

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成10年度博士課程入学
氏名 川崎 善博
指導教官名 秋山 徹

論文題目 癌抑制遺伝子産物 APC による G 蛋白質の制御

APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子はヒト第5番染色体 (5q21-22) に存在し、家族性腺腫性ポリポーシス (familial adenomatous polyposis : FAP ; 大腸に数百～数千の腺腫が発生し、大腸癌に進展する常染色体優性の遺伝性疾患) の原因遺伝子として1991年に単離された癌抑制遺伝子である。さらに、APC 遺伝子の不活性化は FAP 家系の腺腫や大腸癌だけでなく、散発性の大腸癌においても高頻度に見出されることが明らかになっている。APC 遺伝子産物は約 300kD の巨大な蛋白質で、 β -カテニンの分解を誘導して癌化や形態形成に重要な役割を果たす Wnt/Wingless シグナル伝達経路を負に制御していることが良く知られている。また、培養細胞に APC を過剰発現すると細胞周期の G1 期から S 期への進行が阻害されることも見出されている。

本研究では、APC の機能をさらに明らかにするためにヒトから *C.elegans* まで最もよく保存されている APC のアルマジロモチーフを bait としてヒト胎児脳の cDNA ライブラリーを用いて、yeast two-hybrid system を行い、APC 結合蛋白質をコードする遺伝子を検索した。その結果、低分子量 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) の Rho ファミリーに対するヌクレオチド交換因子 (GEF) をコードする遺伝子を新たに見出し Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) と命名した。

1. Asefの構造

Asef 遺伝子産物は 619 アミノ酸から成る約 85kD の蛋白質で、アミノ末端側に蛋白質-蛋白質相互作用を担う SH3(Src homology 3)ドメイン、中央に低分子量 GTP 結合蛋白質の Rho ファミリーに対するヌクレオチド交換反応を行う DH(Dbl homology)ドメイン、カルボキシル末端側に細胞膜への局在に関与していると考えられている PH(Pleckstrin homology)ドメインが存在する。DH ドメインをもつ蛋白質は多数知られており、癌遺伝子 Dbl の産物をはじめ発癌性をもつものが多い。

2. Asefは APC と複合体を形成する

まず、*in vitro*での pull down assay により APC と Asef の結合が直接的であることを確認し、さらに APC との結合領域が SH3 ドメインよりもさらにアミノ末端側に存在することを見出した。また、ラット胚脳の組織溶解液上澄を用いた免疫沈降及びウエスタン-ブロッティングにより APC と Asef が実際に生体内において結合していることも確認した。大変興味深いことに、APC/Asef 複合体にはβ-カテニンも含まれており 3 者複合体を形成していると考えられた。さらに、マウスの腸管上皮や神経細胞において APC、Asef の局在が一致していることを蛍光免疫組織化学及び免疫電子顕微鏡により示した。

3. Asefは Rac 特異的な GEF である

次に、Asef はアミノ酸配列から低分子量 GTP 結合蛋白質の Rho ファミリーに対するヌクレオチド交換因子 (GEF) であることが推測された為、*in vitro*で RhoA、Rac1、Cdc42 と結合するかどうか検討した。その結果、Asef は RhoA と Rac1 に結合することが明らかになった。したがって、Asef は RhoA と Rac1 に対する GEF であると推察された。そこでまず、全長の Asef を用いて *in vitro*において GEF 活性を調べたところ、弱い活性しか認められなかった。そこで、一般に DH ドメインを含む Dbl ファミリー (RhoGEF) はアミノ末端領域の欠失により活性化されることが知られているので、APC 結合領域を含むアミノ末端領域の欠失変異体 (Asef Δ APC) を作製し、再び *in vitro*において GEF 活性を測定した。その結果予想通り、Asef Δ APC は時間依存的及び濃度依存的に Rac1 のみに強い GEF 活性を示すことが明らかになった。一方、RhoA 及び Cdc42 に対して GEF 活性は認められなかった。これらの事実から、Asef は Rac1 に特異的な GEF として機能し、APC 結合領域を含むアミノ末端領域によりその活性が負に制御されていると考えられた。

4. APC は Asef を活性化する

さらに、APC/Asef 複合体形成の生理的意義を解明するために APC が Asef の GEF 活性に与える影響を調べた。その結果、大変興味深いことに *in vitro* において APC は濃度依存的に Asef の GEF 活性を活性化することを見出した。APC が Asef のアミノ末端領域に結合することにより、アミノ末端による GEF 活性の負の制御がはずれ活性化が引き起こされると考えられる。

5. Asef はアクチンネットワークの変化を引き起こす

Rac が活性化するとアクチン細胞骨格系の制御を通してラッフリングやラメリポディアの形成を誘導し形態変化や細胞運動を引き起こすことは良く知られている。そこで、この種の実験によく使われるイヌの腎尿細管上皮由来の MDCK 細胞を用いて、Asef の細胞形態に及ぼす作用について調べた。

まず、MDCK 細胞に全長の Asef を強制発現すると細胞膜のラッフリングやラメリポディアの形成が観察された。そこへさらに、APC も強制発現すると、*in vitro* での結果から予想された通り、より顕著にかつ巨大なラッフリングやラメリポディアの形成がみられた。この Asef と APC を共に強制発現した場合の形態変化の度合は、活性化型の Asef (Asef Δ APC) を強制発現した時とほぼ同じレベルであった。このように、MDCK 細胞において APC は Asef を介した細胞膜のラッフリングやラメリポディアの形成を誘導することが明らかになった。さらに、Asef の GEF 活性が APC により制御されていることを確認するために、Asef の APC 結合領域のみを含む **deletion mutant** を同時に発現すると、期待通り APC による細胞膜のラッフリングやラメリポディアの形成が抑えられた。これらの実験で強制発現した Asef と APC の細胞内における局在を蛍光免疫染色により検討すると、両者とも細胞質、ラッフリング膜、さらに細胞内でも他の細胞と接触していない縁に存在していることが明らかになった。一方、Nelson らが報告しているように、移動している細胞の先端部の微小管末端近傍に APC 蛋白質は濃縮して存在しているが、Asef を強制発現するとこのような APC の局在は観察されなくなった。

6. APC/Asef 複合体と細胞運動

本研究で得られた知見から、APC は Asef を介して低分子量 GTP 結合蛋白質のシグナル伝達経路を活性化することによりアクチン細胞骨格系のネットワークを制御し、細胞運動の制御に重要な働きをしている可能性があると考えられる。事実、時間経過を追って観察すると Asef は細胞運動を顕著に活性化するはたらきがあることが明らかになった。腸管では crypt に存在する stem cell が分裂して、生じた娘細胞が上方へ移動するに従って分裂を止め分化して消化

吸収に携わり最終的に繊毛の先端から脱落していくが、この過程に APC/Asef 複合体が関与している可能性がある。FAP 症例や一般の大腸癌で見られる APC 遺伝子の異常はほとんどが 5'側半分に集中しており、フレームシフト変異やナンセンス点突然変異により終始コドンが生じ、短い遺伝子産物ができることが特徴である。もし、APC に変異が生じて Asef との結合能を失えば細胞運動が正常に起こらなくなり大腸上皮細胞は crypt に留まったまま分裂を続け腺腫の形成に至ると考えることができる。アルマジロモチーフの下流で欠失している場合には Asef との結合は起こるが、 β -カテニン・微小管・DLG との結合ドメインを欠失している場合が多い。APC がこれらの蛋白質と結合することが Asef を適切な場所へ局在させるために重要であると考え、Asef が適切な場所に局在することができず、大腸上皮細胞の運動能が損なわれるのではないかと想像することができる。

さらに、APC と Asef は神経細胞の細胞体、シナプスにおいても局在が一致していることから、神経細胞の運動やシナプスでのシグナル伝達にも関与している可能性があると推測される。

APC には様々な蛋白質が結合し、APC の生体内における生理機能は多岐にわたっていると予想されるが、まだその一端が解明されたにすぎない。今回の Asef の発見によって、APC と低分子量 GTP 結合蛋白質を結ぶ新たな制御機構が明らかになった。さらに今後、Asef ノックアウトマウスの解析、あるいは関係するシグナル伝達分子の同定、解析を行うことにより、細胞運動・細胞骨格の新しい制御機構の実体が明らかになることが期待される。