

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川 崎 善 博

APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子は家族性大腸腺腫症 (FAP) の原因遺伝子として単離された癌抑制遺伝子で、大腸癌の 70 – 80 % の症例で変異が見出される。APC 遺伝子産物は β -catenin や Axin 等と結合することにより β -catenin のユビキチン-プロテアソーム依存的分解を誘導し、形態形成や発癌機構に重要な役割を果たすことで知られている Wnt/Wingless シグナル伝達経路を負に制御することが明らかとなっている。しかし、APC 遺伝子産物はヒトから線虫まで最も高度に保存されたアルマジロモチーフを有しており、この領域が生物学的に大変重要な機能を担っている可能性があると考えられている。本論文は、APC がアルマジロリピートを介して低分子量 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) と結合しアクチンネットワークの制御に関与していることを示したものである。

第 1 章では、APC に関する基礎的な知見をまとめ本論文の目的を述べた。

第 2 章では、APC のアルマジロリピートドメインを bait とする yeast two-hybrid screening により新規の GEF が APC に結合することを明らかにし Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) と命名した。Asef 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。in vitro および in vivo の pull-down assay により APC のアルマジロリピートと Asef のアミノ末端領域が直接結合することを明らかにし、さらに 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ことを見出した。また、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。

第 3 章では、Asef が APC によって活性化される Rac 特異的な GEF で、アクチンネットワークの再編成、細胞の運動性の制御に関与することを明らかにした。まず、Asef は RhoA と Rac1 に結合することを明らかにし、Rac1 に対しては GEF 活性を示すことを見出した。すなわち、全長の Asef は弱い活性しか示さないが APC 存在下では強い GEF 活性を示すことを見出された。また、APC 結合領域の欠失変異体 (Asef Δ APC) は APC 非存在下でも Rac1 に強い GEF 活性を示した。以上の結果から、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た。

Asef の細胞形態への作用を明らかにするためイヌ腎尿細管上皮由来の MDCK 細胞に 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。さらに、APCも同時に強制発現するとより顕著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。さらにAsef Δ APCを発現したMDCK細胞を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と推測された。APCの変異により細胞運動が正常に起こらなくなると大腸上皮細胞は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。

以上、本論文はAPC結合蛋白質Asefの解析によりAPCと低分子量GTP結合蛋白質、細胞骨格を結ぶ新たな制御機構を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の単位論文として価値あるものと認めた。