

学 位 論 文 題 名

DOCK180, a Major CRK-Binding Protein, alters Cell Morphology upon
Translocation to the Cell Membrane

(CRKの主要結合タンパクDOCK180の細胞膜への移行による細胞形態変化の誘導)

学位論文内容の要旨

[目 的]

v-Crk は CT10 レトロウイルスの癌遺伝子産物として同定され、その大部分の構造が Src homology 2 (SH2) 領域および Src homology 3 (SH3) 領域からなるアダプタータンパクである。細胞内の v-Crk の同族体はニワトリ、ヒト、マウスで単離されており、ヒトの CRK 遺伝子からはスプライシングにより 28 kDa の CRK-I と 42 kDa の CRK-II の 2 つのタンパクが翻訳される。CRK を PC12 細胞にマイクロインジェクションすると神経分化が誘導される。また、v-Crk の過剰発現により EGF 刺激下での PC12 細胞の神経分化を加速させる。これらの CRK 依存性の分化には Ras の活性化が必要で、それは CRK の過剰発現により増強される。CRK, Grb2/Ash, Nck などを含むアダプター分子はそれ自身酵素活性を持たず、SH2 を介してリン酸化チロシンを含む分子より情報を受け取り、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。またアダプター分子の機能として、SH3 領域に結合した細胞質内の酵素を細胞膜へ運ぶ役割をはたしている。CRK の SH3 を用いたファーウエスタン法によりこの SH3 が 135~145, 160, 180 kDa のタンパクと結合することが明らかにされていた。本研究では、これら CRK SH3 結合タンパクのうち 180 kDa のタンパクをコードする遺伝子を 180 kDa の CRK の下流因子 (180 kDa protein downstream of CRK) より DOCK180 と名付け、その分子クローニングを試み、かつ得られた分子の機能解析を行なった。

[材料と方法]

1. 遺伝子のスクリーニングのためにヒト脾臓 cDNA ライブラリーを用いた。
2. 結合タンパクを検索するために HeLa 細胞ライセートを抗 DOCK180 抗体で免疫沈降し、GST-CRK SH3, GST-Grb2/Ash をプローブとしたファーウエスタン法を実施した。
3. ノーザンブロット解析、ファルネシル化、細胞への遺伝子トランスフェクションなどは常法に従った。
4. DOCK180 の細胞内分布と DOCK180 導入後の形態変化を免疫組織染色および共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

[結 果]

1. ヒト脾臓の cDNA の発現ライブラリーより陽性クローン ST2 が得られた。この ST2 をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングし、全長 6,519 bp の未知の cDNA を単離した。この cDNA は、5,598 bp のオープンリーディングフレームを持ち 1,866 個のアミノ酸からなる計算上 215 kDa のタンパクをコードしていた。アミノ酸配列からその C 末端にプロリンに富んだ CRK SH3 に結合しえる部分が 2 つ存在すること、および

そのN末端にSH3領域が存在することが判明した。

2. ファーウエスタン法では、免疫沈降後の上清中にはCRKSH3 および Grb2/Ash に結合する 180 kDa のタンパクはみられず、沈降物中に検出された。逆に、細胞のライセートを抗 CRK 抗体で免疫沈降したところ、DOCK180 は抗 CRK 抗体の沈降物の中に含まれていた。
3. DOCK180 の 7.4 kb の mRNA の発現をノーザンブロットにて調べると、末梢白血球以外の全身諸臓器で発現が認められた。発現量の多い臓器は胎盤、肺、腎臓、脾臓、卵巣で、少ない臓器は胸腺、精巣、大腸であった。血球系細胞である Molt-4 Tcells, Raji B cells, THP-1 monocytes では DOCK180 の発現はみられなかった。
4. 野生型の DOCK180 を NIH3T3 細胞にトランスフェクションすると、DOCK180 は細胞質内にびまん性に分布し、細胞形態に変化は認められなかった。一方、Ki-Ras のファルネシル化信号である CAAXbox を DOCK180 の C 末端に融合させて作出した DOCK-F をトランスフェクションすると、DOCK180 は細胞膜に局在し、紡錘形の NIH3T3 細胞を平坦な、多角形細胞へと変化させた。
5. NIH3T3 細胞はヒト EGF レセプターを発現させた紡錘形の細胞であり、EGF で刺激すると特徴的なトランスフォーム（この場合は細胞の球形化）を起こす。野生型の DOCK180 あるいはファルネシル化 GST (GST-F) のみをトランスフェクションした場合には EGF の刺激により細胞の球形化がみられた。一方、DOCK-F をトランスフェクションした細胞においては EGF 刺激により細胞質が樹枝状に進展する樹状様細胞となった。さらに、自己リン酸化部位を欠いた EGF レセプターの変異体を持つために EGF 刺激に対して形態的なトランスフォームを示さない株化細胞を用いて EGF 刺激の効果を調べたところ、DOCK-F をトランスフェクションしても細胞は樹枝状に変化しなかった。

[考 察]

新たに同定された CRK 結合タンパク DOCK180 を膜へ移行させることにより細胞形態が変化することが明らかとなった。DOCK-F の発現によって引き起こされる細胞形態の変化が DOCK180 や GST-F の発現によって起こらないことから、この変化は DOCK180 を膜へ移行させたことに起因するものと考えられる。本実験で DOCK-F が NIH3T3 細胞において EGF によるトランスフォーメーションに拮抗していることが示されたが、もう一つの CRK SH3 結合分子である C3G もファルネシル化により Ras によりトランスフォームした NIH3T3 細胞を正常に戻すことが知られている。従って、2つの主要な CRK-SH3 結合タンパクは癌化抑制作用があることが推測される。また、DOCK180 は血球系細胞において発現がみられないことから細胞接着に関連した情報伝達に関与していることが推察される。CRK, Grb2/Ash はもともと細胞質内のアダプター分子として同定されたが、現在では細胞の接着に関与する情報をも伝えることが知られている。CRK の SH2 領域はインテグリン刺激によりチロシン残基がリン酸化されるパキシリンや p130^{CAS} といった分子とも結合する。このように細胞内の CRK タンパクの中には細胞接着に関与する情報伝達に関わっているものもあり、CRK の SH3 に結合し、細胞形態を制御する DOCK180 の同定は、CRK タンパクの細胞の接着における新たな役割を示すものと推測された。

[結 語]

新しいCRK主要結合タンパクとして DOCK180 を同定し、その機能解析を行い次の結果が得られた。

1. DOCK180 は全長 6,519 bp であり、5,598 bp の翻訳領域を持ち、1,866 個のアミノ酸からなる計算上 215 kDa のタンパクをコードしており、そのタンパクはプロリンに富む SH3 結合領域を持っていた。
2. DOCK180 はほぼ全ての臓器で発現がみられたが、血球系細胞ではみられず接着細胞での情報伝達に関与していることが示唆された。
3. DOCK180 を細胞膜へ移行させると紡錘形の NIH3T3 細胞の形態を平坦な、多角形細胞

へと変化させた。またファルネシル化された DOCK180 からの情報は EGF 刺激によるトランスフォーメーションの情報と拮抗していた。

以上の結果より、DOCK180 は細胞接着機構を介して形態形成や癌化抑制に関与している可能性が示唆された。

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

DOCK180, a Major CRK-Binding Protein, alters Cell Morphology upon Translocation to the Cell Membrane

(CRKの主要結合タンパクDOCK180の細胞膜への移行による細胞形態変化の誘導)

細胞内の情報伝達に関わるアダプター分子の一つCRKは、CT10レトロウイルスの癌遺伝子産物として同定され、そのほとんどの部分がSrc homology 2 (SH2) 領域およびSrc homology 3 (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むSH3結合領域を持つSH3結合タンパクへと情報を伝える。本研究においては細胞内情報伝達におけるCRKの生理的意義と癌化における意義を探るため、CRKのSH3に結合する未知の分子を同定・単離し機能解析を行った。

ヒト脾臓のcDNAの発現ライブラリーをファーウエスタン法によりスクリーニングする事により陽性クローンST2が得られた。更にスクリーニングを進めることにより1,866個のアミノ酸をコードする新しい遺伝子が得られた。180 kDa protein Downstream Of CRKの頭文字をとりDOCK180と名付けた。アミノ酸配列からそのカルボキシル末端にCRKのプロリンに富んだSH3領域に結合しうる部分が2つ存在すること、またそのアミノ末端にSH3領域が存在することが判明した。それ以外に他の既知の分子との相同性は見られなかった。DOCK180の7.4kbのmRNAの発現をノーザンブロット解析で調べると、末梢白血球以外の全臓器で発現が認められた。発現量の多い臓器は胎盤、肺、腎臓、脾臓および卵巣で、少ない臓器は胸腺、精巣、大腸であった。DOCK180の機能を調べるためにKi - Rasのファルネシル化信号CAAX boxをDOCK180のカルボキシル末端に融合させ、それをNIH3T3細胞内で発現させた。野生型のDOCK180では細胞質内にびまん性に分布し、細胞形態に変化を与えないのに対し、ファルネシル化されたDOCK180 (DOCK - F)は細胞膜に局在し、紡錘形のNIH3T3細胞を平坦な、多角形細胞へと変化させた。膜移行型の

DOCK180はセリン残基がリン酸化されていることが判明した。CRKはインテグリンの刺激でリン酸化される分子p130CASあるいはPaxillinといった分子とSH2領域を介して結合していることが知られているので、インテグリン刺激でDOCK180がリン酸化されるかどうか検討した。その結果、DOCK180はインテグリンの刺激依存性にリン酸化されることがわかった。またv - crk, v - srcで癌化した細胞においてもDOCK180がリン酸化されていることが明らかにされた。今回新たに単離・同定されたDOCK180は、細胞の形態変化に関する信号伝達に関与している事が示され、インテグリン刺激からの信号伝達に関わっている新しい分子であることが示唆された。

発表後、葛巻教授より形態変化に関して3T3以外の細胞での検討、膜移行型DOCK180発現細胞におけるアクチンの変化とファルネシル化について、およびDOCK180の骨髄での発現などについての質問があった。次いで齊藤政樹教授より、リン酸化とシグナル伝達のメカニズム、シグナル伝達の本質、本研究の意義などについて質問があった。最後に守内教授より膜移行型DOCK180発現細胞の形態上の変化に伴う多核化などについて質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は多くの報告結果を引用し、豊富な知識に基づいて明解に解答した

本研究で新たに単離されたDOCK180を用いることにより正常細胞および癌化した細胞における細胞形態を制御する信号伝達のメカニズムおよび細胞接着斑の働きなどを解明する事ができると期待される。

審査員一同はこれらの、CRKの主要結合タンパクDOCK180に関する研究成果を高く評価し、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。