

学位論文題名

Both the SH2 and SH3 Domains of
Human CRK Protein Are Required for
Neuronal Differentiation of PC12 Cells

(ヒト CRK 蛋白質による神経細胞分化誘導と細胞内情報伝達系の解析)

学位論文内容の要旨

序論：

細胞は、増殖因子やサイトカインによる刺激を細胞膜表面にある受容体で受けとり、そのシグナルを核へ伝えることによって増殖、分化、その他の様々な応答を引き起こすが、その際にチロシンキナーゼが重要な役割を担っている。近年、活性化された受容体型チロシンキナーゼまたは受容体と結合したチロシンキナーゼの下流で SH2 / SH3 と呼ばれる領域を有する蛋白群がシグナルを伝達することが明らかにされている。SH2 / SH3 領域は、チロシンキナーゼ型癌遺伝子である src と相同性の有る領域として同定され (src homology: SH)、その後ホスホリパーゼ C- γ (PLC γ)、GTPase 活性化蛋白 (GAP)、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI-3K) などシグナル伝達にとって重要な酵素に存在することが示されている。SH2 領域はリン酸化チロシン残基を特異的に認識し結合することが明らかにされているが、SH3 領域はプロリンリッチな配列に結合することが示唆されているものの、その機能は未だに不明な点が多い。

我々は、SH2 / SH3 領域を介する細胞内シグナル伝達機構を解明するために、構造の大部分が SH2 / SH3 領域のみから成り立つ CRK 蛋白について研究を進めてきたが、今回、CRK 蛋白が神経細胞の分化を誘導することを見いだした。そして、この CRK の分化誘導の系を詳しく解析することによって CRK 蛋白が、細胞内情報伝達機構の中でアダプター分子として機能することを明らかにし、さらに、CRK の SH3 領域の標的となる分子を同定する事ができたので報告する。

研究方法及び結果：

1) CRK タンパク質による神経細胞の分化誘導

ヒト CRK を大腸菌で発現させ精製した後、ラットの末梢神経腫瘍細胞株 PC12 細

胞の細胞質に1 mg/mlの濃度で微量注入したところ、16時間後から神経突起の伸張がみられた。PC12の突起伸張は約72時間継続し、分化した細胞は10日以上生存し続けた。細胞内のCRKタンパク質の存在は、抗CRK抗体による免疫染色で確認した。

2) 抗SH2抗体によるCRK媒介細胞内情報伝達の抑制

SH2領域は、細胞内でリン酸化チロシンと特異的に結合することが証明されているが、我々は、SH2領域が情報伝達に必要なであることを、*in vivo*で証明するために抗SH2抗体とCRKとを同時にPC12細胞に微量注入した。2種類の抗SH2抗体のうち *in vitro*でリン酸化チロシンとの結合を抑制するAD2は、CRKによる神経突起伸張を抑制した。また、SH2領域が、必須であることは、SH2領域の中で高度に保存された1アミノ酸を置換したCRK変異体によってPC12細胞が分化誘導されないことから確認された。

3) 過剰量のSH3分子によるCRK媒介細胞内情報伝達の抑制

我々は、SH3領域もSH2領域と同様に何らかの分子間結合に関与している可能性を検討した。細胞内にSH3領域の標的となる分子が一定量存在する場合、CRK分子の作用を過剰量のSH3分子が競合的に阻害すると考えて、SH3分子をCRKタンパク質と同時にPC12細胞に微量注入した。その結果、SH3分子とCRK分子とのモル比が7以上の時に、CRKによる神経分化は阻害され、その程度はモル比に依存性であった。さらに、srcのSH3、PLC γ のSH3、PI-3KのSH3分子を用いて同様の競合阻害実験を行ったが、各SH3分子/CRKのモル比が7以上であっても、阻害効果は認めなかった。このことから、PC12細胞内にはCRKのSH3領域に特異的に結合する分子が存在することが示唆された。

4) CRKのSH3変異体による神経細胞の分化誘導

CRKのSH3領域の中で、情報伝達に必要な部位を同定するためにSH3領域のアミノ酸を1または3個置換したCRK変異体を、PC12細胞に微量注入した。各分子のSH3領域に高度に保存されたアミノ酸を置換したCRK変異体であるK150、TQ、L169は神経分化誘導能を消失したが、あまり保存されていないアミノ酸を置換した変異体であるQVQ、TTは依然として情報伝達能を保持していた。

5) ウェストウェスタン法によるCRKのSH3領域結合タンパク質の検出

C R K - S H 3 の細胞内標的分子がタンパク質である可能性を検討するために、P C 1 2 細胞からの抽出タンパク質をS D S - P A G E で分離し、フィルターに転写した後、膜上でS H 3 分子との結合を試みた。その結果、野生型のC R K のS H 3 またはQ V Q、T T のS H 3 では、約118、125、136 k D a の分子量のバンドが検出された。また、これらのタンパク質は細胞分画法により、細胞質に存在していることが示された。しかし、情報伝達能を消失しているK150、T Q、L169のS H 3 領域やs r c、P L C γ 、P I - 3 K のS H 3 領域を用いた場合には、上記のバンドは検出されなかった。以上より、C R K のS H 3 が3つの分子量のタンパク質と結合することと、情報伝達能を保持することとの間に相関がみられた。

6) 抗R a s 抗体によるC R K 媒介情報伝達の抑制

神経成長因子(N G F)によるP C 1 2 細胞の分化誘導にはR a s タンパク質の活性化が必要であることが証明されている。我々は、C R K タンパク質がP C 1 2 の分化を誘導する場合にも、R a s の活性化が必須であるか否かを検討した。はじめに、我々が準備した抗R a s 抗体がP C 1 2 細胞にたいするN G F の作用を抑制することを確認した後、この抗体をC R K と同時にP C 1 2 細胞に微量注入したところ、C R K による神経分化誘導は抑制された。尚、この抗R a s 抗体は陽性コントロールとしてv R a s によるP C 1 2 細胞の分化誘導を阻害することを確認している。以上より、C R K の作用点は、細胞内情報伝達系の中でR a s の上流に位置していると考えられた。

考察：

C R K は大部分がS H 2 / S H 3 領域から成り立っており、酵素活性部位をもたないが、神経細胞に対して分化誘導能をもつことが明らかにされ、このC R K の情報伝達能にはS H 2 / S H 3 領域の2つの領域が必要であることが示された。さらに、C R K は、チロシンキナーゼからR a s 蛋白へのシグナルの流れをつなぐアダプター分子として作用することが明らかにされた。

細胞内でC R K は自己リン酸化されたチロシンキナーゼ型の増殖因子受容体にS H 2 領域を介して結合し、また、S H 3 領域を介して細胞質内の標的タンパク質と結合することによって、C R K を介する細胞内情報伝達分子複合体を形成する。この、細胞膜近傍に形成された複合体によって、R a s タンパク質が活性化された後、情報が核に伝達されP C 1 2 細胞の場合は分化誘導という表現形に至ると考えられる。

我々は本論文の実験で、CRKのSH3領域に結合する分子量約130 kDa前後の3つの蛋白を同定したが、最近、同様の方法を用いてSH3結合蛋白のcDNAのクローニングを行った。単離された遺伝子は分子量131 kDaの蛋白をコードしており、C末端にRas蛋白の活性化因子であるGRF (Guanine nucleotide releaseing factor) との相同領域を有していたためC3G (CRK SH3 domain binding GRF) と名づけた (TANAKA, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, in press)。

結語：

本論文の結果とC3G分子のクローニングにより、細胞内での、受容体／チロシンキナーゼ→CRK→C3G→Ras蛋白→核というシグナル伝達機構が明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

Both the SH2 and SH3 Domains of Human CRK Protein Are Required for Neuronal Differentiation of PC12 Cells

(ヒト CRK 蛋白質による神経細胞分化誘導と細胞内情報伝達系の解析)

目的：

細胞は、増殖因子やサイトカインによる刺激を細胞膜表面にある受容体で受けとり、そのシグナルを核へ伝えることによって増殖、分化、その他の様々な応答を引き起こすが、その際にチロシンキナーゼが重要な役割を担っている。近年、活性化された受容体型チロシンキナーゼの下流でSH2 / SH3と呼ばれる領域を有する蛋白群がシグナルを伝達することが明らかにされている。SH2 / SH3領域は、癌遺伝子srcと相同性のある領域として同定され (src homology: SH-)、その後、シグナル伝達にとって重要な酵素群に存在することが示されている。SH2領域はリン酸化チロシン残基を特異的に認識し結合することが明らかにされているが、SH3領域はプロリンリッチな配列に結合することが示唆されているものの、その機能は未だに不明な点が多い。SH2 / SH3領域を介する細胞内シグナル伝達機構を解明するために、構造の大部分がSH2 / SH3領域のみから成り立つCRK蛋白について研究を行った。

方法と結果：

(1) ヒトCRK蛋白を、末梢神経腫瘍PC12細胞の細胞質に微量注入したところ、神経突起の伸張がみられた。細胞内のCRKタンパク質の存在は、抗CRK抗体による免疫染色で確認した。(2) SH2領域が情報伝達に必要であることを、in vivo で証明するために抗SH2抗体をCRKとを同時にPC12細胞に微量注入した。in vitro でリン酸化チロシンとの結合を抑制する抗SH2抗体は、CRKによる神経突起伸張を抑制した。また、SH2領域が、必須であることは、SH2領域の中で高度に保存された1アミノ酸を置換したCRK変異体によってPC12細胞が分化誘導されないことから確認された。(3) SH3領域が分子間結合に関与する可能性を検討した。細胞内にSH3領域の標的となる分子が一定量存在する場合、CRK分子の作用を過剰量のSH3分子が競合的に

阻害すると考えて、SH3分子をCRKタンパク質と同時にPC12細胞に微量注入した。その結果、SH3分子とCRK分子とのモル比が7以上の時に、CRKによる神経分化は阻害され、その程度はモル比に依存性であった。さらに、他の酵素のSH3領域を用いて同様の競合阻害実験を行ったが、各SH3分子/CRKのモル比が7以上であっても、阻害効果は認めなかった。このことから、PC12細胞内にはCRKのSH3領域に特異的に結合する分子が存在することが示唆された。(4) CRKのSH3領域のアミノ酸を1または3個置換したCRK変異体を、PC12細胞に微量注入した。各分子のSH3領域に高度に保存されたアミノ酸を置換したCRK変異体は神経分化誘導能を消失したが、あまり保存されていないアミノ酸を置換した変異体は依然として情報伝達能を保持していた。(5) CRKのSH3の細胞内標的分子がタンパク質である可能性を検討するために、PC12細胞からの抽出タンパク質をフィルターに転写した後、膜上でSH3分子との結合を試みたところ、約118、125、136 kDaの分子量のバンドが検出された。また、これらのタンパク質は細胞分画法により、細胞質に存在していることが示された。(6) CRKタンパク質がPC12の分化を誘導する場合にも、Rasの活性化が必須であるか否かを検討した。抗Ras抗体をCRKと同時にPC12細胞に微量注入したところ、CRKによる神経分化誘導は抑制された。CRKの作用点は、細胞内情報伝達系の中でRasの上流に位置していると考えられた。(7) CRKのSH3結合蛋白のcDNAのクローニングを行った。単離された遺伝子は分子量131 kDaの蛋白をコードしており、C末端にRas蛋白の活性化因子であるGRF (Guanine nucleotide releasing factor) との相同領域を有していたためC3G (CRK SH3 domain binding GRF) と名づけた (TANAKA, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, in press)。以上の結果より、細胞内での、受容体/チロシンキナーゼ→CRK→C3G→Ras蛋白→X→核というシグナル伝達機構が明らかにされた。

口頭発表にあたり、癌研分子遺伝葛巻教授より、アダプター分子CRK、GRB2とレセプターの結合の特異性、SH3領域と細胞骨格の結合について、免疫細菌感染柿沼教授より、SH3領域とプロリンリッチ配列との結合についての質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答を行った。また、副査の葛巻、柿沼両教授には個別の審査を受け合格と判定された。

以上、本研究はCRK蛋白がチロシンキナーゼの下流でアダプター分子として機能しC3Gを介してRas蛋白を活性化することを明らかにしたものであり、チロシンキナーゼを介する細胞内情報伝達機構の解明に大きく貢献したものである。よって、博士(医学)の学位授与に充分値するものと判定された。