



Phosphorylation of DOCK180, a major Crk SH3binding protein, in cells stimulated by intergrin or transformed by various oncogenes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 清川, 悦子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1071

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 218号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏 名	清 川 悦 子		
論文題目	Phosphorylation of DOCK180, a major Crk SH3-binding protein, in cells stimulated by integrin or transformed by various oncogenes (Crk の SH3 領域に結合している DOCK180 のインテグリン刺激および癌化によるリン酸化)		

博士(医学) 清 川 悦 子

論文題目

Phosphorylation of DOCK180, a major Crk SH3-binding protein, in cells stimulated by integrin or transformed by various oncogenes

(Crk の SH3領域に結合している DOCK180のインテグリン刺激および癌化によるリン酸化)

論文内容の要旨

〔背景および目的〕

v-*crk* はニワトリレトロウイルス CT10の癌遺伝子として発見された。その遺伝子産物である v-Crk は、レトロウイルス構造蛋白 Gag との融合蛋白で、Src homology 2(SH2)領域及び Src homology 3(SH3)領域と呼ばれる二つの領域からなる。SH2領域と SH3領域は、Crk 以外にも多くの情報伝達物質に共通して認められる領域であるが、Crk のような SH2領域と SH3領域のみからなる蛋白群は特に、アダプター分子と呼ばれる。v-*crk* のヒト相同遺伝子 c-*CRK* には選択的スプライシングにより生ずる CRK-I および CRK-II の二つが知られている。

SH2領域は様々な刺激によりチロシンリン酸化された蛋白に特異的に結合する。Crk の SH2領域は、上皮細胞増殖因子(EGF)の刺激によりチロシンリン酸化された EGF 受容体と Shc、インテグリンによりチロシンリン酸化された p130^{cas}と paxillin、T 細胞受容体刺激によりチロシンリン酸化された c-Cbl と結合する。このことは、Crk が上皮あるいは神経細胞における増殖分化、2) 細胞接着、3) 血球系の増殖分化に関与することを示している。

チロシンリン酸化された蛋白は主として細胞膜近傍に存在するので、SH2領域を介する結合は、アダプター分子とその SH3領域に結合する分子を細胞膜に誘導する。従って、アダプター分子群の機能を解析するには、その SH3領域に結合する蛋白を同定することが必要である。SH3領域は II 型ポリプロリン構造を有する蛋白に結合する。Crk の SH3領域に結合する主要な分子は2つある。1つは、C3G(CRK SH3 binding guanine nucleotide releasing protein for Rap-1)であり、Rap1を活性化することにより Ras による癌化を抑制する。もうひとつが DOCK180(180-kDa protein, downstream of CRK)である。

DOCK180は1866アミノ酸をコードする、既存の蛋白とは相同性を示さない新しい蛋白である。C 末端に Crk の SH3領域に結合するポリリンに富んだ配列を、N 末端には SH3領域を有している。ノーザンブロットによる解析では、末梢血液を除くほとんどの組織に発現が認められる。

先に述べた如くアダプター分子の機能は SH3領域に結合する分子を細胞膜に誘導することにあるので、DOCK180を強制的に細胞膜に発現させることより、DOCK180の活性化状態を模倣することができる。Ki-*ras* の膜移行信号を DOCK180の C 末端に付加したもの(DOCK-F)は、紡錘形の線維芽細胞を大型かつ平坦な細胞へと変化させることから、活性化された DOCK180は細胞の形態を変化させることがわかっている。

本論文においてはこの研究をさらに進め、DOCK180を生化学的に解析しその癌化における役割を解析した。

〔方法、結果および考察〕

1) DOCK180のリン酸化

野生型 DOCK180および細胞膜移行シグナルを付加した DOCK-F を発現する NIH3T3細胞を樹立し、

以下の解析に用いた。まず、これらの細胞を³²p 正リン酸で標識し、DOCK180を抗DOCK180抗体で免疫沈降した後、イメージアナライザーで解析した。その結果、細胞膜移行シグナルを付加した DOCK-F のみが、リン酸化されていることがわかった。このリン酸化 DOCK-F をゲルから切り出し加水分解後、薄層クロマトグラフィーで分離した。その結果、DOCK-F はセリン残基にリン酸化されていることがわかった。

2) DOCK180をリン酸化する刺激の検索

上記の結果は DOCK180は活性化されるとリン酸化されることを示唆している。そこで、Crk が関与する二つの情報伝達系、上皮細胞増殖因子刺激とインテグリン刺激により、DOCK180がリン酸化されるかを調べた。その結果、EGF 刺激ではリン酸化されないが、インテグリン刺激により DOCK180の一過性のリン酸化が認められた。このことは、DOCK180が Crk の関与する情報伝達系のうち、インテグリンからの情報には関与するが上皮細胞増殖因子からの情報伝達には関与しないことを示している。DOCK180の SH3領域が DOCK180の細胞内局在を決定し、それが、この刺激に対する特異性を生み出しているのかも知れない。

3) 癌細胞における DOCK180のリン酸化

癌化における DOCK180の関与を探るために、様々な癌遺伝子で癌化した3Y1細胞で DOCK180のリン酸化を解析した。DOCK180は、v-Src、v-Crk、Rac、Cdc-42Hs で癌化した細胞において著明にリン酸化されていることがわかった。リン酸化アミノ酸の解析では、これらの DOCK180もやはりセリンにリン酸化されていた。正常の3Y1細胞でのリン酸化はほとんど認められなかった。これら癌化した細胞の形態は、DOCK-F による扁平化した形態とは、相反するものである。そこで、次のようなモデルを考えている。インテグリン刺激で DOCK180は細胞膜へ移行し活性化される。信号が情報伝達下流因子に伝播され、細胞が接着し、セリンスレオニンキナーゼが活性化されると、DOCK180はリン酸化により負の制御を受ける。癌化した細胞においては、セリンスレオニンキナーゼが恒常的に活性化されていて、DOCK180も恒常的にリン酸化され機能を発揮できない状態にある。恒常的活性化型と考えられる DOCK-F を癌化細胞に発現すると、癌化を著明に抑制するという結果もこのモデルを裏付ける。

4) DOCK180と Crk の結合

リン酸化が Crk と DOCK との結合に影響を与えるのではないかと考え、DOCK180と Crk の結合を癌化した3Y1および正常3Y1細胞で調べた。その結果、DOCK180は正常細胞ではほとんど、Crk に結合しておらず、v-Src や v-Crk で癌化した細胞においてのみ結合が認められた。組替え Crk 蛋白をこれらの細胞可溶化液に加えたところ、癌化した細胞の DOCK180も正常細胞の DOCK180も、同様によく結合した。このことは、DOCK180と Crk との結合は、Crk 側の修飾により制御されていることを示唆し、DOCK180のリン酸化は、Crk との結合を制御していないことを示している。

〔まとめ〕

DOCK180の活性化型がセリンにリン酸化されていることを発見した。さらに同様の変化をインテグリン刺激を受けた細胞や癌化した細胞に見出した。以上の結果は、Crk に結合する因子として同定された DOCK180が、正常細胞の接着や癌化に伴う形態変化に関与することを強く示唆するとともに、癌化による形態変化を解明する1つのアプローチを提示している。

論文審査の結果の要旨

Src homology2(SH2)領域及び Src homology3(SH3)領域からなるアダプター蛋白質はチロシンキナーゼ活性を介するシグナル伝達経路の一構成ユニットとして細胞の増殖、分化、接着等の制御に関与している。この新しいカテゴリーの蛋白質の機能は、SH2領域でホスホチロシン残基及びその周辺を認識してチロシンリン酸化を受けた蛋白質に結合し、SH3領域でプロリンに富む領域を認識して別の蛋白質と結合することによるシグナル伝達路構成ユニットの連結である。Crk は最初 CT10レトロウイルスの癌遺伝子産物として見出されたアダプター蛋白質であり、インテグリンからのシグナル伝達と上皮成長因子(EGF)の受容体を介するシグナル伝達への関与が示唆されていた。最近、申請者の研究グループはこの Crk の SH3領域と結合する2種類の蛋白質、C3G と DOCK180(180kDa protein downstream of Crk)の cDNA を単離し、且つ DOCK180の C 末端にファルネシル基を付加するという手段を用いて DOCK180を強制的に細胞膜に発現させると紡錐形の線維芽細胞が大型且つ扁平な細胞に変化することを観察した。インテグリンは、細胞外マトリクスと細胞骨格の可逆的連結という機能に加えて、シグナル伝達連鎖反応により直接あるいは遺伝子発現の変化を介して細胞の形、極性、運動、機能等に影響を与えるマトリクス受容体としての役割を持つと考えられている。癌化をもたらすシグナルの異常も細胞骨格の形成に影響を及ぼすことが知られている。しかし、これらのシグナル伝達カスケードの詳細は未だほとんど解析されていない。

申請者はこの細胞骨格へのシグナル伝達の一構成ユニットと推定される DOCK180がインテグリンの刺激、EGF による刺激、癌化シグナル等により受ける生化学的変化を解析した。ファルネシル基を付加して強制的に細胞膜に移行させた DOCK180(DOCK-F)はセリン残基のリン酸化を受けていた。DOCK180はインテグリンの刺激によっても細胞の形態変化(扁平化)の開始と同じ時間帯にセリン残基のリン酸化を受けたが、EGF による刺激ではリン酸化は認められなかった。更に、*v-crk*、*v-src*、*v-Ha-ras* 及び Rho ファミリー GTP 結合蛋白質である Rac、Cdc42Hs をコードするプラスミドで形質転換を受けた細胞でも DOCK180はセリン残基のリン酸化を受けていた。但し、これら形質転換細胞の形態は DOCK-F による扁平化と相反するものであり、且つ DOCK-F の強制発現は形質転換細胞の形態を正常の表現型に復帰させた。以上の結果、まず Crk に結合する因子として発見された DOCK180は細胞接着や癌化に伴う形態変化に関与することが示唆された。更に申請者らは、一見矛盾する DOCK180の挙動と細胞の形態変化との関わりについての一連の観察結果を説明するための作業仮説として、DOCK180は細胞膜への移行により活性化され、その下流にある Ser/Thr キナーゼによるリン酸化で負の制御を受けるという可能性を考え、実験を続けているとのことであった。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) インテグリンの刺激による p130^{cas}と paxillin のチロシンリン酸化の機構、p130^{cas}と paxillin の機能
- 2) DOCK180の C 末端側領域にある SH3の結合相手及び中央部分の K-rich な領域に推定される役割
- 3) DOCK180が細胞膜へ移行しないとセリン残基のリン酸化を受けないのは Crk-DOCK180複合体が更に何らかの Ser/Thr キナーゼをリクルートするからと考えているのか
- 4) リン酸化される DOCK180のセリン残基が DOCK-F として細胞膜に発現させた時やインテグリン刺激した時と形質転換細胞でリン酸化を受けた時では異なるという可能性はないのか
- 5) EGF による刺激で Crk が EGF 受容体に結合するのに DOCK180はリン酸化を受けない理由をどう

考えるか

- 6) 培養細胞、フィブロネクチンでしっかり接着している細胞及び癌細胞での DOCK180の細胞内局在、DOCK180の接着斑に集まっているか
- 7) v-src による刺激で DOCK180のリン酸化が起こることと関連して、Src も接着斑に集まっているのか
- 8) NIH3T3に DOCK180を発現させた時には形態変化は起こらないか

これらの質問に対する申請者の応答は概ね適切であり、問題点も理解していた。また研究そのものも最先端の新しい知見を含むと評価された。以上により、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新

副査 教授 高 田 明 和 副査 講師 田 港 朝 彦