

## 論文内容の要旨

### 論文題目

癌抑制遺伝子 APC に結合する新規グアニンヌクレオチド交換因子 Asef2 の機能解析  
(Role of the APC associated guanine-nucleotide exchange factor Asef2)

氏名 相良 将樹

癌抑制遺伝子 APC 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。APC は散発性の大腸癌においても 80%以上の患者で変異を起こしており、大腸癌発症の初期段階で重要な役割を果たしていると考えられている。多くの大腸癌細胞では APC が変異し、短い断片となっている場合が多い。このような変異 APC は、Wnt シグナル伝達経路の因子であるβカテニンの分解を誘導することが出来ず、恒常的な Wnt 標的遺伝子の転写活性化を引き起こしており、細胞癌化の一因となっている。一方、APC は低分子量 G 蛋白質 Rac1 および Cdc42 に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Asef を活性化し、アクチン細胞骨格系の再構成を誘導することにより細胞運動を制御している。大腸癌細胞で発現している変異 APC は、全長 APC よりも顕著に Asef を活性化し、癌細胞の異常な運動能の亢進を引き起こしていると考えられている。最近我々の研究室では Asef と約 60%の相同性を持つ新規の GEF を見出し、Asef2 と名付けた。本研究では Asef2 の機能を解析することで、APC を中心としたシグナル伝達経路をさらに明らかにすることを試みた。

pull-down assay および免疫沈降実験の結果、Asef2 と APC は直接結合し、細胞内でも複合体を形成していることが示された。さらに Asef2 は Rac1 および Cdc42 に対する GEF 活性をもち、Asef2 の GEF 活性は、大腸癌細胞で発現している変異 APC との共発現により増強された。Asef2 を強制発現するとラメリポディアやフィロポディアの形成が誘導され、これらの表現型は、変異 APC との共発現によってより顕著になった。また、Asef2 は GEF 活性依存的に MDCK 細胞の運動能を活性化することがわかった。さらに、変異 APC を発現している大腸癌細胞株 SW480 において、Asef2 の発現を RNAi によって抑制すると、細胞運動能が低下した。これらの結果から、Asef2 は APC によってその GEF 活性が正に制御され、Rac1 や Cdc42 を活性型へと変換することで、ラメリポディアやフィロポディアの形成を誘導し、細胞運動を活性化することが明らかになった。また、Asef 同様に Asef2 も変異 APC を発現している大腸癌細胞の異常な運動能の亢進に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Asef2 の機能をさらに明らかにするために、質量分析法を用いて Asef2 結合蛋白質の探索を行い、F-アクチン結合蛋白質 Neurabin2/Spinophilin を同定した。Neurabin2 はクロスリンク活性やキャッピング活性を持ち、足場蛋白質として働くことが知られている。Pull-down assay および免疫沈降実験により、Asef2 と Neurabin2 は直接結合することが確かめられた。APC、Asef2 および Neurabin2 の細胞内局在を調べた結果、三者は HGF (肝細胞増殖因子) 刺激により誘導されるラメリポディアやラッフル膜に共局在することがわかった。さらに、APC、Asef2 または Neurabin2 の発現を RNAi により抑制すると、HGF 依存的な細胞運動が抑制された。Neurabin2 の発現を抑制すると、Asef2 の活性型変異体の発現により形成されるフィロポディアの数が減少した。一方、Neurabin2 は Asef2 の GEF 活性に影響を与えなかった。これらの結果から、APC、Asef2、Neurabin2 は HGF 依存的な細胞運動に重要な役割を果たしており、Neurabin2 は Asef2 と結合することで、アクチン細胞骨格系を協調的に制御する足場蛋白質として働いていることが示唆された。