



Title	APC is Colocalized with β -Catenin and hDLG in the Henle's Loop of the Mouse Kidney
Author(s)	垣沼, 直人
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42675
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	かき ぬま なお と 垣 沼 直 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 4 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 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	APC is Colocalized with β -Catenin and hDlg in the Henle's Loop of the Mouse Kidney (マウス腎ヘンレ係蹄における APC、 β -Catenin および hDlg の局在)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 仲 野 徹 (副査) 教 授 岡 田 雅 人 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子は、家族性大腸腺腫症 (FAP; Familial Adenomatous Polyposis) の原因遺伝子として1991年に cloning された癌抑制遺伝子で、FAP 以外にも散発性大腸癌の大部分の症例において変異が確認されている。我々は APC 遺伝子産物が、Drosophila の癌抑制遺伝子産物である Dlg のヒトホモログ、hDlg と C 末端で結合することを見いだした。hDlg や PSD-95 などの Dlg ファミリーの分子は細胞膜の裏打ちタンパク質として存在し、海馬において PDZ ドメインを介して記憶、学習に重要な働きを担うと思われる NMDA レセプターやシェイカー型の K^+ チャンネルと結合してクラスタリングを起こすことが知られている。hDlg はさまざまな組織で発現しているが、APC 遺伝子産物や β -catenin と共に高濃度で発現している組織を検索し、APC/hDlg/ β -catenin の更なる機能を推測することを目的とした免疫染色を試みた。

一方、Drosophila の segment polarity gene である Wingless およびその哺乳動物ホモログである Wnt のシグナル経路の研究により、APC 遺伝子産物は β -catenin の分解を誘導して Wingless/Wnt シグナル経路を負に調節していることがわかった。更に我々は、 β -catenin と結合しその分解を誘導するタンパク質として Axin をクローニングした。Axin は APC 遺伝子産物とも複合体を形成し、協調して β -catenin の分解を誘導していると考えられている。Axin にはその C 末端に Wnt シグナル経路の構成因子である Dishvelled と相同性の高い DIX ドメインが存在するが機能は不明であった。そこで私は、この機能未知の DIX ドメインに何らかのタンパク質が結合し重要な働きを担っていると考え、結合タンパク質を検索することを通して Axin の新たな機能を探った。

更に APC 遺伝子産物の Drosophila ホモログが1997年にクローニングされ、そのアミノ酸配列をほ乳類の APC 遺伝子産物と比較してみたところ、新たに相同性の高い領域があることがわかった。種を越えて相同性が高いこの領域は何らかのタンパク質が結合し重要な働きを担っている可能性が高いと考え、結合タンパク質を検索することを通して APC 遺伝子産物の更なる機能を探った。

以上が本研究の目的である。

【方法ならびに成績】

マウス腎を固定後、クライオスタットにて切片を作製し免疫染色を行ったところ、APC 遺伝子産物は腎髄質で高発現しているのが明らかとなった。更に細かく観察すると APC 遺伝子産物と β -catenin、APC 遺伝子産物と hDlg

はそれぞれヘンレ係蹄部において共に免疫染色された。また、金コロイド法を用いた免疫電子顕微鏡によっても同じくヘンレ係蹄部において局在が一致することが確認された。

Axin の DIX ドメインを bait として yeast two-hybrid system により結合タンパク質の検索を行ったところ、Axin の DIX ドメインを含む領域が得られた。*in vitro* および *in vivo* で結合実験を行ったところ Axin は DIX ドメイン同士でオリゴマーを形成していることが確認できた。更に DIX ドメインを欠いた Axin mutant を細胞に導入したところ β -catenin 分解能が低下していることが明らかになった。

APC 遺伝子産物の相同性領域を bait として yeast two-hybrid system により結合タンパク質の検索を行ったところ、APC 遺伝子産物の exon 9 が alternative splicing されて相同性領域が欠失した約830アミノ酸残基の断片が得られた。*in vitro* および *in vivo* で結合実験を行ったところ、APC 遺伝子産物の相同性領域と得られた APC 遺伝子産物断片は結合することが確認できた。

【総括】

本研究により、マウス腎のヘンレ係蹄部において APC/hDlg/ β -catenin は高い発現が見られ局在も一致することから、この複合体はヘンレ係蹄部において何らかの重要な機能を担っている可能性が示唆された。

更に Axin および APC 遺伝子産物はそれぞれオリゴマーを形成し、巨大な三次構造を取ることで β -catenin の分解誘導を効率よく行い Wnt シグナル経路の on/off に速やかに対応している可能性が示唆された。APC 遺伝子産物はその N 末端においてオリゴマーを形成することが知られていたが、N 末端の alternative splicing によりオリゴマー形成能を持たない APC 遺伝子産物もできる可能性が示唆されていた。しかし今回同定した新たなオリゴマー形成領域により、N 末端の alternative splicing に関わらずオリゴマーを形成できることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

大腸癌の癌抑制遺伝子 APC の産物は、 β -catenin と結合してその分解を誘導し Wnt シグナル経路を負に調節していることが知られている。一方、APC 遺伝子産物は C 末端で hDlg および PSD-95 などの Dlg ファミリー分子の PDZ ドメインと結合していることも知られている。一般に Dlg ファミリー分子は細胞膜裏打ちタンパク質として受容体やイオンチャネルのクラスタリングに関与している。hDlg は AMPA 型受容体の裏打ちタンパク質として機能していることが知られているが神経以外の組織にも発現しており、組織により異なる機能を果たしている可能性があると考えられる。本研究においてマウス腎のヘンレ係蹄部で APC 遺伝子産物、 β -catenin および hDlg の局在の一致が見られたことから、APC/hDlg/ β -catenin 複合体はヘンレ係蹄部において新たな機能を果たしている可能性があると考えられた。

一方、APC 遺伝子産物は Axin と複合体を形成することにより β -catenin の分解を誘導しているが、本研究において APC 遺伝子産物および Axin はそれぞれオリゴマーを形成していることが明らかとなった。APC 遺伝子産物および Axin は巨大な複合体を形成することによって β -catenin の分解誘導を効率よく行い Wnt シグナル経路の on/off に速やかに対応している可能性が示唆された。

本研究は APC 遺伝子産物を中心とした情報伝達機構の解明に新たな可能性を与えるものであり、学位の授与に値すると考えられる。