

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目： 若手研究 ( B )

研究期間： 2007 -2008

課題番号： 19770162

研究課題名 ( 和文 ) 神経突起伸長における APC の機能解析

研究課題名 ( 英文 ) Functional analysis of APC in neurite outgrowth

研究代表者 川崎 善博 ( Kawasaki Yoshihiro )

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号： 10376642

研究成果の概要： APC 結合蛋白質として見出した Asef は、各種 dominant-negative 変異体、及び shRNA を用いた解析により PC12 細胞における NGF 刺激依存的な神経突起伸長に重要であることを見出した。さらに、蛍光イメージングを用いた解析により Asef と APC の細胞膜近傍への集積動態が異なることから、細胞膜近傍に集積した APC が Asef と複合体を形成し、Asef の活性を制御していることが示唆された。

交付額

( 金額単位：円 )

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・細胞生物学

キーワード： 細胞骨格・運動

## 1. 研究開始当初の背景

癌抑制遺伝子 APC (adenomatous polyposis coli) は、大腸癌の大多数の症例で変異が見出されており、大腸腺腫・癌発症の原因遺伝子であると考えられている。さらに、APCは脳神経系において最も高い発現がみられることから神経細胞の機能にも重要な役割を担っていることが示唆されている。我々は、APCの機

能を明らかにするために yeast を用いた two-hybrid screening を行い、APC 結合蛋白質として低分子量 G 蛋白質の Rho family に対する guanine nucleotide exchange factor ( GEF ) 分子 Asef と RING finger ドメインをもつ Neurodap1 を見出していた。

## 2. 研究の目的

Asef は、APC と結合することによって GEF 活性が増大し、細胞の形態変化、接着低下、運動能亢進を引き起こす。また、大腸癌細胞の Asef は変異 APC により恒常的に活性化しており大腸腺腫・癌の発症に重要な働きをしている[Kawasaki et al. *Science* 289, 1194 (2000); *Nat. Cell Biol.* 5, 211 (2003)]。また、Asef は脳神経系でもっとも高い発現を示し、神経細胞の機能に重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。事実、我々は dominant-negative 変異体や shRNA を用いた実験から、Asef が PC12 細胞の NGF 刺激による突起伸長に重要な役割をはたしていることを示す実験結果を得ている。Neurodap1 も脳神経系で特に発現が高く、神経細胞に損傷を与えた時に発現が低下する遺伝子として同定されたが、具体的な機能は不明であった。我々は、Neurodap1 が APC に結合してそのユビキチン化を引き起こし、プロテアソーム依存的な分解を誘導することを見出している。さらに、PC12 細胞の NGF 刺激により Neurodap1 依存的な APC の分解が亢進することを見出した。また、APC は growth cone に局在することが知られているが、APC と Neurodap1 の結合を阻害する dominant-negative 変異体 (Neurodap1-ABR) や Neurodap1 に対する shRNA を細胞に発現することにより、growth cone に局在する APC の量が著しく低下することから、Neurodap1 を介した APC の代謝回転制御が APC の growth cone への局在に重要であることも示唆された。さらに興味深いことに、Neurodap1-ABR や APC 及び Neurodap1 に対する shRNA を細胞に発現することにより、NGF 刺激で引き起こされる突起伸長が顕著に抑制された。これらの実験結果から NGF シグナルによる PC12 細胞の突起伸長に APC が重要な役割を果たしているだけでなく Neurodap1 による APC の分解も必須の役割を果たしていることが推測された。本研究はこれらの実験結果をふまえて、神経突起伸長における APC の機能をさらに明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

- 1) APC の神経突起伸長に果たす役割を、我々の見出した APC によって活性化される Rac 特異的 GEF 分子 Asef との相互作用に着目して解析する。
- 2) Neurodap1 による APC のユビキチン化・分解が NGF 刺激による突起伸長に必要とされる分子機構を明らかにする。
- 3) NGF 刺激による APC 分解促進の分子機構を明らかにする。
- 4) PC12 細胞だけでなく、初代培養神経細胞の突起伸長における APC-Asef 複合体の役割、Neurodap1 による APC 分解の意義を明らかにする。
- 5) 既に Asef ノックアウトマウスおよび Neurodap1 ノックアウトマウスを作製したので、これらを用いて組織レベル、電顕レベル、培養細胞レベル、分子レベルの解析を行い、Asef および Neurodap1 の生理的役割を確証する。

さらに、我々はゴルジ体の重槽構造の維持に重要な膜貫通型のタンパク質 Giantin が APC と複合体を形成することも見出している。現在までに、1) APC、Neurodap1 および Giantin が複合体を形成していること、2) Giantin は Neurodap1 による APC のユビキチン化を促進することを見出している。これらの知見は、APC-Neurodap1 複合体の生理的役割をより詳細に理解するうえでの重要な手がかりになると考えている。

## 4. 研究成果

現在までに我々は Neurodap1 が APC のユビキチン化・分解に関わり、growth cone への APC の濃縮と PC12 細胞の突起伸長に重要であることを見出している。これらの結果から、Neurodap1 による growth cone への APC の集積制御が神経細胞の突起伸長に極めて重要であると考えている。そこで、growth cone における APC/Asef の動態観察を遂行するにあたり、神経細胞に比べて観察が容易な上皮由

来培養細胞を用いて Time-lapse imaging による予備的検討を行った。その結果、APC は微小管上をプラス端に向かって輸送されることを確認し、Asef は増殖因子の刺激依存的にラフリング膜へ濃縮することを見出した。さらに、同様の手法によって PC12 細胞を用いて Asef 及び Neurodap1 の挙動を観察したところ、両者とも主に細胞質に局在すること、及び Asef の一部はラフリング膜へ濃縮していることが明らかとなり、微小管上を + 端方向へ移動し細胞膜近傍に濃縮する APC の挙動とは明らかに異なることを見出した。これらの結果から、細胞膜近傍に集積した APC が Asef と複合体を形成し、Asef の活性を制御していることが示唆された。

また、Neurodap1(-/-)及び Wild-type マウスから得られた海馬及び小脳由来初代培養細胞を用いて Neurodap1 による APC のユビキチン化・分解の意義を検討した。現在までに、NGF、BDNF、或いは NT3 刺激で誘導される神経突起伸長、APC ユビキチン化・分解には、Neurodap1 の有無による明確な有意差は認められていない。この結果は、生体内において Neurodap1 が普遍的ではなく部位、又は時期特異的に APC の制御に関わっていることを示唆していると考えている。使用する細胞種、得られた細胞の培養条件、及び細胞を採取するマウスの週令について今後検討していく必要があると考えている。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Sagara M, Kawasaki Y, Iemura SI, Natsume T, Takai Y, Akiyama T. Asef2 and Neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in HGF-induced cell migration. *Oncogene*, 28, 1357-1365, 2009, 査読有り
2. Kouzmenko AP, Takeyama K, Kawasaki Y, Akiyama T, Kato S.

Ligand-dependent interaction between estrogen receptor alpha and adenomatous polyposis coli.

*Genes Cells.*, 13, 723-730, 2008. 査読有り

3. Kouzmenko AP, Takeyama K, Kawasaki Y, Akiyama T, Kato S.

Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli.

*Oncogene*, 27, 4888-4899, 2008.

査読有り

4. Kawasaki Y, Sagara M., Shibata Y., Shirouzu M., Yokoyama S., Akiyama T.

Identification and Characterization of Asef2, a guanine-nucleotide exchange factor specific for Rac1 and Cdc42.

*Oncogene*, 26, 7620-7627, 2007.

査読有り

5. Muroya K.\*, Kawasaki Y.\*, Hayashi T., Ohwada S., Akiyama T.

\*, These authors equally contributed to this work.

PH domain-mediated membrane targeting of Asef.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 85-88, 2007.

査読有り

6. Murayama K., Shirouzu M., Kawasaki Y, Kato-Murayama M., Hanawa-Suetsugu K., Sakamoto A., Katsura Y., Suenaga A., Toyama M., Terada T., Taiji M., Akiyama T., Yokoyama S.

Crystal structure of the rac activator, asef, reveals its autoinhibitory mechanism.

*J. Biol. Chem.*, 282, 4238-4242, 2007.

査読有り

[学会発表](計 5 件)

1. 川崎善博:「APC の異常と発癌」,九州大学グローバルCOE「Wntシグナルシンポジウム」,2009年3月,福岡
2. 川崎善博:「癌抑制遺伝子 APC の異常を介したポリマー形成における Asef/Asef2 の関わり」,日本分子生物学会,2008年12月,神戸

3. 川崎善博：「Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef/Asef2 in intestinal adenoma formation」, 日本癌学会, 2008年10月, 名古屋
4. 川崎善博：「Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef in signal transduction and angiogenesis」, 日本細胞生物学会, 2008年7月, 横浜
5. 川崎善博：「Role of the APC-associated guanine nucleotide exchange factor Asef in signal transduction and angiogenesis」, 日本癌学会, 2007年10月, 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川崎 善博 (Kawasaki Yoshihiro)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：10376642

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし