

## 審査の結果の要旨

氏名 神 保 猛

Adenomatous polyposis coli (APC) 癌抑制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、 $\beta$ -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いる。これまで APC の機能は主に $\beta$ -catenin との関連で研究されてきたが、APC の機能のすべてが $\beta$ -catenin との関連で説明できるわけではない。例えば最近、APC が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するというユニークな局在化現象が観察され注目を集めている。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されている。本研究では、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ている。何らかのモーター蛋白が介在するのではないかとこの予測のもとに APC と結合する蛋白質を検索することにより、微小管上を移動するモーター蛋白質、KIF3A/3B のアクセサリ蛋白質、KAP3 が APC に結合していることを明らかにし、さらに APC クラスター形成の分子機構と意義について検討を行っている。

### 1. APC 結合蛋白質 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、モーター蛋白質 KIF3A/B のアクセサリ蛋白質、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質である 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 *In vitro* translation assay により検討した。その結果、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 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、 $\beta$ -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。

## 2. APC クラスタ形成における KAP3 の役割

これらの分子の細胞内局在を検討するため、細胞免疫染色を実施した結果、KAP3 もまた細胞先端の APC クラスタに集積して存在することが明らかになった。 $\beta$ -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、通常インヒビター存在下で培養し、染色を行わないと細胞先端での集積は明確に観察されないが、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  $\beta$ -catenin の量が増加した。一方、APC、KAP3 および KIF3A/3B の量は Wnt-3a 刺激で変化せず、KAP3 と  $\beta$ -catenin は共に APC クラスタ中に存在し、APC クラスタにおける  $\beta$ -catenin の量は核内の  $\beta$ -catenin 量同様 Wnt シグナルによって調節されることを示した。

また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- $\Delta$ arm5) を MDCK 細胞に発現させて検討した結果、KAP3- $\Delta$ arm5 発現細胞では APC および  $\beta$ -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。本結果は、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おり、さらに 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られた。

## 3. 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- $\Delta$ 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結果、KAP3- $\Delta$ arm5 を発現させた細胞は、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短い 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 クラスターは検出されなかった。また実際の大腸癌患者で見られた変異 APC および Axin 結合部位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、DLD-1 および SW480 細胞で発現させた結果、短い変異 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 $\beta$ -catenin と共に細胞先端に集積することが明らかになった。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。

#### 4. 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立することができた。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、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。

以上、神保猛の研究業績は、APC の新たな機能の解明・解析に向けて有用な知見をもたらすものでありものであり、今後の癌細胞生物学・医薬開発に重要な貢献をする と期待され、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと考えられた。