

## 論文の内容の要旨

論文題目

### MDCK 細胞における低分子量 G タンパク質 ARF6 による $\beta$ -catenin コヒキチン化の制御機構の解明

氏 名

松川 純

#### [ 背景 ]

ARF6 は Ras family に属する低分子量 G タンパク質の一つであり、主に上皮細胞の細胞内輸送を順行性あるいは逆行性に促進する (Fig. 1)。順行性輸送の例をあげると、胃液を産生する組織である胃底腺において、ARF6 は胃酸分泌細胞である壁細胞に特異的に存在しており、生理的な胃酸分泌刺激である histamine により活性化することで、プロトンポンプである  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase の apical membrane への移行を制御している (1)。

一方、多くの上皮細胞において ARF6 は endocytosis された受容体や細胞表面分子を含む endosome にも局在しており、clathrin 非依存的な endocytosis を促進する (逆行性輸送)。例えば、イヌ腎臓上皮細胞である MDCK 細胞を、HGF (Hepatocyte growth factor) で刺激すると、刺激依存的に ARF6 が活性化し、E-cadherin 等の細胞接着分子を endocytosis させることで細胞遊走性が高まる。この現象は細胞分散とよばれ、上皮ガンの転移・浸潤モデルとして一般的に用いられている。

このように ARF6 は一つの分子で順行性・逆行性の細胞内輸送両方を調節するが、これ

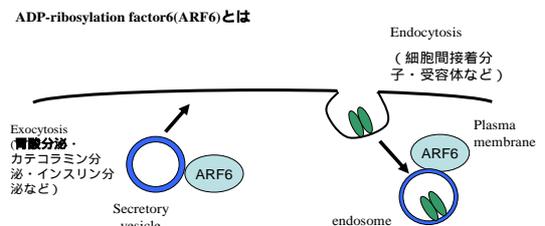


Fig. 1. ARF6 は Ras family に属する低分子量(約20 kDa)の G protein であり、主に exocytosis や endocytosis 等の細胞内輸送を担うタンパクである

までの研究は ARF6 の過剰発現系での分泌現象をモニターするといった現象論的側面からその機能を調べたものが多く、直接のエフェクター分子の探索のような詳細な分子メカニズムの解析はほとんど行われていない。

そこで本研究では ARF6 による細胞内輸送メカニズムをさらに詳細に解明するため、two-hybrid screening により ARF6 の新規エフェクター分子を探索した。その結果、CUL1 という E3 ubiquitin ligase の構成タンパクが ARF6 と結合することを見いだした。CUL1 が構成分子として含まれる SCF (Skp1-Cullin-E box protein) 型 E3 ligase の target は、主なものでは  $\beta$ -catenin や I $\kappa$ B $\alpha$  などがある。

一方、MDCK において、 $\beta$ -catenin は E-cadherin の裏打ちタンパクとして細胞間接着を強化している、HGF 刺激においては E-cadherin と同様にユビキチン化を受けて分解されることはわかっているが、そのユビキチン化がどのように制御されるのかはいまだに明らかではない。

そこで本研究では、ARF6 が CUL1 と複合体形成をするという前提に基づき、ARF6 が CUL1 を介した  $\beta$ -catenin のユビキチン化を促進することで、細胞分散の初期の段階から積極的に細胞接着分子の分解を制御する可能性を考え、以下の実験を行った。

## [ 方法と結果 ]

### (1) MDCK 細胞における ARF6 の局在

C 末端に HA-tag をつけた WT ARF6 各ならびに ARF6 mutant (Q67L, N122I) を MDCK 細胞に一過性に発現させ、免疫細胞染色を行ったところ、WT は細胞全体に様に発現し、GTPase 活性がない構成的活性化体 mutant である Q67L は細胞膜上に強く集積していた。GTP 結合能を持たない不活性型 mutant である N122I は early endosome と思われる小胞上に局在していた。

続けて WT ARF6 を一過性に発現させた MDCK 細胞を HGF (25 ng/ml) で刺激すると膜移行が観察された (Fig. 2)。さらに内在性の ARF6 を HGF 刺激前後で  $\beta$ -catenin と共染色すると、未刺激では核以外の細胞質に様に存在していたが、刺激後数時間で膜移行し、plasma membrane 上で ARF6 と  $\beta$ -catenin が共存している様子が観察された。活性型 mutant である Q67L の挙動と、HGF 刺激時の内因性 ARF6 の挙動から、HGF により活性化した ARF6 は膜移行し、 $\beta$ -catenin と共局在することが示唆された。

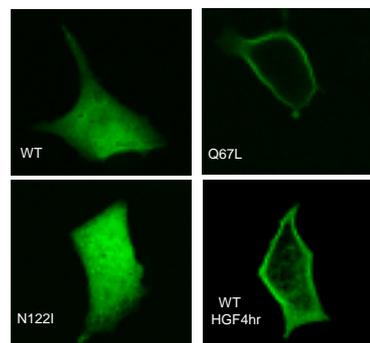


Fig. 2. MDCK細胞に一過性に発現させたARF6各変異体の細胞内局在

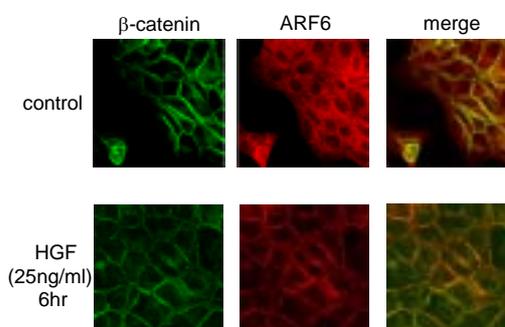


Fig. 3. MDCK細胞の内因性ARF6はHGF刺激によって膜移行し、adherence junctionに局在する $\beta$ -cateninと共局在する

## (2) MDCK 細胞における CUL1 の局在

MDCK 内在性の CUL1 を染色したところ、細胞を低密度に培養した条件では CUL1 は主に核に存在していた。この状態で HGF 刺激を加えても特に局在の変化は観察されなかった (data not shown)。一方で、細胞間接着が起こるような高密度培養をおこなうと細胞全体に一様に存在するようになった。この高密度培養条件でさらに HGF 刺激を加えると、核に存在する CUL1 がサイトゾルに放出される様子が観察された (Fig 4-a)。そこで MDCK 細胞を HGF 刺激後に subcellular fractionation を行い western blotting を

行ったところ、やはり核画分の CUL1 が減少し、cytosolic な CUL1 は増加していた。(Fig 4-b)。さらに CUL1 の細胞内局在は CUL1 の 720 番目の lysine に Nedd8 という ubiquitin like な分子が結合することで変化するという報告があるので、この残基を arginine に変化させた CUL1 (K720R)を一過性に発現させたところ、CUL1 WT に比べてこの mutant は核に強く局在していた (data not shown)。以上のことから、CUL1 は接着結合の形成が見られるような高密度培養条件下では、その局在が核のみから細胞全体へと変化するとともに、さらに HGF 刺激により Nedd8 修飾を受けてサイトゾルに放出され、E3 ligase としてのターゲット分子のユビキチン化を促進するもの考えられた。

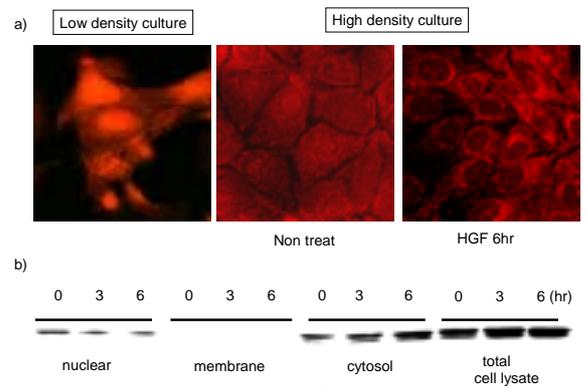


Fig. 4. MDCK細胞をHGF刺激した際のCUL1の細胞内局在の変化

## (3) ARF6-CUL1 complex 形成とβ-catenin の ubiquitin 化

内在性の ARF6 を ARF6 monoclonal antibody で HGF 刺激後に免疫沈降したところ、ARF6 と共免疫沈降する内在性 CUL1 の量は HGF 刺激後に時間依存的に増加していた (Fig. 5 の一番上のパネル)。そこで MDCK 細胞に ARF6 各 mutant と Flag-ubiquitin を共発現させ、HGF 刺激後にβ-catenin を免疫沈降し、Flag monoclonal 抗体をもちいたイムノプロットにより検出する方法で ubiquitin 化されたβ-catenin を可視化した (Fig. 6)。Flag-ubiquitin のみを発現させたコントロール群では極弱いユビキチン化が観察されたただけだったが、WT 発現下はそれが増強され、さらに活性化型 mutant である Q67L を発現させた場合には非常に強いユビキチン化が観察された。

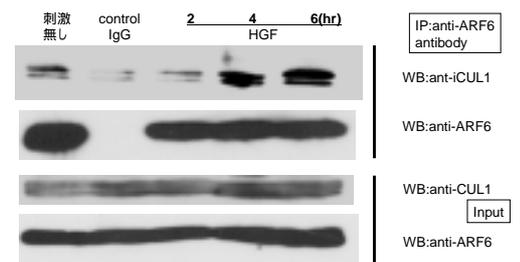


Fig. 5. 内在性のARF6とCUL1はHGF刺激依存的にcomplexを形成する

#### (4) HGF 刺激による ARF6 活性化メカニズム

HGF による ARF6 の活性化メカニズムを探るために、GTP 型 (活性化型) ARF6 と特異的に結合する分子 (metallothionein-2) を GST fusion protein として作成し、pull-down 法により ARF6 activation assay を行ったところ、ARF6 は HGF 刺激後に時間依存的に活性化した (Fig. 7)。さらにその活性化は phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) inhibitor である LY294002 および Wortmannin (500nM) によって抑制された。ARF6 はそれ自体では GTPase 活性が非常に低いので、full activation には必ず GEF (guanine nucleotide exchange factor) を必要とする。よって MDCK 細胞における ARF6 の活性化には PI-3K 依存的な GEF (ARNO など) が必要であると考えられる。さらに LY294002 および Wortmannin は HGF 依存的な  $\beta$ -catenin のユビキチン化も抑制した (data not shown)。PI-3K は従来、細胞分散を抑制することは知られていたが、この実験から PI-3K の機能は ARNO などの GEF を介した ARF6 の活性化と、それに伴う  $\beta$ -catenin のユビキチン化の促進を担うことが示唆された。

[まとめ] 本研究は、低分子量 G タンパク質である ARF6 が、SCF 型 E3 ligase の構成分子の一つである CUL1 と HGF 刺激依存的な complex を形成することで  $\beta$ -catenin の ubiquitin 化を促進するという初めての報告である。さらに CUL1 に関しては細胞密度が CUL1 自体の細胞内局在を変化させ、かつ HGF 刺激で CUL1 が核から細胞質へ放出されることも見出した。

従来、MDCK cell scattering における ARF6 の役割は、E-cadherin 等の細胞間接着分子の endocytosis (逆行性輸送) に特化していると考えられていたが、本研究によって ARF6 が CUL1 と複合体を形成することで  $\beta$ -catenin の ubiquitin 化を促進し、より積極的に接着分子の分解に関与することが示された。

E-cadherin や  $\beta$ -catenin といった細胞間接着分子の脱落は実際の上皮ガンの転移においてごく一般的に観察される現象である。さらに最近、ヒトの乳がん細胞の cell line はその転移・浸潤能が高いほど ARF6 が高発現しているという報告がなされた。本研究の成果は、ARF6 が接着分子の分解を調節することで、ガン細胞の転移・浸潤能獲得に密接に関係することを示唆しており、ガンの転移現象の新規分子メカニズムの解明に大きく貢献するのみならず、転移抑制を目的とした抗がん剤開発のターゲット分子としての ARF6 の可能性を

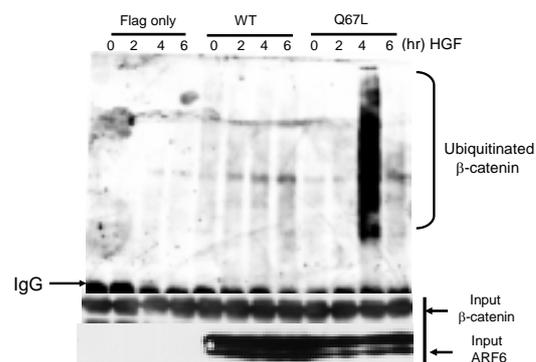


Fig. 6. ARF6 WT および Q67L の過剰発現は HGF 依存的な  $\beta$ -catenin のユビキチン化を亢進させる

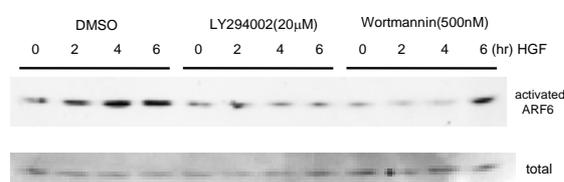


Fig. 7. MDCK 細胞において ARF6 は HGF 刺激依存的に活性化し、その活性化は PI-3K 依存的である

も示唆するものである。

[参考文献]

(1) Matsukawa J, Nakayama K, Nagao T, Ichijo H, Urushidani T., *J Biol Chem.* **278**,36470-5, 2003.