

学 位 論 文 題 名

Reconstructed β -Catenin/TCF4 Signaling in Yeast Applicable to Functional Evaluation of APC Mutations

(酵母内 β -Catenin/TCF4 転写経路の再構築による
APC 遺伝子変異解析法の開発)

学位論文内容の要旨

背景と目的

癌抑制遺伝子 APC は家族性大腸腺腫症 FAP の原因遺伝子として同定され、後に非遺伝性の大腸癌をはじめとする様々な悪性腫瘍にも認められている。近年、APC 蛋白は β -catenin、GSK3- β 及び Axin と複合体を形成して癌遺伝子 β -catenin の分解を担う重要な役割が明らかとなってきた。APC 遺伝子の機能不全によりこの分解機構が破綻すると、細胞内に蓄積した β カテニンが転写因子 TCF4 と結合して核に移行する。その結果、c-myc や cyclin D1 を初めとする様々な増殖関連分子の転写を促進して癌が進展していくと考えられている。このことから APC 遺伝子変異の同定は、FAP の診断だけでなく癌の生物学的特性の解明に重要な意義があると考えられる。APC 遺伝子診断法として SSCP 法や APC Yeast Color Assay 法があるが、変異 APC 蛋白の機能的評価は出来なかった。そこで著者は、この問題点を解決するために酵母内にヒト β カテニンと TCF4 が関与する転写機構を再構成した APC の機能的診断法を考案し、有用性と実用性および問題点を検討した。

方法・結果

1. 酵母内での β -catenin, TCF4 発現・転写活性系の再構成

β -catenin/TCF4 複合体がレポーター遺伝子の転写に必要な DNA 結合配列 CTTTGAAC を上流活性配列に持つ ADE2 レポーターを導入した酵母株 yTOP-ADE に β -catenin あるいは TCF4 を単独で発現させた。 β -catenin あるいは TCF4 単独発現では β -catenin/TCF4 複合体反応性の ADE2 レポーターは転写されず赤色コロニーを示したが、 β -catenin、TCF4 両者を同時に発現させると酵母は β -catenin/TCF4 複合体反応性の ADE2 レポーター活性化を示す白色コロニーを形成した。この結果 β -catenin/TCF4 は酵母内においても生体内同様複合体を形成し転写活性を持つことが確認された。

2. β -catenin, TCF4 と APC の共発現

正常型 APC を β -catenin、TCF4 と共に導入すると酵母は β -catenin/TCF4 複合体反応性の ADE2 レポーター活性を示さず赤色コロニーを形成した。 β -catenin/TCF4 複合体による転写活性を定量的に評価するために酵母内で二重ルシフェラーゼ測定法を行った。酵母株は蛍光ルシフェラーゼを発現

する β -catenin/TCF4 複合体反応性のレポータープラスミドを酵母染色体に導入した yTOP-LUC を使用。内部補正に海椎茸ルシフェラーゼを用いた。海椎茸ルシフェラーゼのみの空ベクター導入時の相対的ルシフェラーゼ活性は平均 0.335 であった。正常型 APC を β -catenin、TCF4 と共発現したときの相対的ルシフェラーゼ活性（平均 4.763）は β -catenin、TCF4 のみの発現時の相対的ルシフェラーゼ活性（平均 10.897）より低値であり、正常型 APC は β -catenin/TCF4 複合体の転写活性を強く抑制した。ルシフェラーゼの測定結果は酵母色の白から赤色への変化を正確に反映しており、このアッセイは酵母コロニーの色彩によって転写活性を簡便に評価可能である。

3. APC の機能的診断への応用

4 種類の Colo320DM, HT29, SW480, DLD1 細胞株由来の欠失型変異 APC の導入では ADE2 レポーター活性を示す白色の酵母コロニーを形成した。次に、大腸癌の変異体(1114X, 1545X, 1554A insert)の導入では ADE2 レポーター活性を示す白色を示した。登録されている 5 種類の APC missense mutation (R414C, G1120E, I1307K, E1317Q, S1395C)ではいずれも ADE2 レポーター転写活性が抑制されていることを示す赤色の酵母コロニーを形成した。これらの結果より、APC 変異の 90% を占める欠失型 APC 変異体では β -catenin/TCF4 複合体の転写活性を抑制する機能は失われているが、ミスセンス型変異は正常型 APC と同様に、 β -catenin/TCF4 複合体の転写活性を抑制する機能を保持していた。

考察

多くの蛋白は複雑なネットワークを形成しており、蛋白の機能的変化は蛋白間の相互作用に様々な影響を及ぼす。遺伝子変異の検索も単なる塩基配列の異常を検索するのではなく、変異蛋白が引き起こす事象の解析が必要である。本アッセイ法の特長は酵母内において複数分子からなるヒト分子システムを再構築し遺伝子変異検索に応用する新しい研究手法である。また酵母の特長である高い相同組み換え能を利用して目的遺伝子を鋳型とした PCR 断片と gap vector の導入により簡単に変異蛋白発現が得られ迅速に遺伝子の機能的変異診断が可能である。

本アッセイ法では転写活性化ドメインを持つ β -catenin と DNA 結合ドメインを持つ TCF4 が複合体を形成し、レポーター遺伝子を転写しており蛋白本来の働きを再現している。さらに、APC の共発現によって転写活性が抑制される現象が認められ、酵母内においても、ヒト蛋白の細胞内動態を再現でき、蛋白機能解析に有用である。大腸癌細胞株および大腸癌検体より得られた欠失型変異 APC は β -catenin/TCF4 複合体の転写抑制機能を喪失しており癌化との関連が示唆された。しかし、これまでに報告されている 5 種類のミスセンス変異 APC では、いずれも β -catenin/TCF4 複合体の転写を抑制する機能は正常型 APC と同程度に保持されていた。この結果からミスセンス変異 APC は β -catenin への転写抑制機能は喪失しておらず、 β -catenin 制御に関する別の機序で癌化に関わっているものと推測できる。あるいはこれらのミスセンス変異は転写抑制に影響していない可能性も考えられる。これらの機能診断は今までの診断法では不可能であり、ヒト細胞を用いた APC 蛋白発現による解析も非常に手間のかかるものであった。この系であれば酵母色の変化を見ることにより簡便に機能評価可能である。

本アッセイ法は今後、1) APC の機能的変異診断、2) β -catenin/TCF4 の転写標的遺伝子のスク

リーニング、3) β -catenin/TCF4 転写の抑制あるいは促進に関する新規蛋白のスクリーニング、4) β -catenin、TCF4、APC 蛋白の homolog の比較などに応用が可能である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Reconstructed β -Catenin/TCF4 Signaling in Yeast Applicable to Functional Evaluation of APC Mutations

(酵母内 β -Catenin/TCF4 転写経路の再構築による
APC 遺伝子変異解析法の開発)

近年、癌抑制遺伝子 APC は β -catenin、GSK3- β 及び Axin と複合体を形成して癌遺伝子 β -catenin の分解を担う重要な役割が明らかとなってきた。APC 遺伝子変異の同定は、FAP の診断だけでなく癌の生物学的特性の解明に重要な意義があると考えられる。そこで酵母内にヒト β カテニンと TCF4 が関与する転写機構を再構成した APC の機能的診断法を考案し、有用性と実用性および問題点を検討した。

β -catenin/TCF4 複合体がレポーター遺伝子の転写に必要な DNA 結合配列 CTTTGAAC を上流活性配列に持つ ADE2 レポーターを導入した酵母株 yTOP-ADE に β -catenin あるいは TCF4 を単独で発現させた。 β -catenin あるいは TCF4 単独発現では β -catenin/TCF4 複合体反応性の ADE2 レポーターは転写されず赤色コロニーを示したが、 β -catenin、TCF4 両者を同時に発現させると酵母は β -catenin/TCF4 複合体反応性の ADE2 レポーター活性化を示す白色コロニーを形成した。この結果 β -catenin/TCF4 は酵母内においても生体内同様複合体を形成し転写活性を持つことが確認された。

正常型 APC を β -catenin、TCF4 と共に導入すると酵母は β -catenin/TCF4 複合体反応性の ADE2 レポーター活性を示さず赤色コロニーを形成した。 β -catenin/TCF4 複合体による転写活性を定量的に評価するために酵母内で二重ルシフェラーゼ測定法を行った。空ベクター導入時の相対的ルシフェラーゼ活性は平均 0.335 であった。正常型 APC を β -catenin、TCF4 と共発現したときの相対的ルシフェラーゼ活性 (平均 4.763) は β -catenin、TCF4 のみの発現時の相対的ルシフェラーゼ活性 (平均 10.897) より低値であり、正常型 APC は β -catenin/TCF4 複合体の転写活性を強く抑制した。ルシフェラーゼの測定結果は酵母色の白から赤色への変化を正確に反映しており、このアッセイは酵母コロニーの色彩によって転写活性を簡便に評価可能である。

4 種類の細胞株由来の欠失型変異 APC の導入では ADE2 レポーター活性

を示す白色の酵母コロニーを形成した。次に、大腸癌の変異体の導入では ADE2 レポーター活性を示す白色を示した。5 種類の APC missense mutation ではいずれも ADE2 レポーター転写活性が抑制されていることを示す赤色の酵母コロニーを形成した。これらの結果より、APC 変異の 90%を占める欠失型 APC 変異体では β -catenin/TCF4 複合体の転写活性を抑制する機能は失われているが、ミスセンス型変異は正常型 APC と同様に、 β -catenin/TCF4 複合体の転写活性を抑制する機能を保持していることが証明された。

本アッセイ法の特長は酵母内において複数分子からなるヒト分子システムを再構築し遺伝子変異検索に応用する新しい研究手法である。また酵母の特長である高い相同組み換え能を利用して目的遺伝子を鋳型とした PCR 断片と gap vector の導入により簡単に変異蛋白発現が得られ迅速に遺伝子の機能的変異診断が可能である。大腸癌細胞株および大腸癌検体より得られた欠失型変異 APC は β -catenin/TCF4 複合体の転写抑制機能を喪失しており癌化との関連が示唆された。しかし、これまでに報告されている 5 種類のミスセンス変異 APC では、いずれも β -catenin/TCF4 複合体の転写を抑制する機能は正常型 APC と同程度に保持されていた。これらの機能診断は今までの診断法では不可能であり、この系であれば酵母色の変化を見ることにより簡便に機能評価可能である。

口頭発表において、加藤紘之教授より酵母内 β -catenin/TCF4/APC 蛋白相互作用の再構成による APC 機能の評価方法に関する考察、大腸癌以外の悪性腫瘍での臨床応用の可能性について質問があった。つづいて吉木敬教授より APC における変異部位によるアッセイ上の変化について、APC のミスセンス型変異における臨床的意義、本アッセイの今後の発展性・汎用性・臨床材料への応用について質問があった。また守内哲也教授より APC 以外の抑制因子 (AXIN1, GSK3- β) が本アッセイにおいて抑制機能を示さない事象に関する質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

この論文は、酵母内にヒト β カテニンと TCF4 が関与する転写機構を再構成した APC の機能的診断法を新しく開発したことで高く評価される。今後の具体的な臨床応用に向けての発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。