Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Racl GTPase by interaction with Tiam1

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　３５１号	学位授与年月日	平成１４年　３月２６日
氏　　名	大　月　寛　郎		
論文題目	Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1 (腫瘍転移抑制遺伝子 nm23H1 によるグアニンヌクレオチド交換因子 Tiam1 を介する Rac1GTPase の制御)		

博士(医学)　大 月 寛 郎

論文題目

Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Racl GTPase by interaction with Tiam1
(腫瘍転移抑制遺伝子 nm23H1によるグアニンヌクレオチド交換因子 Tiam1を介する RaclGTPase の制御)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

我々は Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質(以下 GTPase)Rac1とそのグアニンヌクレオチド交換因子(以下 GEF)Tiam1の信号伝達経路の機能解明を行ってきた。

近年、Ras ファミリー GTPase である Rad に対し腫瘍転移抑制遺伝子 nm23H1が GTPase 活性化蛋白質として働くという報告があった。nm23H1は腫瘍転移抑制遺伝子と考えられており、生理的には脳と精巣に局在する。現在まで様々な腫瘍においてその発現量と予後の改善について報告されているが、腫瘍によっては転移能と相関しないという報告がある。しかし、nm23H1の腫瘍転移抑制の機序について明らかにはなっていなかった。

我々は Rho ファミリー GTPase についても nm23H1が関与しているのではないかという仮説を立てた。Rho ファミリー GTPase には Rac、Cdc42、Rho などがあり、細胞骨格形成や細胞移動能に関連するシグナル伝達における重要な分子である。Rho ファミリーの GTPase の GEF として Tiam1、Pix、Vav 等が知られている。Tiam1は Rac1特異的な GEF であり、マウスの脳と精巣に高発現しているといわれている。本研究は Rho ファミリー GTPase、特に Rac1やその GEF が関与するシグナル伝達と nm23H1の関連を調べ、nm23H1の腫瘍転移抑制に対する機序を明らかにすることを目的とした。

〔材料ならびに方法〕

1) nm23H1 と Rac1 GEF(Tiam1、pix、Vav)との複合体形成について。
  a. 培養細胞(293T 細胞)を用い、in vivo、in vitro での複合体形成を免疫沈降及びウエスタンブロット法にて調べる。
  b. マウス大脳内の生理的な条件下で nm23H1と Tiam1との複合体形成を調べる。
  c. nm23H1と Tiam1の変異体を作成し、複合体形成に必要な部位特定や、多量体形成について調べる。
2) Tiam1による Rac1の活性化に及ぼす nm23H1の影響について。
  a. 293T 細胞を用いた in vivo の系で GTP 結合型 Rac1の割合の変化を調べる。
  b. Tiam1-Rac1の下流の JNK1の基質(c-jun)に対するキナーゼ活性を調べる。
3) nm23H1の Rac1に対する NDP キナーゼとしての影響について。
  a. UV で固定した GDP 結合型 Rac1の GTP 結合型への変換を in vitro の系で調べる。
  b. 293T 細胞を用いた in vivo の系を用い、GTP 結合型 Rac1割合を調べる。
4) Tiam1-Rac1のシグナル伝達は、Rat1細胞において、細胞外基質フィブロネクチンへの接着によるメンブレンラッフル形成を促すといわれている。F−アクチン及び Tiam1の免疫組織化学染色を行う事により、nm23H1によるメンブレンラッフ形成と Tiam1の細胞内局在への影響について調べる。

〔結果〕

1) a. 293T 細胞を用いた系で Tiam1は nm23H1と複合体形成することが確認できた。βPix、Vav1とは認められなかった。

b. マウスの大脳の抽出タンパク質にて Tiam1と nm23H1との間の複合体形成が認められた。

c. Tiam1はアミノ末端 1-392アミノ酸に nm23H1との複合体形成に必要な部位が分かった。また、Kpn ループを欠損した変異 nm23H1は Tiam1と複合体形成はおこらなかった。この時 Kpn ループを取り除いた nm23H1変異体は多量体形成ができなくなることがわかった。

2) a. 293T 細胞を用いた in vivo の系では、Tiam1の導入により GTP 結合型 Rac1の割合が増加し、nm23H1を同時に導入することにより割合は減少した。

b. Tiam1により上昇した JNK1キナーゼ活性は nm23H1の導入により低下した。

3) a. in vitro の系にて nm23H1により GDP から GTP 結合型 Rac1へのリン酸化がみられた。

b. 293T 細胞の in vivo の系を用い、GTP 結合型 Rac1の割合を調べた。GEF である Tiam1による GTP 結合型 Rac1の割合の増加と比較すると、NDP キナーゼである nm23H1による GTP 結合型 Rac1の割合の増加は非常に弱いものであった。

4) Tiam1-Rac1のシグナル伝達による Rat1細胞のメンブレンラッフル形成が認められ、内在性の Tiam1はメンブレンラッフルに局在していた。nm23H1導入によりメンブレンラッフル形成は抑制され、Tiam1の細胞膜への局在も見られなくなった。

〔結論〕

Tiam1と nm23H1の複合体形成は Rac1-GEF の中でも Tiam1に特異的なもので、Tiam1-Rac1のシグナル伝達に特異的に nm23H1が関連していると考えられる。また、マウス大脳内の生理的条件下でも複合体形成が認められた。複合体形成部位である Tiam1のアミノ末端 1 −392アミノ酸には PEST ドメインが含まれている。このドメインは蛋白質構造の安定化に関与しているといわれているが、他の蛋白質との結合に関与するという報告はない。今後複合体形成部位の細かな検索は必要である。nm23H1は 6 量体構造をとっており、その形成には Kpn ループが重要である。この部分を欠損させた変異体では多量体構造がとれず、nm23H1は Tiam1との複合体形成に際し、この立体構造が必要である可能性が大きいことが分かった。

nm23H1は野生型、NDP キナーゼ活性のない H118C 変異型ともに Tiam1と複合体形成により Rac1に対する Tiam1の GEF としての作用を抑制し、下流の JNK1の活性も抑制することが複数の実験で明らかとなった。Rsc1 に対する nm23H1の NDP キナーゼとしての活性は弱いものであった。この Rac1の活性を上昇させたり、Tiam1を介して抑制させたりといった nm23H1の相反する作用は、現在までの報告で腫瘍転移抑制遺伝子である nm23H1の発現が腫瘍の転移能との相関を示さない場合があるという事実への説明となりうる。

また、Rat1細胞のメンブレンラッフルや Tiam1の局在は現在までの報告に合致するものであった。Tiam1は細胞間接着のない、細胞が散在した状態では細胞膜ラッフルに局在するが、MDCK 上皮細胞においては細胞間接着部位に局在し、カドヘリン依存性の細胞接着をより強固にすると報告されている。前者の作用で Tiam1は細胞の運動能が亢進し、腫瘍細胞では浸潤、転移を促進し、後者の作用で転移に対して抑制性に作用するという 2 面性が考えられている。したがって Tiam1の発現する腫瘍組織では、その細胞接着性の動態により、nm23H1による転移、浸潤への修飾も異なることが予想でき、これも上述の nm23H1の相反する 2 つの事実に対する一根拠となりうる。

論文審査の結果の要旨

nm23(non metastasis 23)遺伝子はもともと、マウスメラノーマ細胞株の高転移を示す株に高発現を、低転移を示す株に低発現をしている遺伝子として過去に単離された。ヒトには5種、ラット、マウスには2種、ハエには1種ファミリー遺伝子の存在が知られている。申請者の研究は、PIX(PAK interacting exchange factor)蛋白に結合する蛋白をFar-Western法で検索していたところ、得られたのがnm23H1であったことから始まる。PIX蛋白とnm23H1蛋白を用いて確認実験を行ったところ、実際はこの両者は結合しないことが明らかになった。そこで、nm23H1蛋白と相互作用する蛋白群(Rad, Menin, EBNA-3C他)に焦点を移した。RasファミリーのGTPaseであるRedに対し、nm23H1蛋白がGTPase活性化蛋白として働くという報告に注目した。細胞骨格形成や細胞移動に関与すると言われるRhoファミリーGTPaseにはRac, Ddc42, Rhoなどがあり、そのGEF(グアニンヌクレオチド交換因子)として、Tiam1, Pix, Vavなどが知られていた。また、Tiam1はRac1特異的なGEFである。

申請者は腫瘍転移抑制遺伝子nm23H1がRhoファミリーのシグナル伝達系と関係するかどうかを検討し、また細胞運動に対するこれら関連蛋白の効果を検討することにより、nm23H1の腫瘍転移抑制に対する分子機構を明らかにしようとした。

主に用いた方法は、シグナル関連蛋白およびその変異体蛋白の発現ベクターを培養細胞293Tあるいは大腸菌で組換え蛋白を作製して、蛋白蛋白相互作用、リン酸化酵素活性を検討し、また細胞運動能に関する検討はフィブロネクチンコート上のRat1細胞の観察によっている。データは膨大にのぼっているので、詳細を記述することは差し控え、要点のみを報告する。まず、293T細胞への外来性遺伝子の導入実験および、マウス大脳抽出液においてnm23H1蛋白(152アミノ酸)がPix, Vav1とは無関係で、同じRacのGEFであるTiam1蛋白(1591アミノ酸)と特異的に複合体を形成することを世界で初めて明らかにした。この相互作用に係わるそれぞれの蛋白のドメイン決定を行い、nm23H1蛋白のkpn(killer of the prune mutation)変異部位やNDP kinase活性は相互作用に必須でないが、Kpnループは必要であることが明らかになった。

次に、293T細胞の場で、Tiam1によるRac1活性化(GTP型化)を、nm23H1蛋白およびキナーゼ活性のないnm23H1変異蛋白が抑制することを観察している。また、Rac1活性化をPAKのPBD(p21 binding domain)との結合でもって検討し、nm23H1蛋白の同様効果を得た。さらに、Rac1シグナル下流のJNK(c-Jun kinase)についても検討を行い、Tiam1によるJNK活性の増加に対し、nm23H1およびキナーゼ変異蛋白は抑制することも確かめている。

そして、nm23H1が細胞内でRac1に対してGEF活性を示すかどうかを検討したところ、外来性nm23H1蛋白はRac1のGTP型化活性に対し極めて弱い効果しか示さないことが明らかになった。

最後に、フィブロネクチンコート上のRat1細胞のmembrane ruffingに対するnm23H1蛋白の効果を検討し、その強制発現により、Tiam1蛋白のlamellipodiaへの集積抑制、membrane rufflingの減少を観察したが、キナーゼ活性のない変異蛋白も同様の効果を示した。細胞移動機構が単純ではないことを示しているのかもしれない。

申請者は医学部卒業とともに大学院に進学し、毎日長時間の努力と工夫を重ねた結果、膨大な実験結果と素晴らしい論文を得るに至っている。通常なら、最初の結合がないことがわかった時点で終わるかもしれない研究を展開させて意義を見出し、力強く仮説を提唱するに至っている。大学院において養われたこれらの経験は将来において、大きく社会に役立つであろうと評価できる。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

1）nm23H1とTiam1は直接結合ではないらしいが、複合体を形成する抽出液の条件は
2）nm23H1とTiam1が両方とも脳に発現している理由は
3）抗リン酸化抗体による検出とアイソトープによるリン酸化反応の検出の違いは
4）nm23H1、Tiam1は他のMAPK経路への影響はないのか
5）今回の研究とPIXの関係は
6）すべて外来性の遺伝子を用いて仮説を提唱しているが、内因性の系が動いている証拠があるのか
7）nm23H1, Tiam1が生理的に機能していることを証明する方法は
8）脳内でのnm23H1蛋白とTiam1蛋白の発現パターンはパラレルか
9）nmH23H1, Tiam1 蛋白の細胞内分布は
10）nm23H1は6量体を形成するが、Kpnループ変異体で6量体を形成できないことを確認するにはどういう方法があるか
11）細胞外基質を変えると今回の結果が変わるのではないか
12）細胞遊走自体に対するnm23H1, Tiam1の効果を見たか
13）CD44蛋白、CD44v3蛋白とは今回の研究はどう関連するのか

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　三浦直行
副査　北川雅敏　副査　小林　浩