

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成10年度博士課程進学

氏名 小山 亮

指導教官名 秋山 徹

## 論文題目

### 癌抑制遺伝子 APC によるユビキチンシステムの制御

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ある。APC 遺伝子の変異は FAP のみにとどまらず、非遺伝性の大腸腺腫や大腸癌の発生にも寄与していることが示されている。APC 遺伝子産物は $\beta$ -catenin や Axin 等と結合することにより $\beta$ -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 遺伝子産物は人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。そこで本研究室において、APC のアミノ酸453~767に存在する7回反復型アルマジロモチーフをベイトとして用いた yeast two-hybrid screening を行った。その結果、ヒト成人脳ライブラリーからリングフィンガーモチーフを有し、ゴルジ体と小胞体の膜上に局在することが示されていた細胞内蛋白質 Neurodap1 を、ヒト胎児脳ライブラリーからゴルジ体の層板構造を維持するのに必須とされている細胞内蛋白質 Giantin を取得した。したがって現在までに全く報告がなかったが、APC がゴルジ体や小胞体においても機能していることが示唆された。

ユビキチンシステムは E1, E2, E3 と呼ばれる3種類の酵素群の働きによって蛋白質のリシン側鎖にユビキチン分子が付加される反応である。時期を得てか

つ選択的にユビキチンを付加された基質蛋白質は、プロテアソームによって ATP 依存的に分解される。その反応系の中で最も重要と考えられているのは標的蛋白質にユビキチンを結合させる反応を触媒する酵素 E3、ユビキチンプロテインライゲースである。最近の知見から大部分の E3 複合体はリングフィンガーモチーフを有する蛋白質を複合体の一部として含むことが明らかとなってきたが、その中には単独で E3 として機能するリングフィンガータイプのユビキチンライゲースも存在する。前述の APC 結合蛋白質 Neurodap1 もこのタイプに属するユビキチンライゲースであると判断してこの分子の解析を進めた。本研究においてはリングフィンガーモチーフ自体がその基質に親和性を持ち、基質特異性を決定しているという仮説を元にその基質を探索した。その結果、前述の APC 結合蛋白質であるゴルジ体の構造蛋白質 Giantin を基質候補として取得した。

Giantin は主としてゴルジ体に局在する 1 回膜貫通蛋白質でコイルドコイル構造に富み、ロッド上に伸びた細胞質ドメインを大きく細胞質側に突き出している。ゴルジ体と小胞体とを結んでいる COP I 小胞にも局在していることが確認され、ゴルジ体と小胞体間の小胞輸送に関与していることが既に示されていた分子である。現在までに Giantin のユビキチン化の報告はなかったが、実際に Neurodap1 のリングフィンガー依存的にユビキチン化され、プロテアソームによって分解されることを示した。また、Neurodap1 と Giantin は共に生体内において APC と複合体を形成していることが判明し、APC-Neurodap1-Giantin の三者複合体を形成することを示した。加えて APC のアルマジロモチーフに結合した Neurodap1 は細胞内において自己ユビキチン化が抑制され、安定化することが判明した。したがって Neurodap1-Giantin ユビキチン反応系において、APC はそれを促進する効果があると結論した。

#### 1) APC と直接結合するリングフィンガータイプのユビキチンライゲース Neurodap1

APC と Neurodap1 との直接結合を示すために GST pull-down assay を行ったところ、両者の直接結合が確認できた。続いて *in vitro* ubiquitination assay 系を用いて Neurodap1 のユビキチンライゲース活性を評価した結果、E2 であるユビキチン結合酵素 UbcH5C 依存的にその活性を示すことが判明した。またそのライゲース活性はリングフィンガーのコンセンサス配列を点変異で破壊した変異体においては観察されなかった。また、Neurodap1 を 293T 細胞において強制発現させたところ、細胞が接着能を失いシャーレから剥がれていく現象が観察された。この現象は前述の変異体では観察されなかったことから、Neurodap1 の

ユビキチン化の標的基質は細胞接着分子、またはそれを輸送する蛋白質であると推測した。Neurodap1 の局在はゴルジ体と小胞体が主であるという報告と合わせて判断すると、後者の可能性が高いと考えられた。

## 2) Neurodap1 の標的蛋白質 Giantin の同定

リングフィンガーモチーフは近年 E2 結合部位として認識されてきているが、リングフィンガーのキメラ実験の報告や構造学的な知見から私はリングフィンガー自体がその基質に親和性を有すると仮説をたて、Neurodap1 のリングフィンガー領域 71 アミノ酸をベイトとした yeast two-hybrid screening を行った。その結果、ヒト胎児脳ライブラリーから Giantin をコードする cDNA 断片を取得した。これは前述の APC のアルマジロモチーフ結合蛋白質として取得されていた遺伝子と同一であるが異なる領域をコードしていた。GST pull-down assay を行ったところ両者の直接結合を確認できた。続いて 293T 細胞を用いた両者の免疫沈降実験により細胞内における両者の結合も確認した。さらに、Neurodap1 の基質であることを示すために *in vitro* ubiquitination assay を行った結果、Giantin の効率的なユビキチン化を確認することができた。また、リングフィンガーの変異体ではそのライゲース活性を失っていた。加えて HA 標識したユビキチン発現ベクターを用いた実験の結果、293T 細胞内在性の Giantin も Neurodap1 のリングフィンガー依存的にユビキチン化されることを示した。同様に 293T 細胞に Neurodap1 を強制発現させると細胞の Giantin が速やかに分解されることを免疫染色法にて示した。よって Neurodap1 は細胞内において Giantin を標的とするユビキチンライゲースとして機能し、ゴルジ体近傍の分泌を調節していることが示唆された。前述の Neurodap1 強制発現時に細胞が剥がれてしまう現象も、細胞内において Giantin が過剰に分解されて細胞接着分子の輸送に異常が生じたことの結果であると推測した。

## 3) APC と直接結合するゴルジ蛋白質 Giantin

Neurodap1 の標的蛋白質が Giantin であることが判明したので、APC と Giantin の直接結合が重要である可能性が高いと判断した。APC と Giantin の GST pull-down assay を行った結果、両者の直接結合が確認できた。さらに Giantin の特異的抗体を作製してラット胎児脳を用いた免疫沈降実験を行った結果、両者の共沈が確認できた。この免疫沈降実験において大変明瞭な結果を得たことから、APC と Giantin は生体内において安定な複合体に含まれることが示唆された。加えて Giantin は膜貫通領域を持つゴルジ体蛋白質なので、APC がゴルジ体の膜上にも局在することを示す最初の報告となった。

## 4) Neurodap1-Giantin 分解系における APC の機能

APC が Neurodap1 と Giantin の両者に直接結合することから、APC が Neurodap1-Giantin ユビキチン反応系の制御に関与していると推測した。また、リングフィンガータイプのユビキチンライゲースは自己ユビキチン化による不安定化によってその存在量が調節されていることが報告されていたので、Neurodap1 においても同様の制御を受けている可能性があると考えた。COS7 細胞に Neurodap1 とその変異体を強制発現させて経時変化を観察した結果、野生型は速やかに発現が消失していくが変異体は変化しないことがわかった。*in vitro* ubiquitination assay においても Neurodap1 はそのリングフィンガー依存的に自己ユビキチン化することが判明していたので、Neurodap1 は自己ユビキチン化の増減によって制御されていると判断した。そこで Neurodap1 野生型と APC アルマジロモチーフを共発現させたところ、Neurodap1 の自己ユビキチン化が抑制されて半減期が顕著に長くなることが明らかとなった。したがって生体内において APC は Neurodap1 の自己ユビキチン化を抑制することによって Neurodap1 を安定化し、Giantin のユビキチン化を促進していると結論した。これは Giantin に APC が結合していることに矛盾しない仮説である。下に概念図を示す。

以上、本研究では APC がリングフィンガータイプのユビキチンライゲースとその標的基質の両者に結合して、そのユビキチン化を直接的に制御していることを証明した。また、その作用点はゴルジ体の膜上であり、APC がゴルジ体機能の制御にも関与している可能性を示した。両者とも極めて新規性の高い知見であり、APC の生物学的な機能の解析と発癌機構の解明に大きく貢献するものと期待される。

