

学 位 論 文 題 名

血球細胞特異的に発現する M-DOCK 蛋白の機能の解析

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

DOCK180 は、アダプター分子 Crk の SH3 領域に結合する蛋白として同定され、その機能は p130^{Cas}-Crk 複合体を介する focal adhesion からのシグナル伝達に関与することがわかっている。さらに、DOCK180 は Rac1 と結合し、活性化することで focal adhesion から細胞骨格へのシグナルを伝達していることが報告された。

ヒトにおける DOCK180 の相同蛋白は、データベース検索にて少なくとも 3 つが確認された。骨髓芽球 (Myeloblast) 由来の KG-1 細胞からクローニングされた KIAA0209 (GenBank/EMBL/DDBJ, D86964)、脳から分離された KIAA0299 (AB002297)、そしてリンパ芽球から分離された GS034D21 である。すなわち、ヒトにおいては少なくとも 4 つの DOCK ファミリー蛋白の存在が認められる。しかしながら、これまで DOCK180 以外のものについてはその機能、性質について全く報告されていない。本研究ではこのうち、KIAA0209（以下、M-DOCK と呼称）について解析したので報告する。

II. 研究方法

1. Plasmids

KIAA0209 の cDNA は、かずさ DNA 研究所、野村博士より御供与頂いた。これを本実験で使用するに際し、N 末に Flag tag を付けた全長の cDNA を pCXN2 発現ベクターに組み込んで用いた。CrkII 及び DOCK180 に関する発現ベクターは、松田らが作製したものをを用いた。

2. 抗体

大腸菌にて M-DOCK の C 末の GST-tag recombinant protein を作製。これをウサギに免疫して、抗 M-DOCK ポリクローナル抗体を作成した。抗 DOCK180 ポリクローナル抗体及び抗 Crk 3A8 モノクローナル抗体は、松田らが作製したものをを使用した。

3. 細胞

293T 細胞及び NRK 細胞は DMEM にて培養を行った。Jurkat 細胞、Ramos 細胞、及び THP-1 細胞は、RPMI1640 にて培養を行った。

4. 免疫染色

ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト剖検標本を用いて、抗 M-DOCK ポリクローナル抗体にて各組織の免疫染色を行った。

6. DNA トランスフェクション、免疫沈降と Western blotting

pCXN2-CrkII と pCXN2-Flag-DOCK180 ないし pCXN2-Flag-M-DOCK を、リン酸カルシウム法を用いて 293T 細胞にトランスフェクトし、48 時間後に溶解バッファーにて回収した細胞溶解液を各種抗体と protein A-Sepharose を用いて免疫沈降を行った。ビーズに結合した蛋白は、SDS-PAGE にて分離し、抗 Flag M5 抗体及び抗 CrkII 抗体にて Western blotting を行った。

7. マイクロインジェクション法

NRK 細胞にマイクロインジェクション装置にて、圧 400 hPa, 0.1 秒のコンディションで pEGFP と共に各 cDNA 発現ベクターを核内に導入した。細胞はインジェクション後 5 時間から 30 分おきに、confocal laser microscopy で観察した。

8. THP-1 細胞の Phorbol ester 刺激

浮遊状態で培養した THP-1 細胞に TPA を最終濃度 10 ng/ml となるように注入して 24 時間後に細胞を回収した。細胞溶解液を SDS-PAGE にて分離し、Western blotting にて内因性 M-DOCK 蛋白の発現を調べた。

III. 結果

1. DOCK ファミリー蛋白の相同性の比較

M-DOCK の cDNA は全長 5,490 bp, 1,830 アミノ酸をコードし、計算上 212 kDa の蛋白を発現する。アミノ酸配列で、C 末の変領域を除くと archetype である DOCK180 に対して 62.3% と高い同一性を持つ。

2. M-DOCK のヒト組織における発現分布

Northern blotting にて M-DOCK mRNA の発現は末梢血白血球で最も強く認められ、続いて胸腺、脾臓で発現が見られ、DOCK180 に対して相補的であった。各種組織の免疫染色では、間質内及び肺泡マクロファージ、リンパ球において M-DOCK 強陽性であった。

3. M-DOCK と Crk の結合

CrkII と DOCK180 ないし M-DOCK を強制発現させた 293T 細胞の溶解液を、抗 Crk モノクローナル抗体にて免疫沈降した結果、DOCK180 と異なり、M-DOCK と CrkII との結合は認められなかった。

4. M-DOCK 強制発現による NRK 細胞の形態変化

マイクロインジェクションによって M-DOCK を NRK 細胞において強制発現させると、細胞の形態が球形となり、また細胞を基質から剥離させることが示された。

IV. 考察

Northern blotting 及び、Western blotting の結果、当初の予想通り DOCK180 と M-DOCK の発現は完全に相補的であった。すなわち、M-DOCK は血液中及び組織においても T 細胞、B 細胞、マクロファージといった浮遊系細胞にのみ発現が認められる一方、DOCK180 は付着系の細胞にのみその発現が認められた。また、293T 細胞における抗 Crk 抗体による免疫沈降で、M-DOCK は CrkII と共沈せず、M-DOCK は CrkII を介するシグナル伝達には関与しないことが証明された。その意味において、DOCK180 が、線虫における同位体である Ced-5 の変異体で失われた 2 つの機能のうちひとつしか補完できなかったということは、Ced-5 の持つ 2 つの機能がヒトにおいては細胞の系に応じて 2 つの異なった DOCK ファミリー蛋白に分離された可能性を示唆している。さらに、DOCK180 が補完出来なかった ced-5 の機能は apoptotic body の食食であり、ヒトにおいて phagocytosis を担っているのが血球細胞特異的に発現する M-DOCK である可能性があり、今後の更なる検討が必要である。

V. 結語

1. DOCK ファミリーの一員である M-DOCK は計算上、212 kDa の分子量を有する蛋白で、N 末には DOCK180 同様 SH3 構造を持つが、C 末には DOCK180 に見られる Crk 結合部位を欠き、Crk 蛋白との結合も見られない。
2. M-DOCK の発現は白血球、脾臓、胸腺に認められ、その他主要臓器には認められなかった。これは DOCK180 の分布と相補的であり、浮遊系の細胞においては M-DOCK が、付着系の細胞では DOCK180 が機能していると考えられる。
3. M-DOCK は NRK 細胞において強制発現させると、細胞の形態が球形となり、また細胞を基質から剥離させる機能をもつことが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

血球細胞特異的に発現する M-DOCK 蛋白の機能の解析

目的: DOCK180 は、アダプター分子 Crk の SH3 領域に結合する蛋白として同定され、その機能は、Rac1 と結合し、活性化することで focal adhesion から細胞骨格へのシグナルを伝達していることが報告された。ヒトにおける DOCK180 の相同蛋白は、骨髓芽球からクローニングされた KIAA0209 (GenBank/EMBL/DDBJ, D86964)、脳から分離された KIAA0299 (AB002297)、そしてリンパ芽球から分離された GS034D21 の 3 つが確認されているが、これまで DOCK180 以外のものについてはその機能、性質について全く報告されていない。本研究ではこのうち、KIAA0209 (以下、M-DOCK と呼称) について解析したので報告する。

材料と方法: KIAA0209 の cDNA は、かずさ DNA 研究所、野村博士より御供与頂いた。これを本実験で使用するに際し、N 末に Flag tag を付けた全長の cDNA を pCXN2 発現ベクターに組み込んで用いた。

293T 細胞及び NRK 細胞は DMEM にて培養を行った。Jurkat 細胞、Ramos 細胞、及び THP-1 細胞は、RPMI1640 にて培養を行った。

ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト剖検標本を用いて、抗 M-DOCK ポリクローナル抗体にて各組織の免疫染色を行った。用いた抗 M-DOCK 抗体は、大腸菌にて M-DOCK の C 末の GST-tag recombinant protein を作製。これをウサギに免疫して作成した抗 M-DOCK ポリクローナル抗体を使用した。

293T 細胞へのトランスフェクトはリン酸カルシウム法にて行った。回収した細胞溶解液を各種抗体と protein A-Sepharose を用いて免疫沈降を行った。ビーズに結合した蛋白は、SDS-PAGE にて分離し、抗 Flag M5 抗体及び抗 CrkII 抗体にて Western blotting を行った。

NRK 細胞への M-DOCK 強制発現は、マイクロインジェクション装置にて、圧 400 hPa, 0.1 秒のコンディションで pEGFP と共に各 cDNA 発現ベクターを核内に導入した。細胞はインジェクション後 5 時間から 30 分おきに、confocal laser microscopy で観察した。

結果: M-DOCK の cDNA は全長 5,490 bp, 1,830 アミノ酸をコードし、計算上 212 kDa の蛋白を発現する。アミノ酸配列で、C 末の可変領域を除くと archetype である DOCK180 に対して 62.3% と高い同一性を持つ。

Northern blotting にて M-DOCK mRNA の発現は末梢血白血球で最も強く認められ、続いて胸腺、脾臓で発現が見られ、DOCK180 に対して相補的であった。各種組織の免疫

染色では、間質内及び肺胞マクロファージ、リンパ球において M-DOCK 強陽性であった。

CrkII と DOCK180 ないし M-DOCK を強制発現させた 293T 細胞の溶解液を、抗 Crk モノクローナル抗体にて免疫沈降した結果、DOCK180 と異なり、M-DOCK と CrkII との結合は認められなかった。しかしながら、Rac に対する結合は、DOCK180 同様に認められ、欠失変異体を用いた解析で、Rac との結合部位は 934-1323 アミノ酸に存在することが推定された。

マイクロインジェクションによって M-DOCK を NRK 細胞において強制発現させると、細胞の形態が球形となり、また細胞を基質から剥離させることが示された。

考察：Northern blotting 及び、Western blotting の結果、当初の予想通り DOCK180 と M-DOCK の発現は完全に相補的であった。すなわち、M-DOCK は血球系の細胞にのみ発現が認められる一方、DOCK180 は血球系以外の細胞にその発現が認められた。このことは、DOCK ファミリーの機能がヒトにおいては細胞の系に応じて分離された可能性を示唆する。また、M-DOCK は CrkII と結合しないものの、DOCK180 の下流因子である Rac とは結合することが確認された。Rac は普遍的に発現する一方で、付着系の細胞では細胞骨格の制御、血球系の細胞では phagocytosis や NADPH 産生の制御といった、細胞特異的な機能を持っており、これらの発現制御を担っているのが上流因子である DOCK ファミリーである可能性が考えられた。

公開發表に引き続き、上出教授より、マイクロインジェクション後の M-DOCK 蛋白の発現の確認、M-DOCK の上流因子に関して、田中教授より、Rac の活性化、in vitro での Rac との結合、他の Rac 活性化因子と M-DOCK との相同性に関して、守内教授より、Jurkat 細胞へのアンチセンス導入についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去に行われた関連する研究報告との比較検討や、現在継続中の最新の研究結果などに基づいて明解に解答した。

以上、本研究は新たにクローニングされた DOCK ファミリーの一員である M-DOCK 蛋白について解析し、低分子量 G 蛋白 Rac を介して細胞の形態制御に関する機能を持つことを明らかにしたものであり、博士（医学）の学位授与に充分値するものと思われる。