

## 審査の結果の要旨

氏名 松川 純

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。順行性輸送の例としては、ARF6 は MIN6 細胞における insulin 分泌、chromaffin 細胞からの noradrenalin 分泌、胃壁細胞における胃酸分泌といった種々の exocytosis において、細胞内小胞を細胞質から plasma membrane に輸送する制御因子として機能する。

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-F 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、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。

### (1) MDCK 細胞における ARF6 の局在

MDCK 細胞において内在性の ARF6 を HGF 刺激前後に免疫染色すると、未刺激では核以外の細胞質全体に存在していたが、刺激後数時間で膜移行している様子が観察された。膜移行した ARF6 は plasma membrane 上で  $\beta$ -catenin とよく共染色された。一方野生型 ARF6 と ARF6 活性型 mutant である Q67L をそれぞれ MDCK の細胞に一過性に発現させて免疫染色したところ、野生型は内在性 ARF6 と同様細胞質全体に局在していたのに対し、Q67L は plasma membrane 上に強く集積していた。これらのことから HGF 刺激によって ARF6 は活性化して膜移行し、 $\beta$ -catenin と共局在することが示された。

## (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。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 diffuse 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 が細胞質に放出される様子が観察された。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。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。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、HGF 刺激により Nedd8 修飾を受けて積極的に細胞質に放出され、E3 ligase として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。

## (3)ARF6-CUL1 complex 形成と $\beta$ -catenin のユビキチン化

内在性の ARF6 を ARF6 monoclonal antibody で HGF 刺激後に免疫沈降したところ、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ことから、ARF6 および CUL1 は HGF 刺激依存的に複合体形成を行うことが示唆された。続けて MDCK 細胞に ARF6 各 mutant と Flag-ubiquitin を共発現させ、HGF 刺激後に $\beta$ -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、ユビキチン化された $\beta$ -catenin を可視化したところ、Flag-ubiquitin のみを発現させたコントロール群では、HGF 刺激依存的にごく弱いユビキチン化が観察されただけだったが、ARF6 WT 過剰発現下はそれが増強され、さらに活性化型 mutant である Q67L を過剰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。

## (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、pulldown 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。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 ARNO(ADP-ribosylation factor nucleotide-binding site opener)などの GEF が必要であると考えられる。実際、ARNO を MDCK 細胞に過剰発現させた場合には、HGF 刺激依存的な $\beta$ -catenin のユビキチン化が亢進していた。さらに LY294002 および Wortmannin 存在下では $\beta$ -catenin のユビキチン化が抑制されていた。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。

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 のユビキチン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 のユビキチン化を促進し、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 の可能性をも示唆するものである。以上のことから本研究は博士（薬学）の学位に十分値するものと判断した。