

学位論文題名

変異体 Crk II-23による NRK 細胞の

EGF, TGF- β 依存性トランスフォーメーションの抑制機構の解析

学位論文内容の要旨

〔目的〕 アダプター蛋白は様々な細胞表面から受容体を介した細胞内への情報を伝達する役割を担っている。v-CrkはニワトリのレトロウイルスCT10の癌遺伝子産物であり、その細胞内ホモログが、アダプター蛋白として初めに発見された。Crk蛋白は様々な組織で胎児から成人ですべての臓器で発現している。このことはCrk蛋白は細胞に不可欠な蛋白であることを示唆する。上皮増殖因子 (EGF) とトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β) でトランスフォーメーションするNRK細胞に突然変異源を作用させて、トランスフォーメーション抵抗性変異復帰株NRK23細胞が得られた。この変異復帰株NRK23細胞の解析からアダプター分子CrkIIをコードする遺伝子に変異が生じていることが判明した。遺伝子変異の結果、CrkII蛋白のアミノ末端側のSH3領域に2カ所にアミノ酸置換が生じている (CrkII-23)。そこで本研究では、Crk蛋白の正常細胞での役割を明らかにする目的で、野性型CrkIIと変異型CrkII-23の生化学的違いを調べた。

〔材料と方法〕 1. 発現ベクター：野性型CrkII、変異型CrkII-23、CrkII-23-R38V変異体とCrkII-23-W169L変異体にMycタグのcDNAをcrkのcDNAのN末端に結合させた。タグをつけたcDNAはpCAGGS発現ベクターまたはネオマイシン耐性遺伝子をもつpCAGGS発現ベクター、pCXN2にサブクローニングした。
2. 細胞：人のEGF受容体を発現したNIH3T3細胞系とCOS1細胞を、5%FBS添加DMEMにて培養を行った。発現ベクターとp-cos-SV2hmB-pLをLipofectamineを用いNIH3T3細胞にトランスフェクトし、ハイグロマイシンBで選別を行い、数個独立したクローンを分離し、Crk蛋白を同等量発現しているクローンを実験で使用した。
3. 免疫沈降と免疫ブロッティング：細胞を飢餓状態にしたのち、EGFで刺激した。細胞をTBS-V bufferで2度洗浄し、溶解バッファーで細胞を溶解した。同等量の蛋白を免疫沈降と免疫ブロッティングに使用した。
4. EGF受容体と大腸菌にて作成したCrk蛋白の結合：ラットのCrkIIとCrkII-23をGST融合蛋白として発現、精製した。EGF刺激前後のNIH3T3細胞を溶解バッファーで溶解し、GST-CrkIIまたはGST-CrkII-23を加え反応させた。GST融合蛋白を回収し、SDS-PAGE後、抗EGF受容体抗体にてウエスタンブロッティングを行った。
5. Crkの脱リン酸化：NIH3T3に発現させたCrkII蛋白を抗Crkモノクローナル抗体にて免疫沈降した。この免疫複合体をPTP1Bと反応させた。溶解バッファーで洗浄した後、SDS-PAGEし、抗Crkモノクローナル抗体にてウエスタンブロッティングした。
6. コロニーアッセイによるトランスフォーム能の解析：野性型または変異型のCrkをリン酸カルシウム法にてNRK細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトしたNRK細胞をG418を含むメEDIUMにて培養し、抗生剤耐性になったコロニーのうちEGFとTGF- β 存在下でトランスフォーム能を検討した。

〔結果〕 1. EGF刺激下におけるCrkIIのチロシンリン酸化：NIH3T3にてEGF刺激後42 kDaのCrkIIが増加し、リコンビナントのプロテインチロシンフォスファターゼ、GST-PTP1Bを反応させると42 kDaのCrkIIは消失した。このことは電気泳動速度の遅

い42 kDaのCrkIIはチロシンリン酸化型であることを示唆している

2. CrkIIとCrkII-23のEGF受容体への結合：CrkII-23はNRK細胞においてEGFとTGF- β 依存性トランスフォーメーションを抑制することから、CrkIIとCrkII-23のEGF受容体への結合について調べた。NIH3T3、3T3-Myc-CrkII、と3T3-Myc-CrkII-23細胞を用い、EGF刺激前後で細胞を溶解し、抗EGF受容体抗体で免疫沈降した。野性型のCrkIIは、EGF刺激依存性にEGF受容体に結合する。対照的に、変異体であるCrkII-23は刺激前にも結合している。EGF刺激後には、野性型CrkIIと変異型CrkII-23は同等量EGF受容体に結合した。

3. *in vitro*でのGST-CrkIIとGST-CrkII-23のEGF受容体への結合：変異型CrkII-23がEGF受容体に静止状態の細胞で結合する機構を明らかにするために、*in vitro*での結合を見た。GST-CrkIIとGST-CrkII-23はEGF受容体に同等量EGF刺激後に結合した。

NIH3T3、3T3-Myc-CrkIIと3T3-Myc-CrkII-23細胞溶解液間の違いも見られなかった。これらの結果は、真核生物におけるCrkII-23の翻訳後修飾が、静止期細胞でEGF受容体に対しての結合の違いの理由であることを示唆する。

4. CrkII-23の変異体解析：CrkII-23がNRK細胞のトランスフォーメーション抑制機構にSH2またはSH3(N)領域が必須であることを調べた。SH2またはSH3領域の結合能に必須なアミノ酸を置換したCrkII-23-R38VまたはCrkII-23-W169Lという2つの変異体を作成し、この変異体の生物学的活性を調べた。CrkII-23とは対照的にCrkII-23-R38VまたはCrkII-23-W169Lという2つの変異体は、EGFとTGF- β 存在下でトランスフォーメーションを抑制できなかった。このことはCrkII-23のトランスフォーメーション抵抗性機能には、SH2またSH3(N)領域が必須であることを示している。変異体のEGF受容体への結合を調べた。CrkII-23-R38VとCrkII-23-W169LともにEGF刺激以前のEGF受容体に結合した。

[考察] NRK23細胞は、CrkII蛋白をコードする対立遺伝子のうちSH3(C)領域の1本に変異が入り変異型CrkII-23をコードしもう1本は野性型CrkIIをコードしている。このためにNRK23細胞は、EGFとTGF- β 存在下でのトランスフォーメーションに抵抗性となった。変異型CrkII-23が機能消失型ではなく機能獲得型の変異であることが以下のことから考えられる。CrkII-23のSH3(C)領域が機能を失っているとすれば、SH3(C)領域を持たず、NRK細胞のトランスフォーメーション抑制することのできないCrkIとCrkII-23は同等の機能を持つと考えられる。NRK23細胞とNRK細胞でCrkIIまたはCrkII-23の全蛋白発現量またはmRNA発現量にも違いはない。

CrkIIとCrkII-23の違いは、CrkII-23は静止期細胞でEGF受容体に結合することである。SH2またはSH3(N)領域の変異体を用いた解析によって、この結合はSH2またはSH3(N)領域を介した結合ではなくSH3(C)領域を介したものであることが示唆された。大腸菌で発現させたCrkIIとCrkII-23を用い、この刺激前の結合の原因がEGF受容体側かCrk側のどちらにあるかを*in vitro*で調べたが*in vivo*での結合の違いは見られない。静止期細胞でCrkII-23がEGF受容体に結合する機構は、他の蛋白との物理学的結合を含め細胞内での翻訳後修飾が調節しているのではないかと思われる。

アダプター蛋白の機能の1つは、細胞質の酵素をチロシンキナーゼ受容体のような膜に局在する蛋白近傍に移動させることにある。CrkII-23がEGF刺激前にEGF受容体に結合していることは、CrkII-23はCrkIIの膜移行かつ活性化状態を反映しているとみなすことができる。NRK23細胞のEGFとTGF- β 存在下でのトランスフォーメーション抑制にCrkII-23のSH2またはSH3(N)領域が必要であることは、膜近傍に存在するCrkII-23は活性化状態であることを支持する。

多くの蛋白が、CrkIIのSH2またはSH3(N)領域に結合するが、SH3(C)領域の機能についてはほとんどわかっていない。SH2領域を介して刺激後に情報を下流に伝えるとされているEGF受容体の複合体に、SH3(C)領域に変異が入ったCrkII-23変異体が含まれることを明らかにした。

[結語] NRK細胞は、上皮増殖因子(EGF)とトランスフォーミング増殖因子(TGF- β)でトランスフォーメーションする。トランスフォーメーション抵抗性変異復帰株NRK23細胞の解析からアダプター分子CrkIIをコードする遺伝子に変異が生じていることが判明した。遺伝子変異の結果、CrkII蛋白のアミノ末端側のSH3領域に2カ所にアミノ酸置換が生じている(CrkII-23)。そこで野性型CrkIIと変異型CrkII-23

の生化学的違いを調べた結果以下の結果が得られた。

- 1) *in vivo*で、野生型CrkIIと変異型CrkII-23は、EGF刺激後に同等にEGF受容体に結合するが、変異型CrkII-23は静止期のNIH3T3細胞でもEGF受容体に結合できた。
 - 2) *in vitro*では大腸菌にて作成したGST-CrkIIとGST-CrkII-23は、EGF刺激前後のNIH3T3細胞のEGF受容体に同等量結合し、*in vitro*での結合能に違いは見られなかった。
 - 3) 変異型CrkII-23のSH2またはSH3の機能消失変異体はCrkII-23のトランスフオメーション抑制活性を失うが、静止期細胞のEGF受容体に結合できた。
- 以上の結果より、継続的にCrkII23がEGF受容体に結合することと、CrkII-23のSH2またはSH3を介した情報が伝達されることが、NRK23細胞でEGF、TGF- β によるトランスフオメーションを抑制するメカニズムであること示された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 守内 哲也
副査 教授 齋藤 政樹
副査 教授 葛巻 暹

学位論文題名

変異体 Crk II-23による NRK 細胞の

EGF, TGF- β 依存性トランスフォーメーションの抑制機構の解析

アダプター蛋白は、細胞表面から様々な受容体を介した細胞内への情報を伝達する役割を担っており、Crk蛋白は最初に見出されたアダプター蛋白である。そのほとんどの部分がSrc homology2 (SH2) 領域及びSrc homology3 (SH3) 領域からなり、それ自体は酵素活性を持たない。Crkは、そのSH2を介しリン酸化チロシンを含む分子に特異的に結合することにより情報を受け取り、そのSH3を介してプロリンに富んだSH3結合領域を持つSH3結合タンパクへと情報を伝えていく。Crk蛋白は増殖因子、細胞接着や、免疫抗原刺激などさまざまな情報伝達に関わっていることが報告されている。近藤らは、上皮増殖因子 (EGF) とトランスフォーメーション増殖因子 (TGF- β) でトランスフォーメーションするNRK細胞に突然変異源を作用させて、トランスフォーメーション抵抗性変異株NRK23細胞を得た。この変異株NRK23細胞ではCrkII蛋白のアミノ末端側のSH3領域に2カ所アミノ酸置換が生じている (CrkII-23) ことが知られている。そこで、野性型CrkIIと変異型CrkII-23の生化学的違いを調べた。

はじめに、SH3 (N) を介してシグナルを伝えるC3G蛋白への結合を、COS細胞に一過性に発現させたCrkIIまたは変異型CrkII-23蛋白を用いて免疫沈降法により調べた。その結果、野性型CrkIIまたは変異型CrkII-23の間にC3Gへの結合の差はみられなかった。次に、EGF受容体を発現しているNIH3T3細胞で野性型CrkIIまたは変異型CrkII-23を過剰発現させ、EGF受容体とCrk蛋白との結合をみた。その結果 in vitroで、野性型CrkIIと変異型CrkII-23は、EGF刺激後に同等にEGF受容体に結合するが、変異型CrkII-23は静止期のNIH3T3細胞でもEGF受容体に結合できた。変異型CrkII-23のSH2またはSH3の機能消失変異体を発現することのできるベクターをNRK細胞にトランスフェクションし、EGFおよびTGF- β 依存性トランスフォーメーションを抑制できるかを調べた。しかしこれ

らの変異体はEGFおよびTGF- β 依存性トランスフォーメーションを抑制できなかった。このことは変異体CrkII-23は機能消失型の変異体ではなく、むしろ機能獲得型の変異体であることを示唆している。また変異型CrkII-23のSH2またはSH3 (N) の機能消失変異体を過剰発現させた細胞を作成してEGF受容体への結合をみた。その結果、変異体は静止期細胞のEGF受容体に結合できることが示された。変異体CRKII-23のこれらの結果から、継続的にCrkII-23がEGF受容体に結合すること、およびCrkII-23のSH2またはSH3を介した情報が伝達されることが、NRK23細胞でEGFおよびTGF- β によるトランスフォーメーションを抑制するメカニズムであることが示された。

以上のことから、正常NRK細胞では、EGF刺激が入った後にRasを介するシグナルが大量に伝わるために細胞増殖およびトランスフォーメーションに向かう。しかし、NRK23細胞では、恒常的にCrkII-23が細胞膜近傍に存在するためにC3G-Rap1を介したシグナルが恒常的に入っており、Rasを介するシグナルを抑制できるという予測モデルを提示した。

発表後、葛巻教授より野性型CrkIIと変異型CrkII-23の結合様式の違いに関して、NRK細胞の性質についておよび癌化抑制のメカニズムについての質問がなされた。次いで齊藤政樹教授より、Crk蛋白とcell cycleとの関連性について、癌抑制シグナルの様式についておよび膜移行蛋白についての考え方について質問がなされた。最後に守内教授より、癌化と癌抑制へのCrk蛋白の関与について、CrkIとCrkIIの違いについて、CrkIIのC末端のSH3の役割についておよび今後のCrk蛋白の研究における課題についての質問がなされた。発表者はいずれの質問に対しても豊富な知識に基づいて明解に回答した。

さらに、本研究で用いた実験系から細胞の癌化とその抑制に関する分子生物学的知見が得られると期待される。

審査員一同はこれらの、CrkのEGFおよびTGF- β 依存性トランスフォーメーションの抑制機構の解析を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。