

Title	The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase
Author(s)	白, 京勲
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41734">https://hdl.handle.net/11094/41734</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	白 京 勲
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 9 4 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 9 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系学研究所 生理系専攻
学 位 論 文 名	The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> to S phase (癌抑制遺伝子 APC 産物による細胞周期制御)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 仲 野 徹 (副査) 教 授 野 島 博 教 授 岡 部 勝

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 『目的』

APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子は1991年に家族性腺腫性ポリポーシス (familial adenomatous polyposis : FAP) の原因遺伝子として第 5 染色体の長腕から単離された。APC は通常の大腸癌の発生にも関与し、この遺伝子の異常が大腸腺腫を引き起こすと考えられている。しかし、APC 遺伝子の異常がどのようなメカニズムで腺腫を引き起こすかはまだ不明である。

そこで本研究では、APC の異常による大腸癌発症の分子機構を明らかにすることを目的として、細胞周期制御における APC の役割を解析した。

### 『方法ならびに成績』

細胞周期調節における APC タンパクの機能を調べるためにテトラサイクリンで APC の発現を調節できるベクター系を構築した。この発現ベクターを繊維芽細胞 NIH3T3 にトランスフェクションしてその抽出物を APC の C-末端を認識する抗体で免疫沈降すると 300 kDa の APC タンパクが検出されたが、テトラサイクリン存在下では APC タンパクの発現が見られなかった。

1) APC の細胞周期抑制能：この発現ベクターを用いて腎臓繊維芽細胞株 CV-1 で Colony Formation Assay を行った。正常な APC を発現させるとコントロールに比べて colony の形成が 10 倍近く押さえられた。一方、大腸癌の細胞株で見ついている APC の Mutant では colony 形成抑制効果が低下していた。次に APC の細胞周期における作用点を検討した。Serum-starved NIH3T3 細胞に APC の cDNA を Microinjection 法で導入し、血清を加えて細胞周期を進行させた後 BrdU の取込みを測定した。APC を発現している細胞は  $\beta$ -galactosidase を発現している細胞に比べて BrdU の取込みが有意に低いことから APC は G<sub>1</sub> 期から S 期への移行を阻止していることが考えられた。一方、C 末端を欠損した Mutant は正常の APC に比べて弱い抑制効果を示したが、N 末端を欠損している Mutant はほとんど効果がなかった。また、正常の APC をこれらの Mutants と co-injection するとその効果が低下することから C 末端を欠損した Mutants は正常な APC の細胞周期抑制活性を阻害すると推測された。次に APC の細胞周期抑制における

作用点をさらに明確にするために G<sub>0</sub> 期に同調させた NIH3T3 細胞に血清を加えた後、経時的に APC を発現させて BrdU の取込みを調べた。血清添加後 8 時間までは APC を発現させると S 期への移行が阻害されたが、10 時間以後はほとんどその効果が見られなかった。これらのことから APC の細胞周期抑制能は G<sub>1</sub> 期中期から後期にかけて作用すると考えられた。

2) APC と Cyclin/CDK : APC の細胞周期制御機構をさらに明らかにするために細胞周期調節に関わる重要ないくつかの分子を co-injection して APC の抑制効果に対する影響を調べた。癌抑制遺伝子 pRB あるいは p53 の細胞周期抑制能を阻害する分子である SV40largeT 抗原と HPV の E6/E7 は APC の抑制能に影響を及ぼさなかった。また、活性型 raf や v-src も APC の活性には影響しなかった。しかし、cyclinD/CDK4 あるいは cyclinE/CDK2 の複合体を APC と co-injection すると APC の細胞周期抑制能が阻害された。CyclinD あるいは cyclinE 単独では部分的に APC の機能を阻害したが、CDK4 あるいは CDK2 単独ではその効果が見られなかった。次に cyclin/CDK 複合体が APC の下流であるかどうかを検討するために APC を過剰発現した時の cyclin/CDK キナーゼ活性の変化を調べた。一過性に APC を発現する細胞を獲得する目的で細胞表面蛋白である decay accelerating factor (DAF) を APC と co-transfection し、flow cytometry で DAF 陽性細胞を分離した。これらの細胞から CDK2 および CDK4 をそれぞれ免疫沈降した後それらの基質であるヒストン H1 や pRB 蛋白を用いてキナーゼ活性を調べた。APC を発現している細胞ではコントロールに比べて CDK2 のキナーゼ活性の低下が認められたが、CDK4 のキナーゼ活性には影響がなかった。その時 CDK2 および CDK4 の蛋白量には変化が認められなかった。

【総括】

癌抑制遺伝子 APC は cyclin-CDK 複合体のキナーゼ活性を負に制御することによって G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> から S 期への細胞周期進行を押さえる可能性が推測された。

## 論文審査の結果の要旨

APC 遺伝子は家族性腺腫性ポリポーシス (FAP) の原因遺伝子として通常の大腸癌の発生にも関与し、この遺伝子の異常が大腸腺腫を引き起こすと考えられている。しかし、APC 遺伝子の異常がどのようなメカニズムで腺腫を引き起こすかはまだ不明な点が多い。

本論文では、APC の異常が大腸癌発症に関与することに着目し、細胞周期制御における APC の役割を解析した。その結果、APC は細胞周期の G<sub>1</sub> 中期から後期にかけて cyclin-CDK 複合体のキナーゼ活性を負に制御することで細胞周期進行を抑制し、細胞の増殖を押さえることが明らかになった。

以上のことから、いまだ不明な点が多い大腸癌発症の分子機構の解明に重要な情報を提供することが期待され、学位に値するものと認める。