

Title	Identification of a brain-specific APC homologue, APCL, and its interaction with β -catenin
Author(s)	中川, 英刀
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41730
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	中川英乃
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15308号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Identificaton of a brain-specific APC homologue, APCL, and its interaction with β -catenin. (脳特異的に発現する癌抑制遺伝子 APC の新規ホモログの同定と β カテニンとの関係)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 高井 義美 教授 吉峰 俊樹

論文内容の要旨

【目的】

癌抑制遺伝子 APC は家族性腺腫性ポリポージスの原因遺伝子として単離され、その異常は大腸癌発生の主要な原因となる。最近では Wnt/Wingless 信号伝達経路の一員として、 β カテニンの制御に関与している事が明らかになってきた。われわれは19染色体短腕のゲノムシークエンス中に偶然、この APC に酷似する新規遺伝子 APCL (APC-like) を同定した。本研究では、その構造および機能解析を行うことにより、APC ファミリーの機能を明らかにすることを目的とする。

【方法ならびに成績】

1) APCL の構造：19染色体短腕に位置する新規 APC ホモログ APCL は、2303アミノ酸から成る巨大蛋白をコードし、その N 末端側は APC と非常に高い相同性を有している。APC 蛋白の N 末端の coiled-coil domain は45%が APCL で保存されており、APC 同様、2量体を形成すると考えられる。Armadillo domain も76%が APCL で保存されており、APC と結合する蛋白質と結合できるものと考えられる。また、APC が β カテニンと結合するのに不可欠な7つの20アミノ酸モチーフの繰り返しは、APCL では5つの繰り返しとして存在し、APC と同様 β カテニンと結合する能力があるものと予測される。しかし、 β カテニンとの結合に関与する3つの15アミノ酸の繰り返し配列は APCL には存在せず、C 末端側は13%の相同性しか認めない。

APCL の遺伝子構造は、小さな13個のエクソンと巨大な最終エクソンから成り立っている。5' 末端には多くのスプライシングの変化があり、遺伝子構造的にも APC と酷似している。

2) APCL の発現様式：ノーザンブロット解析では、APC が多くの臓器で発現しているのに対して APCL は中枢神経系特異的に高発現していた。APC は中枢神経系の発達との関連性が報告されており、中枢神経系特異的に発現する APCL も中枢神経系の発達に重要な役割を果たしていると考えられる。

3) APCL の β カテニンとの結合および β カテニンの負の制御：APCL の5つの20アミノ酸モチーフの繰り返し部分を含む領域(コドン627-1666)を [³⁵S] Met の存在下に *in vitro* 翻訳し、そのペプチドが GST または GST- β カテニン融合蛋白と共沈するか否かを調べた。結果、APCL の5つの20アミノ酸モチーフの繰り返し配列は GST- β カテニンのみと共沈し、*in vitro* での結合が証明された。

正常な APC を欠く大腸癌細胞株 SW480 において、正常 APC の発現はその細胞質内に蓄積している β カテニンの

レベルを低下させることが証明されている。SW480細胞に APCL を一時的に強制発現させ細胞質内の β カテニンが変化する否かを蛍光免疫染色法により検討した。その結果、APCと同様、APCLが強制発現している SW480細胞では β カテニンレベルが著しく低下し、APCLは β カテニンを負に制御する能力を有することが *in vivo* にて証明された。

4) APCLの β カテニン-Tcf 系への影響: Tcf ファミリーの1つ hTcf-4 は β カテニンと結合して核に移行し、転写因子として作用する。正常 APC 蛋白は細胞質中の β カテニンを負に制御することにより、この hTcf-4 の転写因子としての活性を抑制し、その下流遺伝子の発現を抑え、癌抑制遺伝子としての役割を果たしていると考えられている。

APCLにも同様の Tcf 系の抑制機能が有るか否かを検討するため、Tcf reporter gene assay を施行した。SW480 細胞に APCL 発現 plasmid、APC 発現 plasmid、vector control と reporter plasmid pTOPFLUSH を co-transfection し、24時間後に luciferase 活性を測定した。internal control として pRL-TK を co-transfection しその活性を測定した。その結果、APC よりはその抑制効果は弱いものの、APCLにより luciferase 活性は低下し、APCLの β カテニン-Tcf 系への負の効果が発現された。

【総括】

今回同定した新規 APC ホモログ APCL は、癌抑制遺伝子 APC と構造的にも機能的にも酷似し、APC と同様 β カテニンと結合し負に制御する機能を有していることが証明された。癌抑制遺伝子 APC および APCL はファミリーとして β カテニンの制御および Wnt/Wingless 信号伝達経路にかかわり、癌の発生や神経系の発達に関連しているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

この論文は、癌抑制遺伝子 APC の新規ホモログ APCL (APC-like) を19染色体短腕より単離同定し、その特徴を明らかにしたものである。

癌抑制遺伝子 APC は家族性腺腫症の原因遺伝子として単離され、その異常は大腸癌発生の主要な原因となる。最近では Wnt/Wingless 信号伝達経路の一員として、 β カテニンの制御に関与している事が明らかになってきている。APC が多くの臓器で発現しているのに対して、新規遺伝子 APCL は中枢神経系特異的に高発現していた。APCL は 2303 アミノ酸から成る巨大蛋白をコードし、N 末端側は APC と非常に高い相同性を有しているが、C 末端側は13% の相同性しか認めていない。

そして、APC が β カテニンと結合するのに不可欠な7つの20アミノ酸モチーフの繰り返しは、APCL では5つの繰り返しとして存在している。*in vitro* の系にて APCL はこの領域を介して、 β カテニンと直接結合することができるとを証明した。また、正常 APC を欠く大腸癌細胞株 SW480において、APC と同様、APCL 強制発現により細胞質内の β カテニンのレベルが著明に下がることを証明した。さらに、Wnt/Wingless 信号伝達経路のエフェクターである Tcf- β カテニンの転写活性機能をも抑制することを reporter gene assay にて証明した。

このように、新規遺伝子 APCL は構造的にも機能的にも APC と酷似しておりファミリーとして β カテニンの制御および Wnt/Wingless 信号伝達経路にかかわり、癌の発生や神経系の発達に関連しているものと考えられる。

癌抑制遺伝子 APC のファミリーの報告はこれまでになく、この業績は非常に originality 富むものであり、学位の授与に値するものと考えられる。