

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title         | Subcellular localization of the APC protein :<br>Immunoelectron microscopic study of the<br>association of the APC protein with catenin                                                                                                                                                                            |
| Author(s)     | 宮代, 勲                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Citation      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Issue Date    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| oaire:version |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| URL           | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40409">https://hdl.handle.net/11094/40409</a>                                                                                                                                                                                                                                |
| rights        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Note          | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|               |                                                                                                                                                                                          |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 宮 代 勲                                                                                                                                                                                    |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 2 7 0 4 号                                                                                                                                                                            |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 8 年 9 月 30 日                                                                                                                                                                         |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                                                                         |
| 学 位 論 文 名     | Subcellular localization of the APC protein: Immunoelectron microscopic study of the association of the APC protein with catenin<br>(Adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子産物の細胞内局在に関する研究) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 門 田 守 人<br>(副査)<br>教 授 秋 山 徹 教 授 高 井 新 一 郎                                                                                                                                   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】 Adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子は家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis coli, FAP) の原因遺伝子であるばかりでなく, sporadic な大腸腫瘍の発生過程にも深く関与している。APC 遺伝子産物(以下 APC) は2843アミノ酸からなる300 kDa のタンパク質であり, そのアミノ酸配列が他のタンパク質との相同性に乏しいこともあって未知の部分が多い。近年, APC と cell adhesion molecule E-カドヘリンの結合タンパク質  $\beta$ -カテニンとの複合体形成が報告され, 細胞接着・細胞骨格との関連が注目されている。したがって, APC の細胞内局在を知ることはその機能を理解するうえからも重要と考えられる。本研究では, APC の正常腸上皮細胞での細胞内局在を光顕的・電顕的に明らかにし, カテニンとの関連を両者の局在から検討した。また APC 遺伝子に germline mutation をもち FAP 類似の phenotype を示す Min マウスを用い, 非腫瘍部と腫瘍部での APC の局在を比較検討した。

【方 法】 ヒト APC の C 末端14アミノ酸由来合成ペプチドで rabbit を免疫することにより APC に対する polyclonal 抗体(anti-APC-C-ter)を作製し, この抗体を用いてマウス腸上皮細胞における APC の局在をみた。なお, ヒト APC の C 末端14アミノ酸はマウス APC のそれと同一である。さらに,  $\beta$ -カテニンを介して APC との複合体を形成する  $\alpha$ -カテニンに対する monoclonal 抗体  $\alpha$ -18 を併用することにより, APC とカテニンの関連について, 光顕的・電顕的に両者の局在から検討した。なお, 光顕・電顕とも, マウス腸の frozen section を用いた免疫組織化学染色を行い, 光顕では蛍光標識, 電顕では金コロイド標識した二次抗体を用いた。また, APC とカテニンとの局在比較は, 光顕では連続切片, 電顕では同一切片上の二重標識により検討した。

【結 果】 1) 光顕的に APC は正常腸上皮細胞の apical および lateral cytoplasm に局在が認められた。これに対し,  $\alpha$ -カテニンは lateral cytoplasm に局在が認められた。これらの局在の違いから, lateral cytoplasm における両者の関連が示唆される一方, apical region では両者が関連していない可能性が考えられた。そこで, より詳細に両者の局在についての関連をみる目的で二重免疫電顕を行った。その結果, lateral cytoplasm, とくに lateral plasma membrane にそって両者が共存する像が認められたが, 互いに独立して存在する像も認められた。その他の部位においては共存像はほとんど認められなかった。2) Min マウス腸管の非腫瘍部および腫瘍部の anti-APC-C-ter 抗体を

用いた染色では、非腫瘍部で染色性が認められるが、腫瘍部では認められなかった。Min マウスでは nonsense mutation により850アミノ酸で truncate した APC 遺伝子産物ができ、これは anti-APC-C-ter 抗体により認識できない。非腫瘍部では APC 遺伝子の正常 allele 由来のものが発現しているが、腫瘍部では正常 allele が不活化されていることを示唆し、Knudson の two-hit theory に合致する所見と考えられた。

【総括】 APC は正常腸上皮細胞内において lateral cytoplasm でカテニンと共存するものの、同部位においてもカテニンとは独立して存在するものが認められ、また、その他の部位においては共存像はほとんど認められない。したがって、APC は catenin-dependent な機能のみならず、catenin-independent な機能を持つ可能性があると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

Adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子は家族性大腸腺腫症の原因遺伝子であるばかりでなく、sporadic な大腸腫瘍の発生過程にも重要な関わりをもつことが明らかとなり、大腸腫瘍・癌の発生過程を研究するうえで非常に重要な遺伝子である。しかしながら、その遺伝子産物の生理的機能については不明の点が多く、正常 APC の腸上皮における細胞内局在の解明が重要な課題であった。

本論文は、APC に対する特異的抗体を作製し、その抗体を用いて、正常腸上皮における APC が lateral および apical cytoplasm に局在することを光顕・電顕的に明らかにした。さらに、APC の機能を考えるうえで、その関連が注目されているカテニンとの局在関係について、光顕および二重免疫電顕により、両者の共存像が lateral cytoplasm、とくに lateral plasma membrane にそって認められる一方で、互いに独立して存在する像が認められることを明らかにした。今後の APC の機能解析をすすめるうえで、重要かつ不可欠な情報を与えるものであり、本論文は学位に値すると考える。