



平成 23 年 10 月 12 日
独立行政法人理化学研究所
国立大学法人東京大学分子細胞生物学研究所

大腸がん発症に関わる APC タンパク質複合体の立体構造を解明

—がんを抑制するタンパク質複合体の形成において重要なアミノ酸が判明—

本研究のポイント：

○がん抑制タンパク質 APC と Sam68 の複合体を X 線結晶構造解析で立体構造解明

○細胞のがん化を導く APC タンパク質の変異箇所が判明

○大腸がん発症の分子メカニズムの解明に重要な知見を与え、その治療戦略につながる成果

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、大腸がんの発症にかかわると考えられている APC（adenomatous polyposis coli）タンパク質の機能上重要となる部分の構造とその結合因子である Sam68 との複合体の立体構造を決定することに成功し、大腸がんの新たな治療戦略に関わる重要な知見を得ました。これは理研生命分子システム基盤研究領域の横山茂之領域長（東京大学大学院理学系研究科構造生物学社会連携講座教授）、エラ ザリナ モリシタ（Ella Czarina Morishita）特別研究員らと、国立大学法人東京大学分子細胞生物学研究所、および東京大学大学院理学系研究科の秋山徹教授らとの共同研究の成果です。

大腸がんは、他のがんに比べて患者数が増加傾向にあり、日本では 23 万 5 千件の罹患が報告されています。（平成 20 年厚労省患者調査の概況より）。世界的にもがんによる主要死因の 1 つになっていて、効果的な治療法がまだ見つかっていないのは、分子レベルでの解明が十分ではないことがその一因といわれています。これまでに大腸がんの発症にかかわる重要な遺伝子の 1 つに「APC 遺伝子」が同定され、大多数の大腸がん患者でこの遺伝子に変異が見いだされていることから、がん抑制遺伝子として機能していると考えられています。APC タンパク質は非常に大きいため、複雑な高次構造をとっていると推測されていますが、特に多くのタンパク質と結合するアルマジロリピート（Arm）ドメイン^{*1}という領域に注目した研究が盛んに行われてきました。Arm ドメインと結合するタンパク質の 1 つに Sam68^{*2}と呼ばれるタンパク質があります。最近、東京大学の秋山徹教授らは、Sam68 と APC タンパク質の結合ががん化につながるシグナル伝達を制御することを見いだしました。そこで本研究グループは、X 線結晶構造解析法を用いて、APC タンパク質と Sam68 との複合体の立体構造を決定し、この複合体を形成する重要なアミノ酸を同定することに成功しました。

この成果は、変異した APC タンパク質がどのようにがんの発症を導くのか、その分子メカニズムの解明に重要な知見を与え、がん治療の足がかりになると期待できます。さらに、決定した立体構造を利用して、新たな抗がん剤や浸潤・転移抑制剤の開発にもつながると考えられます。

本研究成果は、文部科学省「ターゲットタンパク研究プログラム」、「研究開発施設共用等促進費補助金（創薬等支援技術基盤プラットフォーム）事業」の一環として行われたもので、米国の科学雑誌『*Structure*』オンライン版（10 月 11 日付け：日本時間 10 月 12 日）に掲載されるとともに、その表紙を飾ります。

1. 背景

APC (Adenomatous polyposis coli) タンパク質は、2843 アミノ酸残基からなる大きなタンパク質で、がん化や形態形成に重要な役割を果たす Wnt シグナル^{※3} 伝達経路に関する β カテニンに結合して、その分解を誘導することが知られています。大腸がんで見いだされる変異 APC タンパク質は β カテニンの分解を誘導できないため、細胞内に β カテニンが蓄積され、TCF/LEF^{※4} と呼ばれる転写因子と相互作用して、Wnt 標的遺伝子の転写を促進します。それらの標的遺伝子は無制御な細胞増殖を刺激し、大腸がんを引き起こすことが分かっています。一方、正常な APC タンパク質は細胞質内で β カテニンに結合し、その分解を促進します。その結果、Wnt 標的遺伝子の転写が制御され、細胞の過増殖が防止されます。

APC タンパク質は他のタンパク質との結合に関わるドメインを有しています。多くのタンパク質は APC タンパク質にあるアルマジロリピート (Arm) ドメインという領域に結合します。最近、東京大学の秋山徹教授の研究室は、APC タンパク質が β カテニンの分解誘導以外にも、Sam68 というタンパク質と Arm ドメインを介して結合し、TCF の活性を制御して Wnt シグナルを阻害することを見いだしました。APC タンパク質と Sam68 の複合体は TCF のスプライシング^{※5} を制御し、TCF のスプライスバリエント^{※5} が過剰にできないようにしています (図 1a)。TCF のスプライスバリエントは Wnt 標的遺伝子を活性化し、過剰に存在するとがん化を誘導します。変異した APC タンパク質は Sam68 と結合はできるものの、その複合体は TCF のスプライシングを制御できなくなってしまうため、TCF のスプライスバリエントが増えることで Wnt 標的遺伝子が強く活性化され、細胞ががん化します (図 1b)。研究グループは、変異した APC タンパク質がどのようにがんの発症を導くのか、その分子メカニズムの解明につながる APC タンパク質と Sam68 の複合体の立体構造の解明に取り組みました。

2. 研究手法と成果

一般的に、APC タンパク質を含むヒト由来の大きなタンパク質を、高い品質で効率良く調製することは容易なことではありません。理研生命分子システム基盤研究領域では、独自開発した無細胞タンパク質合成系^{※6}をはじめ、数々の技術を基に高難度タンパク質に対応した試料調製システムの開発を進めています。研究グループはこのシステムをヒト APC と Sam68 タンパク質の発現に応用することで、100 通り以上のアミノ酸領域について迅速な試行を重ねた結果、APC と Sam68 タンパク質のそれぞれについて、効率よく試料が得られる領域を見いだしました。さらに、この方法を用いて X 線結晶構造解析に適した高品質なタンパク質を大量に精製し、SPring-8^{※7} および Swiss Light Source^{※8} で X 線回折データを取得し、APC の Arm ドメインの構造を 2.1 Å (オングストローム、1 Å=0.1nm) の分解能で、Sam68 のチロシンリッチドメインとの複合体の構造を 2.4 Å の分解能でそれぞれ決定することに成功しました (図 2)。立体構造を詳細に分析した結果、APC タンパク質の 516 番目のリジン残基 (Lys516) が特に Sam68 との複合体を作るのに重要であることが分かりました。さらに、等温滴定カロリーメトリー (isothermal titration calorimetry, ITC) ^{※9} を用いた研究により、実際にこの箇所に変異を入れると、APC タンパク質と Sam68 との間の結合能が落ちることを確認しました。また Sam68 のチロシン残基 (Tyr387) がリン酸化されると APC タンパク質との結合能が失われることも見いだしました。大腸がん患者の APC タンパク質では、Lys516 の部分がアスパラギン残基 (Asn) に変異している事例があることから、この箇所が変異した複合体は Wnt 標的遺伝子を強く活性化し、細胞のがん化を導くと考えられ、変異

APC タンパク質と細胞のがん化との関連性を立体構造の観点からも明らかにすることができました。

3. 今後の期待

大腸がんが発症するためにはまず APC 遺伝子に異常が起こることが必要であると考えられています。今回、大腸がんを研究する上で最も注目を集めているタンパク質の 1 つである APC タンパク質と Sam68 複合体の立体構造が明らかになりました。この成果は、変異した APC タンパク質によるがん発症の分子メカニズムの解明に重要な知見を与え、大腸がんに対する新しい治療戦略にもつながると考えます。がん進行における APC の役割についてさらに深く理解するために、現在、Sam68 以外の結合タンパク質と APC との複合体の構造解析を目指して研究を行っています。また、決定した立体構造や今後の構造解析は、正常なシグナル伝達には影響せずにかん細胞にだけ選択的に作用する薬剤の創製につながることを期待できます。

原論文情報

Ella Czarina Morishita, Kazutaka Murayama, Miyuki Kato-Murayama, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Yuri Tomabechi, Tomoatsu Hayashi, Takaho Terada, Noriko Handa, Mikako Shirouzu, Tetsu Akiyama, and Shigeyuki Yokoyama
“Crystal Structures of the Armadillo Repeat Domain of Adenomatous Polyposis Coli and Its Complex with the Tyrosine-Rich Domain of Sam68” *Structure* 2011 Doi:10.1016/j.str.2011.07.013

<報道担当・問い合わせ先>

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

生命分子システム基盤研究領域

領域長 横山 茂之 (よこやま しげゆき)

Tel: 045-503-9196 / Fax: 045-503-9195

横浜研究推進部 企画課

Tel: 045-503-9117 / Fax: 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715

国立大学法人東京大学分子細胞生物学研究所

事務部 総務チーム

TEL : 03-5841-7803 FAX : 03-5841-8465

<補足説明>

※1 アルマジロリピート (Arm) ドメイン

ショウジョウバエの遺伝子産物 Armadillo(アルマジロ)で初めて見つかった約40アミノ酸長からなる繰り返し構造。このモチーフはタンパク質間の相互作用に重要な役割を担っていると考えられている。

※2 Sam68 (Src-associated in mitosis, 68 kDa)

核内に存在する RNA 結合タンパク質で、シグナルを伝えたり RNA の代謝の際に働いていると考えられている。Sam68 はチロシンリン酸化酵素によりリン酸化され、チロシンがリン酸化されると RNA 結合能が阻害される。

※3 Wnt シグナル

Wnt と呼ばれる分泌タンパク質が、細胞に作用することにより活性化される細胞内シグナル伝達機構を Wnt シグナル経路と呼ぶ。初期発生において形態形成や細胞極性の決定などの重要な生命現象に関係しているが、恒常的に活性化されるとがんが引き起こされると考えられている。

※4 TCF/LEF (T-cell factor /lymphoid enhancer factor)

DNA に結合する転写因子のグループの1つで、 β カテニンと結合することで転写が活性化される。

※5 スプライシング、スプライスバリエーション

真核生物では、メッセンジャーRNA 前駆体にあるイントロンを除去し、前後のエキソンを結合する反応 (スプライシング) が起こり、タンパク質が翻訳される領域が切り出される。その際、異なる場所でスプライシングが起こり、1つのメッセンジャーRNA 前駆体から異なる成熟 mRNA が生産されることがある。その多様な mRNA をスプライスバリエーションと呼び、活性の異なるタンパク質が合成されることもある。

※6 無細胞タンパク質合成系

生命体に依存しない人工的なシステムで、細胞からタンパク質合成に必要な成分一式を抽出し、これに目的のタンパク質をコードする遺伝子を合成装置が読み取れる形にして添加して、タンパク質を合成する技術。外部からさまざまな因子を加えることが容易であり、反応条件の変更や最適化も容易であるなど、多くの優れた特徴を持つ。

※7 SPring-8

兵庫県の播磨科学公園都市にある世界最高の放射光を生み出す理化学研究所の施設。SPring-8 の名前は **Super Photon ring 8GeV** に由来する。放射光とは、電子を光とほぼ等しい速度まで加速し、電磁石によって進行方向を曲げた時に発生する、絞られた強力な電磁波のこと。

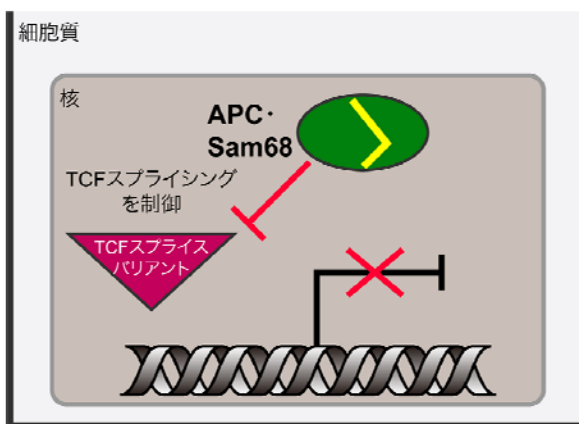
※8 Swiss Light Source (SLS)

スイス・ポールシェラー研究所が保有する第三世代放射光施設。2.4 GeV のエネルギーの高輝度光子ビームを提供する。

※9 等温滴定カロリメトリー (isothermal titration calorimetry, ITC)

生体分子の相互作用にはさまざまな化学結合が関与しており、その反応前後においてエネルギーの吸収/放出が起こる。ITC は、その熱量変化を直接測定することにより、溶液中での2つ以上の分子間の相互作用の結合の強さ、エンタルピー変化などを定量的に測定する方法である。

(a) 野生型APC



(b) 変異型APC



図1 Wnt シグナル伝達における APC・Sam68 複合体の役割

(a) 野生型 APC タンパク質は Sam68 と結合し、TCF スプライスバリエントの過剰発現を防ぐ。そのため、Wnt の標的遺伝子の活性化は阻止されて Wnt シグナルが阻害される。

(b) 変異型 APC タンパク質と Sam68 との複合体は TCF スプライスバリエントの過剰発現を促進し、Wnt の標的遺伝子を強く活性化される。そのため無制御な細胞増殖が引き起こされる。

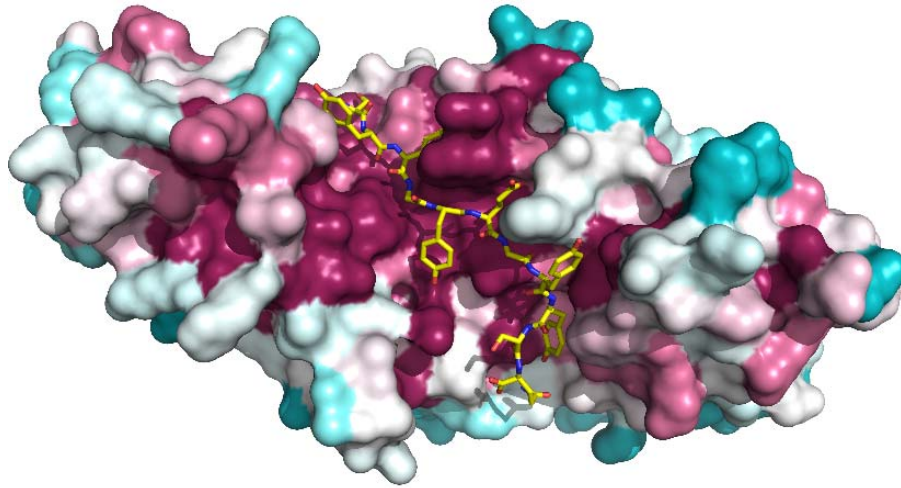


図2 APCのArmドメインとSam68のチロシンリッチドメインとの複合体の結晶構造

APC タンパク質の分子表面は一次配列の保存性に従い色付けした。様々な生物種において、相当するタンパク質の同じ一次配列の位置に、同じ種類のアミノ酸残基が存在することを保存されているという。多くの生物種において保存されている場合には保存性が高いという。濃い紫色が高い保存性を示し、青色が低い保存性を示す。Sam68はスティックモデルで示した（赤：酸素 青：窒素 黄色：炭素）。