

137. 脱リン酸化型 Parafibromin 発現マウスの *in vivo* 発がん解析

高橋 昌史

東京大学 大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 微生物学教室

Key words : *HRPT2/Hrpt2* 遺伝子, Parafibromin, SHP2 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase), Wnt シグナル伝達経路, PAF (RNA polymerase II-associated factor) 複合体

緒言

研究の背景：ヒト *HRPT2* 遺伝子によりコードされる Parafibromin (CDC73) は、遺伝子発現を制御する PAF (RNA polymerase II-associated factor) 複合体の主要構成分子であり、全身性に発現する核内タンパク質である。副甲状腺がんを好発する遺伝性の副甲状腺機能亢進症-顎腫瘍症候群 (Hyperparathyroidism-jaw tumor (HPT-JT) syndrome) および弧発性副甲状腺がんの7割強の症例および小児腎臓がんにおいて、Parafibromin のC 端側欠失を生じる *HRPT2* 遺伝子変異が報告されている。しかしながら、*Hrpt2* 遺伝子のホモ接合型ノックアウトマウスが急性致死を引き起こすことから、*Hrpt2* 欠損の発がんにおける役割は未だマウスを用いて解析されていない。一方で、著者は、Parafibromin が細胞内で Y290/Y293/Y315 にチロシンリン酸化修飾を受けることを見出し、がんタンパク質であるチロシンホスファターゼ SHP2 によって脱リン酸化されることを明らかにした。さらに、チロシン脱リン酸化された Parafibromin が β -catenin と複合体を形成し、Wnt 経路の標的遺伝子を転写誘導することを明らかにし、がん抑制タンパク質として理解されていた Parafibromin が、SHP2 によるチロシン脱リン酸化に依存して、発がん促進活性を獲得する機構を報告した (図1) ¹⁾。しかしながら、「チロシン脱リン酸化による Parafibromin の機能転換」が発がんに果たす役割は不明であり、*Hrpt2*/Parafibromin 改変マウスによる *in vivo* 発がん解析が急務となっていた。

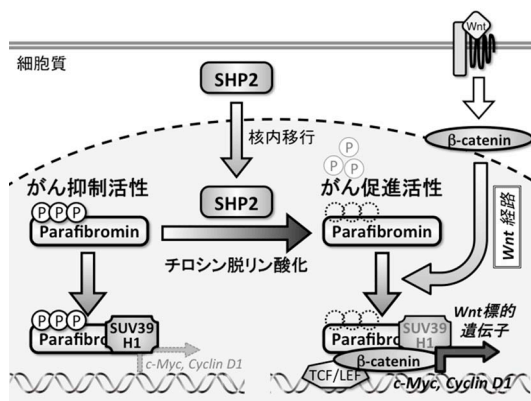


図1. SHP2 チロシンホスファターゼによる Parafibromin の脱リン酸化を介した Wnt 経路標的遺伝子の転写活性化
PAF 複合体の主要構成分子である核内タンパク質 Parafibromin は SHP2 によりチロシン脱リン酸化され、 β -catenin と複合体を形成することで Wnt 経路の標的遺伝子の転写を活性化する。副甲状腺のがん抑制タンパク質として知られる Parafibromin は、SHP2 および核内チロシンキナーゼによりチロシンリン酸化状態の調節を受けることで、細胞内での機能が変化すると考えられる。SHP2 は細胞質で Ras-ERK 経路を活性化するチロシンホスファターゼとして知られているが、Hippo シグナルに依存して核内に移行することが明らかにされている²⁾。

研究の目的：SHP2によりチロシン脱リン酸化された Parafibromin を模倣することで機能亢進型分子として振舞う「チロシンリン酸化耐性型 Parafibromin^{Y290F/Y293F} (Parafibromin^{YF})」を発現する *Hrpt2*^{YF} ノックインマウスを作出する (図2)。副甲状腺がんて単離される機能欠損型変異 Parafibromin を模倣する「C 端側欠失型 Parafibromin (Parafibromin^{ΔC})」を発現する *Hrpt2*^{ΔC-LSL} ノックインマウスを作出する (図2)。これらの変異 *Hrpt2* ノックインマウスのがんの発症に着目した表現型解析を並行して進めることで、Parafibromin のチロシン脱リン酸化が Parafibromin の発がん促進性機能／発がん抑制性機能に果たす役割を明らかにする。

方法

機能亢進型 Parafibromin をコードする *Hrpt2*^{LSL-YF} ノックインアレルを持つマウスを Cre 組換え酵素発現マウスおよび FLP 組換え酵素発現マウスと交配し、得られたコンパウンドマウスの表現型を解析する。

C 端側欠失型 Parafibromin を構成的に発現する *Hrpt2*^{ΔC-LSL} アレルを持つノックインマウスを作出し、表現型解析を行う。

マウスの遺伝子型は、尾端断片より抽出・精製した各個体のゲノム DNA を各遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅し、得られた PCR 産物のアガロース電気泳動およびシーケンス解析を行うことで判定した。

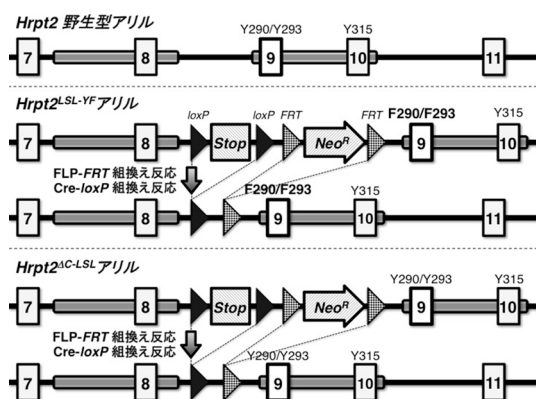


図2. Cre/FLP 組換え酵素に依存したコンディショナル発現型 *Hrpt2*^{LSL-YF} ノックインアレルならびに構成的発現型 *Hrpt2*^{ΔC-LSL} ノックインアレルの構造

上段：Parafibromin をコードする *Hrpt2* 遺伝子の野生型アレルを示す。

中段：コンディショナル発現型 *Hrpt2*^{LSL-YF} ノックインアレルを示す。Cre/FLP 組換え酵素によって、loxP 間/FRT 間の転写終結配列を含む DNA 領域が除去され、Parafibromin^{Y290F/Y293F} が発現する。

下段：構成的発現型 *Hrpt2*^{ΔC-LSL} ノックインアレルを示す。Cre/FLP 組換え酵素非存在時には構成的に Parafibromin^{ΔC-LSL} を発現する。Cre/FLP 組換え酵素が共に存在する時には、野生型 Parafibromin を発現する。Y290、Y293、Y315：Parafibromin のチロシンリン酸化／脱リン酸化部位、Stop：転写終結配列、Neo^R：ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット（転写終結配列を含む）。

結果および考察

Hrpt2^{LSL-YF} アレルをヘテロ接合型で持つ F1 個体を兄妹交配したが、この YF 変異型 *Hrpt2* アレルをホモ接合型で持つ個体は得られなかった。同様の交配を YF 点変異を持たない *Hrpt2*^{ΔC-LSL} アレルを持つ F1 マウスについても行ったが、ホモ接合型個体は得られなかった。

全身性の *Hrpt2* 遺伝子の構成的ノックアウトがマウス個体に発生過程における胎生致死を引き起こすことから³⁾、Parafibromin の C 端側（エキソン 9 以降がコードする C 端側領域）はマウスの個体発生に不可欠な役割を持つことが

推察された。ここで示したC端側領域には、酵母のParafibromin オルソログである cdc73p からヒト Parafibromin まで種間で保存された PAF 複合体の形成に関わる部位が含まれることから、これらのC端側欠失型 *Hrpt2* 変異マウスで見られる胎生致死に PAF 複合体の形成異常/機能異常が関与する可能性も考えられる。

Hrpt2^{LSL-YF} アリルをヘテロ接合型で持つ個体と全身性に FLP を構成的に発現するトランスジェニックマウスを交配した結果、予想に反して、変異 *Hrpt2* アリルと *FLP* 遺伝子を両方持つコンパウンド個体は得られなかった。この結果は、全身性に Cre を構成的に発現するトランスジェニックマウスを用いた際にも同様であった。一方で、YF 点変異を持たない *Hrpt2^{ΔC/LSL}* アリルのヘテロ接合型個体を用いた同様の交配実験では、変異 *Hrpt2* アリルと *FLP* 遺伝子または Cre 遺伝子を共に持つコンパウンド個体が得られた。

これらの結果から、*FLP* 遺伝子または Cre 遺伝子を持つ個体では、*Hrpt2* 遺伝子の YF 点変異の存在に依存した致死性の発生異常が誘導されることが示唆された。本研究で用いた変異 *Hrpt2* ノックインアリルには、転写終結配列がそれぞれ *loxP* 配列間および *FRT* 配列間に存在する。*Hrpt2^{LSL-YF}* アリルと Cre 遺伝子あるいは *FLP* 遺伝子を共に持つ個体では、組換え反応を経て上記のうち一方の転写終結配列が除去される。以上から、Cre/FLP による組換え反応が *Hrpt2^{YF}*-mRNA 前駆体の転写のリークを引き起こし、その結果スプライシングと翻訳を介して産生する Parafibromin^{YF} が致死性の表現型を与えたと推察するが、詳細は不明である。

上記の致死性の発生異常を回避するために、タモキシフェン投与依存的に全身性で FLP 組換え酵素を誘導発現する *FLP-ERT2* トランスジェニックマウスを用いて同様に交配を進めた結果、*Hrpt2^{LSL-YF}* アリルと *FLP-ERT2* 遺伝子を共に持つコンパウンド個体を得ることに成功した。現在、このコンパウンド個体にタモキシフェンを腹腔内投与した後、表現型の出現の有無を継続的に観察している。

タモキシフェン投与依存的に全身性で Cre 組換え酵素を誘導発現する *Cre-ERT2* トランスジェニックマウスを交配に用いた場合も同様に *Hrpt2^{LSL-YF}* アリルを持つコンパウンド個体が得られることが予想される（現在 実施中）。

C 端側欠失型 Parafibromin を構成的に発現する *Hrpt2^{ΔC/LSL}* ヘテロ接合型ノックインマウスを継続的に飼育した結果、約 80 週齢で病変を発症する個体が観察された。現在、観察された病変の病理学的診断を進めるとともに、病変発症への *Hrpt2^{ΔC/LSL}* 変異アリルおよび C 端側欠失型 Parafibromin の役割を明らかにするために、対照同腹仔の観察とともに病変部における *Hrpt2* 遺伝子のヘテロ接合性の喪失 (LOH) の有無を解析している。

共同研究者

Hrpt2 変異ノックインマウスの作製は、理研 CDB LARGE の清成寛先生のチームとの共同開発で進めた。

文 献

- 1) Takahashi A, Tsutsumi R, Kikuchi I, Obuse C, Saito Y, Seidi A, Karisch R, Fernandez M, Cho T, Ohnishi N, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Neel B G, Hatakeyama M. SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver. 2011;43(1):45-56. PubMed PMID: 21726809. doi: 10.1016.
- 2) Tsutsumi R, Masoudi M, Takahashi A, Fujii Y, Hayashi T, Kikuchi I, Satou Y, Taira M, Hatakeyama M. YAP and TAZ, Hippo signaling targets, act as a rheostat for nuclear SHP2 function. 2013;26(6):658-665. PubMed PMID:24035415. doi: 10.1016.
- 3) Wang P, Bowl M R, Bender S, Peng J, Farber L, Chen J, Ali A, Zhang Z, Alberts A S, Thakker R V, Shilatifard A, Williams B O, Teh B T. Parafibromin, a component of the human PAF complex, regulates growth factors and is required for embryonic development and survival in adult mice. 2008;28(9):2930-2940. PubMed PMID: 18212049. doi: 10.1128.