

論文の内容の要旨

論文題目 癌抑制遺伝子産物 APC の細胞内局在化の分子機構

氏名 神保 猛

【序論】 Adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子は、家族性腺腫性ポリポーシスの原因遺伝子として単離された。本遺伝子の変異は散发性の大腸癌においても高頻度に見出され、変異の約 80%は遺伝子産物のほぼ中央部分に集中し、終止コドンが生じて短い産物を発現するのが特徴である。APC 遺伝子産物の分子レベルでの機能については、癌化や形態形成に重要な役割を果たす Wnt/Wingless シグナル伝達経路の重要な構成因子、 β -catenin に結合してプロテアソーム依存性の分解を誘導する活性をもつことが良く知られており、大腸癌で見出される変異 APC 蛋白質は β -catenin の分解を誘導する活性を失っている。これまで APC の機能は主に β -catenin との関連で研究されてきたが、APC の機能のすべてが β -catenin との関連で説明できるわけではない。最近、APC はクラスターを形成して微小管上をマイナス端からプラス端に移動し、細胞の先端部分に濃縮して存在しているというユニークな局在化現象が観察された。さらにこの APC クラスターは、細胞間の隙間を修復しようとする細胞の先端に特に濃縮されて存在することから、細胞の移動や運動性に関与すると想像できる。そこで、私はこのユニークな局在化現象に注目し、この現象が腸上皮細胞の移動や運動、或いは癌の転移・浸潤に関わる細胞運動、すなわち悪性度等、癌の細胞生物学上重要な意味があるのではないかと考え、この

局在化の分子機構の解明を試みることにした。私はここに何らかのモーター蛋白が介在するのではないかと考え、APC と結合する蛋白を検索し、微小管上を移動するモーター蛋白、KIF3A/3B のアクセサリ蛋白、KAP3 が APC に結合していることを見出した。本研究では APC、KAP3 および KIF3A/3B がどのように相互作用しているのかを中心に解析し、APC クラスター形成の分子機構と意義について検討した。

【本論】第1章 APC 結合蛋白 KAP3 の同定

Yeast two-hybrid screening により APC 結合タンパクの探索を行った結果、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーから、物質輸送の際の運び屋として働くモーター蛋白 KIF3A/B のアクセサリ蛋白、KAP3 の断片が得られた。KAP3 は、生体内ではキネシンモーター蛋白である KIF3A/3B とヘテロトリマーを形成し、物質輸送を担っていると考えられている。従って APC は KAP3 を介して KIF3A/3B と結合し、微小管上をマイナス端からプラス端に運搬される可能性が考えられた。この可能性を検討するため、先ずこれらの分子の相互作用を検討した。*In vitro* translation により合成された KAP3 は、APC のアルマジロリピート (APC-arm) と結合したが、 β -catenin と直接結合しなかった。また APC-arm は、KIF3A/3B ヘテロダイマーと直接には結合しなかった。従って、APC-arm は KAP3 を介して KAP3-KIF3A/3B 複合体と共沈することが明らかとなり、さらに domain analysis の結果から、KAP3 の arm-8, 9 および C 末の一部分と APC-arm の全体が直接結合していることが示唆された。また、イヌ腎臓尿細管上皮由来 MDCK 細胞の lysate を使用し、内在性 KAP3 と APC の結合を免疫沈降法によって検討したところ、KAP3 は APC、 β -catenin および KIF3A/3B と共沈することが判明し、これらの分子は細胞内で同じ複合体中に含まれることが示唆された。

第2章 APC クラスター形成における KAP3 の役割

これらの分子の細胞内局在を検討するため、抗 KAP3 抗体を使用した細胞免疫染色の結果、KAP3 もまた細胞先端の APC クラスターに集積して存在することが明らかになった。 β -catenin はプロテアソーム依存的な分解を受けていることが知られているため、インヒビター存在下で培養して染色を実施したところ、細胞先端における β -catenin の集積を明確に観察することができた。また β -catenin は、形態形成および癌化に重要な役割を果たすことの知られている Wnt のシグナルを受けて安定化することがわかっているため、Wnt-3a 刺激による APC クラスター中の β -catenin の集積を Wnt-3a 感受性のマウス線維芽細胞 L 細胞を用いて検討した。その結果、Wnt-3a 添加により細胞質や核内に

加えて APC クラスタ中に存在する β -catenin の量が増加した。一方、APC、KAP3 および KIF3A/3B の量は Wnt-3a 刺激で変化しなかった。これらの結果は、KAP3 と β -catenin は共に APC クラスタ中に存在し、APC クラスタにおける β -catenin の量は核内の β -catenin 量同様 Wnt シグナルによって調節されることを示している。

これまでの知見から、細胞内で APC は KAP3 を介して KIF3A/3B と結合し、微小管上をプラス端へ向かって移動する可能性が考えられる。この可能性を APC と KAP3 の結合を阻害する KAP3 変異体 (KAP3- Δ arm5) を用いて検討した。KAP3- Δ arm5 を pEGFP vector にサブクローニングして MDCK 細胞に発現させ、細胞先端における APC や β -catenin の集積が阻害されるか否かを検討した結果、KAP3- Δ arm5 発現細胞では APC および β -catenin の細胞先端への集積が認められないことが明らかになった。この結果は、APC と KAP3 の結合が APC の細胞先端への集積に重要であることを示していると考えられる。さらにこれらの結果から、APC が KAP3-KIF3A/3B を介して微小管のプラス端へ向かって運搬されるメカニズムが存在すると考えることも可能になった。

第3章 APC クラスタ形成の意義

APC クラスタが細胞の移動方向の先端に集中して観察されることから、細胞運動に関係があると推測することもできる。本可能性を検討するため、MDCK 細胞に KAP3- Δ arm5 を発現させて APC クラスタの形成を阻害し、トランスウエルチャンバーを用いた細胞運動性の検討を行った。その結果、KAP3- Δ arm5 を発現させた細胞は、vector やワイルドタイプの KAP3 を発現させた細胞と比較してチャンバーを通過した細胞が多く、細胞運動性が増加することが明らかとなった。これらの結果は、細胞運動性の調節には APC と KAP3 の相互作用が重要であることを示唆している。

大腸癌細胞における APC 遺伝子変異の大部分は中央部に集中しており、その結果として終始コドンが生じて truncated APC 断片が産生される。そこで、このような APC 断片を発現している大腸癌細胞株 SW480 や DLD-1 での APC の局在がどのようになっているかを検討したが、APC クラスタは検出されなかった。一方、これらの lysate を用いて pull-down assay を行った結果、APC はいずれの細胞株においても KAP3 および KIF3A/3B と複合体を形成していることが明らかとなった。また、大腸癌細胞において APC は、KAP3-KIF3A/3B と複合体を形成しているにもかかわらず細胞先端に集積しないのは、APC の断片化に起因する可能性も考えられる。そこで、実際の大腸癌患者で見られた変異 APC およびマウスでは癌を生じないことが報告され、MCR 下流まで含ん

だ正常型に近いと考えられている APC 断片 (APC-1866) を発現するベクターを作製し、MDCK 正常上皮細胞や DLD-1 および SW480 大腸癌細胞にトランスフェクションして APC クラスターを形成するか否かを検討した。その結果、短いタイプの変異 APC はいずれの細胞株においても細胞先端に集積しないが、APC-1866 は β -catenin と共に細胞先端に集積することが明らかになった。これらの結果から、癌細胞において APC が細胞先端に集積できないのは MCR の下流に存在するクラスター形成に重要な領域が欠失しているためであることが示唆された。

第 4 章 癌細胞における PSA の発現と意義

これまで述べたように、APC がクラスターを形成して細胞先端に移動する分子メカニズムを解明し、APC の新たな機能の解明・解析に向けての分子基盤を確率することができた。今後は生物学的意義を明確化すると共に、転移等の解明へ向けた癌細胞の運動性への関与についてさらなる検討を行っていききたい。また、このような細胞レベルの変化に関係した現象についてさらに理解するためには、細胞の運動や移動に関わる別の分子にも目を向けることも必要と考えられる。私は APC の研究と並行して、神経細胞の移動や突起伸長に関与することが報告されている polysialic acid (PSA) についても注目して検討を行った。PSA は神経細胞接着因子、NCAM 特異的に付加する糖鎖分子であり、近年、PST および STX の 2 種類の酵素が実際に PSA の生合成を担うことが明らかとなった。癌細胞における PSA 発現の意義は明確でないが、癌の悪性度（運動性）に関わっている可能性も考えられるため、癌細胞で PSA の安定発現株を作製してヌードマウスに移植し、本分子の作用についても若干の検討を行った。その結果、PSA の高発現が認められる強制発現株は、発現が見られない細胞と比較して腫瘍の生着や増殖に違いが見られ、細胞同士あるいは細胞と細胞外基質の接着にも影響を与える可能性が考えられた。細胞運動には数多くの分子が関与するため、このように一つ一つの分子についてその作用を明らかにしていくことが肝要であり、将来的には転移現象の解明へと結びつくことを期待したい。

【結論】 以上、APC の新たな機能の解明・解析に向けての分子基盤を確立した。今後は本成果をもとにさらなる研究を進め、APC の新たな生物学的意義を明確化すると共に、癌細胞の運動性、転移の解明等、APC の機能の全容が解明できることを期待したい。さらに、他の運動性関連分子にも目を向け、創薬標的となり得る分子の獲得に向けてさらなる検討を続けて行きたい。