

[研究論文] **Survivin 相互作用を標的とした  
アポトーシス誘導剤スクリーニング系の開発**

齋藤宇伸<sup>1</sup>・長谷部佑亮<sup>2</sup>・前澤祐花<sup>2</sup>・高村岳樹<sup>1,3</sup>・飯田泰広<sup>1,2</sup>

1 工学研究科 応用化学・バイオサイエンスコース専攻 博士前期課程 1年

2 応用バイオ科学部 応用バイオ科学科

3 工学部 応用化学科

**Development of screening system of apoptosis-inducing agent  
based on the survivin-interaction as a target**

Takanobu SAITOH<sup>1</sup>, Yusuke HASEBE<sup>2</sup>, Yuka MAEZAWA<sup>2</sup>, Takeji TAKAMURA<sup>3</sup>, Yasuhiro IIDA<sup>1,2</sup>

**Abstract**

Apoptosis is necessary to keep homeostasis for the human. Survivin is a member of the Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) family. If DNA is damaged in cells, the DNA will be repaired. However, if the irreparable damage occurs, the cells will induce apoptosis. It is known that the apoptosis is suppressed by inhibition of caspase-9 activity by binding of survivin to the caspase-9, and that it is needed to form a complex of survivin with XIAP to inhibit the activity of caspase-9. Therefore, inhibition of interaction of survivin and XIAP will become a target of apoptosis induction.

In this study, we developed an evaluation system of interaction of survivin and XIAP based on a Two-Hybrid method. Survivin and XIAP were cloned from HepG2 cells and those were constructed as vectors pACT II-survivin (prey vector) and pAS1-XIAP (bait vector). The yeast was transformed with both vectors by lithium acetate method and cultured in SG medium including the X-gal. In the results, blue colony attributed to survivin and XIAP interaction was obtained and the results indicated that the evaluation system of survivin-XIAP interaction was successfully developed.

**Keywords:** survivin, apoptosis, BIR domain

**1. まえがき**

がん(悪性腫瘍)は、1981年以來一貫して我が国における死亡原因の一位であり、現在では死因の3割以上を占めるに至っている。国際的に見ても2011年時の死因の上位に位置しており、エイズや結核よりも多く、8人に一人はがんが原因で死亡しており(American cancer society調べ)、科学技術が進歩した今日においても解決すべき問題である。がんの発生に関して様々な説が提唱されているが、DNA損傷に対する不完全な修復の蓄積が問題となることは多くの知見から明らかとなっている。

我々多細胞生物は、細胞周期におけるチェックポイント機構が正常にはたらくことによって恒常性が保っている<sup>(1)</sup>。例えば、DNAが環境や内因性物質により損傷をうけても、それをDNA複製時のチェックポイントにおいて識別し、修復するまで細胞分裂を遅らせることによって恒常性を保っている<sup>(2)(3)</sup>。細胞周期において修復できない場合はアポトーシスと呼ばれるプログラムされた細胞死が

誘導され<sup>(4)</sup>、この機構によりがん化を免れていると考えられている。細胞周期におけるDNAの修復ミス<sup>(5)(6)</sup>やアポトーシスの阻害<sup>(7)</sup>はがんにつながることを示唆されている。

アポトーシスはカスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼが実行因子となっている。DNA損傷刺激を受け取ると、ATMなどのシグナル伝達因子がアポトーシス誘導因子のp53へ伝達されアポトーシスが誘導される<sup>(8)</sup>。細胞質に存在するBcl-2ファミリーがそのシグナルを受け取りミトコンドリアへ移動する。その後、細胞質へのシトクロムcの放出を促進しカスパーゼ9と複合体を形成後活性化し下流シグナル経路のカスパーゼ3へとシグナルを伝える。カスパーゼ3が実行因子となりアポトーシスを行う<sup>(9)</sup>。

通常の細胞ではほぼsurvivinのタンパク質の発現は見られないが、がん細胞において高度に発現しているため、現在新しい抗がん剤のターゲットとして注目されている。

Survivin は IAP (Inhibitor of apoptosis protein) family に属する caspase 阻害タンパク質<sup>(9)</sup>であり、IAP family に属する XIAP と結合、caspase-9 活性を阻害してアポトーシスを抑制する<sup>(10)</sup>。不死化した細胞の異常増殖により、がんなどの疾病に繋がると考えられている。ヒトの survivin は 142 アミノ酸 (NCBI ID : CR541740) 中 16~87 番目のアミノ酸に BIR (Baculovirus IAP Repeat) 領域を 1 つ持つ。XIAP は 497 アミノ酸 (UniProtKB/Swiss-Prot : P98170) 中 28~95、164~232、266~331 アミノ酸の計 3 つの BIR 領域を持つ。このうち、survivin の 15~38 アミノ酸が XIAP と相互作用しアポトーシスを抑制することが示唆されている<sup>(11)</sup>。また、Survivin がもつ 99~142 番目のアミノ酸は紡錘体形成に関与している。また、117 番目のアミノ酸は有糸分裂に関わる、AuroraB キナーゼが結合するために必要な配列である<sup>(12)</sup>。また、survivin は多くのがん細胞において発現が確認されているため、survivin を標的とした抗がん剤の開発は、多くの種類のがん治療に応用できることが期待できる。現在、survivin を標的とした薬剤で製品化されたものは販売されていないため、早急な開発が望まれている。Survivin はアポトーシス抑制と、有糸分裂に必要な配列をそれぞれ有している。Survivin の完全な機能阻害は、正常細胞における有糸分裂の阻害に繋がり、人体へは副作用として現れる可能性がある。アポトーシス抑制に必要な配列を特異的に阻害しアポトーシスを誘導することで、人体への副作用が軽減されたがんの治療に繋がると考えられる。本研究では、新たな抗がん剤探索法を開発を目的とし、survivin と XIAP のタンパク質の相互作用を阻害する物質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングするための簡便な評価系の構築を行った。

## 2. 実験

### 2.1 材料および装置

Survivin および XIAP のクローニングにヒト肝がん細胞 (HepG2) を用いた。*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competent cells、発現ベクターの構築に使用した In-Fusion HD Cloning Kit、PCR の際の Ex Taq HS、誘導発現の確認に用いた X-gal は TaKaRa Bio Inc.より購入した。酵母ツーハイブリッド (Yeast Two Hybrid) に用いる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY3913 と、発現ベクターの pAS1 (NBRP ID : BYP1009) 及び pACT2 (NBRP ID : BYP1008) を OSAKA UNIVERSITY から購入した。DNA の切断に用いた制限酵素 EcoR I 及び BamH I、Nco I は TOYOBO CO., LTD. (Osaka) から購入した。核酸の精製に用いた QIAquick Gel Extraction Kit は QIAGEN K.K. (Tokyo Japan)、DNA の電気泳動に用いたアガロース、LB 培地 Miller、LB 寒天培地 Miler、ガラクトース、アミノ酸は NACALAI TESQUE, INC. (Kyoto Japan) よ

りそれぞれ購入した。Bacto Peptone 及び Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid、Bact<sup>TM</sup> Yeast Extract (Extract of Autolysed Yeast cells) は Becton, Dickinson and company Difco から購入した。D-グルコースは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka Japan) から購入した。その他の試薬は、特級および生化学グレードで購入し使用した。

### 2.2 Survivin および XIAP 遺伝子発現確認

HepG2 に対して survivin と XIAP の遺伝子発現の評価を行うために RNA 抽出を行った。細胞の溶液が入ったチューブを室温で 5 分間静置した後、クロロホルム 0.2 mL 加え激しく攪拌した。5 分間静置させ、遠心 (12,000 $\times$ g、10 min、4  $^{\circ}$ C) させた。遠心後、上層の RNA が含まれている水層を新しいチューブに移し、2-プロパノール 0.5 mL 加え、激しく攪拌し 10 分間静置させた後、遠心 (12,000 $\times$ g、10 min、4  $^{\circ}$ C) を行った。遠心後、上清を除去し、予め氷上に冷やしておいた 75 %エタノール 1 mL を加えて遠心し、再び上清を除去した。沈殿物を確認した後、上清を除きペレットを乾燥させた。DEPC-Water を 50  $\mu$ L 加え、分光光度計 (ナンドロップ : ND-1000) で核酸濃度ををはかり、濃度が 50 ng/ $\mu$ L になるように DEPC-Water を加え調製した。

得られた total RNA に、DNase 処理を行った。DNase 処理は、PCR チューブに RNA サンプル 5  $\mu$ L、10 $\times$ DNase I Reaction Buffer 1.0  $\mu$ L、DNase I Amplification Grade 1.0  $\mu$ L、DEPC-Water 3.0  $\mu$ L、を分注し、サーマルサイクラーで 25  $^{\circ}$ C、20 min 反応させた後、25 mM EDTA 1.0  $\mu$ L 加え、さらに 65  $^{\circ}$ C、10 min 反応させた。

DNase 処理後、cDNA 作成を行った。PCR チューブに DNase 処理した RNA 5  $\mu$ L、10 $\times$ RT Buffer 1  $\mu$ L、25 $\times$ dNTP Mixture 0.4  $\mu$ L、10 $\times$ RT Random Primers 1  $\mu$ L、Multiscribe Reverse Transcriptase 0.5  $\mu$ L、RNase Inhibitor 0.5  $\mu$ L、DEPC-Water 1.6  $\mu$ L を加え、25  $^{\circ}$ C、10 min、37  $^{\circ}$ C、120 min、85  $^{\circ}$ C、5 min の 3 段階の処理をサーマルサイクラーで行い、逆転写反応をし cDNA を作成した。

作成後、遺伝子発現の確認を行った。PCR チューブに、10 $\times$ EX Taq Buffer 2  $\mu$ L、dNTP Mixture 1.6  $\mu$ L、Fw Primer 1.0  $\mu$ L、Re Primer 1.0  $\mu$ L、TaKaRa Ex Taq 0.1  $\mu$ L、DEPC-Water 12.3  $\mu$ L を分注し、サーマルサイクラーで PCR を行い survivin および XIAP の遺伝子の増幅をさせた。プライマーは GAPDH (Fw : 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'、Re : 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3')、survivin (Fw : ATG GGT GCC CCG ACG TTG-3'、Re : 5'-TCA ATC CAT GGC AGC CAG-3')、XIAP (Fw : 5'-ATG ACT TTT AAC AGT TTT GAA GG-3'、Re : 5'-TTA AGA CCA TAA AAA TTT TTT GCT TG-3')

を使用した。反応条件は、94 °C 1min (初期熱変性)、94 °C 30 sec (増幅:熱変性)、58 °C 1 min ( $\beta$ アクチン) 58 °C 30 sec (XIAP) 68 °C 30 sec (survivin) (増幅:アニーリング)、72 °C 1 min (増幅:伸長反応)、72 °C 2 min (最終伸長反応)、4 °C  $\infty$  min (保存) で増幅反応のみを 35 サイクル行った。反応後、1.0 %アガロースゲルで確認を行った。

### 2.3 シークエンシングによる配列の確認

DNA 配列の解析を行うために 2.2 で PCR を行った反応液を用いて解析を行った。シークエンシングによる配列の解析が 1000 bp 以上で正確に解析することが困難であったため、1494 bp の XIAP は 2 つに配列を分割して PCR を行った後、シークエンシングにより配列を解析した。シークエンシング用に使用した XIAP のプライマーの配列は XIAP<sup>1</sup> (Fw: 5' -ATGACT TTTAAC AGT TTT GAA GG-3', Re: 5'-CAT AGT CTG GCC AGT TCT GAAA-3') と、XIAP<sup>2</sup> (Fw: TGG TAC CAG GGT GCAAAT ATC-3', Re: 5' -TTAAGA CCA TAAAAA TTT TTT GCT TG-3') である。サンプルの作成は、PCR 産物を SUPREC-02 に全量に移し、TE Buffer 50  $\mu$ L 加え卓上遠心機で遠心をした。この操作を数回繰り返した。ナノドロップで核酸濃度を測った後、サンプル濃度が 1.5 ng/ $\mu$ L になるように TE Buffer で調製した。PCR チューブに、サンプル 1  $\mu$ L、プライマー 1  $\mu$ L (終濃度: 1.6 pmol/L)、滅菌水 5  $\mu$ L、Big Dye Sequencing Buffer 1  $\mu$ L、Ready Reaction Premix 2  $\mu$ L を分注した。使用したプライマーは 2.2 で使用したものと同じである。サーマルサイクラーでの PCR 条件は、96 °C 1 min 反応を行った後、96 °C 10 sec, 50 °C 5 sec, 60 °C 4 min を 25 サイクル行い、4 °C で保存した。

反応後、精製を行った。磁気プレート上に 96 ウェルプレート置き、サンプル全量、85 %エタノール 42  $\mu$ L、Clean SEQ 10  $\mu$ L を加えピペッティングを行った後、3 分間静置した。磁気ビーズ以外を取り除き、85 %エタノール 100  $\mu$ L を加え 30 秒間静置した。この操作を 2 回繰り返した。その後、磁気ビーズ以外を取り除き 10 分間乾燥させた後、滅菌水 40  $\mu$ L を加え、5 分間静置した後、磁気ビーズを吸わないように 30  $\mu$ L 取り、新しい 96 ウェルプレートに移しシークエンサーにかけた。

### 2.4 発現ベクターの構築

In-Fusion HD Cloning Kit を用いて発現ベクターの構築を行った。ORF の配列に +15 bp した In-Fusion 用のプ

ライマーを用いて、PCR を行い、survivin 及び XIAP 遺伝子の増幅を行った後、電気泳動を行いゲルから目的バンドの切り出しを行った。切り出したバンドに Buffer QG 500  $\mu$ L を加えヒートブロック 50 °C で 10 分間溶解した。プライマーは、survivin (Fw: 5'-GAG GCC CCG GGG ATC ATG GGT GCC CCG ACG TTG-3', Re: 5'-CTT CGA ATT CGG ATC TCA ATC CAT GGC AGC CAG-3')、XIAP (Fw: 5'-GGT CAT ATG GCC ATG ATG ACT TTT AAC AGT TTT GAA GG-3', Re: 5'-CCC GGG GCC TCC ATG TTA AGA CCA TAA AAA TTT TTT GCT TG-3') を使用した。5 $\times$ In-fusion HD Enzyme Premix 2 mL、線状化ベクター 1  $\mu$ L、PCR サンプル 1  $\mu$ L、D<sub>2</sub>W 6  $\mu$ L を加え、50 °C 15 分間反応させた後、氷上静置した。

In-Fusion 反応には線状化したベクターを用いるため、使用するベクターを以下の様に制限酵素で処理をした。Survivin 発現用ベクターの pACT II は BamH I で処理をした。組成は、プラスミド (0.19 ng/ $\mu$ L) 3  $\mu$ L、K Buffer 1  $\mu$ L、BamH I (15 Units/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L、滅菌水 5.5  $\mu$ L で 37 °C で 1 時間反応させた。XIAP 発現用ベクターの pAS I は Nco I で処理をした。組成はプラスミド (0.59 ng/ $\mu$ L)、K Buffer 1  $\mu$ L、Nco I (10 Units/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L、BSA 2  $\mu$ L、滅菌水 14.5  $\mu$ L で 37 °C で 1 時間反応させた。得られた survivin と XIAP のサンプルは 1.0 %アガロースゲルで確認した。

PCR チューブにインサート DNA と線状化ベクターを加え、In-Fusion HD Cloning Kit に付属の酵素を加えた。組成は、survivin は DNA (33.3 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L、線状化ベクター (5.1 ng/ $\mu$ L) 10  $\mu$ L、5 $\times$ In-Fusion HD Enzyme Premix 2  $\mu$ L、滅菌水 7  $\mu$ L の 20  $\mu$ L スケールで行い、XIAP は DNA (3.5 ng/ $\mu$ L) を 15  $\mu$ L、線状化ベクター (20.2 ng/ $\mu$ L) 3  $\mu$ L、5 $\times$ In-Fusion HD Enzyme Premix 6  $\mu$ L、滅菌水 6  $\mu$ L の 30 mL スケールで行った。それぞれの組成溶液を攪拌後、ヒートブロックで 50 °C、15 分間反応させ、その後氷上で 30 分間静置することで、Fig.1 に示す pAS1-XIAP および、Fig.2 に示す pACT II -survivin を構築した。

構築したベクターサンプルを QIA quick column に全量移し、卓上遠心機で 1 分間遠心した後、溶液を除去した。同操作を 3 回繰り返し、最後の遠心のみ 4 分間行った。QIA quick column をマイクロチューブに取り付け、Buffer TE 30  $\mu$ L を加えた後 3 分間静置し、2 分間遠心を行った。得られた溶液を精製後サンプルとした。

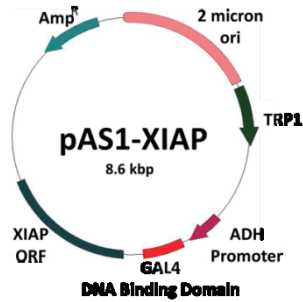


Fig.1 XIAP 発現用ベクターpAS I

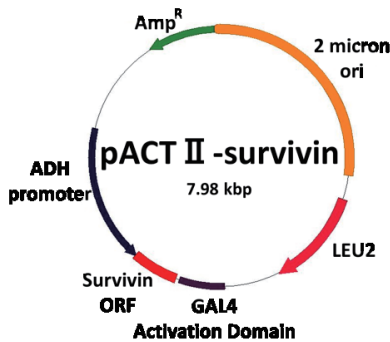


Fig.2 Survivin 発現用ベクターpACT II

## 2.5 大腸菌の形質転換

構築したベクターを増やすためにヒートショック法により大腸菌への形質転換を行った。*E.coli* DH5 $\alpha$  competent cells 100  $\mu$ L を氷上で融解した後、50  $\mu$ L ずつに分注し、それぞれに pAS I-XIAP および pACT II-survivin を 1  $\mu$ L 加え、氷上で 60 分間静置した。恒温槽で 42  $^{\circ}$ C、45 秒間インキュベートを行った後、氷上で静置したサンプルに LB 培地 250  $\mu$ L 加え、37  $^{\circ}$ C、1 時間培養した。培養後の溶液をアンピシリン (100 mg/mL) 20  $\mu$ L を塗布した LB 寒天培地 (Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, Agar 15 g/L : 1 枚あたり約 20 mL) に、サンプル溶液を 100  $\mu$ L ずつ塗布し 37  $^{\circ}$ C で培養した。

## 2.6 大腸菌からプラスミド抽出

アルカリプレップ法を用いて大腸菌に導入したベクターの抽出を行った。LB 培地 (Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) 50 mL にアンピシリン (100 mg/mL) 50  $\mu$ L と形質転換した大腸菌 (pAS I-XIAP/*E.coli*, pACT II-survivin/*E.coli*) のシングルコロニーをピックアップして加え、37  $^{\circ}$ C で over night で振とう培養を行い、これを前培養液とした。前培養液 50 mL

全量を遠沈管に移し、遠心 (3,300 $\times$ g、5 min、4  $^{\circ}$ C) を行った後、培地を取り除き、solution 1 (50 mM D-グルコース、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA) を 2 mL 加えボルテックスによりペレットを完全に溶解させた。Solution 2 (0.2 M 水酸化ナトリウム、1% (w/v) SDS) 4 mL 加え、転倒混和で混合した後 3 分間氷冷した。Solution 3 (3 M 酢酸カリウム、2 M 酢酸) 3 mL 加え、転倒混和し混合した後 5 分間氷冷した。氷冷後、遠心 (8,200 $\times$ g、5 min、4  $^{\circ}$ C) を行い、白い沈殿物を吸わないように溶液だけを新しい遠沈管に移し、RNase 80  $\mu$ L (100  $\mu$ g/mL) を加え軽く攪拌した後、37  $^{\circ}$ C、15 分間培養した後、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1 を 2 mL 加え、激しく攪拌し遠心 (8,200 $\times$ g、5 min、4  $^{\circ}$ C) した。上清を新しい遠沈管に移しクロロホルム 3 mL 加え、遠心 (8,200 $\times$ g、5 min、4  $^{\circ}$ C) した。上清を新しい遠沈管に移し 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を溶液の 1/10 量、2-プロパノールを溶液と等量加え、激しく攪拌した後、遠心 (8,200 $\times$ g、20 min、4  $^{\circ}$ C) を行い、上清を除去した。70%エタノール 8 mL を加え、遠心 (8,200 $\times$ g、15 min、4  $^{\circ}$ C) を行い、上清を除去した。10 分間程度風乾させ、TE 100  $\mu$ L を加え、マイクロチューブに移した後、分光光度計 (ナノドロップ) により定量し、-20  $^{\circ}$ C で保存した。

## 2.7 酵母の形質転換

Wild Type の *S.cerevisiae* BY3913 は YPD 培地 (Bacto Peptone 10 g/L, Bacto Yeast Extract 10 g/L, D-グルコース 20 g/L : 1 枚あたり約 20 mL) で培養を行った。酵母に使用されるベクターは、大腸菌に導入されたベクターを 2.3 で記載したプライマーを用いて PCR を行った後、電気泳動を行い、目的の分子量との相同性を確認した後に用いた。

酵母の形質転換体 (pAS I-XIAP/ *S.cerevisiae*, pACT II-survivin/ *S.cerevisiae*) の作成は酢酸リチウム法を用いた。YPD 培地 5 mL に *S.cerevisiae* BY3913 のシングルコロニーをピックアップして加え、30  $^{\circ}$ C、over night で振とう培養し、これを前培養液とした。前培養液を YPD 培地 30 mL に OD<sub>600</sub>=0.1~0.2 になるように前培養液を加え、OD<sub>600</sub>=0.4 になるまで 30  $^{\circ}$ C で培養を行った (約 4~6 時間)。培養液の遠心分離 (2,000 rpm、5 min、4  $^{\circ}$ C) を行い、培地を除去した。1 $\times$ TE 2 mL を加え遠心 (2,000 rpm、5 min、4  $^{\circ}$ C) をかけた後、溶液を除去した。酢酸リチウム溶液 (終濃度: 100 mM Lithium Acetate, 5 mM Tris HCl (pH 8.0)、0.5 M EDTA) を 2 mL 加え 30  $^{\circ}$ C、1 時間培養した。培養液を遠心 (2,000 rpm、5 min、4  $^{\circ}$ C) にかけて、溶液を除去した。構築したベクター 1  $\mu$ L、酢酸リチウム/グリセロール溶液 (終濃度: 100 mM Lithium Acetate, 10 mM Tris HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、15%



(w/v) グリセロール) 300  $\mu$ L、50%ポリエチレングリコール (PEG 6000) 700  $\mu$ Lを加え攪拌した後、30  $^{\circ}$ Cで1時間培養した。その後、30秒間、卓上遠心機で遠心を行い、沈殿物を確認後、1 $\times$ TE 500  $\mu$ Lに溶解し選択培地 (2.9 参照) へ100  $\mu$ Lずつ塗布した。

## 2.8 酵母のポジティブスクリーニング

Wild Type の *S.cerevisiae* BY3913 は YPD 培地で培養を行うが、形質転換した酵母はベクターのもつ遺伝子配列により培地の栄養欠損を相補される。pAS I -XIAP/*S.cerevisiae* は TRP 1 を、pACT II -survivin/*S.cerevisiae* は LEU 2 をそれぞれコードしているため、前者はトリプトファン (Trp) 欠損培地を使用し、後者はロイシン (Leu) 欠損培地を使用し、セクションを行った。

500 mL 作成時の組成は、アミノ酸 drop out mix 0.58 g (終濃度: 1.159 g/L)、Yeast Nitrogen Base w/o amino acid 3.35 g (終濃度: 6.70 g/L) を純水で 400 mL に溶解したものと、別のメディウムビンで D-グルコース 10.0 g (終濃度: 2%) を純水 100 mL に溶解したものを作成し、別々にオートクレーブにかけた。炭素源は、アミノ酸溶液がある程度冷めてから、無菌環境下で加えた。寒天培地を作る際の Agar の終濃度は 1.5% に作製した。

アミノ酸は、アデニン 0.125 g (終濃度: 0.019 g/L)、ウラシル、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン、グリシン、L-(+) -イソロイシン、L-リシン、L-メチオニン、L-(-) -フェニルアラニン、L-(-) -プロリン、L-セリン、L-トレオニン、L-チロシン、L-バリンはそれぞれ 2.0 g (培地作成時の終濃度: 0.076 g/L) 取り、粉末を乳棒と乳鉢ですりつぶし混ぜ合わせたものを、アミノ酸 drop out mix とした。

pAS I -XIAP/*S.cerevisiae* を培養の際は、アミノ酸 drop out mix にヒスチジン 0.038 g (培地作成時の終濃度: 0.019 g/L) と、ロイシン 0.198 g (培地作成時の終濃度: 0.395 g/L) を加え、-Trp 培地を作成し、酵母を培養した。pACT II -survivin/*S.cerevisiae* を培養の際は、アミノ酸 drop out mix にヒスチジンとトリプトファンをそれぞれ 0.038 g (培地作成時の終濃度: 0.019 g/L) 加え、Leu 欠損培地を作成し、酵母を 30  $^{\circ}$ C、3日間培養した。

## 2.9 酵母のベクター保持の確認

酵母のプラスミド抽出は、Zymolyase 20T で細胞壁を分解後、アルカリプレップ法でベクターの抽出を行った。

遠沈管に 50 mL の選択培地を加え、pAS I -XIAP/*S.cerevisiae* のシングルコロニーをピックアップして加え、30  $^{\circ}$ Cで約3日間、振とう培養を行った。酵母の分裂による濁度が観察できたら、全量を 50 mL の遠沈管に移し、遠心 (2,000 rpm、5 min、4  $^{\circ}$ C) をかけた後、

培地を除去した。1 $\times$ TE 2mLを加え、遠心 (2,000 rpm、5 min、4  $^{\circ}$ C) をかけた後、上清を除去した。その後、zymolyase 溶液 (1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 5 mL、滅菌水 1 mL、zymolyase -20T 粉末 0.1 mg) を 1 mL 加え、軽く攪拌し沈殿物を溶解した後、37  $^{\circ}$ Cで3時間振とうさせながら反応させた。その後は、2.7と同様のアルカリプレップ法を用いてベクターの抽出を行った。その後、どちらも保持している制限酵素配列である Sal I で酵素処理を行い、線状化し 0.7% のアガロースゲルで確認を行った。

## 2.10 タンパク質間相互作用評価法

出芽酵母の遺伝子は Open reading frame (ORF) の上流で活性が制御されている。上流プロモーターは TATA box を含むコアプロモーターとその上流にある制御領域 (アッププロモーター) に分けられる。アッププロモーターには、転写の活性化に必要な領域が存在し、活性化領域に活性因子が結合すると転写が活性化し、下流に位置する TATA box や ORF の転写や翻訳が行われる。Two Hybrid 法 (Yeast Two Hybrid System: YTH system) は、出芽酵母の転写活性化因子 GAL4 を利用したタンパク質相互作用解析システムである。酵母ツーハイブリッドシステムでは、GAL4 応答性プロモーターの下流にレポーター遺伝子をもつ酵母宿主株に、GAL4 DNA - BD (DNA 結合ドメイン) を融合した Bait (擬似餌) の発現プラスミドと、GAL4 AD (転写活性化ドメイン) を融合した Prey (餌) の発現ベクターを導入する。酵母中で Bait と Prey のタンパク質が相互作用すると、GAL4 転写活性が再構成され、下流のレポーター遺伝子が発現する。レポーター遺伝子の発現を選択培地での生育やレポーター活性により検出し、タンパク質 - タンパク質間相互作用解析を行った。*S.cerevisiae* BY3913 はレポーター遺伝子に HIS3 と Lac-Z の配列を持つため、pAS I の TRP 1 と pACT II の LEU 2 によるトリプトファン、ロイシン欠損培地に加え、ヒスチジンの欠損と 2% X-gal 50  $\mu$ L を培地に添加することによって、Two Hybrid 法によるタンパク質間相互作用の検出を行った。

## 3. 結果および考察

### 3.1 RNA の抽出結果

HepG2 の細胞(①、②)から RNA を抽出後、電気泳動を行った結果を Fig.3 に示す。泳動した結果、いずれのサンプルからも、28S RNA、18S RNA、5S RNA のバンドが確認できたため、total RNA が抽出できたと考え、この中に mRNA が含まれているとし実験を進めた。その後、逆転写反応を行い、遺伝子発現の評価を行った。

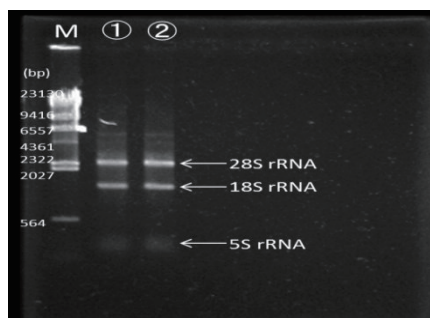


Fig.3 RNA の電気泳動結果

M:  $\lambda$ -HindIII digest、①、②HepG2 の RNA 抽出し電気泳動を行った結果

### 3.2 Survivin および XIAP 遺伝子発現の確認

3.1 において、抽出した total RNA から逆転写反応を行い、cDNA を作製した後、当該サンプルに対して、survivin(S)の増幅配列と XIAP(X)の増幅配列による PCR を 4 本ずつ行った結果を Fig.4 に示す。また、ポジティブコントロールとして、ハウスキーピング遺伝子の GAPDH(G)を、共に泳動した。泳動の結果、Survivin の目的分子量は 429 bp、確認されたバンドの推定分子量は、405 bp であった。また、XIAP の目的分子量は、1494 bp であり、確認されたバンドの推定分子量は 1462 bp であった。どちらも、目的分子量付近にバンドが確認でき、遺伝子の発現確認ができた。

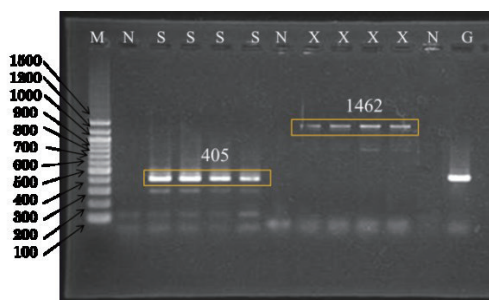


Fig.4 cDNA を survivin と XIAP のプライマーで PCR 後の泳動結果

M:100bp DNA Ladder、N:ネガティブコントロール、S:survivin の PCR 産物、X:XIAP の PCR 産物、G:GAPDH の PCR 産物

### 3.3 シークエンシングによる配列の確認

DNA シークエンサーで配列解析を行った。シークエンシングで得られた Survivin の配列 (429 bp) と XIAP の配列 (1494 bp) は、Ensemble のデータベースと比較した結果、100% の一致を示した。このことから、survivin およ

び XIAP の配列の信頼性が確認できた。

### 3.4 ベクター構築の確認

3.2 で確認できたそれぞれの ORF 配列に対して、In-Fusion 反応によりベクター構築後、同一の Survivin (S) および XIAP (X) のサンプル 2 つに対し、PCR を行い電気泳動による確認を行った結果を Fig.5 に示す。Survivin の PCR 産物を泳動したものを A、XIAP を泳動したものを B に示す。使用したプライマーは、次の工程の In-Fusion 反応に必要なとされる、ORF の配列の 5'および 3'末端に +15 bp されたものであり、survivin の目的分子量は 459 bp、XIAP の目的分子量は 1524 bp である。泳動の結果、survivin は 441 bp、XIAP は 1592 bp にバンドが確認できた。どちらも目的分子量付近に近いことから、それぞれベクター構築に必要な DNA の増幅の確認ができた。

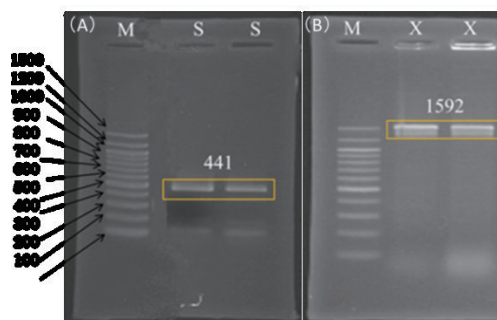


Fig.5 In-Fusion 用のプライマーで PCR 後の泳動結果

M:100 bp DNA Ladder、

(A) S: インサート用 survivin ORF の PCR 産物

(B) X: インサート用 XIAP ORF の PCR 産物

### 3.5 大腸菌のベクター保持の確認

#### 3.5.1 ベクターの制限酵素処理による確認

3.4 の結果を受け、pACTII を BamHI で処理、pAS1 を NcoI で処理し線状化後、In-Fusion 反応により、pACTII-survivin と pAS1-XIAP のベクター構築を行った。構築後、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competent cells の形質転換を行った。それぞれの形質転換株をアルカリプレップ法でプラスミドを抽出した後、Fig.6 の A には pACTII (①)、pACTII-survivin (②) は EcoRI で制限酵素処理したものを、B には pAS1 (①)、pAS1-XIAP (②) は BamHI で制限酵素処理を行い、電気泳動を行った結果を示す。目的分子量は、pACTII が 7550 bp、pACTII-survivin が 7979 bp、pAS1 が 7100 bp、pAS1-XIAP が 8594 bp である。泳動の結果、pAS1 は 7422 bp、pAS1-XIAP は 8008 bp、pACTII は 7032 bp、pACTII-survivin は 8547 bp にバンドが確認できたため、構築したベクターである pACT

II-survivin および pAS1-XIAP は、インサートを保持していることが示唆された。このことから、Two Hybrid に応用できるベクターが構築できたことが確認出来たため、この構築ベクターを *S.cerevisiae* BY3913 の形質転換に用いた。

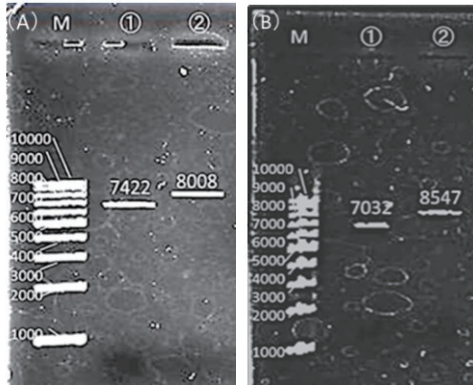


Fig.6 ベクターの制限酵素処理後電気泳動図

M : 1000 bp DNA Ladder、

(A) ① : pACT II、② : pACT II-survivin

(B) ① : pAS I、② : pAS I-XIAP

pACT II は BamH I、pAS1 は Nco I で制限酵素処理を行い空ベクターとインサートが挿入されたサンプルを比較することで、ベクター構築の確認を行った。

### 3.6 酵母のポジティブセレクション

3.5 の結果から、構築ベクターを *S.cerevisiae* BY3913 に酢酸リチウム法で形質転換し、pAS1-XIAP/*S.cerevisiae* (A) を -Trp 培地、pACT II-survivin/*S.cerevisiae* (B) を -Leu 培地で 4 日間、30 °C で培養した結果を Fig.7 の A, B に示す。観察の結果、それぞれコロニーの形成が確認出来たため、酵母のベクター保持が示唆され、栄養選択性による酵母のセレクションが可能であることが確認できた。

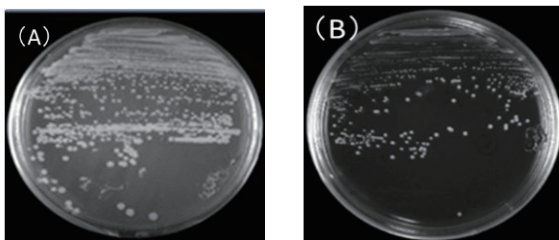


Fig.7 栄養欠損培地で形質転換酵母を 4 日間培養した結果

(A) pAS1-XIAP/*S.cerevisiae*

(B) pACT II-survivin/*S.cerevisiae*

### 3.7 酵母のベクター保持の確認

形質転換された pAS1-XIAP/*S.cerevisiae* からプラスミド抽出を行い、3.2 と同様の条件で PCR を行った後、電

気泳動を行った結果を Fig.8 に示す。泳動したサンプルは、コントロール (N) として、TE を PCR したものと、pAS1-XIAP/*S.cerevisiae* の違うシングルコロニーをピックアップし、プラスミド抽出後、PCR した(X<sub>①</sub>~④)を泳動した。泳動した結果、X<sub>④</sub>で 1476 bp の目的分子量である 1494 bp と近いバンドが確認出来たため、使用した菌を培養後、Bait ベクター保持した酵母として、Two Hybrid に応用することとした。

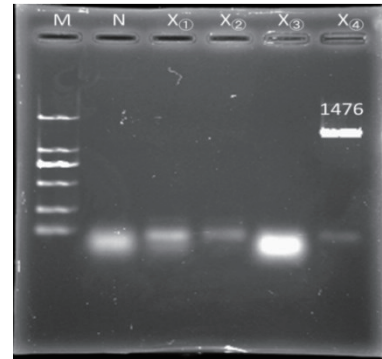


Fig.8 pAS1-XIAP/*S.cerevisiae* の PCR 後の電気泳動結果

M : 100~200 bp wide range、N : TE、X<sub>①</sub>~④ : 酵母からプラスミド抽出後 ORF のプライマーを用いて PCR 反応を行った。X<sub>①</sub>~X<sub>④</sub>まで同 Dish 中の異なったシングルコロニーからのプラスミド抽出を行った。

### 3.8 Yeast Two Hybrid の構築

3.7 の結果から、形質転換酵母の Bait ベクターの pAS1-XIAP 保持が確認出来たため、Prey ベクターである pACT II-survivin を形質転換し Two Hybrid 法により survivin と XIAP の相互作用を調べた。形質転換後、-Trp、-Leu、-His SG 培地で、30 °C、7 日間培養した結果を左側の Fig.9 (A)に示す。観察の結果、酵母のコロニーが観察できたため、pACT II-survivin は pAS1-XIAP/*S.cerevisiae* に形質転換されている。その結果、survivin と XIAP の相互作用し、レポーター遺伝子である HIS3 の転写活性化によりヒスチジンが合成されたことが示唆された。また、このシングルコロニーをピックアップし、X-gal を添加した YPD 培地に塗布し、30 °C、4 日間培養した結果を、右側の Fig.9 (B)に示す。観察の結果、酵母のコロニーは青色に着色しており、レポーター遺伝子である LacZ コードのβガラクトシダーゼによる X-gal の分解がされたためであると考えられる。このことから、Two Hybrid 法による survivin と XIAP の相互作用の確認が出来たため、当該タンパク質の相互作用阻害剤スクリーニング系に応用できることが示唆された。



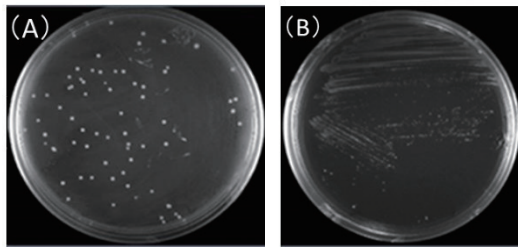


Fig.9 形質転換した酵母の Two Hybrid 構築時の酵母の観察

(A) pAS1-XIAP/pACT II-survivin *S.cerevisiae* を -Trp,-Leu,-His SG 培地で培養したシャーレ

(B) pAS1-XIAP/pACT II-survivin *S.cerevisiae* のシングルコロニーを X-gal を添加した YPD 培地で培養したシャーレ

#### 4. まとめ

survivin と XIAP のタンパク質の相互作用を阻害する物質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングするための簡便な評価系の構築を行うことができた。本システムを用いることにより、survivin と XIAP との結合部を特異的に阻害した物質が、アポトーシスを誘導することにより、副作用の小さな抗がん剤を開発につながることを示唆された。

#### 5. 参考文献

- 1) S Zinkel1, A Gross, E Yang, BCL2 family in DNA damage and cell cycle control, *Cell Death and Differentiation*, **13**, 1351, (2006)
- 2) Thomas Helledaya, Justin Loc, Dik C. van Gentd, Bevin P. Engelwardc, DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment, *DNA repair*, **6**, 923, (2006)
- 3) Jillian Richmond, Marina Tuzova, William Cruikshank, David Center, Regulation of Cellular Processes by Interleukin-16 in Homeostasis and Cancer, *Cellular Physiology*, **229**, 139, (2013)
- 4) Michael B. Kastan, Christine E. Canman and Christopher J. Leonard, P53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer, *Cancer and Metastasis Reviews* **14**, 3, (1995)
- 5) Michelle D. Garrett, Cell cycle control and cancer, *CURRENT SCIENCE*, **81**, 515, (2001)
- 6) Paz Polak, Michael S Lawrence, Eric Haugen, Nina Stoletzki, Petar Stojanov, Robert E Thurman4, Levi A Garraway, Sergei Mirkin, Gad Getz, John A Stamatoyannopoulos & Shamil R Sunyaev, Reduced local mutation density in

regulatory DNA of cancer genomes is linked to DNA repair, *nature biotechnology*, **32**, 71, (2014)

- 7) J. Grossmann, Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis—Anoikis”, *Apoptosis*, **7**, 247, (2002)
- 8) Mai-Jing Liao, Chaying Yin, Carrolee Barlow, Anthony Wynshaw-Boris, and Terryvan Dyke, Atm Is Dispensable for p53 Apoptosis and Tumor Suppression Triggered by Cell Cycle Dysfunction, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, **4**, 3095, (1999)
- 9) Domagoj Vucic and Wayne J. Fairbrother, The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer, *American Association for Cancer Research*, **13**, 5995, (2007)
- 10) Ingo raniin. Van Wang, Ed Sausville, Dominic A. Scudiere, Nicole Vigna, Turnan Oltersdorf, and John C. Reed, IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs, *American Association for Cancer Research*, **58**, 5315, (1998)
- 11) Che Xiao-Fang, Development of surviving targeted therapy for adult T cell, *科学研究費補助金研究成果報告書*, C-19, (2011)
- 12) Xu-Hui Zhang, Mahadev Rao, Joseph A. Loprieto, Julie A. Hong, Ming Zhao, Guo-Zhu Chen, Ashley E. Humphries, Dao M. Nguyen, Jane, B. Trepel, Xiaodan Yu1, David S. Schrupp, Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer, *Cancer Biology & Therapy*, **7**, 1388, (2008)