

Title	The colorectal tumour suppressor APC is present in the NMDA-receptor PSD-95 complex in the brain
Author(s)	柳内, 浩之
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42604
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	柳 内 浩 之 や な い ひろ ゆき
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 8 6 2 号
学位授与年月日	平成13年2月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	The colorectal tumour suppressor APC is present in the NMDA-receptor-PSD-95 complex in the brain (癌抑制遺伝子産物 APC は脳では NMDA 受容体-PSD-95 複合体の中に存在する。)
論文審査委員	(主査) 教授 仲野 徹 (副査) 教授 審良 静男 教授 野島 博

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

APC 遺伝子は常染色体性優性遺伝疾患の家族性腺腫性ポリポーシス (FAP) の原因遺伝子として単離された癌抑制遺伝子である。また、一般の大腸腺腫や癌においても高頻度の変異が認められており、このことは APC 遺伝子が遺伝性、非遺伝性に限らず大腸腺腫、癌の発生に重要な役割をはたしていることを示唆している。近年、APC は β -catenin を含む多くのタンパク質と複合体を形成することが明らかにされている。 β -catenin は E-cadherin の裏打ちタンパク質として細胞接着の制御に関与するのみならず、Wnt 情報伝達系の重要な因子として様々な発生過程や癌化に深く関わっている。APC は β -catenin と結合し、分解を促進することで Wnt 情報伝達系を負に制御していると考えられている。一方で、APC は脳で高い発現が見られる。我々は以前、海馬神経細胞においてショウジョウバエの癌抑制遺伝子 dlg のヒトホモログである hDLG 遺伝子の産物と APC の局在が一致すること、また両者が生体内で複合体を形成することを明らかにしている。しかしながら、APC の神経細胞における役割は依然として不明の点が多く残されている。そこで本研究では、APC の神経細胞での機能を明らかにする目的で、APC 結合タンパク質の検索を行った。

[方法ならびに成績]

APC 結合タンパク質の検索は Yeast two hybrid 法を用いて行った。APC タンパク質の C 末424アミノ酸を bait にして、human fetal brain library を検索した結果、hDLG 以外に1つの陽性クローンを見出した。全長を単離し、塩基配列を決定した結果、この陽性クローンはラットで神経細胞のシナプス後肥厚部 (post synaptic density, PSD) に特異的に存在する PSD-95 のヒトホモログであった。ヒト PSD-95 は724アミノ酸からなり、ラット PSD-95 と全く同一のアミノ酸配列を有していた。

まず、PSD-95 と APC が直接結合することを確認するために in vitro pull-down assay を行った。その結果、Yeast two hybrid 法で得られた結果と同様に両者が結合することが確認され、さらにその結合は APC の C 末端の S/TXV モチーフ、PSD-95 の PDZ2ドメインを介していることが示唆された。さらに APC と PSD-95 の結合について、表面プラズモン共鳴現象を測定原理とする BIAcore 1000 (Pharmacia Biosensor) を用いて詳細に解析を行った結果、APC の C 末端と PSD-95 の PDZ2ドメインの結合定数は $3.45 \times 10^{-9} \text{M}$ であることが明らかとなった。

次に APC と PSD-95 が in vivo でも複合体を形成するかどうかを調べるために免疫沈降実験を行った。マウス脳の Triton X-100 に不溶性の画分からライセートを調整し、抗 APC 抗体で免疫沈降した後、抗 PSD-95 抗体でイムノブロットを行った。その結果、確かに APC は PSD-95 と共沈することが確認され、生体内でも複合体を形成することが明らかとなった。以前、PSD-95 は NMDA 受容体と結合し、そのクラスター形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで抗 APC 抗体での免疫沈降物を抗 NMDA 受容体抗体でイムノブロットした結果、NMDA 受容体も存在することが明らかとなった。APC と NMDA 受容体は直接結合しないことから、APC と NMDA 受容体は PSD-95 を介して複合体を形成する可能性が示唆された。さらに、PSD-95 は N 末端に多量体形成に必須のシステイン残基を有しているが、このシステイン残基に変異を導入すると APC と NMDA 受容体は共沈しなくなった。したがって、PSD-95 の N 末端のシステイン残基が APC/PSD-95/NMDA 受容体複合体の形成に重要であると考えられた。これらの事実から、APC/PSD-95/NMDA 受容体複合体の形成には PSD-95 の多量体形成が重要であり、PSD-95 単量体には APC、NMDA 受容体のどちらか一方のみしか結合しないことが示唆された。

[総括]

APC の機能解析を目的として APC 結合タンパク質の検索を行い、ラット PSD-95 のヒトホモログを単離した。

APC と PSD-95 の複合体形成について様々な生化学的手法を用いて検討し、以下の結果を得た。

- 1) APC はその C 末端の S/TXV モチーフを介して PSD-95 の PDZ2 ドメインと結合する。
- 2) APC の C 末端と PSD-95 の PDZ2 ドメインの結合定数は $3.45 \times 10^{-8} \text{M}$ である。
- 3) in vivo においても APC は PSD-95 と複合体を形成し、さらに NMDA 受容体もこの複合体に含まれる。
- 4) APC/PSD-95/NMDA 受容体複合体の形成には PSD-95 の N 末端部分に存在する 2 つのシステイン残基が重要である。

また最近の報告で PSD-95 は細胞骨格に関係するタンパク質やシグナル伝達分子と複合体を形成すること、PSD-95 のノックアウトマウスにおける解析から PSD-95 がシナプス可塑性に関与している可能性が示されている。これらの報告と本研究における結果から考え合わせると、APC は PSD-95 を介して NMDA 受容体の機能制御やシグナル伝達に関与している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

癌抑制遺伝子 APC は家族性腺腫性ポリポーシス (FAP) の原因遺伝子として発見されたが、その後の研究から大腸癌のみならず多くの癌で変異が見つかっており、APC の機能を分子レベルで解明することは重要な研究課題の一つである。本研究では Yeast two hybrid 法を用いて APC 結合タンパク質の検索を行い、その機能から APC の機能を明らかにすることを試みたものである。

本研究では APC 結合タンパク質としてシナプス後肥厚部 (Post-synaptic density) に特異的に存在する PSD-95 のヒトホモログを単離し、生体内でも複合体を形成していることを見いだした。さらに APC/PSD-95 複合体にはシナプスの可塑性に深く関与している NMDA 受容体サブユニットが含まれることを見いだした。PSD-95 の N 末には多量体形成に必須のシステイン残基が存在しており、三者複合体を形成するためにはこのシステイン残基が重要であることを明らかにした。

APC の機能については現在までに Wnt シグナル伝達系への関与が示されているが、神経細胞における APC の機能に関してはほとんど知見が得られていない。本研究により明らかとなった事実は、APC が PSD-95 を介して NMDA 受容体の機能制御に関与している可能性を想像させ、APC の機能に新たな可能性を示唆するものであり、学位の授与に値すると考えられる。