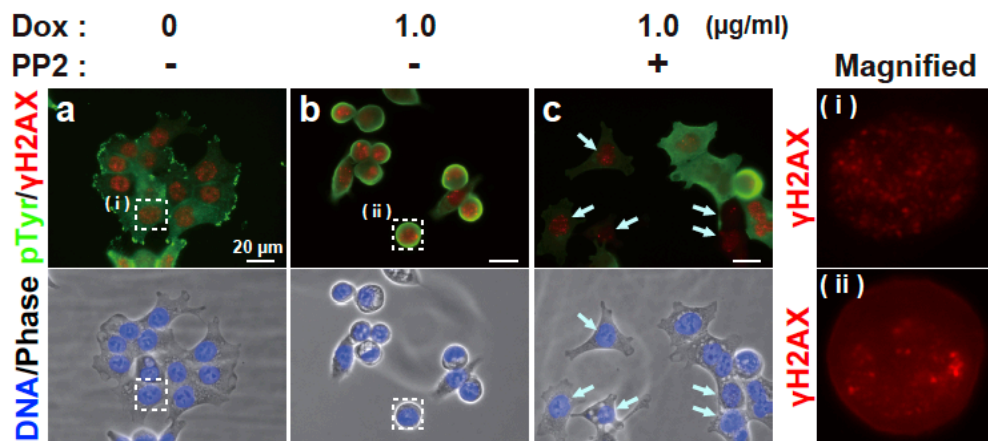


図3-6. v-Srcのキナーゼ活性に依存したDNA損傷の増加

HCT116/v-Src細胞を1.0 μg/mL Doxおよび10 μMのPP2 (Srcキナーゼ阻害剤)を含む培養液で12時間培養した。3-2-4に記載した方法で細胞の固定を行った。DNA (青) と位相差画像を統合した画像と、リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質 (緑) とγH2AX (赤) を統合した画像を示す。矢印は、チロシンリン酸化とγH2AXの蛍光シグナル強度が共に低下している細胞を指す。点線で囲んだ領域のγH2AX単独の拡大画像を右側に示す。スケールバーは20 μm。 *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 871. Figure 2より引用。

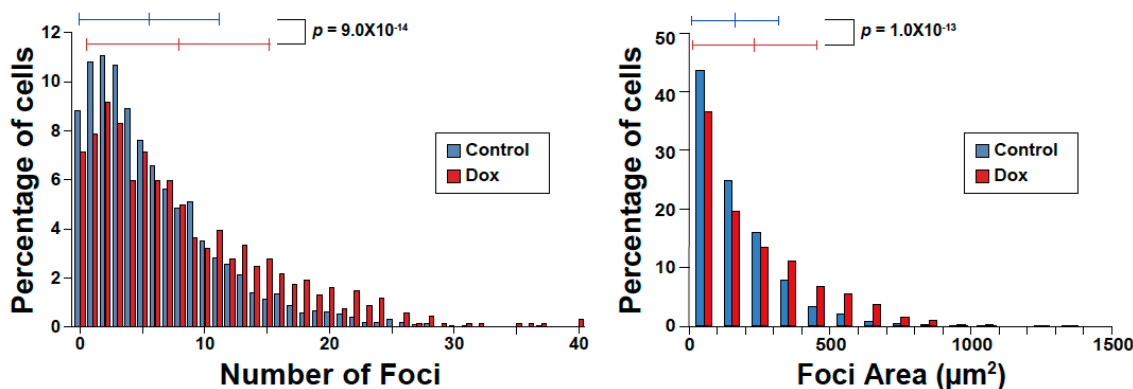


図3-7. v-SrcによるγH2AXフォーカスの増加

HCT116/v-Src細胞を1.0 μg/mL Doxで12時間培養し、3-2-4に記載した方法で細胞の固定を行った。免疫蛍光染色したγH2AXの蛍光シグナルをハイコンテンツイメージングシステムで自動解析した。核1つあたりのγH2AXフォーカスの数 (左)、面積 (右) をヒストグラムに示す。核1つあたりのγH2AXの数あるいは面積の平均値±SDsをヒストグラム中に示す。p値はStudent's *t*-testで算出した。

Control, n=2870; Dox, n=686。 *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 871. Figure 2より引用。

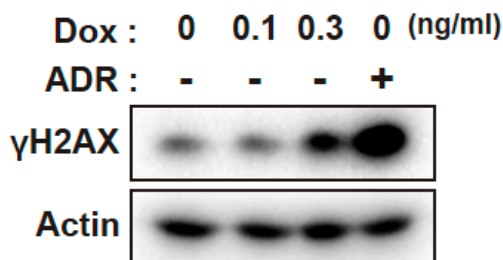


図3-8. v-SrcによるγH2AXの増加

HCT116/v-Src細胞を図に示す濃度のDoxで3日間、またはポジティブコントロールとして300 ng/mL アドリアマイシン (ADR) を24時間処理した。全細胞を回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット解析した。

*Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 871. Figure 2より引用。



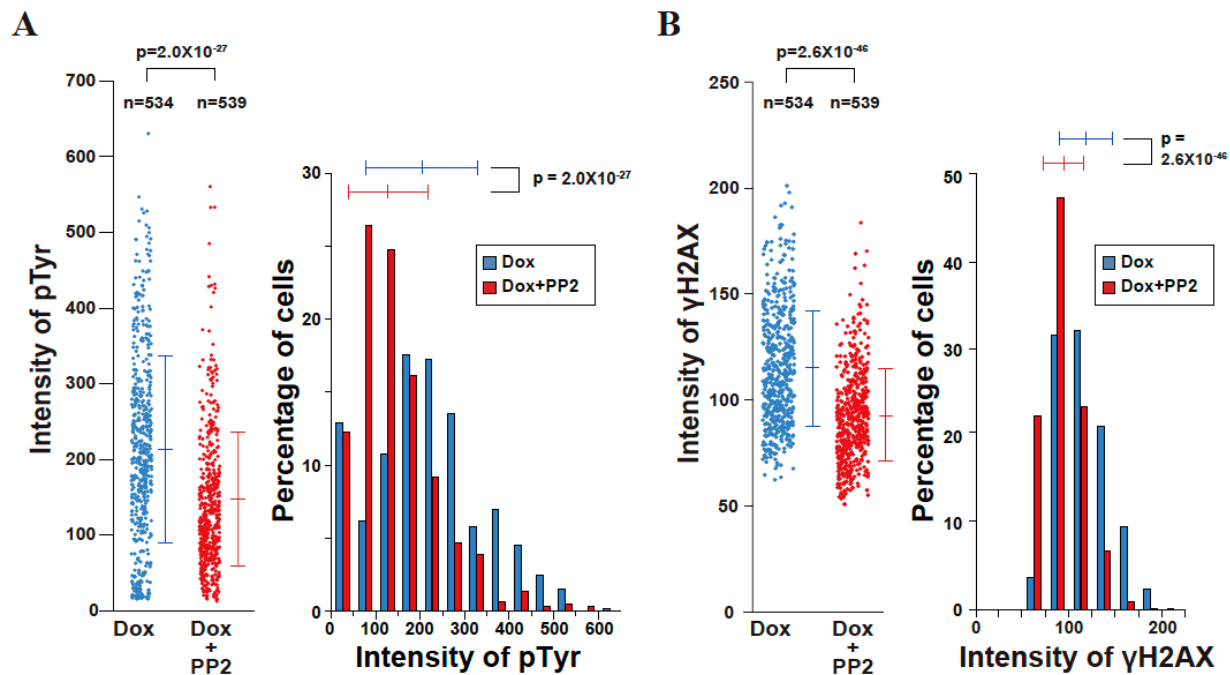


図3-9. Srcキナーゼ阻害はv-SrcによるDNA損傷を抑制する

HCT116/v-Src細胞を10  $\mu$ M PP2と1.0  $\mu$ g/mL Doxを含む培養液で12時間培養した。3-2-4に記載した方法で細胞の固定を行った。リン酸化されたチロシン残基を持つタンパク質と $\gamma$ H2AXを免疫蛍光染色し、蛍光シグナル強度をハイコンテンツイメージングシステムで自動解析した。(A) 細胞1つあたりのチロシンリン酸化したタンパク質の蛍光シグナル強度の平均をドットプロット(左)とヒストグラム(右)で示した。蛍光シグナル強度の平均値 $\pm$ SDsを各グラフに示す。(n>534) (B) 核1つあたりの $\gamma$ H2AXの蛍光シグナル強度の平均をドットプロット(左)とヒストグラム(右)で示した。蛍光シグナル強度の平均値 $\pm$ SDsを各グラフに示す。(n>534) p値はStudent's *t*-testで算出した。

*Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 871. Figure 2より引用。

### 3-3-3 v-SrcによるDNA損傷応答経路の活性化

DNA 損傷を受けた細胞は、Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) / Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) や Checkpoint kinase 1 (Chk1) / Checkpoint kinase 2 (Chk2) からなる DNA 損傷応答経路を活性化して、細胞周期の停止、DNA 損傷修復、アポトーシスなどの様々な細胞応答を引き起こす (図 3-10 A) <sup>87</sup>。そこで、v-Src 発現により誘発される DNA 損傷が ATM/ATR 経路を活性させるか調べるため、ATR によってリン酸化される Chk1 の Ser345<sup>88</sup> と ATM によってリン酸化される Chk2 の Thr68、Kruppel-associated Box (KRAB)-associated co-repressor (KAP1) の Ser824<sup>89</sup> のリン酸化レベルを解析した。ポジティブコントロールとして用いた ADR やブレオマイシン (BLM) の処理により、Chk1 (Ser345) と KAP1 (Ser824) のリン酸化が亢進し、Dox 処理においても Chk1 (Ser345)、Chk2 (Thr68)、KAP1 (Ser824) のリン酸化が亢進した (図 3-10 B, C, D)。この結果より、v-Src のキナーゼ活性に依存した DNA 損傷が、ATM/ATR 経路を活性化することが示唆された。

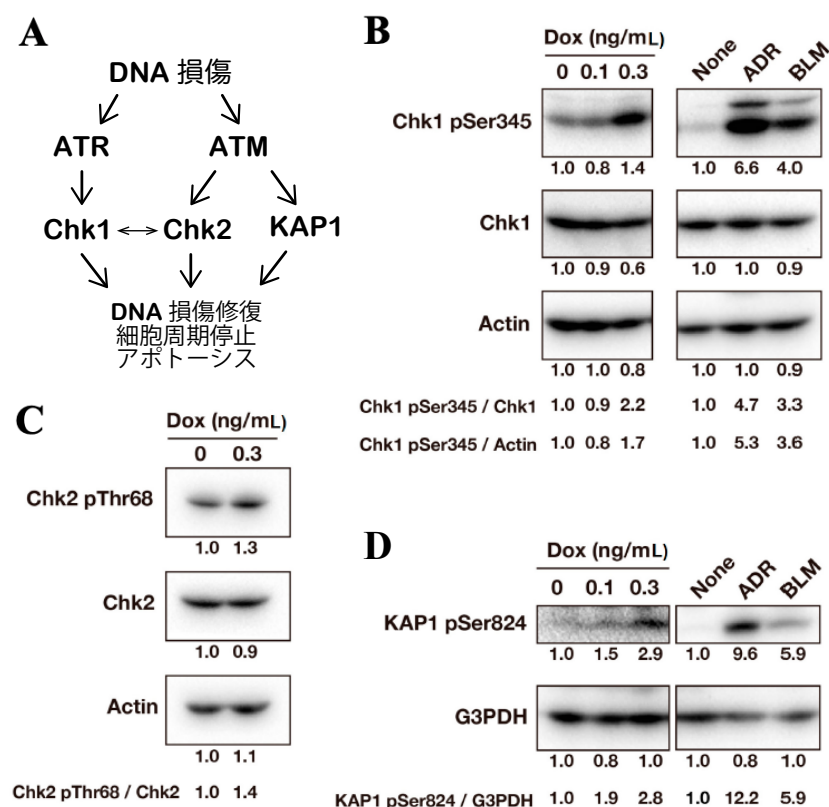


図3-10. v-SrcによるATM/ATR経路の活性化

(A) DNA損傷によりATM/ATRキナーゼが活性化し、その後Chk1/Chk2キナーゼやKAP1の活性化を介してDNA損傷修復、細胞周期停止、アポトーシスなどが引き起こされる。(B-D) HCT116/v-Src細胞を図に示す濃度のDoxで3日間、またはポジティブコントロールとして300 ng/mLアドリマイシン (ADR) や4.46 µg/mLブレオマイシン (BLM) で1日間処理した。全細胞を回収し、図に示す抗体でウェスタンブロット解析した。(B) アクチン、Chk1、Chk1 pSer345のシグナル強度と、アクチンに対するChk1 pSer345、Chk1に対するChk1 pSer345のシグナル強度比をプロットの下に示す。(C) アクチン、Chk2 pThr68、Chk2のシグナル強度と、Chk2に対するChk2 pThr68のシグナル強度比をプロットの下に示す。(D) KAP pSer824およびG3PDHのシグナル強度と、G3PDHに対するKAP pSer824のシグナル強度比をプロットの下に示す。(B-D) は、*Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 871. Figure 3より引用。

DNA損傷は染色体架橋形成を誘発するため<sup>83</sup>、ATM/ATR経路阻害剤であるカフェインをv-Src発現細胞に処理し、v-Src発現下で増加する染色体架橋形成にATM/ATR経路が関与するか調べた。Dox処理により分裂期後期・終期に染色体架橋をもつ細胞が増加し、その増加がカフェイン処理により減少した(図3-5)。カフェイン処理はSrc (Tyr416)のリン酸化レベルおよび様々なタンパク質のチロシンリン酸化レベルに影響を与えず、カフェイン処理がv-Srcのキナーゼ活性に影響しないことを確認した(図3-11)。しかし、予想外なことに、v-SrcによるChk1 (Ser345)のリン酸化亢進はカフェイン処理により抑制されず(図3-12)、本実験条件において、カフェインはATRのキナーゼ活性を抑制しないことが示唆された。これらの結果から、カフェインがATR経路以外の経路を抑制して、v-Srcによる染色体架橋形成を阻害したと考えられる。

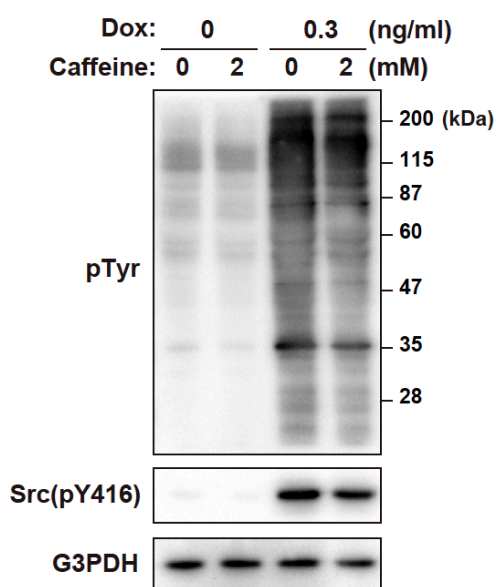


図3-11. カフェイン処理はv-Srcのキナーゼ活性に影響を与えない

HCT116/v-Src細胞を0.3 ng/mL Doxを含む培養液で3日間培養し固定または回収した。2 mM カフェインは、細胞を固定または回収する24時間前に添加した。全細胞を回収し、図に示す抗体でウエスタンブロット法により解析した。Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 871. Figure 4より引用。

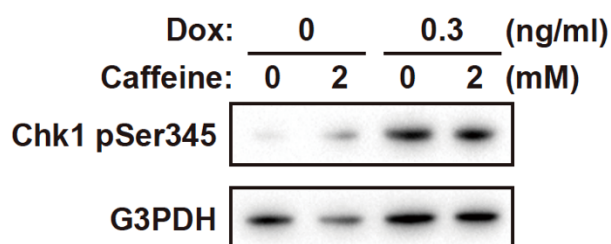


図3-12. カフェインはATR経路を抑制しない

HCT116/v-Src細胞を0.3 ng/mL Doxで3日間培養した。2 mM カフェインは、細胞を回収する24時間前から処理した。全細胞を回収し、図に示す抗体でウエスタンブロット法により解析した。Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 871. Figure 4より引用。



### 3-4 考察

第3章では、v-Srcのキナーゼ活性に依存してDNA損傷が起こり、ATM/ATR経路が活性化することを見出した。

MAPKカスケードを活性化する活性型Ras (v-Ras、Ha-Ras) は、G1期からS期への進行を促進してDNA複製ストレスを誘発する<sup>84-86,90</sup>。v-SrcがRas-MAPKカスケードの活性化を介して細胞増殖を亢進する<sup>14</sup>ことから、v-SrcによるMAPKカスケードの活性化がG1期からS期への進行を促進し、DNA複製ストレスを起こす可能性がある。細胞周期は、Cyclin-dependent kinase (CDK) やCyclinなどによって制御されており、CDKの活性はそれぞれの細胞周期の段階に特異的なCyclinとの結合により主に調節されている。Cyclin Aは、S期、G2期に置いて発現量が高く、G1期での発現量増加は通常よりも早くS期へと進行させてDNA複製ストレスを誘発する<sup>91</sup>。また、G1期からS期への進行時にはCyclin E-CDK2が関与しており、CDK2阻害因子であるp27は細胞周期を進行させる条件が整うまで進行を止める。v-SrcがCyclin Aの発現量を増加させることやCTGFの過剰発現がCyclin Aの発現量を増加させることが報告されている<sup>92,93</sup>。さらには、Srcによるp27のリン酸化がp27のCDK2阻害作用を抑制することが報告されており<sup>94</sup>、v-SrcによるCyclin Aの発現量増加やCyclin E-CDK2の活性化もS期への早期進行に寄与すると推定している。

細胞周期には、CDKやCyclinのような細胞周期を促進する制御だけでなく、細胞の異常を検知し、細胞周期を抑制するチェックポイント機能がある。G1期でDNA損傷を持つ細胞がS期に進行しないように、p53がG1/Sチェックポイントとして働く。しかし、v-Srcの発現はp53の発現を低下させる<sup>38</sup>ため、G1/Sチェックポイントの働きは減弱していることになる。つまり、v-Srcは、Ras-MAPKカスケードの活性化、Cyclin Aの発現量増加、p27の不活性化を介してG1期からS期への進行を促進させ、p53の発現量を低下させてG1/S期チェックポイントの機能を弱める。その結果、細胞は未熟なままS期に進行しDNA複製ストレスを介してDNA損傷を引き起こすと考えている。

DNA損傷は遺伝子の異常を経て細胞のがん化をもたらすため、細胞は恒常性を維持するためにDNA損傷応答経路を活性化し、細胞周期を遅延させてDNAを修復する。S期においてDNA損傷を持つ細胞の細胞周期は、Chk1によってS期に停止する<sup>95</sup>。v-Src発現時にChk1は活性化しており、v-SrcによるDNA損傷がG1期からS期への早期進行によってS期で起こっているのであれば、その損傷を修復するためにChk1が活性化し、S期に細胞周期を停止させている可能性がある。つまり、DNA損傷応答経路の活性化によるS期での細胞周期停止あるいは遅延が、v-Srcによる細胞増殖抑制につながると考えられる。また、G1期のCDK2、G2/M期のCDK1の活性を抑制するp21の発現量がv-Srcの発現により増加し、G1期で同調した細胞の細胞周期がG2/M期で停止することが報告されている<sup>96</sup>。そのため、v-Srcによるp21の発現量増加も細胞増殖抑制に寄与すると考えられる。

v-Srcによる染色体架橋がカフェイン処理により減少したが、今回の実験条件において、カフェインはATR経路を阻害せず、v-Srcによる染色体架橋はATM/ATR経路とは別の経路で起こることが示唆された。細胞内に生じたDNA二本鎖切断の多くは、相同組換え (HR: homologous recombination) または非相同末端結合 (NHEJ: non-homologous end joining) によって修復され

る。NHEJによるDNA修復が染色体架橋形成の防止に役立ち、NHEJが起こらない状態でのHRによるDNA損傷修復が染色体架橋の形成につながる<sup>83</sup>。カフェインはATM/ATR経路の阻害とは別に、HRによるDNA損傷修復に重要なRAD51/54のDNA損傷部位への結合を阻害すると報告されている<sup>97,98</sup>。v-Src発現により増加した染色体架橋がカフェイン処理により減少したことは、v-Src発現下でのDNA損傷がHRを介して修復されて染色体架橋形成に繋がった可能性を示唆する。さらに、NHEJを介したDNA損傷修復に関与するPRMT5の活性がSrcからのリン酸化によって低下し、NHEJによるDNA損傷修復を阻害することが報告されている<sup>99</sup>。以上のことから、v-Src発現がNHEJを阻害し、細胞内に蓄積したDNA損傷がHRによって修復された結果v-Srcによる染色体架橋形成細胞が増加したと考えている。

v-Src発現により、 $\gamma$ H2AXの増加、DNA損傷応答経路の活性化、DNA損傷などにより誘発される染色体架橋形成の増加が起こることから、v-Src発現によるDNA損傷が示唆された。しかし、v-Src発現細胞にDNA損傷が存在しているかは解析しておらず、ATMやATRによってヒストンH2AXがリン酸化される<sup>100,101</sup>ことを考慮すると、v-Src発現下でのDNA損傷非依存的なATM、ATRの活性化が、 $\gamma$ H2AXの増加を引き起こす可能性も考えられる。ATMの活性化には、ATMの単量体化、Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体の損傷部位への集積、MRN複合体によるDNA末端の二重らせんの巻き戻しが必要である<sup>102,103</sup>。そして、活性化したATMによる損傷部位周辺のヒストンH2AXのリン酸化により $\gamma$ H2AXフォーカスが形成し、 $\gamma$ H2AXフォーカス形成領域にDNA損傷応答関連因子が集積してDNA損傷が修復される<sup>103</sup>。つまり、二重らせんの巻き戻しが起こらない環境下ではATMは活性化せず、 $\gamma$ H2AXフォーカスは形成しないと推測される。よって、 $\gamma$ H2AXフォーカスが形成しているv-Src発現細胞では、DNA損傷が存在すると考えられる。v-SrcによるATMやATRのリン酸化がDNA損傷非依存的なATM/ATRの活性化に繋がるかは、v-Srcによる直接的なATM/ATRのリン酸化と、そのリン酸化がATM/ATRのキナーゼ活性に与える影響を*in vitro*キナーゼアッセイで評価することで明らかになる。また、今後の課題として、MRN複合体の局在の観察やTUNEL染色による断片化したDNAの検出を行い、v-Src発現細胞にDNA損傷が存在するかを明らかにする必要がある。

放射線、紫外線、熱などから刺激を受けた細胞が、アポトーシスを引き起こすシグナルを活性化させると、DNAの断片化、細胞膜のブレブなどの細胞の形態変化が起こる<sup>63,87</sup>。v-Src発現下、ブレブ形成細胞で活性型caspase-3は検出されなかったが、caspase-3の活性化を伴わないアポトーシス由来のブレブは起こり得るだろうか。アポトーシスに起因する細胞膜のブレブは、活性型caspase-3によるROCKの活性化を介したアクチオシンの収縮により引き起こされる<sup>104</sup>。つまり、アポトーシスを起こす細胞はブレブ形成に先行してcaspase-3を活性化させる。v-SrcはPI3K/Akt経路を活性化させることが報告されており<sup>13,14,20</sup>、PI3K/Aktの活性化はアポトーシスを抑制する<sup>105,106</sup>。他にも、Cyr61がNF- $\kappa$ B依存的にアポトーシスへの抵抗性を高める<sup>107</sup>ことが報告されており、Cyr61の発現量はv-Src発現時に増加していた。以上のことから、v-Srcの発現はアポトーシスへの抵抗性を高めており、v-Src発現細胞でアポトーシスは起こりにくいと推測される。よって、v-Srcにより形成したブレブ細胞で活性型caspase-3が観察されなかったことと、v-Srcはアポトーシスに対して抵抗性を示すことから、v-Src発現細胞で観察されたブレブ細胞はアポトーシスに起因しないと考えられる。v-Srcにより誘導されるブレブ形成の生理的意義については、『総括』において議論する。

### 3-5 小括

本章では、以下のことを明らかにした。v-Src発現によるブレブ形成はアポトーシスに起因せず、v-Srcによるブレブの形成は細胞増殖抑制効果には関係しない（図3-13 ①）。一方、v-Srcのキナーゼ活性に依存してDNA損傷が起こり（図3-13 ②）、それにより惹起されるDNA損傷応答の活性化（図3-13 ③）による細胞周期停止が、v-Srcによる細胞増殖抑制効果に関与することが示唆された（図3-13 ④）。

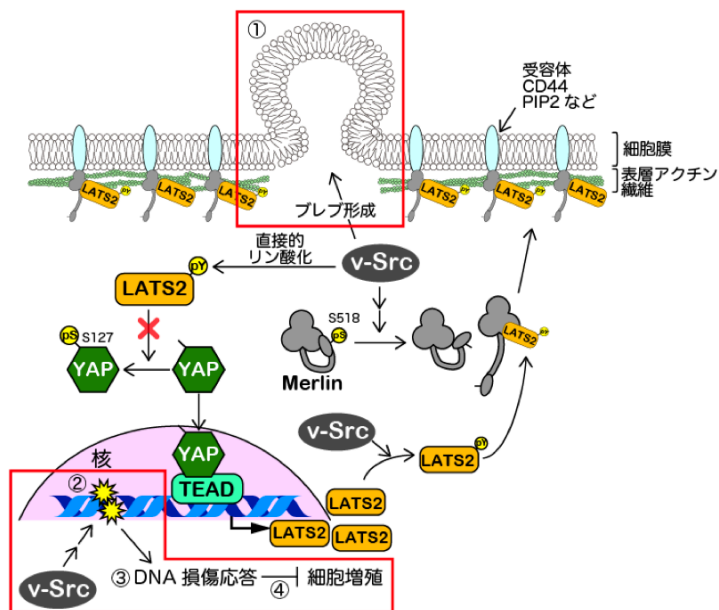


図3-13. 第3章のまとめ

本研究結果より予想されるモデルを示す。第3章で明らかにした部分を赤枠内に示す。詳細は、本文参照。

## 総 括

本研究ではv-Srcによる細胞のがん化機構の解明を目指し、v-SrcがHippo経路の中心的なキナーゼであるLATS2に与える影響と、v-Srcにより誘導されるブレブ形成や異常に活性化される生存・増殖シグナルに抵抗する細胞応答を解析した。第1章では、v-Srcによる直接的なLATS2のチロシンリン酸化がLATS2のキナーゼ活性を抑制すること、それによりHippo経路の抑制から解除されたYAPがLATS2の発現量を増加させること、さらに、LATS2がキナーゼ活性非依存的にv-Srcによるブレブ形成を抑制することを見出した。第2章では、v-SrcがLATS2-Merlin複合体の形成を促進し、細胞膜においてこの複合体がv-Srcによるブレブ形成を抑制することを明らかにした。第3章では、v-Srcにより誘導されるブレブ形成がアポトーシスに関与しないこと、さらにはv-SrcがDNA損傷を誘発しDNA損傷応答経路を活性化させることを明らかにした。これらの結果は、v-Srcの細胞がん化機構の一端とv-Src発現初期に惹起される細胞応答を示しており、v-Srcにより活性化される増殖シグナルや細胞遊走・浸潤の亢進に対して抵抗するための細胞応答であると考えられる。Cskのノックダウンにより活性化したc-Srcにおいても、LATS2の発現量増加を検出しており、臨床においても同様な現象が起こっていることが予想される。

v-Srcによる増殖シグナルの亢進に対し、細胞はまずHippo経路を活性化して抵抗しようとすることが示唆された。Hippo経路は、サイトカラシンD、ラトランキュリンA処理や、細胞が高密度になったときのアクチンストレスファイバーの減少により活性化し<sup>24</sup>、LATS2とMerlinが複合体を形成し細胞膜局在<sup>28,29</sup>を示す。v-Srcの発現において、この複合体の細胞膜局在が観察されたことは、Hippo経路が活性化したことを示している。v-Srcは、Rho-ROCK-LIMキナーゼ経路の抑制や、Rho抑制因子p190 Rho-GAPの活性化などを引き起こし、アクチンストレスファイバーを減少させて、細胞の形態変化を引き起こす<sup>13,18,108</sup>。このアクチンストレスファイバーの減少がHippo経路を活性化する引き金になると考えられる。

v-Src発現細胞においてLATS2-Merlinは細胞膜に局在するが、v-Src発現細胞ではYAPを介した転写が亢進する。細胞はこの転写亢進をHippo経路の活性化により遮断しようとするが、LATS2のキナーゼ活性抑制により達成されない。しかし、細胞はLATS2の過剰発現という別の手段により、v-Srcによるブレブ形成を抑制する。すなわち、これまで報告のないLATS2の新たな機能によりv-Srcによるブレブ形成に抵抗する。細胞膜のブレブはアポトーシス細胞において観察される現象としてよく知られるが、ブレブの形成と退縮はがん細胞の遊走・浸潤にも深く関わっている<sup>62,69</sup>。上皮由来のがん細胞は、上皮間葉転換を起こした後に基底膜を破壊して間質へと浸潤し、ECMの中を移動した後、血管やリンパ管に侵入し、原発巣から離れた臓器へと移動する。がん細胞は、マトリックスプロテアーゼ（MMP）を分泌してECMを分解しながら遊走する間葉系遊走と、ECMの分解を行わずにECMの間をすり抜けながらブレブ形成と退縮を利用して遊走するアメーバ様遊走を切り替えながら、効率的にECM内を移動する<sup>109,110</sup>。一部のがん細胞では優先的にアメーバ様遊走を利用することが報告されている<sup>109,111</sup>。Srcによるブレブ形成が細胞の遊走・浸潤に関与する可能性が示唆されている<sup>64</sup>ことから、LATS2にはSrcのブレブを利用した浸潤または遊走を抑制する働きがあると推測した。

ブレブ形成の抑制によりv-Srcにより活性化される遊走を抑制できるのか解析するため、創傷治癒アッセイやボイデンチャンバーアッセイにより解析を試みた。しかし、これらの方法では本研究で見出したブレブ形成が遊走に關与するかを評価できなかった。その原因として、創傷治癒アッセイではv-Srcによる浮遊化に伴う細胞の形態変化が創傷部位以外にも隙間を生み出し遊走する方向性を統一できなかったこと、ボイデンチャンバーアッセイではv-Srcによる細胞の浮遊化・接着減少により遊走しない細胞が出現したことや遊走した細胞がボイデンチャンバーのメンブレンフィルターから剥がれたことなどが考えられる。ブレブ形成と退縮を介した細胞遊走はECMの隙間をすり抜けるときに起こることから、アメーバ様遊走が起こりやすい硬さのマトリゲルの中に細胞を播種し、3次的に細胞の遊走を観察すれば、v-Src誘発性ブレブが浸潤に關与するか、さらにはその浸潤をLATS2が抑制するかを評価することができると考えている。

v-Srcにより誘導されるブレブ形成がアポトーシスに伴う現象であれば、LATS2はv-Srcを発現するがん細胞の生存を促進することになる。すなわち、LATS2のがん抑制遺伝子産物としての性質とは逆である。しかしながら、v-Srcにより誘導されるブレブ形成細胞ではアポトーシスの指標である活性型caspase-3のシグナルが観察されず、v-Srcによる細胞増殖抑制の原因はアポトーシス誘導ではないことが示唆された。Srcの発現は、MAPKカスケードの活性化やYAPを介した増殖関連遺伝子の転写亢進を誘導し、増殖亢進シグナルの活性化を引き起こす<sup>13,14,36,37</sup>。実際に、v-SrcはYAPを介して腫瘍形成を促進することが報告されている<sup>49</sup>。しかし、v-Src発現が細胞増殖を抑制することは、v-Srcによる増殖亢進シグナルの活性化が細胞増殖促進に直結しないことを示唆する。第3章で述べたように、v-Srcの発現はMAPKカスケードの活性化やCyclin Aの発現量増加を介して、S期でのDNA損傷を誘発すると推測している。さらに、YAPがCyclin Eの発現を促進することや、Cyclin Eの過剰発現がG1期からS期への早期進行を介してDNA損傷を引き起こすことから<sup>112,113</sup>、v-SrcによるYAP依存的な転写亢進がCyclin Eの発現量を増加させ、S期でのDNA損傷に寄与する可能性がある。すなわち、v-SrcによるMAPKカスケードの活性化やHippo経路の破綻を介した過剰な増殖シグナルが、G1期からS期への早期進行をもたらすDNA損傷を誘発すると考えられる。そして、その損傷を感知した細胞がDNA損傷応答経路を介して細胞周期を停止し、細胞増殖が抑制されると考えている。

v-Srcは、MAPKカスケードの活性化による増殖シグナルの亢進（図4a）、アクチンリモデリングの活性化やMMPの分泌を促進して転移・浸潤を引き起こし（図4b）、がん化や転移を促進することが報告されている<sup>13</sup>。これらの報告と本研究結果を踏まえて、次のようなv-Srcによる新たな細胞のがん化・悪性化機構が考察される。上述のように、Src活性化細胞での形態変化などがHippo経路活性化の引き金となるが、SrcによるYAPのリン酸化やPI3Kの活性化を介したLATS2のキナーゼ活性低下、さらにはv-SrcによるLATS2の直接的なリン酸化によるLATS2のキナーゼ活性低下により、Hippo経路が破綻する（図4c）。また、v-Srcは増殖亢進以外にも、DNA損傷誘導（図4d）、ブレブなどによる転移・浸潤の亢進（図4e）を引き起こす。細胞はYAPを介した増殖関連遺伝子の発現を抑制するためにLATS2の発現量を増加させ（図4f）、Hippo経路の活性化を介して増殖を抑制しようとする（図4g）が、v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性抑制（図4h）により、Hippo経路は活性化できない。しかし、細胞はv-SrcによるDNA損傷誘導に対してDNA損傷応答経路を活性化し（図4i）、v-Srcにより惹起されるDNA損

傷を修復するために細胞周期を停止する（図4j）。また、細胞は増加したLATS2を利用してブレブ形成を抑制して転移・浸潤を防ぐ（図4k）。v-Src発現は染色体架橋形成細胞を増加させ、架橋が解消されないまま細胞質分裂が完了すると、架橋した染色体の切断により染色体が不均等に分配された娘細胞が出現する（図4l）。また、v-Srcは、Aurora Bの局在異常やCDK1の不活性化を引き起こし、異常な細胞分裂を介して、二核・巨核細胞を出現させる（図4m）<sup>20,114</sup>。通常、二核細胞の細胞周期はHippo経路によって停止する（図4n）<sup>115</sup>が、v-Src発現下ではHippo経路が破綻しており（図4o）二核細胞は細胞周期を進行させてしまう。異常な染色体数を持つ細胞の細胞分裂が繰り返されると、遺伝的多様性を示す細胞集団が現れ（図4p）、その中からLATS2の発現量が低く転移・遊走する細胞（図4q）や、細胞増殖抑制を受けずに自律性増殖する細胞（図4r）が出現する可能性がある。つまり、これまでに報告されてきたv-SrcによるMAPKカスケードの活性化などが細胞増殖亢進に直結するのではなく、v-Src発現初期は増殖シグナルの亢進よりもDNA損傷応答による増殖抑制が優位に働き、異常な細胞分裂を繰り返す中で、増殖抑制よりも増殖亢進が優位になった細胞がv-Srcによる細胞増殖亢進につながる可能性を考えている。また、v-Srcによる遊走亢進には間葉系遊走だけでなくアメーバ様遊走も関与しており、染色体不安定性によりLATS2の発現量が減少すると、ブレブ形成と退縮によるアメーバ用遊走を利用したがん転移が起こるのではないかと推測している。

大型がんゲノムプロジェクトThe Cancer Genome Atlas（TCGA）のデータをWebリソース（cBioPortal for Cancer Genomics）で解析し、Srcを過剰発現するがん患者の全生存率とLATS2発現量の相関を調べた。結腸直腸腺がん（TCGA, Firehose Legacy）のデータを解析すると、636人中、7.3%の人にSrcのコピー数多型異常があった。また、Srcにコピー数多型異常を持つ人の中で15.6%の人には、LATS2にもコピー数多型異常があった。約85ヶ月時点での全生存率を比較すると、Src単独のコピー数多型異常を持つ人の全生存率は60%であり、SrcとLATS2共にコピー数多型異常を持つ人の場合は75%であった。Src発現下ではLATS2のキナーゼ活性が抑制されていると仮定すると、細胞内に増加しているLATS2がキナーゼ活性非依存的に全生存率を上昇させていると推測される。ほとんどの固形がんのがん化にYAP/TAZを介した転写亢進が寄与していると言われており<sup>34</sup>、YAPを標的として抗がん剤の開発が精力的に進められている。しかし、Srcの発現量が増加しているがん細胞にYAP阻害剤を処理すると、増殖亢進に関与する遺伝子の転写抑制が期待できるが、LATS2の発現量が減少して転移・浸潤への抵抗性が減弱し、全生存率が低下する恐れもある。そのため、YAPを標的とした抗がん剤が臨床で用いられる場合には、Srcの発現量または活性化状態を調べ、Srcキナーゼ阻害剤と併用して治療するかを判断する必要があると考えられる。また、SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下を回復させる治療薬として次の2つが考えられる。1つ目は、近年着目されているタンパク質-タンパク質相互作用阻害を応用したMOB-LATS2相互作用促進剤である。もう1つは、Srcが結合するペプチドの開発であり、このペプチドにSrcが優先的に結合することでSrcによるLATS2のリン酸化を抑制できると考えている。これらの様なSrcによるLATS2の活性抑制を改善する薬剤とSrc阻害剤を併用することで、YAPを介した増殖促進とSrcによるブレブを介した転移・浸潤を抑制できる可能性がある。

本研究は、v-SrcによりHippo経路が破綻する新規機構と、LATS2がキナーゼ活性非依存的にv-Srcによるブレブ形成を抑制する働きを見出し、上述したv-Srcによる新たな細胞のがん

化機構を提示する。これらの新しい知見は、Src 活性が亢進しているがんの治療や、今後開発が進むと考えられる YAP を標的とした抗がん剤の適正使用に対して有益な情報になる可能性を持つ。

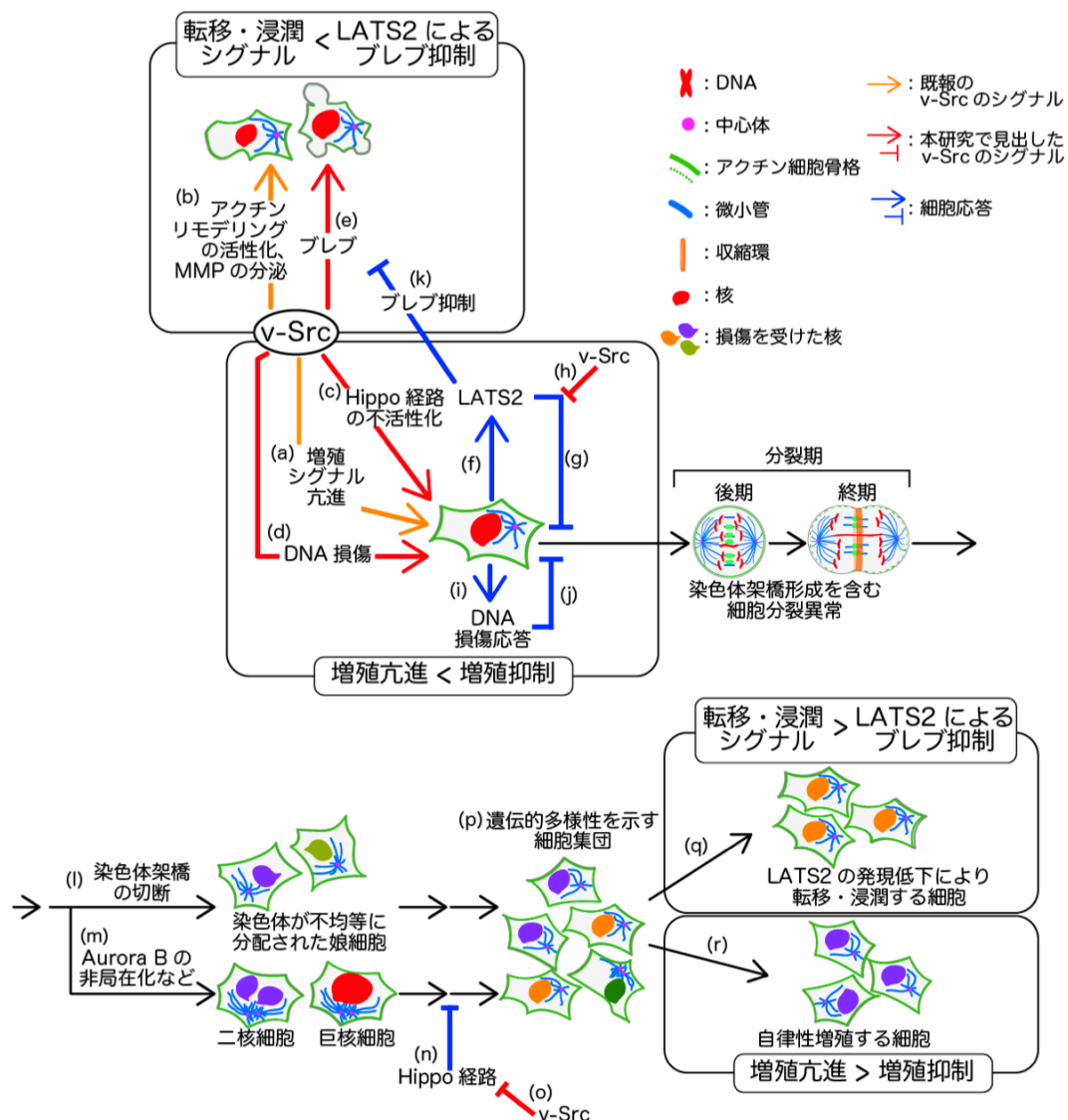


図 4. v-Src による細胞のがん化モデル

v-Src により亢進する増殖シグナル、転移・浸潤シグナルは、v-Src により惹起される細胞応答の抑制を受ける。また、DNA 損傷応答により細胞増殖は亢進せず、細胞は増殖抑制を示す。しかし、染色体架橋形成などの細胞分裂異常により遺伝的多様性を示す細胞集団が現れ、その中から、増殖亢進する細胞や、転移・浸潤する細胞が出現する。詳細は、本文参照。

転移・浸潤シグナル < LATS2 によるプレブ抑制: 転移・浸潤に関するプレブ形成を LATS2 が抑制する。増殖亢進 < 増殖抑制: v-Src 発現により MAPK の活性化や Hippo 経路の破綻が起こるが、DNA 損傷応答経路の活性化により増殖は抑制される。転移・浸潤シグナル > LATS2 によるプレブ抑制: 転移・浸潤に関するプレブ形成を LATS2 が抑制するが、LATS2 の発現量が減少するとプレブを介した転移・浸潤が亢進する。増殖亢進 > 増殖抑制: v-Src による増殖亢進シグナルは常に亢進しており、増殖抑制を受けない細胞が出現すると細胞増殖が促進する。オレンジ色の線: 既報の v-Src のシグナル、赤色の線: 本研究で見出した v-Src のシグナル、青色の線: 細胞応答

## 引用文献

- 1 Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, 22, 337–358.
- 2 Ishizawar R, Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell.* **2004**, 6, 209–214.
- 3 Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest.* **1993**, 91, 53–60.
- 4 Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta.* **2002**, 1602, 114–130.
- 5 Oneyama C, Iino T, Saito K, Suzuki K, Ogawa A, Okada M. Transforming potential of Src family kinases is limited by the cholesterol-enriched membrane microdomain. *Mol Cell Biol.* **2009**, 29, 6462–6472.
- 6 Morinaga T, Abe K, Nakayama Y, Yamaguchi N, Yamaguchi N. Activation of Lyn tyrosine kinase through decreased membrane cholesterol levels during a change in its membrane distribution upon cell detachment. *J Biol Chem.* **2014**, 289, 26327–26343.
- 7 S.M. Thomas JSB. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **1997**, 13, 513–609.
- 8 Oneyama C, Hikita T, Enya K, Dobenecker MW, Saito K, Nada S, Tarakhovsky A, Okada M. The lipid raft-anchored adaptor protein Cbp controls the oncogenic potential of c-Src. *Mol Cell.* **2008**, 30, 426–436.
- 9 Aleshin A, Finn RS. SRC: A century of science brought to the clinic. *Neoplasia.* **2010**, 12, 599–607.
- 10 Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R, Yeatman TJ. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet.* **1999**, 21, 187–190.
- 11 Kato S, Okamura R, Mareboina M, Lee S, Goodman A, Patel SP, Fanta PT, Schwab RB, Vu P, Raymond VM, Lanman RB, Sicklick JK, Lippman SM, Kurzrock R. Revisiting epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification as a target for anti-EGFR therapy: analysis of cell-free circulating tumor DNA in patients with advanced malignancies. *JCO Precis Oncol.* **2019**, 3, 1–14.
- 12 G. Steven Martin. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2001**, 1602, 467–475.
- 13 Frame MC. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci.* **2004**, 117, 989–998.
- 14 Penuel E, Martin GS. Transformation by v-Src: Ras-MAPK and PI3K-mTOR mediate parallel pathways. *Mol Biol Cell.* **1999**, 10, 1693–1703.
- 15 Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of



- the E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol.* **1993**, 120, 757–766.
- 16 Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HEM, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* **2002**, 4, 222–231.
  - 17 Woodcock SA, Rooney C, Lontos M, Connolly Y, Zoumpourlis V, Whetton AD, Gorgoulis VG, Malliri A. SRC-induced disassembly of adherens junctions requires localized phosphorylation and degradation of the rac activator tiam1. *Mol Cell.* **2009**, 33, 639–653.
  - 18 Fincham VJ, Chudleigh A, Frame MC. Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J Cell Sci.* **1999**, 112, 947–956.
  - 19 Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JE. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol.* **1998**, 18, 2553–2558.
  - 20 Soeda S, Nakayama Y, Honda T, Aoki A, Tamura N, Abe K, Fukumoto Y, Yamaguchi N. v-Src causes delocalization of Mklp1, Aurora B, and INCENP from the spindle midzone during cytokinesis failure. *Exp Cell Res.* **2013**, 319, 1382–1397.
  - 21 Welman A, Cawthorne C, Ponce-Perez L, Barraclough J, Danson S, Murray S, Cummings J, Allen TD, Dive C. Increases in c-Src expression level and activity do not promote the growth of human colorectal carcinoma cells in vitro and in vivo. *Neoplasia.* **2006**, 8, 905–916.
  - 22 Webb BL, Jimenez E, Martin GS. v-Src generates a p53-independent apoptotic signal. *Mol Cell Biol.* **2000**, 20, 9271–9280.
  - 23 Kato J, Takeya T, Grandori C, Iba H, Levy JB, Hanafusa H. Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60c-src protein to a transforming protein. *Mol Cell Biol.* **1986**, 6, 4155–4160.
  - 24 Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development.* **2011**, 138, 3907–3914.
  - 25 Warren JSA, Xiao Y, Lamar JM. YAP/TAZ activation as a target for treating metastatic cancer. *Cancers (Basel).* **2018**, 10, 115.
  - 26 Li W, Cao Y, Xu J, Wang Y, Li W, Wang Q, Hu Z, Hao Y, Hu L, Sun Y, Xu G, Ao G. YAP transcriptionally regulates COX-2 expression and GCCSysm-4 (G-4), a dual YAP/COX-2 inhibitor, overcomes drug resistance in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* **2017**, 36, 1–20.
  - 27 Zhang X, Abdelrahman A, Vollmar B, Zechner D. The ambivalent function of YAP in apoptosis and cancer. *Int J Mol Sci.* **2018**, 19, 1–21.
  - 28 Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor merlin/NF2. *Cell.* **2013**, 154, 1342–1355.
  - 29 Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* **2016**, 30, 1–17.

- 30 Couzens AL, Xiong S, Knight JDR, Mao DY, Guettler S, Picaud S, Kurinov I, Filippakopoulos P, Sicheri F, Gingras A-C. MOB1 mediated phospho-recognition in the core mammalian hippo pathway. *Mol Cell Proteomics*. **2017**, 16, 1098–1110.
- 31 He C, Lv X, Huang C, Hua G, Ma B, Chen X, Angeletti PC, Dong J, Zhou J, Wang Z, Rueda BR, Davis JS, Wang C. YAP1-LATS2 feedback loop dictates senescent or malignant cell fate to maintain tissue homeostasis. *EMBO Rep*. **2019**, 20, 1–21.
- 32 Bae SJ, Luo X. Activation mechanisms of the Hippo kinase signaling cascade. *Biosci. Rep*. **2018**, 38, 1–14.
- 33 Thompson BJ. YAP/TAZ: Drivers of tumor growth, metastasis, and resistance to therapy. *Bioessays*. **2020**, 42, 1–16.
- 34 Zanconato F, Battilana G, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the roots of cancer. *Cancer Cell*. **2018**, 29, 26–33.
- 35 Kim HB, Myung SJ. Clinical implications of the Hippo-YAP pathway in multiple cancer contexts. *BMB Rep*. **2018**, 51, 119–125.
- 36 Kim NG, Gumbiner BM. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *J Cell Biol*. **2015**, 210, 503–515.
- 37 Li P, Silvis MR, Honaker Y, Lien WH, Arron ST, Vasioukhin V.  $\alpha$ E-catenin inhibits a Src–YAP1 oncogenic module that couples tyrosine kinases and the effector of hippo signaling pathway. *Genes Dev*. **2016**, 30, 798–811.
- 38 Kakae K, Ikeuchi M, Kuga T, Saito Y, Yamaguchi N, Nakayama Y. v-Src-induced nuclear localization of YAP is involved in multipolar spindle formation in tetraploid cells. *Cell Signal*. **2017**, 30, 19–29.
- 39 Honda T, Soeda S, Tsuda K, Yamaguchi C, Aoyama K, Morinaga T, Yuki R, Nakayama Y, Yamaguchi N, Yamaguchi N. Protective role for lipid modifications of Src-family kinases against chromosome missegregation. *Sci Rep*. **2016**, 6, 38751.
- 40 Nakayama Y, Matsui Y, Takeda Y, Okamoto M, Abe K, Fukumoto Y, Yamaguchi N. c-Src but not Fyn promotes proper spindle orientation in early prometaphase. *J Biol Chem*. **2012**, 287, 24905–24915.
- 41 Yang X, Boehm JS, Yang X, Salehi-Ashtiani K, Hao T, Shen Y, Lubonja R, Thomas SR, Alkan O, Bhimdi T, Green TM, Johannessen CM, Silver SJ, Nguyen C, Murray RR, Hieronymus H, Balcha D, Fan C, Lin C, Ghamsari L, Vidal M, Hahn WC, Hill DE, Root DE. A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. *Nat Methods*. **2011**, 8, 659–661.
- 42 Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, Fuss JO, Campisi J, Yaswen P, Cooper PK, Kaufman PD. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One*. **2009**, 4, e6529.
- 43 Bryant DM, Datta A, Rodríguez-Fraticelli AE, PeräCurrenny Signnen J, Martín-Belmonte F, Mostov KE. A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol*. **2010**, 12, 1035–1045.

- 44 Guo F, Chiang MY, Wang Y, Zhang YZ. An in vitro recombination method to convert restriction- and ligation-independent expression vectors. *Biotechnol J*. **2008**, 3, 370–377.
- 45 Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*. **2009**, 138, 389–403.
- 46 Johnson D, Frame MC, Wyke JA. Expression of the v-Src oncoprotein in fibroblasts disrupts normal regulation of the CDK inhibitor p27 and inhibits quiescence. *Oncogene*. **1998**, 16, 2017–2028.
- 47 Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. **2013**, 48, 452–458.
- 48 Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics*. **2006**, 5, 749–757.
- 49 Si Y, Ji X, Cao X, Dai X, Xu L, Zhao H, Guo X, Yan H, Zhang H, Zhu C, Zhou Q, Tang M, Xia Z, Li L, Cong YS, Ye S, Liang T, Feng XH, Zhao B. Src inhibits the hippo tumor suppressor pathway through tyrosine phosphorylation of Lats1. *Cancer Res*. **2017**, 77, 4868–4880.
- 50 Furth N, Aylon Y. The LATS1 and LATS2 tumor suppressors: Beyond the hippo pathway. *Cell Death Differ*. **2017**, 24, 1488–1501.
- 51 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**, 124, 57–67.
- 52 Yabuta N, Mukai S, Okada N, Aylon Y, Nojima H. The tumor suppressor Lats2 is pivotal in Aurora A and Aurora B signaling during mitosis. *Cell Cycle*. **2011**, 10, 2724–2736.
- 53 Li J, Chen X, Ding X, Cheng Y, Zhao B, Lai ZC, AlHezaimi K, Hakem R, Guan KL, Wang CY. LATS2 suppresses oncogenic Wnt signaling by disrupting  $\beta$ -Catenin/BCL9 interaction. *Cell Rep*. **2013**, 5, 1650–1663.
- 54 Rusnak L, Tang C, Qi Q, Mo X, Fu H. Large tumor suppressor 2, LATS2, activates JNK in a kinase-independent mechanism through ASK1. *J Mol Cell Biol*. **2018**, 10, 549–558.
- 55 Xiao L, Chen Y, Ji M, Dong J. KIBRA regulates hippo signaling activity via interactions with large tumor suppressor kinases. *J Biol Chem*. **2011**, 286, 7788–7796.
- 56 Paramasivam M, Sarkeshik A, Yates JR, Fernandes MJG, McCollum D. Angiomotin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. *Mol Biol Cell*. **2011**, 22, 3725–3733.
- 57 Park GS, Oh H, Kim M, Kim T, Johnson RL, Irvine KD, Lim DS. An evolutionarily conserved negative feedback mechanism in the Hippo pathway reflects functional difference between LATS1 and LATS2. *Oncotarget*. **2016**, 7, 24063–24075.
- 58 Ad GD. 14-3-3 proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*. **2011**, 22, 681–687.
- 59 Nguyen TH, Kugler JM. Ubiquitin-dependent regulation of the mammalian hippo pathway: Therapeutic implications for cancer. *Cancers (Basel)*. **2018**, 10, 121.

- 60 Dehm S, Senger MA, Bonham K. SRC transcriptional activation in a subset of human colon cancer cell lines. *FEBS Lett.* **2001**, 487, 367–371.
- 61 Jiang X, Maruyama J, Iwasa H, Arimoto-Matsuzaki K, Nishina H, Hata Y. Heat shock induces the nuclear accumulation of YAP1 via SRC. *Exp Cell Res.* **2021**, 399, 112439.
- 62 Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, Ikenouchi J. A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016**, 113, 1863–1871.
- 63 Aoki K, Satoi S, Harada S, Uchida S, Iwasa Y, Ikenouchi J. Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb. *Mol Biol Cell.* **2020**, 31, 833–844.
- 64 Tournaviti S, Hannemann S, Terjung S, Kitzing TM, Stegmayer C, Ritzerfeld J, Walther P, Grosse R, Nickel W, Fackler OT. SH4-domain-induced plasma membrane dynamization promotes bleb-associated cell motility. *J Cell Sci.* **2007**, 120, 3820–3829.
- 65 Gadea G, De Toledo M, Anguille C, Roux P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol.* **2007**, 178, 23–30.
- 66 Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev.* **2006**, 20, 2687–2700.
- 67 Kunda P, Pelling AE, Liu T, Baum B. Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr Biol.* **2008**, 18, 91–101.
- 68 Robinson MS, Watts C, Zerial M. Membrane dynamics in endocytosis. *Cell.* **1996**, 84, 13–21.
- 69 Fackler OT, Grosse R. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol.* **2008**, 181, 879–884.
- 70 Paluch EK, Raz E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* **2013**, 25, 582–590.
- 71 McClatchey AI, Fehon RG. Merlin and the ERM proteins-regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. *Trends Cell Biol.* **2009**, 19, 198–206.
- 72 Yu T, Bachman J, Lai ZC. Mutation analysis of large tumor suppressor genes LATS1 and LATS2 supports a tumor suppressor role in human cancer. *Protein Cell.* **2014**, 6, 6–11.
- 73 Li Y, Zhou H, Li F, Chan SW, Lin Z, Wei Z, Yang Z, Guo F, Lim CJ, Xing W, Shen Y, Hong W, Long J, Zhang M. Angiotensin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Res.* **2015**, 25, 801–817.
- 74 Sabra H, Brunner M, Mandati V, Wehrle-Haller B, Lallemand D, Ribba AS, Chevalier G, Guardiola P, Block MR, Bouvard D.  $\beta$ 1 integrin-dependent Rac/group I PAK signaling mediates YAP activation of Yes-associated protein 1 (YAP1) via NF2/merlin. *J Biol Chem.* **2017**, 292, 19179–19197.
- 75 Sher I, Hanemann OC, Karplus AP, Bretscher A. The tumor suppressor Merlin controls growth in its open state, and phosphorylation converts it to a less-active more-closed state. *Dev Cell.* **2012**, 22, 703–705.

- 76 Spassov DS, Wong CH, Sergina N, Ahuja D, Fried M, Sheppard D, Moasser MM. Phosphorylation of trask by Src kinases inhibits integrin clustering and functions in exclusion with focal adhesion signaling. *Mol Cell Biol.* **2011**, 31, 766–782.
- 77 James MF, Manchanda N, Gonzalez-Agosti C, Hartwig JH, Ramesh V. The neurofibromatosis 2 protein product merlin selectively binds F-actin but not G-actin, and stabilizes the filaments through a lateral association. *Biochem J.* **2001**, 356, 377–386.
- 78 Lallemand D, Saint-Amaux AL, Giovannini M. Tumor-suppression functions of merlin are independent of its role as an organizer of the actin cytoskeleton in Schwann cells. *J Cell Sci.* **2009**, 122, 4141–4149.
- 79 Sun CX, Robb VA, Gutmann DH. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci.* **2002**, 115, 3991–4000.
- 80 Dai X, She P, Chi F, Feng Y, Liu H, Jin D, Zhao Y, Guo X. Phosphorylation of angiomin by Lats1/2 kinases inhibits F-actin binding, cell migration, and angiogenesis. *J Biol Chem.* **2013**, 288, 34041–34051.
- 81 Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science.* **2002**, 297, 565–569.
- 82 Stewenius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Gisselsson D. Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**, 102, 5541–5546.
- 83 Acilan C, Potter DM, Saunders WS. DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. *Genes Chromosom. Cancer.* **2007**, 46, 522–31.
- 84 Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* **2008**, 319, 1352–1355.
- 85 Wilhelm T, Said M, Naim V. DNA replication stress and chromosomal instability: dangerous liaisons. *Genes (Basel).* **2020**, 11, 1–35.
- 86 Murcia L, Clemente-Ruiz M, Pierre-Elies P, Royou A, Milán M. Selective killing of RAS-malignant tissues by exploiting oncogene-induced DNA damage. *Cell Rep.* **2019**, 28, 119–131.
- 87 Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.* **2004**, 23, 2797–2808.
- 88 Fukumoto Y, Morii M, Miura T, Kubota S, Ishibashi K, Honda T, Okamoto A, Yamaguchi N, Iwama A, Nakayama Y, Yamaguchi N. Src family kinases promote silencing of ATR-Chk1 signaling in termination of DNA damage checkpoint. *J Biol Chem.* **2014**, 289, 12313–12329.
- 89 Fukumoto Y, Kuki K, Morii M, Miura T, Honda T, Ishibashi K, Hasegawa H, Kubota S, Ide Y, Yamaguchi N, Nakayama Y, Yamaguchi N. Lyn tyrosine kinase promotes silencing of ATM-dependent checkpoint signaling during recovery from DNA double-strand breaks. *Biochem Biophys Res Commun.* **2014**, 452, 542–547.

- 90 Denko NC, Giaccia AJ, Stringer JR, Stambrook PJ. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1994**, 91, 5124–5128.
- 91 Tane S, Chibazakura T. Cyclin A overexpression induces chromosomal double-strand breaks in mammalian cells. *Cell Cycle*. **2009**, 8, 3900–3903.
- 92 Riley D, Carragher NO, Frame MC, Wyke JA. The mechanism of cell cycle regulation by v-Src. *Oncogene*. **2001**, 20, 5941–5950.
- 93 Kothapalli D, Grotendorst GR. CTGF modulates cell cycle progression in cAMP-arrested NRK fibroblasts. *J Cell Physiol*. **2000**, 182, 119–126.
- 94 Chu I, Sun J, Arnaout A, Kahn H, Hanna W, Narod S, Sun P, Tan CK, Hengst L, Slingerland J. p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of Cyclin E-Cdk2. *Cell*. **2007**, 128, 281–294.
- 95 Zhang WH, Poh A, Fanous AA, Eastman A. DNA damage-induced S phase arrest in human breast cancer depends on Chk1, but G2 arrest can occur independently of Chk1, Chk2 or MAPKAPK2. *Cell Cycle*. **2008**, 7, 1668–1677.
- 96 Honda T, Morii M, Nakayama Y, Suzuki K, Yamaguchi N, Yamaguchi N. v-Src-driven transformation is due to chromosome abnormalities but not Src-mediated growth signaling. *Sci Rep*. **2018**, 8, 1–14.
- 97 Zelensky AN, Sanchez H, Ristic D, Vidic I, Van Rossum-Fikkert SE, Essers J, Wyman C, Kanaar R. Caffeine suppresses homologous recombination through interference with RAD51-mediated joint molecule formation. *Nucleic Acids Res*. **2013**, 41, 6475–6489.
- 98 Choi EH, Yoon S, Park KS, Kim KP. The homologous recombination machinery orchestrates post-replication DNA repair during self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Sci Rep*. **2017**, 7, 1–13.
- 99 Hwang JW, Kim SN, Myung N, Song D, Han G, Bae GU, Bedford MT, Kim YK. PRMT5 promotes DNA repair through methylation of 53BP1 and is regulated by Src-mediated phosphorylation. *Commun Biol*. **2020**, 3, 1–13.
- 100 Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. **2001**, 276, 42462–42467.
- 101 Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*. **2001**, 276, 47759–47762.
- 102 Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. **2005**, 308, 551–554.
- 103 van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. The MRN complex: Coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep*. **2003**, 4, 844–849.
- 104 M Sebbagh, C Renvoizé, J Hamelin, N Riché, J Bertoglio JB. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*. **2001**, 3, 346–52.

- 105 Zhuang Z, Zhao X, Wu Y, Huang R, Zhu L, Zhang Y, Shi J. The anti-apoptotic effect of PI3K-akt signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Ann Clin Lab Sci.* **2011**, 41, 364–372.
- 106 Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* **2000**, 151, 483–494.
- 107 Lin MT, Chang CC, Chen ST, Chang HL, Su JL, Chau YP, Kuo ML. Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF- $\kappa$ B-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem.* **2004**, 279, 24015–24023.
- 108 Pawlak G, Helfman DM. MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway. *J Biol Chem.* **2002**, 277, 26927–26933.
- 109 Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* **2003**, 4, 711–719.
- 110 Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, Von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeoid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* **2003**, 160, 267–277.
- 111 Friedl P. Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* **2004**, 16, 14–23.
- 112 Böttcher RT, Sun Z, Fässler R. A forceful connection: mechanoregulation of oncogenic YAP. *EMBO J.* **2017**, 36, 2467–2469.
- 113 Guerrero Llobet S, van der Vegt B, Jongeneel E, Bense RD, Zwager MC, Schröder CP, Everts M, Fehrmann RSN, de Bock GH, van Vugt MATM. Cyclin E expression is associated with high levels of replication stress in triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* **2020**, 6, 1–13.
- 114 Maria H, Takahisa K, Youhei S, Nagano M, Adachi J, Tomonaga T, Yamaguchi N, Nakayama Y. The tyrosine kinase v-Src causes mitotic slippage by phosphorylating an inhibitory tyrosine residue of Cdk1. *J Biol Chem.* **2018**, 293, 15524–15537.
- 115 Ganem NJ, Cornils H, Chiu SY, O'Rourke KP, Arnaud J, Yimlamai D, Théry M, Camargo FD, Pellman D. Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. *Cell.* **2014**, 158, 833–848.

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に際し、研究の基礎から論文作成に至るまで終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 生化学分野 中山祐治 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査をして頂き、御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学 細胞生物学分野 藤室雅弘 教授ならびに統合薬科学系 高田和幸 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究の御指導、御助言を賜りました京都薬科大学 生化学分野 齊藤洋平 助教、幸龍三郎 助教に深甚なる謝意を表します。

本研究は、日本学術振興会特別研究員制度（DC1）の助成の下に行いました。

大学院生活を共に過ごし、切磋琢磨してきた生化学分野の卒業生の皆様並びに学部生の皆様に深く感謝の意を表すると共に、益々の御活躍を祈念いたします。

最後に、常に私を支え、見守り、研究に専念できる環境を築いて下さった、家族に心から感謝致します。



## 補足データ

ウェスタンブロット法により解析したメンブレンと、切り抜いたバンド箇所（赤枠）を以下に示す。

図 1-1 A

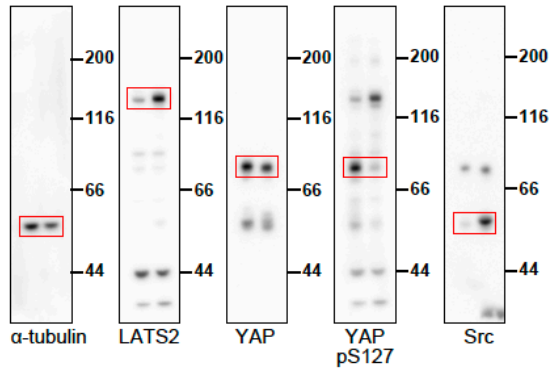


図 1-1 B

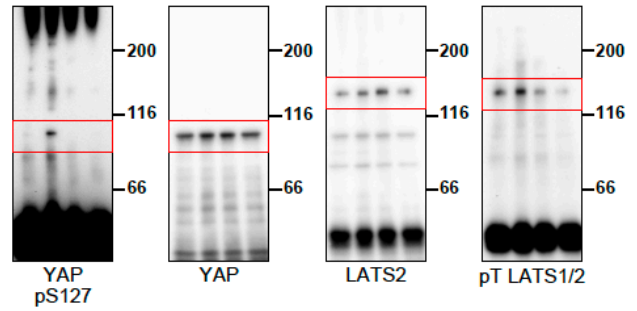


図 1-2 A

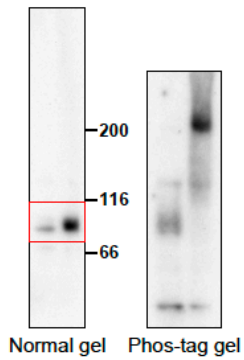


図 1-2 B

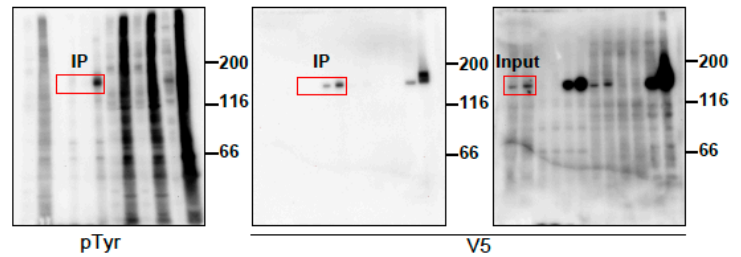


図 1-2 C

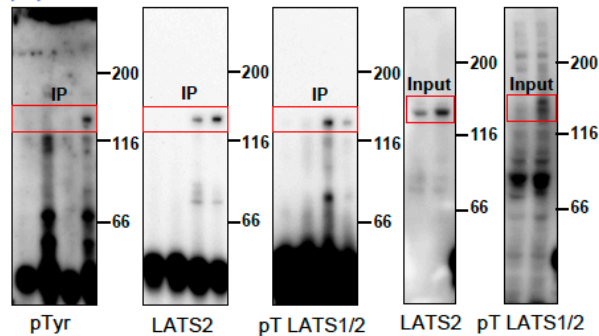
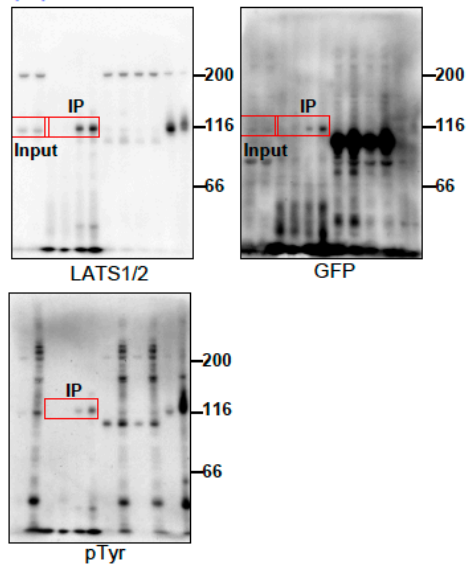
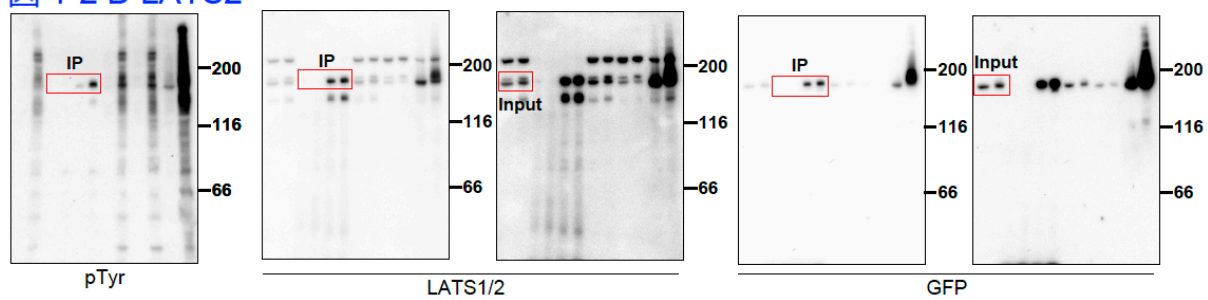


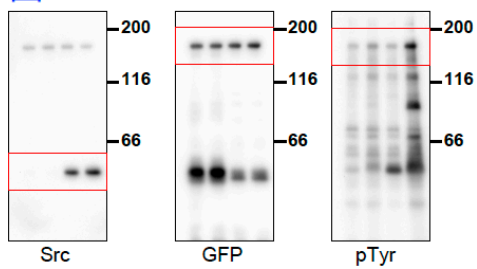
図 1-2 D LATS1



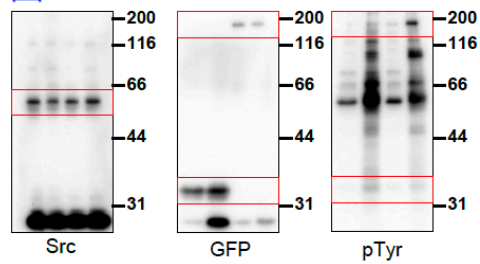
### ☒ 1-2 D LATS2



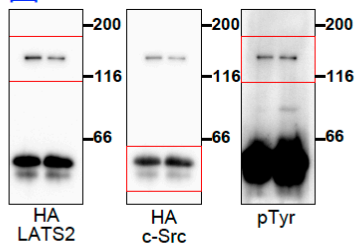
### ☒ 1-3 A



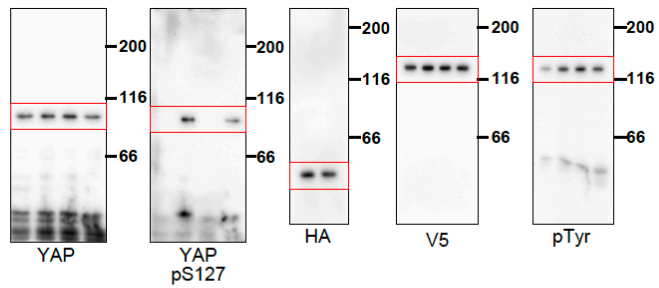
### ☒ 1-3 B



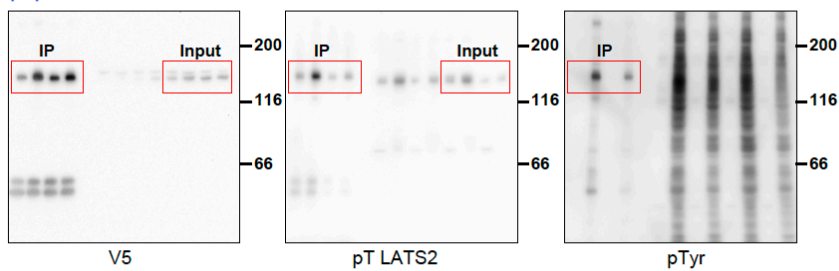
### ☒ 1-4



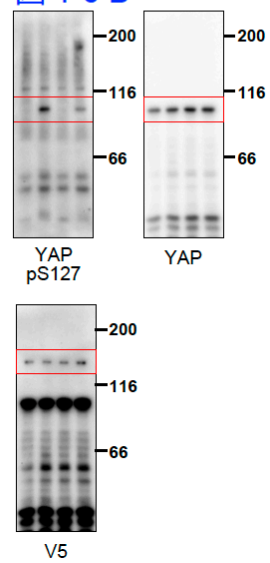
### ☒ 1-5



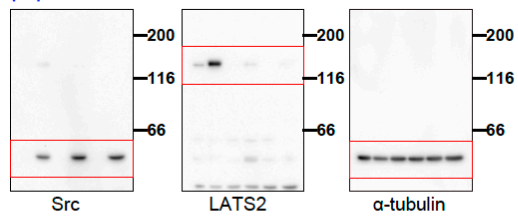
### ☒ 1-6 A



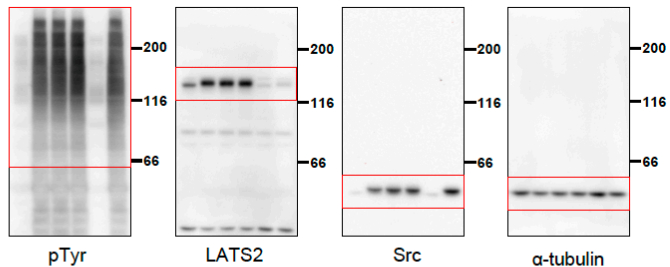
### ☒ 1-6 B



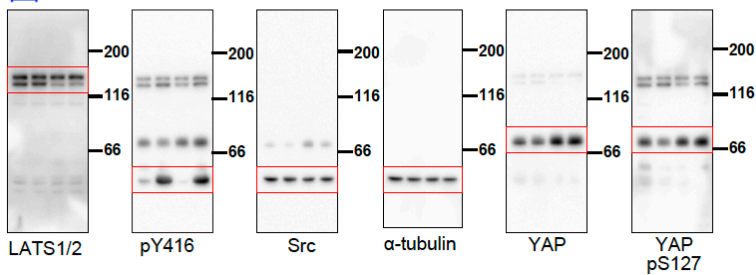
☒ 1-7 C



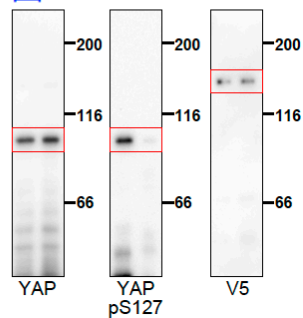
☒ 1-8



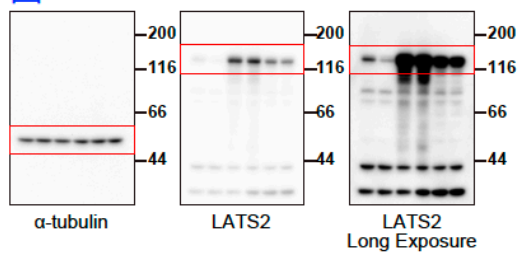
☒ 1-9 A



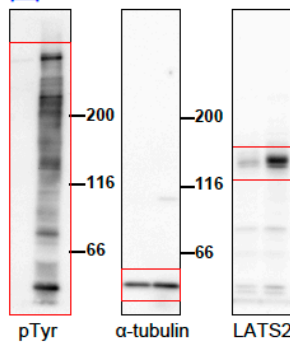
☒ 1-10 B



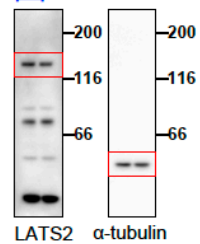
☒ 1-12 B



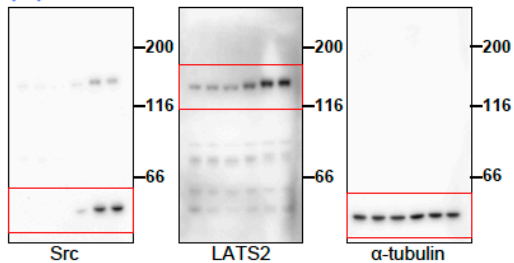
☒ 1-13 A



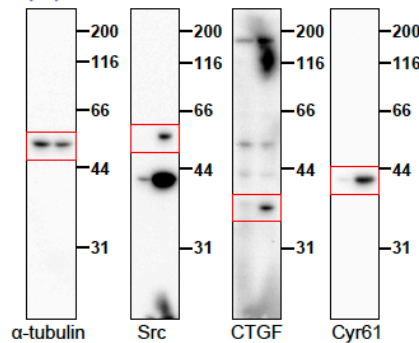
☒ 1-13 D



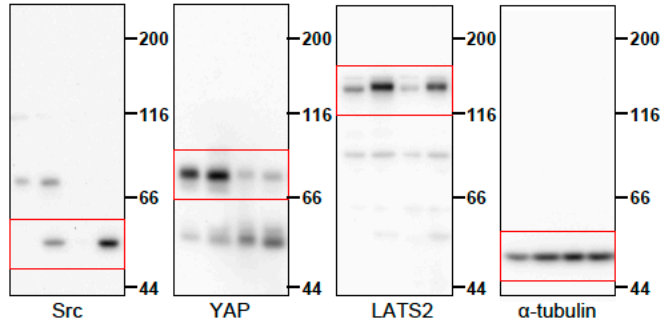
☒ 1-13 B



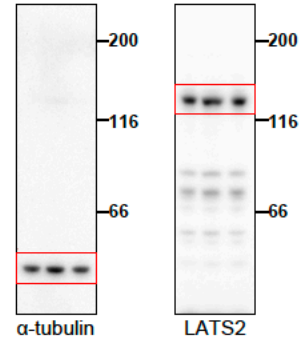
☒ 1-14 A



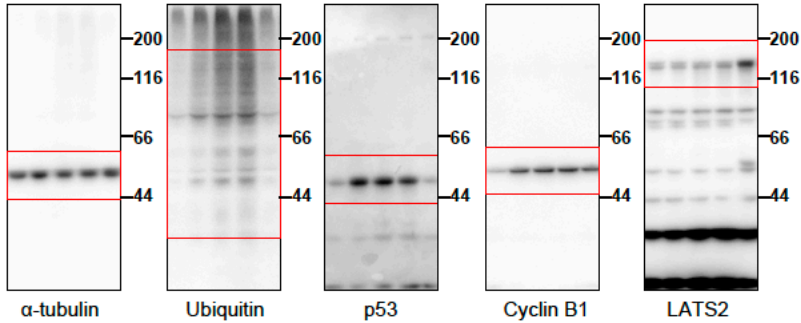
☒ 1-14 B



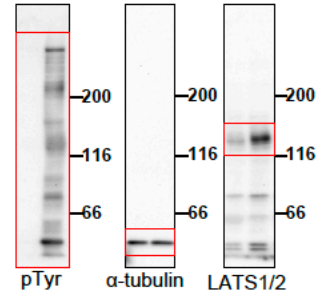
☒ 1-15 B



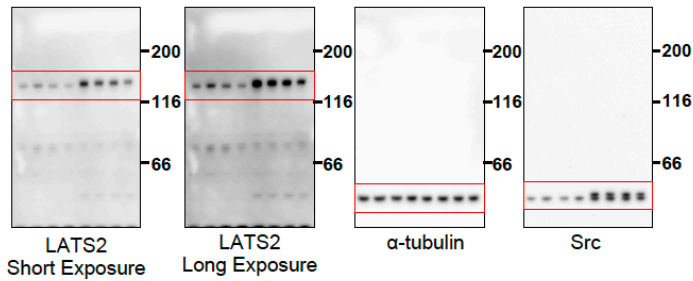
☒ 1-15 A



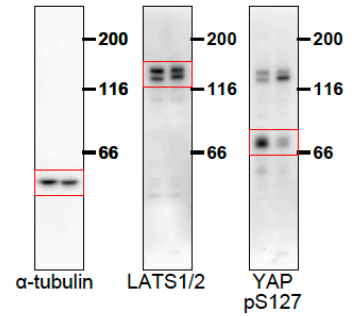
☒ 1-17 A



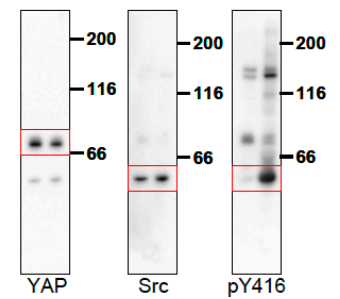
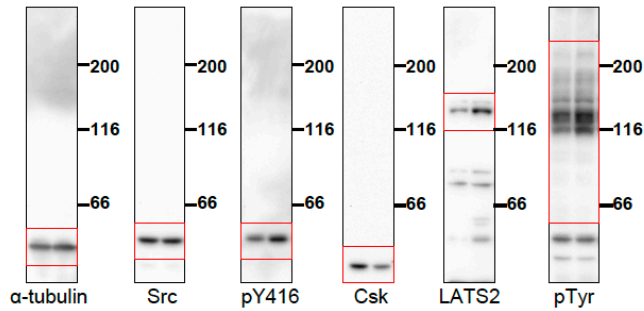
☒ 1-16



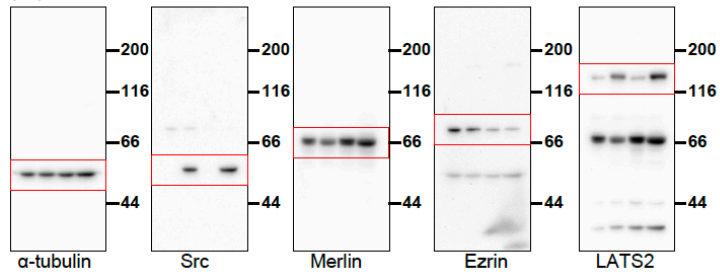
☒ 1-17 B



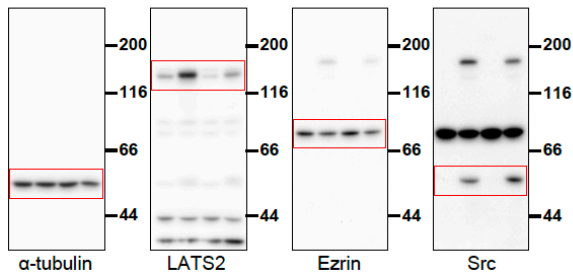
☒ 1-17 C



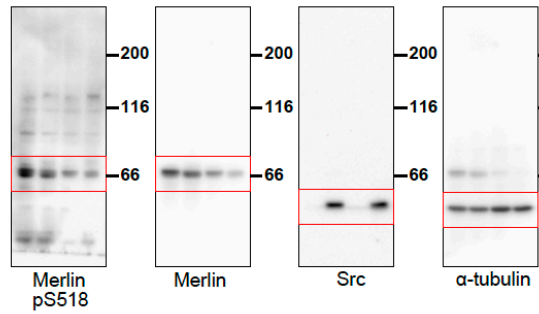
☒ 2-1 C



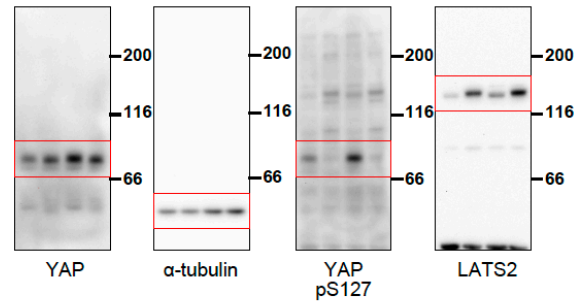
☒ 2-1 D



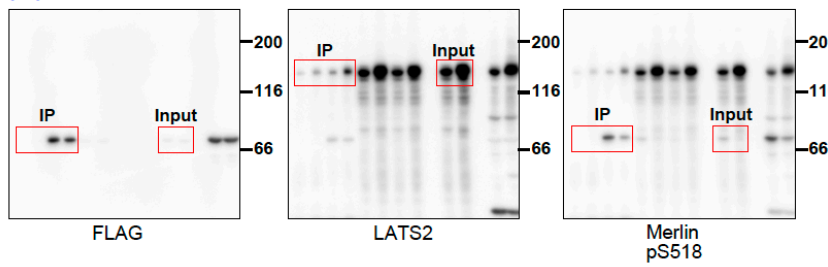
☒ 2-2 C 左



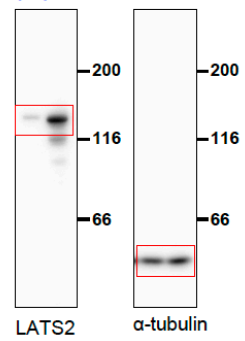
☒ 2-2 C 右



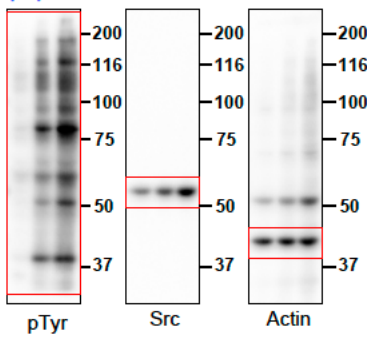
☒ 2-6



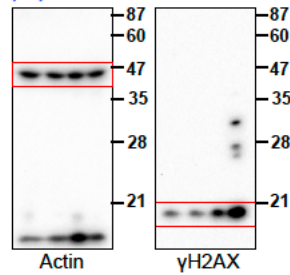
☒ 2-7



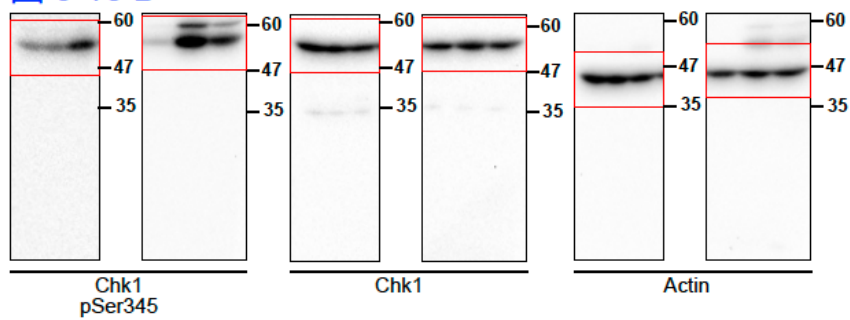
☒ 3-4 B



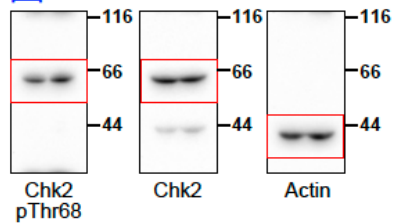
☒ 3-8



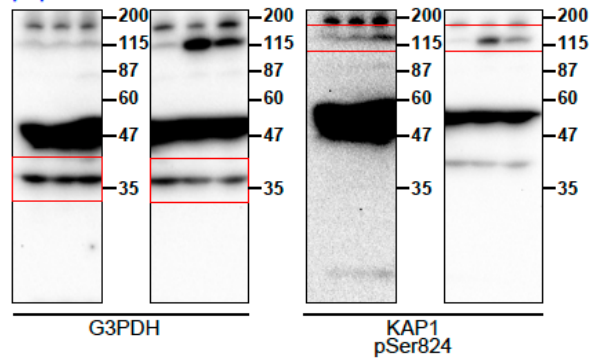
☒ 3-10 B



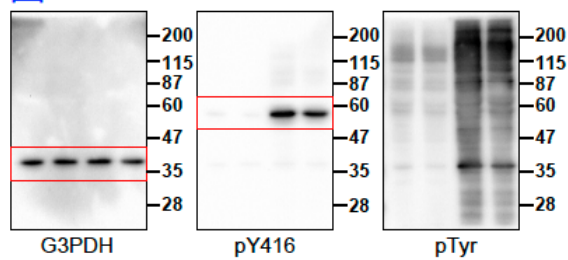
☒ 3-10 C



☒ 3-10 D



☒ 3-11



☒ 3-12

