

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小 山 亮

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 $\beta$ -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ユビキチンライゲースNeurodap1および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と複合体を形成していることを明らかにし、APCのゴルジ体や小胞体における機能を明らかにしたものである。

第1章では、APCがリングフィンガータイプのユビキチンライゲースNeurodap1と直接相互作用することを *in vitro* および *in vivo* の pull-down assay によって示した。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。

第2章では、Neurodap1の標的蛋白質を yeast two-hybrid systemを用いて検索し Giantinが基質であることを明らかにした。まず *in vitro* および *in vivo* の pull-down assay によって Neurodap1と Giantinが直接相互作用することを示した。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が示された。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。

第3章では、ゴルジ蛋白質 Giantin が APC と直接結合することをやはり *in vitro* および *in vivo* の pull-down assay によって示した。

第4章では、Neurodap1-Giantin 分解系における APC の機能を解析した。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、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明らかとなった。*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。

以上、本論文では 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。