

アポトーシス誘導性抗腫瘍物質スクリーニング用の
酵母ツーハイブリッドシステムの開発

秋山 佳穂・長谷部 佑亮・齋藤 宇伸・高村 岳樹・飯田 泰広

[研究論文] アポトーシス誘導性抗腫瘍物質スクリーニング 用の酵母ツーハイブリッドシステムの開発

秋山佳穂¹・長谷部佑亮¹・齋藤宇伸¹・高村岳樹^{1,2}・飯田泰広^{1,3}

1 応用化学・バイオサイエンス専攻

2 工学部 応用化学科

3 応用バイオ科学部 応用バイオ科学科

Development of Yeast Two Hybrid system for screening of apoptosis-inducing anti-tumor reagent

Yoshiho AKIYAMA¹, Yusuke HASEBE¹, Takanobu SAITO², Takeji TAKAMURA^{1,3}, Yasuhiro IIDA^{1,4}

Abstract

Apoptosis is a type of death that occur in multicellular organisms as a programmed cell death, and it is necessary to keep an individual development and homeostasis. If DNA is damaged in cells, the DNA will be repaired. However, if the irreparable damage occurs, the cells will induce apoptosis. One of the basic characteristics of cancer is having resistance to apoptosis, and the function of the apoptosis is suppressed in many kinds of cancer cells. Survivin is a member of the Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) family. It is hardly expressed in normal cells but is known to be highly expressed in many cancer cells. It is also known that Survivin interacts with HBXIP (Hepatitis B X-interacting protein) and the complex inhibit apoptosis in many tumor cells. Therefore, inhibition of interaction of Survivin and HBXIP will become a new target of apoptosis induction to tumor cells.

In this study, we developed an evaluation system of interaction of Survivin- α and HBXIP based on a Two-Hybrid method. Survivin- α and HBXIP were respectively inserted into the pACTII and pAS1 vector, and the two vectors were introduced into *Saccharomyces cerevisiae* BY 3913. Growth of transformed yeast in 3-AT assay suggested that two vectors were introduced into the yeast and that Survivin and HBXIP were interacted. In addition, we developed an evaluation method of Survivin-HBXIP interaction by β -galactosidase activity of the Two-Hybrid system. Our method will be applicable to screening method for apoptosis inducer against tumor cells.

Keywords: Apoptosis, Survivin, HBXIP, BIR domain

1. まえがき

がんは1981年以降、日本人の死因の第一位を占めており、現在では全死亡者の25%以上を占めている¹⁾。国際的に見ても、多くの国においてがんは死因の上位に位置しており²⁾、科学技術が進歩した今日においても解決すべき課題である。近年 Hanahan と Weinberg によって、がん化の過程に伴う10種類の生体内(細胞内)変化が提唱された³⁾。本来我々の体内では、発生したがん細胞に対して悪性化を抑制する仕組みが働いているが、がん細胞は自らを正常細胞とは異なる形態へと変化させることで、がんの抑制プロセスをクリアしているものと考えられる。本研究では、

がん細胞が持つ10の特徴の1つである「細胞死への抵抗性」に着目し、その形質を司る遺伝子及びタンパク質を標的としている。

DNA が環境や内因性物質により DNA に損傷を受けると、チェックポイント機構により細胞周期が停止され DNA 修復が行われるが、重度の損傷で修復困難の場合にはアポトーシスが誘導され異常な細胞を除去する^{4),5)}。アポトーシスはカスパーゼの連続的な活性化カスケードによって媒介されることが報告されている⁶⁾。DNA 損傷刺激を受け取ると、シグナル伝達因子がアポトーシス誘導因子 p53 へ伝達され、アポトーシスが誘導される⁷⁾。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* の放出を促進する。放出されたシトクロム *c* はカスパーゼ 9 や Apaf1 と複合体を形成後、カスパーゼ 9 を活性化し、カスパーゼ 3 へとシグナルを伝える。このカスパーゼ 3 がアポトーシスの実行因子となり、細胞内のタンパク質を切断することによって、アポトーシスが起こればと考えられている⁸⁾。

アポトーシスを阻害するタンパク質は、多くのがん細胞で過剰発現していることが知られており、その内の1つが Survivin である。Survivin は IAP (Inhibitor of apoptosis protein) ファミリーに属するタンパク質である⁹⁾。正常細胞では、Survivin のタンパク質発現はほとんど見られないが、がん細胞においては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4つのエクソンと5つのイントロンを持っている。Survivin は10種類のスプライシングバリエーションが存在しており、そのうちの7種類 (Survivin- α , 2B, Delta-Ex3, 3B, SI, 3 α , 2 α) は機能がわかっている^{10,11)}。そのなかでも4つ全てのエクソンからなる Survivin- α が主転写物であり、最も一般的な形態である。ヒトの Survivin- α は142アミノ酸 (NCBI ID : CR541740) であり、16-88番目のアミノ酸に BIR (Baculovirus IAP Repeat) ドメインを1つ持つ。この BIR ドメインに、同じ IAP ファミリーに属する XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) が結合し、アポトーシスを抑制することが知られている¹²⁾。XIAP の他にも、Survivin は HBXIP とも相互作用することがわかってきた。HBXIP は当初、B型肝炎ウイルスが有する X タンパク質 (HBx) との相互作用するタンパク質として同定され¹³⁾、現在までに様々な種類のがんで高発現が報告されている¹⁴⁾。HBXIP は Survivin と相互作用し複合体を形成する。その Survivin-HBXIP 複合体は pro-Caspase 9 に結合し、アポトーシスを選択的に抑制する^{15,16)}。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¹⁷⁾。

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。よって、Survivin は多くのがん治療における抗がん剤のターゲットとして有効であるといえるが、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、副作用として現れる可能性がある。そのため、Survivin の2つの機能 (アポトーシス抑制と有糸分裂) のうち、アポトーシス抑制のみを特異的に阻害することで、がん細胞のアポトーシス誘導型で人体への副作用が少ない抗がん剤開発に繋がると考えられる。本研究では、Survivin と HBXIP の相互作用を評価する系として酵母ツーハイブリッド法をベースに構築することを目的としている。この活性を指標に相互作用を阻害する物質のスクリーニングを行うことにより、アポトーシス誘導型の抗がん剤のリード化合物を得ることが期待できると考えている。

2. 実験装置および測定方法

2-1. 試薬及び装置

Survivin- α および HBXIP の遺伝子は、ヒト肝がん細胞 (HepG2) からクローニングした。本実験で用いたプライマーは全て Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。Escherichia coli DH5 α 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、DNA の切断に用いた制限酵素 BamHI及び NcoIは TaKaRa Bio Inc. (Shiga, Japan) より購入した。PCR産物の精製に用いた QIAquick Gel Extraction Kit は QIAGEN K.K. (Tokyo Japan) から購入した。シーケンス解析に用いた BigDye Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing Buffer、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 は Applied Biosystems (Waltham, USA) を用いた。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) は大阪大学から購入した。LB 培地 Miller、LB 寒天培地 Miler、3-amino-1,2,4-triazole、Zymolyase®-20T、アミノ酸は NACALAI TESQUE, INC. (Kyoto, Japan) より購入した。o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG)、D-グルコースは Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より購入した。Yeast nitrogen base w/o amino acids、Bacto™ Peptone、BACTO™ Yeast Extract Extract of Autolysed Yeast Cells は Becton, Dickinson and company Difco (Tokyo, 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を購入し使用した。形質転換酵母の培養に用いた SC 培地の組成は、0.67% Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids、2%グルコース、0.076 g/L [arginine, cysteine, lysine, threonine, aspartic acid, isoleucine, methionine, phenylalanine, proline, serine, tyrosine, valine, glutamine, glycine, uracil, tryptophan, histidine]、0.019 g/L adenine、0.395 g/L leucine であり、形質転換酵母の選択マーカーに応じて、適宜アミノ酸を除いた SC 選択培地を使用した。また、寒天培地の際は、上記の組成に1%寒天末を加えて作製した。

また、サーマルサイクラーは FTGENE-Y2 (TECHNE, Staffordshire, UK)を用いた。ゲル撮影機は CHEMI DOC XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)、エレクトロポレーターは MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)、紫外可視分光光度計は V-550 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。

2-2. HBXIP のクローニング

HepG2 細胞の cDNA を鋳型として PCR にて HBXIP ORF の増幅を行った。PCR チューブに、10×EX Taq Buffer 2 μ L、dNTP Mixture 1.6 μ L、Fw Primer 1.0 μ L、Re Primer 1.0 μ L Ex Taq polymerase (H.S.) 1.0 μ L、D₂W 11.4 μ L、cDNA 溶液 2 μ L を加え、PCR 反応溶液を作製した。ネガティブコントロールとして cDNA の代わりに D₂W を用いて行った。プライマーは HBXIP-ORF-Fw (5'-ATGGAGGCGACCTTG

A-3')、HBXIP-ORF-Rv (5'-TTAAGAGGCCATTTTGTGCA-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)、50 °C 30 sec (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 ∞ min (保存) で増幅反応は 35 サイクル行った。反応後、2.5 %アガロースゲルで確認を行い、バンドの切り出し及び QIAquick Gel Extraction Kit による精製を行った。

また、シーケンス解析による配列の確認を行った。シーケンス解析用の溶液を得るために、PCR による蛍光色素の付加反応を行った。PCR チューブに D₂W 3.3 μL、抽出プラスミド 3.2 μL、BigDye Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing Buffer 1.5 μL、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 1 μL、プライマー 1 μL を加え、蛍光色素付加反応溶液を作製した。プライマーは上記に示した HBXIP-ORF を使用し、Fw プライマーと Re プライマーは個別に反応させた。反応条件は、96 °C 2 min 反応を行った後、96 °C 10 sec、50 °C 5 sec、60 °C 4 min を 35 サイクル行い、4 °C で保存した。反応後、精製を行うために、精製用 96 穴プレートに PCR 産物を全量移し、Agencourt CleanSEQ を 10 μL 加えた。さらに 85 %エタノールを 42 μL 加えピペティングし、磁気プレート上に置き 5 分間静置した。5 分後に上清を廃棄し、100 μL の 85 %エタノールを加え 30 秒静置し上清を廃棄する操作を 2 回行った。磁気プレートから外した後 10 分間風乾させ、D₂W を 40 μL 加え 10 分間静置した。その後、上清 30 μL をシーケンス用 96 穴プレートに移し配列解析を行った。

2-3. Survivin のクローニング

本研究でクローニングのターゲットとする遺伝子は Survivin-α である。Survivin アイソマーはスプライシングバリエーションに因るものと考えており、開始コドンや終止コドン側は非常に類似した配列であるため、正常な PCR では Survivin-α のみを特異的に増幅することは困難であった。そのため本研究では、Overlap Extension PCR(OEPCR)を用いた Survivin-α の特異的な増幅を行った。この OEPCR の概略図を Fig. 1 に示す。

はじめに、3 組のプライマーを用いた Primary PCR によって、目的となる Survivin-α を Target A、Cassette、Target B の 3 領域を増幅した。PCR チューブに、10×EX Taq Buffer 2 μL、dNTP Mixture 1.6 μL、Fw Primer 1.0 μL、Rv Primer 1.0 μL、Ex Taq polymerase (H.S.) 1.0 μL、D₂W 11.4 μL、cDNA 溶液 2 μL を加え、PCR 反応溶液を作製した。ネガティブコントロールとして cDNA の代わりに D₂W を用いて行った。ここで用いるプライマーは Survivin-α に特異的な配列から増幅するように設計し、各断片の末端には隣り合う断片と相補的になるように付加した。使用したプライマーの配列は、Target A (Fig. 1 の a 及び b、Fw:5'-ATGGGTGCCC CGACGTTG-3'、Rv:5'-CAGAAGAAACACTGGGCCAAGT CTGGC-3')、Cassette (Fig. 1 の c 及び d、Fw:5'-GGCCCA GTGTTTCTTCTGCTTCAAGGA-3'、Rv:5'-TCAAATCTTT

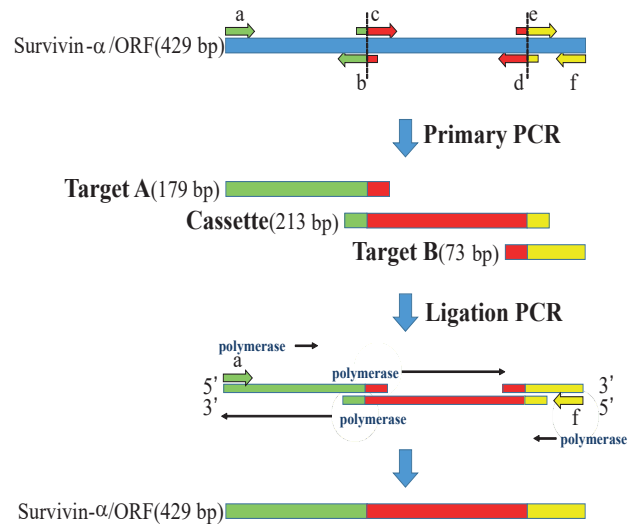


Fig. 1 OEPCR の概略図

CTTCTTATTGTTGGTT-3')、Target B (Fig. 1 の e 及び f、Fw:5'-TAAGAAGAAAGAATTTGAGGAAACTGT-3'、Rv:5'-TCAATCCATGGCAGCCAG-3') である。反応条件は、94 °C 1 min (初期熱変性)、94 °C 30 sec (増幅：熱変性)、55 °C 30 sec (target A)、50 °C 30 sec (cassette, target B) (増幅：アニーリング)、72 °C 1 min (増幅：伸長反応)、72 °C 1 min (最終伸長反応)、4 °C ∞ min (保存) で増幅反応は 35 サイクル行った。反応後、4.0 %アガロースゲルで確認を行い、バンドの切り出し及び QIAquick Gel Extraction Kit による精製を行った。

次に、得られた 3 種類の Primary PCR 産物 (Target A, Cassette, Target B) をモル比が等量になるように混合し、Survivin-α の全長を増幅するプライマーを用いて Ligation PCR を行った。PCR チューブに、10×EX Taq Buffer 2 μL、dNTP Mixture 1.6 μL、Fw Primer 1.0 μL、Re Primer 1.0 μL Ex Taq polymerase (H.S.) 1.0 μL、D₂W 11.4 μL、3 種類の Primary PCR 産物 (Target A, Cassette, Target B) を等量混合した溶液 2 μL を加え、PCR 反応溶液を作製した。ネガティブコントロールとして、Primary PCR 産物を等量混合した溶液の代わりに、D₂W を用いて行った。プライマーは上記に示した Target A の Fw プライマー (Fig. 1 の a) と Target B の Rv プライマー (Fig. 1 の f) を使用した。反応条件は、94 °C 1 min (初期熱変性)、94 °C 30 sec (増幅：熱変性)、55 °C 30 sec (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 ∞ min (保存) で、増幅反応は 35 サイクル行った。反応後、2.0 %アガロースゲルで確認を行い、バンドの切り出し及び QIAquick Gel Extraction Kit による精製を行った。また、シーケンス解析による配列確認を行った。プライマーは Ligation PCR と同じものを用いて、同様の条件で行った。

2-4. 発現用ベクターの構築

はじめに、In-Fusion に用いるためのベクターの線状化を行った。pAS1 ベクターは NcoI、pACTII は BamHI を用

いて制限酵素処理した。マイクロチューブに pAS1 ベクターにおいては、D₂W 76 μ L、10 \times K buffer 10 μ L、BSA 10 μ L、NcoI 5 μ L、pAS1 溶液 1 μ L を混合、pACTII ベクターにおいては D₂W 76 μ L、10 \times K buffer 10 μ L、BamHI 5 μ L、pACTII 溶液 1 μ L を混合し、オーバーナイトで制限酵素処理による線状化を行った。その後アガロースゲル電気泳動を行い、バンドの切り出し及び QIAquick Gel Extraction Kit による精製を行った。

次に、In-Fusion 用に用いるために、HBXIP ORF 及び Survivin- α ORF の末端への 15 塩基の付加反応を行った。PCR チューブに、10 \times EX Taq Buffer 2 μ L、dNTP Mixture 1.6 μ L、Fw Primer 1.0 μ L、Re Primer 1.0 μ L Ex Taq polymerase (H.S.) 1.0 μ L、D₂W 11.4 μ L、cDNA 溶液 2 μ L を加え、PCR 反応溶液を作製した。ネガティブコントロールとして cDNA の代わりに D₂W を用いて行った。プライマーには、HBXIP (In-Fusion) (Fw:5'-GGTCATATGGCCATGATGGAGGCGACCTTGA-3', Rv:5'-CCCGGGGCCTCCATCTTAAGAGGCCATTTTGTGCA-3'), Survivin (In-Fusion) (Fw:5'-GAGGCCCGGGGATCGGTGCCCGACGTTG-3', Rv:5'-CTTCGAATTCGATCATCCATGGCAGCCAG-3') を使用した。反応条件は、94 $^{\circ}$ C 1 min (初期熱変性)、94 $^{\circ}$ C 30 sec (増幅:熱変性)、62 $^{\circ}$ C 30 sec (HBXIP ORF)、60 $^{\circ}$ C 30 sec (Survivin- α ORF) (増幅:アニーリング)、72 $^{\circ}$ C 1 min (増幅:伸長反応)、72 $^{\circ}$ C 2 min (最終伸長反応)、4 $^{\circ}$ C ∞ min (保存) で、増幅反応は 35 サイクル行った。その後アガロースゲル電気泳動を行い、バンドの切り出し及び精製を行った。

次に、作製した線状化ベクター 1 μ L と In-Fusion 用のインサートの溶液 2 μ L を混合し、5 \times In-Fusion Enzyme Premix 2 μ L、D₂W 5 μ L を加え、50 $^{\circ}$ C で 15 分間 In-Fusion 反応を行った。これにより、Fig. 2 に示す pAS1-HBXIP および、Fig. 3 に示す pACTII-Survivin を構築した。

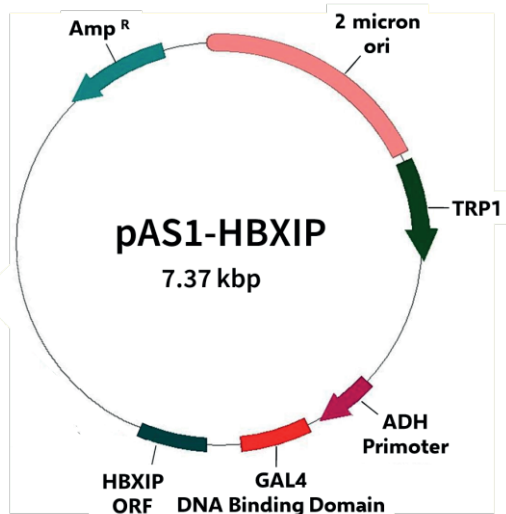


Fig. 2 pAS1-HBXIP

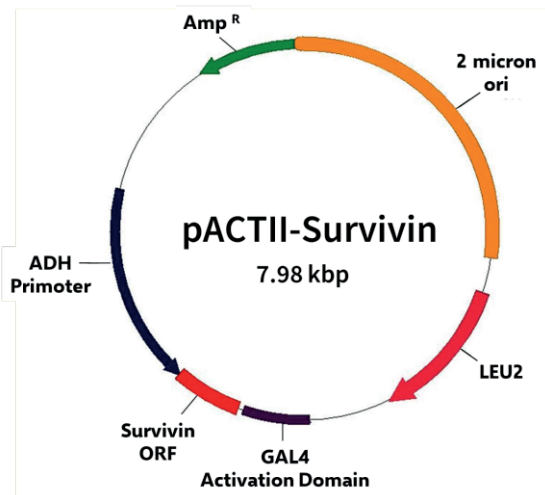


Fig. 3 pACTII-Survivin

2-5. 大腸菌への形質転換及びインサート保持の確認

構築したベクターを増やすために、ヒートショック法を用いて pAS1-HBXIP 及び pACTII-Survivin- α をそれぞれ大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。LB+Amp 寒天培地に 100 μ L ずつ塗布し、37 $^{\circ}$ C で培養した。

次に、得られた形質転換体からアルカリミニプレップ法を用いてプラスミドを抽出した。この抽出したプラスミドに対して、PCR によるインサート保持の確認を行った。PCR チューブに、10 \times EX Taq Buffer 2 μ L、dNTP Mixture 1.6 μ L、Fw Primer 1.0 μ L、Re Primer 1.0 μ L Ex Taq polymerase(H.S.) 1.0 μ L、D₂W 11.4 μ L、プラスミド抽出溶液 2 μ L を加え、PCR 反応溶液を作製した。ネガティブコントロールとして、プラスミド抽出溶液の代わりに D₂W を用いて行った。プライマーは、2-2 に示した HBXIP-ORF と 2-3 に示した Survivin_human_ORF を使用した。反応条件は、2-2 および 2-3 の Ligation PCR 時と同様に行った。その後、電気泳動によってインサート保持の確認を行い、バンドの切り出し及び QIAquick Gel Extraction Kit による精製を行った。

また、シーケンス解析による配列の確認を行った。プライマーは 2-2 に示した HBXIP-ORF と 2-3 に示した Survivin_human_ORF を使用し、2-2. に示した方法と同様に行った。

2-6. 酵母への形質転換

2-5. で抽出したプラスミドを酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY3913 に形質転換を行った。本研究で作製する形質転換酵母を Fig. 4 に示す。pAS1-HBXIP と pACTII-Survivin を持つ形質転換体の他に、レポーター遺伝子の発現が、Survivin と HBXIP の相互作用によるものであることを確かめるために、コントロールとなる 3 種類の形質転換体も作製した。

Saccharomyces cerevisiae BY3913 を 5 mL の YPD 液体培地で、30 $^{\circ}$ C、12 時間培養した。培養液を遠沈管に全量移

Variations of transformants

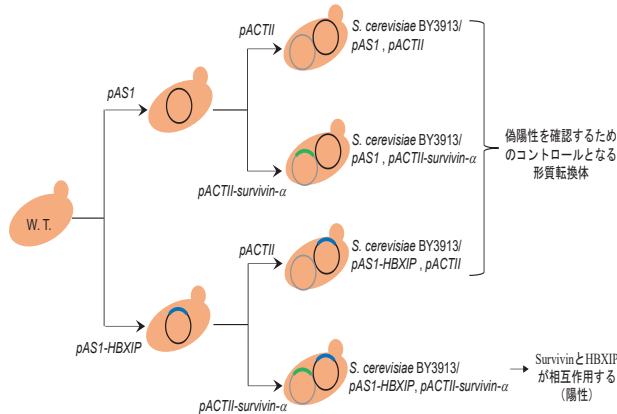


Fig. 4 形質転換体作製の概略図

し、遠心 (3,000×g、5 min、4 °C) を行った。上清を破棄し、1 M ソルビトールに懸濁し、遠心 (3,000×g、5 min、4 °C) を行い、上清を破棄する洗浄操作を 3 回行った。洗浄後のペレットを 1 mL の 1 M ソルビトールに懸濁し、500 μL ずつ 2 本のマイクロチューブに分注した。遠心 (14,000×g、10 sec、4 °C) を行い、上清を破棄した。それぞれのマイクロチューブに 50 μL の 1 M ソルビトールを加え懸濁し、40 μL ずつ別々のエレクトロポレーション用キュベットに分注した。各マイクロチューブに残った 10 μL の懸濁液はネガティブコントロールとして用いた。各キュベットにベクター溶液 (各 100 ng/μL) を 1 μL 加え、1.5 kV、5 msec の電気刺激を与えた。各キュベットに 360 μL の 1 M ソルビトールを加え再懸濁し、SC 選択培地に 100 μL ずつ塗布し、30 °C で培養した。

2-7. 3-AT アッセイ

2-6. で作製した pAS1-HBXIP と pACTII-Survivin-α を共発現させた酵母は、Fig. 5 に示すように、HBXIP と Survivin-α が相互作用すると、酵母のゲノム上の binding domain より下流の転写が活性化され、HIS3 が発現する。そのため酵母ツーハイブリッドシステムにおいて、HIS3 はヒスチジン欠損培地におけるセレクションマーカーとして機能する。この性質を利用し、HIS3 に対するレポーターアッセイである 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) アッセイを行った。3-AT はヒスチジンの生合成を阻害する物質である。酵母ツーハイブリッド法においてヒスチジンの生合成能力は偽陽性よりも陽性の方が強くなるため、偽陽性のヒスチジン合成抑制が可能な濃度の 3-AT を添加すると、陽性の酵母のみが生育することができる。

Survivin 25 mM、50 mM、75 mM、100 mM の 3-AT 溶液を調製した。SC 寒天培地溶液 155 mL、D-グルコース溶液 40 mL、各 3-AT 溶液 5 mL を混合し、3-AT アッセイ用寒天培地 (-Leu、Trp、His、+Glu) を作成した。作成した培地を 4 区画に分け、偽陽性株 3 種と陽性株 1 種をストリーキングし、30 °C にて約 1 週間の培養を行い、HBXIP と Survivin-α の相互作用を確認した。

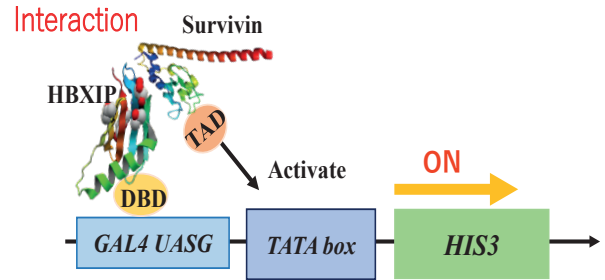


Fig. 5 ツーハイブリッド酵母による HIS3 発現の概略図

2-8. β-galactosidase アッセイ

pAS1-HBXIP と pACTII-Survivin-α を共発現させた酵母は、Fig. 6 に示すように、HBXIP と Survivin-α が相互作用により LacZ が発現する。この LacZ に対して、レポーターアッセイである β-galactosidase アッセイを行った。

野生型酵母および形質転換体 4 種類を OD600 が 1.0 程度になるまで培養した。各培養液をマイクロチューブに 1 mL 取り、遠心 (12000 rpm、4 °C、1 min) を行い、ペレットを得た。上清を除去し、1 mL の Z-buffer (62 mM リン酸水素二ナトリウム・12 水、38 mM リン酸二水素ナトリウム二水和物、10 mM 塩化カリウム、1 mM 硫酸マグネシウム七水和物、0.27% 2-メルカプトエタノール) に懸濁させ、同様に遠心分離、上清の除去を行った。再び 1 mL の Z-buffer に懸濁させ、30 °C で 5 分間静置した。Zymolyase (10 mg/mL) を 100 μL 加え、35 °C で 20 分間処理した。200 μL の ONPG 溶液 (4 mg-ONPG/mL-Z-buffer) を加え、30 °C で 2 時間反応させた。420 nm での吸光度を測定し、酵素活性を算出した。

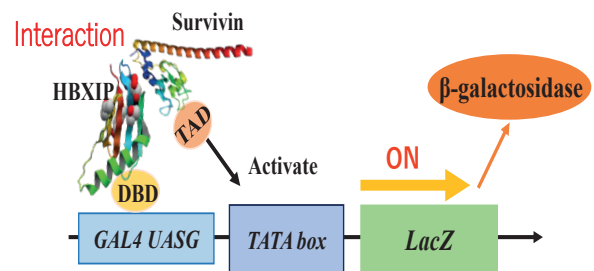


Fig. 6 ツーハイブリッド酵母による LacZ 発現の概略図

3. 結果及び考察

3-1. HBXIP ORF のクローニング

HepG2 細胞由来の cDNA を用いて、PCR で HBXIP ORF を増幅後、電気泳動を行った結果を Fig. 7 に示す。

レーン③において検出されたバンドは単一であり、HBXIP ORF の目的分子量 273 bp と近似する値が算出されたことから、HepG2細胞のcDNAからPCRによってHBXIP ORF が増幅されたことが確認できた。また、シーケンス解析の結果、NCBI における HBXIP の配列 (ACCESSION:CR542130) と、作製した PCR 産物の配列

が 100%一致した。



Fig. 7 HBXIP ORF の電気泳動結果

①:100bp DNA Ladder、②:ネガティブコントロール、
③:HBXIP ORF

3-2. Survivin のクローニング

3組のプライマーを用いた Primary PCR によって、目的となる Survivin- α の全長を Target A、Cassette、Target B の3領域として増幅し、電気泳動した結果を Fig. 8 に示す。Target A、Cassette、Target B の目的分子量はそれぞれ 179 bp、213 bp、79 bp であり、各レーンに目的分子量付近のバンドが検出された。このことから、HepG2 細胞の cDNA から各フラグメントが増幅されていることが示唆された。



Fig. 8 Primary PCR 産物の電気泳動結果

①: $\text{fx}174$ Hae III digest、②,⑤,⑧:ネガティブコントロール、
③,④:Target A、⑥,⑦:Cassette、⑨,⑩:Target B

次に、上記で得られた各断片をモル比が等量になるように混合し、Survivin- α 全長を増幅するプライマーを用いて Ligation PCR を行った。Ligation PCR 後の電気泳動結果を Fig. 9 に示す。

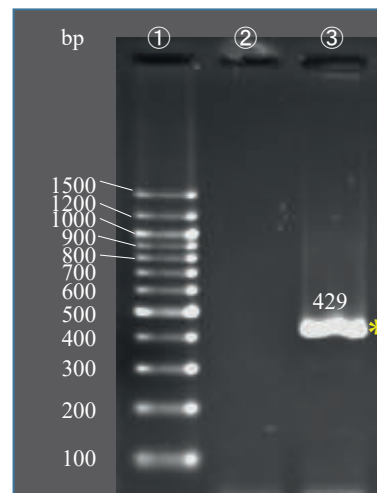


Fig. 9 Ligation PCR 産物の電気泳動結果

①: 100bp DNA Ladder、②:ネガティブコントロール、
③:Ligation PCR 産物

レーン③においてバンドが単一で検出され、Survivin- α の目的分子量である 429 bp と一致したことから、Ligation PCR によって Survivin- α が特異的に増幅されたことが確認できた。また、シーケンス解析の結果、NCBI における Survivin- α /ORF の配列 (ACCESSION:CR541740) と、Ligation PCR 産物が 100%一致した。

3-3. 形質転換大腸菌におけるインサート保持の確認

In-Fusion によって作製した pAS1-HBXIP 及び pACTII-Survivin- α を大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。作製した各形質転換大腸菌からプラスミドを抽出し、PCR を行った後の電気泳動結果を Fig. 10 に示す。

各抽出プラスミド由来の PCR 産物において、HBXIP 及び survivin-a の目的分子量付近にバンドが検出された。また、NCBI における HBXIP の配列 (ACCESSION:CR542130) 及び survivin-a/ORF の配列 (ACCESSION:CR541740) と、構築した各ベクターからの PCR 産物のシーケンス解析結果が 100%一致した。よって、pAS1-HBXIP 及び pACTII-Survivin- α が構築されていることが示唆された。



Fig. 10 インサート保持確認の PCR 後の電気泳動結果

3-4. 酵母ツーハイブリッドシステムの構築

3-3の結果より、pAS1-HBXIP と pACTII-Survivin- α が構築できたため、構築したベクターを *Saccharomyces cerevisiae* BY3913 に形質転換した。Fig. 4 に示すように、4種類の形質転換体を作製し、選択培地で培養したところ、全ての形質転換体が生育を示したことから、いずれの形質転換体にも二つのベクターが導入されていることが示唆された。しかし、ヒスチジンを欠損させた培地においても、全ての形質転換体が生育したことから、コントロールにおいてもレポータータンパク質が発現しており、偽陽性を示していることが示唆された。

そのため、HIS3 に対するレポーターアッセイである 3-AT アッセイを行った。酵母ツーハイブリッド法において、ヒスチジンの生合成能力は偽陽性よりも陽性の方が強くなることから、偽陽性のヒスチジン合成を抑制できるだけ の 3-AT を添加することで、全体のバックグラウンドが下がり、陽性の酵母のみが生育できる。この 3-AT 試験の結果を Fig. 11 に示す。

4 区画の概要は、左上が pAS1/pACTII (1,II)、右上が pAS1/pACTII-Survivin- α (1,II-S)、左下が pAS1-HBXIP/pACTII (1-H,II)、右下が pAS1-HBXIP/pACTII-Survivin- α (1-H,II-S) を形質転換したものであり、右下の陽性の形質転換体以外は本来相互作用しない偽陽性の形質転換体となっている。3-AT アッセイの結果、コントロール(0 mM) では全ての形質転換体が生育したものの、75 mM や 100 mM では、矢印で示した陽性酵母のみが生育し、偽陽性の生育が抑制されていることが観察された。このことから、陽性の形質転換体内では、HBXIP と Survivin- α が相互作用していることにより生育が促進されていることが示唆された。

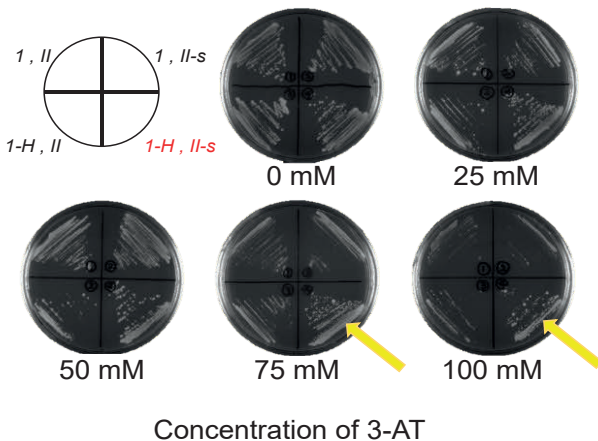


Fig. 11 3-AT アッセイの結果

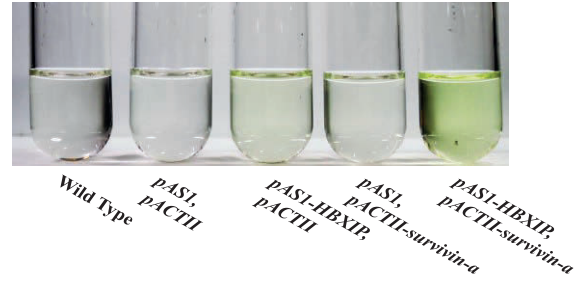
1 : pAS1, II : pACTII,

1-H : pAS1-HBXIP, II-S : pACTII-Survivin- α

3-5. β -galactosidase アッセイ結果

構築した形質転換酵母を用いて、 β -galactosidase アッセイを行った結果を Fig. 12 に示す。

(A)



(B)

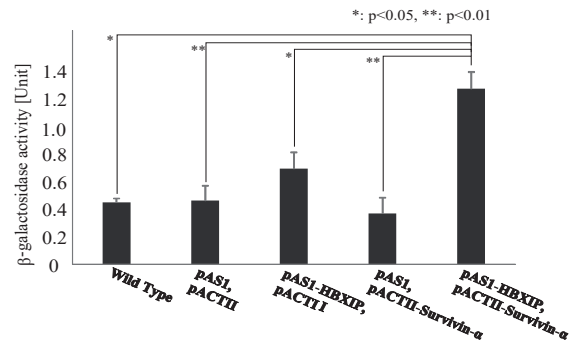


Fig. 12 β -galactosidase アッセイの結果

(A) β -galactosidase アッセイ後の溶液の写真

(B) 算出した β -galactosidase 活性

Fig. 12 (A)より、Survivin と HBXIP を発現している陽性酵母に強い黄色の呈色が見られた。また、Fig. 12 (B)に示した β -galactosidase の酵素活性を算出した結果から、野生型酵母や偽陽性の形質転換体 3 種と比較して、陽性の形質転換体はおよそ 2 倍の有意な差が確認され、Survivin と HBXIP の相互作用により、lacZ の発現量が増加していることが示唆された。

4. まとめ

Survivin- α と HBXIP が共発現するように作製した形質転換体 *S. cerevisiae* BY3913/pAS1-HBXIP, pACTII-Survivin- α は、その β -galactosidase 活性の増減を測定することにより、Survivin- α と HBXIP の相互作用を評価できると考えられた。したがって、本システムを用いることにより、Survivin- α と HBXIP との相互作用を特異的に阻害する物質のスクリーニングに利用でき、アポトーシス誘導型の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] 厚生労働省「令和 2 年(2020)人口動態統計月報年計(概数)の概況」,p.10,(2021)
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F.: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin.*, 71(3), 209-249, (2021).
- [3] Hanahan D, Weinberg RA.: Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell.*, 144(5), 646-74, (2011).
- [4] 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).
- [5] 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).
- [6] Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG: Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer, *Apoptosis*, 22(12), 1487-1509, (2017).
- [7] 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).
- [8] J. Grossmann: Molecular mechanisms of detachment-induced apoptosis—Anoikis, *Apoptosis*, 7, 247, (2002).
- [9] Domagoj Vucic and WayneJ. Fairbrother: The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer, *American Association for Cancer Research*, 13, 5995, (2007).
- [10] Sah, N.K., Seniya, C. : Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumor Biol.* 36, 6623–6631 (2015).
- [11] Wheatley SP, Altieri DC: Survivin at a glance, *J Cell Sci.*, 132(7):jcs223826, (2019).
- [12] Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, Marusawa H, Zou H, Armstrong R, Matsuzawa S, Salvesen GS, Reed JC, Altieri DC: An IAP-IAP complex inhibits apoptosis, *J Biol Chem.*, 279 (33), 34087-90, (2004).
- [13] Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR.: Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication, *J Virol.*, 72(3), 1737-43, (1998).
- [14] Xiu M, Zeng X, Shan R, Wen W, Li J, Wan R.: The oncogenic role of HBXIP, *Biomed Pharmacother.*, 133, 111045, (2021).
- [15] Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC.: HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression, *The EMBO Journal.*, 22(11), 2729-40, (2003).
- [16] Cheng, C. W. et al.: PIN1 inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma through modulation of the antiapoptotic function of survivin, *American Journal of Pathology*, 182, 765–775, (2013).
- [17] Xu-Hui Zhang, Mahadev Rao, Joseph A. Loprieato, Julie A. Hong, Ming Zhao, Guo-Zhu Chen, Ashley E. Humphries, 2Dao 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).

工学教育研究推進機構運営会議

議長 上平 員丈

| | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 構成委員 | 木村 茂雄 | 河原崎徳之 | 栗原 誠 | 納富 一宏 | 馬嶋 正隆 |
| | 黄 啓新 | 高村 岳樹 | 山口 淳一 | 小池あゆみ | 岡崎 美蘭 |
| | 高橋 勝美 | 一色 正男 | 井上 秀雄 | 兵頭 和人 | 山家 敏彦 |
| | 塩川 茂樹 | 工藤 嗣友 | 脇田 敏裕 | 野田 毅 | 吉満 俊拓 |
| | 高橋 正雄 | 三井 和博 | 星野 潤 | 井藤 晴久 | |

神奈川工科大学研究報告

B-46 理工学編 通巻 46 号

令和 4 年 3 月 1 日 発行

編集兼発行者 神 奈 川 工 科 大 学

〒 243-0292 神奈川県厚木市下荻野1030

電 話 046-241-6221

印 刷 者 株式会社スクールパートナーズ

当該研究報告に掲載された論文の著作権は本学に帰属する。