The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification and Characterization of E-APC, a Novel Drosophila homologue of the Tumor Suppressor APC
Author(s)	村田, 陽二
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41735
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	村田陽二（むらたようじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15245　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 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Identification and Characterization of E-APC, a Novel *Drosophila* homologue of the Tumor Suppressor APC （ヒト癌抑制遺伝子 *APC* の新規 *Drosophila* ホモログ *E-APC* の同定と機能解析）
論文審査委員	（主査） 教授　仲野　徹 （副査） 教授　野島　博　　教授　審良　静男

論文内容の要旨

【目的】

Wnt／Wingless シグナル伝達系は個体発生、形態形成、細胞増殖に深く関わると同時に癌の発症においても重要な役割を果たしていることが示されている。このシグナル伝達系に関与する遺伝子産物として Axin、β－catenin、APC、TCF／LEF 転写因子などが同定されており、Axin は β－catenin との相互作用を通じこのシグナル伝達系を負に調節することが明らかとなっている。そこで、このシグナル伝達系の分子メカニズムをさらに明らかにする目的で Axin に結合するタンパク質を Yeast two-hybrid 法を用いて検索し、その機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

Wnt／Wingless シグナル伝達系は *Drosophila* と哺乳類の間で非常に類似している。そこで遺伝学的解析が容易である *Drosophila* の Axin（D-Axin）を用いて解析を行うこととした。

D-Axin／Axin はGタンパク質などと相互作用し、Gタンパク質や他のシグナル伝達系において重要な役割を果たしていることが示唆されている RGS（regulator of G-protein signaling）領域を持つ。この領域を欠損した D-Axin は Wnt／Wingless シグナル伝達系を負に調節する活性を消失していることが見出されている。そこで、D-Axin の RGS 領域を bait とし、この領域に結合するタンパク質を Yeast two-hybrid 法を用いて *Drosophila* Embryo の cDNA ライブラリーから検索した。7 x10^6 クローンのスクリーニングの結果、ヒト大腸癌原因遺伝子である APC に非常に類似したアミノ酸1次構造をもつ新規 *Drosophila* APC（*E－APC* と命名）の cDNA 断片を得た。*E－APC* は1067アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、アミノ酸1次構造からAPC タンパク質ファミリーに見られる Armadillo repeats, Armadillo／β－catenin 結合部位である15、20アミノ酸リピート構造及び D-Axin／Axin との結合部位である Axin 結合領域を持つことが明らかとなった。また、すでに同定されている *Drosophila* APC（*D－APC*）とは全体で46％の相同性を有していた。*in vitro* の結合実験の結果、E－APC は Armadillo／β－catenin 及び D-Axin と直接結合することが明らかとなった。さらに、大腸癌由来 SW480 細胞に E－APC を過剰発現すると細胞内の β－catenin の分解が誘導されること、及び β－catenin と複合体を形成し転写活性化を起こす転写因子 TCF／LEF の転写活性を抑制することが明らかとなった。*Drosophila* の発生段階における *E－APC* の発現をノーザンブロット法により検討したところ、すべての発生段階において *E－APC* の発現が認められた。さらに *in situ* hybridization 法を用いた実験から *E－APC* は Embryo の初期の発生段階から発現しており、成虫原基である wing、

leg、eye-antellal においても発現していることが明らかとなった。

【総括】

Yeast two-hybrid 法を用い D-Axin の RGS 領域に結合する蛋白質を検索した結果、ヒト大腸癌原因遺伝子 *APC* に非常に類似したアミノ酸一次構造をもつ新規 *Drosophila APC* 遺伝子 *E−APC* を同定した。この E−APC は Armadillo／β−catenin、D-Axin と直接結合すると共に、β−catenin の分解を誘導し、転写因子 TCF／LEF の転写活性を抑制する活性を持つことが明らかとなった。以上の実験結果から、E−APC はアミノ酸一次構造のみならず機能的側面においても APC と同様の機能を有し、*APC* 遺伝子ファミリーの一つであることが強く示唆された。さらに、*Drosophila* のすべての発生段階においてその発現が認められ、成虫原基においてユビキタスに発現する遺伝子であることが明らかとなったこと、すでに同定されている *Drosophila APC* 遺伝子の一つである *D-APC* は、中枢神経特異的な発現を示すことから、この *E−APC* は *D-APC* と異なり中枢神経のみならず様々な領域における Wnt／Wingless シグナル伝達系の負の調節因子として機能している可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

Drosophila の Wingless シグナル伝達系に相当する哺乳類の Wnt シグナル伝達系は、個体発生、形態形成、細胞増殖に深く関わっている。近年、このシグナル伝達系が癌の発症に重要な役割を果たしており、家族性大腸癌の原因遺伝子である *APC*（Adenomatous polyposis coil tumor suppressor gene）がこのシグナル伝達系を負に制御する因子であるということが示されている。しかし、Wnt シグナル伝達系での APC の生理機能、さらには Wnt シグナル伝達系以外でのその生理機能については十分に明らかではない。そこで、ヒト APC の生理機能を明らかとする上で *Drosophila* をモデル生物として用いることは非常に有効な手段であると考えられる。

本研究において、新規ヒト APC の *Drosophila* ホモログであるE −APC が単離され同定された。E−APC は D−Axin／Axin、Armadillo／β−catenin と複合体を形成し、Armadillo／β−catenin の分解誘導を通じ Wnt／Wingless シグナル伝達系を負に制御する活性を持つことが明らかとなった。また、*E−APC* は、すべての発生段階において発現しており、wing、leg などの成虫原基においてユビキタスな発現が認められた。さらに、*E−APC* はその発現パターンから個体の様々な領域における Wnt／Wingless シグナル伝達系を負に制御する因子であると示唆された。

本研究は、*Drosophila* の Wnt シグナル伝達系を負に制御する新たな遺伝子産物を同定し、今後、*Drosophila* をモデル生物とした遺伝学的解析を通じ APC 遺伝子産物の未知の機能、並びに Wnt シグナル伝達系での生理機能の解析に大きく貢献するものであり、博士の学位論文に値するものと認められる。