

学位論文題名

Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180.

(Elmo1による Dock180のユビキチン化の抑制)

学位論文内容の要旨

緒言

細胞内シグナル伝達アダプター蛋白である Crk の SH3 ドメイン結合分子として同定された Dock180 (Downstream of CRK 180-kDa)は、様々なシグナル経路の下流に於いて、Rac1 を活性化することにより細胞運動や貪食作用に関与している。また Elmo1(Engulfment and Cell Motility 1) は線虫の Ced-12 の哺乳動物における相同遺伝子産物として同定され、Dock180 と直接結合し相互作用することによって細胞運動や貪食作用を制御することが明らかにされている。今回我々は Elmo1 と Dock180 との相互作用について検討した。

方法と結果

HEK293T 細胞に Dock180 と Elmo1 を共発現させると、Dock180 単独発現時よりも Dock180 の発現量が上昇する事を見出した。そこで、Elmo1 が Dock180 のタンパク質量を制御している可能性を考え、<sup>[35 S]</sup> -メチオニンを用いて Dock180 及び Elmo1 を過剰発現させた 293T 細胞内のタンパク質を標識し、Dock180 の半減期について検討した。結果、Dock180 単独に比して Elmo1 との共発現で、Dock180 の半減期の延長を認めた。また RT-PCR 法により Dock180 の mRNA 量を検討したところ、Elmo1 存在下、非存在下で Dock180 の mRNA 量はほぼ同量であった。これらの結果から、Dock180 の発現量はタンパク質レベルで何らかの制御を受ける事と Elmo1 が Dock180 のタンパク質の安定化に関与していることが示唆された。

はじめに我々は Dock180 のタンパク質量の制御機構としてユビキチン・プロテアソーム系が関与する可能性を考え、Dock180 が細胞内でユビキチン化されるか否かを検討した。HEK293T 細胞に Dock180 と HA-tag を付加した ubiquitin (HA-ubi) を共発現させた細胞抽出液を用意し、抗 Dock180 抗体での免疫沈降を行った後に抗 HA-tag 抗体を用いたウエスタンブロット法により Dock180 のユビキチン化を検出した。Dock180 は HA-ubi と共発現させた時にのみユビキチン化が検出され、このユビキチン化はプロテオソーム阻害薬である MG-132 によって亢進した。また MG-132 と cycloheptide を用いて内因性の Dock180 の半減期を調べたところ、MG-132 処理によって半減期の延長が認められた。これらの結果より Dock180 は細胞内でユビキチン化されプロテオソームによって分解されることが明らかとなった。

次に Dock180 のユビキチン化に対する Elmo1 の作用を検討する目的で Dock180、HA-ubi に加えて Elmo1 を共発現させた HEK293T 細胞抽出液を用いて Dock180 のユビキチン化を調べた。結果、Elmo1 は Dock180 のユビキチン化を抑制する事が判明した。更に Elmo1 の変異体を用いた解析において Dock180 との結合能を有する Elmo1 の欠失変異体では Dock180 のユビキチン化は抑制され、結合能を有しない変異体では抑制効果が認められなかった。これらの事から、Elmo1 は Dock180 と結合する事によって Dock180 のユビキチン化を抑制することが示された。

更に細胞内での Dock180 のユビキチン化の役割を調べる為に、Dock180 と HA-ubi を発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液を膜成分と細胞質成分に分画し、Dock180 のユビキチン化の程度を比較した所、膜分画に於いてより強いユビキチン化を認めた。また Elmo1 はこの膜分画での Dock180 のユビキチン化を抑制した。また HEK293T 細胞を用いた免疫染色法によって、Dock180 と ubiquitin の細胞周縁部での共局在が観察され、Dock180 のユビキチン化が細胞膜近傍で起こる事が示唆された。

続いて、Dock180 は細胞外からの刺激により Crk 等の上流因子によって膜近傍に誘導される事が知られているので、EGF 刺激、fibronectin 依存的な刺激、Crk の共発現下における膜分画中の Dock180 のユビキチン化の程度を検討した。結果、何れも Dock180 のユビキチン化は亢進した。

#### 考察

Dock180 が細胞内、特に細胞膜近傍でユビキチン化されることが明らかになったが、Dock180 のユビキチン化が細胞膜近傍で起こっている事や細胞外からの刺激によって亢進する事から、Dock180 は細胞外からの刺激を契機に Crk 等の上流因子によって膜近傍に誘導され Rac を活性化すると共にユビキチン化されていると推察される。また Dock180 に対するユビキチン化酵素は同定されておらず、今後の詳細な解析の為にこのユビキチン化酵素の同定が必要である。Elmo1 は結合依存的に Dock180 のユビキチン化を抑制する事が示されたが、詳細な抑制機構については明らかにされていない。ユビキチン化酵素の Dock180 への接近を阻害する可能性や Dock180 のユビキチン化部位を被覆している可能性等が考えられた。今後は、Dock180 の膜近傍への局在がユビキチン化に必要とされる理由や、Dock180 の膜への局在化及び Dock180 のユビキチン化が Rac の活性に与える影響について、Dock180 のユビキチン化酵素の同定も含めて検討する予定である。

#### 結語

- 1) Dock180 が細胞膜近傍でユビキチン化されプロテアソームによる制御を受ける事が示された。
- 2) Elmo1 は Dock180 のユビキチン化を抑制し、Dock180 タンパク質の安定性の上昇に関与した。
- 3) Dock180 のユビキチン化は増殖因子や細胞外マトリックス等、上流からの様々な刺激によって亢進した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

## Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180.

(Elmo1による Dock180のユビキチン化の抑制)

Dock180 は、様々なシグナル経路の下流に於いて、Rac1 を活性化することにより細胞運動や食食作用に関与している。また Elmo1 は Dock180 と直接結合し相互作用することによって細胞運動や食食作用を制御することが明らかにされている。今回我々は Elmo1 と Dock180 との相互作用について検討した。HEK293T 細胞に Dock180 と Elmo1 を共発現させると、Dock180 単独発現時よりも Dock180 の発現量が上昇する事を見出した。そこで、Elmo1 が Dock180 のタンパク質量を制御している可能性を考え、 $[^{35}\text{S}]$  -メチオニンを用いて Dock180 及び Elmo1 を過剰発現させた 293T 細胞内のタンパク質を標識し、Dock180 の半減期について検討した。結果、Dock180 単独に比して Elmo1 との共発現で、Dock180 の半減期の延長を認めた。また RT-PCR 法により Dock180 の mRNA 量を検討したところ、Elmo1 存在下、非存在下で Dock180 の mRNA 量はほぼ同量であった。これらの結果から、Dock180 の発現量はタンパク質レベルで何らかの制御を受ける事と Elmo1 が Dock180 のタンパク質の安定化に関与していることが示唆された。我々は Dock180 のタンパク質量の制御機構としてユビキチン・プロテアソーム系が関与する可能性を考え、Dock180 が細胞内でユビキチン化されるか否かを検討した。HEK293T 細胞に Dock180 と HA-tag を付加した ubiquitin (HA-ubi) を共発現させた細胞抽出液を用意し、抗 Dock180 抗体での免疫沈降を行った後に抗 HA-tag 抗体を用いたウエスタンブロット法により Dock180 のユビキチン化を検出した。Dock180 は HA-ubi と共発現させた時にのみユビキチン化が検出され、このユビキチン化はプロテオソーム阻害薬である MG-132 によって亢進した。また MG-132 と cycloheimide を用いて内因性の Dock180 の半減期を調べたところ、MG-132 処理によって半減期の延長が認められた。これらの結果より Dock180 は細胞内でユビキチン化されプロテオソームによって分解されることが明らかとなった。次に Dock180 のユビキチン化に対する Elmo1 の作用を検討する目的で Dock180、HA-ubi に加えて Elmo1 を共発現させた HEK293T 細胞抽出液を用いて Dock180 のユビキチン化を調べた。結果、Elmo1 は Dock180 のユビキチン化を抑制する事が判明した。更に Elmo1 の変異体を用いた解析において Dock180 との結合能を有する Elmo1 の欠失変異体では Dock180 のユビキチン化は抑制され、結合能を有しない変異体では抑制効果が認められなかった。これらの事から、Elmo1 は Dock180 と結合する事によって Dock180 のユビキチン化を抑制することが示された。更に細胞内での Dock180 のユビキチン化の役割を調べる為に、Dock180 と HA-ubi

を発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液を膜成分と細胞質成分に分画し、Dock180 のユビキチン化の程度を比較した所、膜分画に於いてより強いユビキチン化を認めた。また Elmo1 はこの膜分画での Dock180 のユビキチン化を抑制した。また HEK293T 細胞を用いた免疫染色法によって、Dock180 と ubiquitin の細胞周縁部での共局在が観察され、Dock180 のユビキチン化が細胞膜近傍で起こる事が示唆された。続いて、Dock180 は細胞外からの刺激により Crk 等の上流因子によって膜近傍に誘導される事が知られているので、EGF 刺激、fibronectin 依存的な刺激、Crk の共発現下における膜分画中の Dock180 のユビキチン化の程度を検討した。結果、何れも Dock180 のユビキチン化は亢進した。以上から刺激依存的に細胞膜近傍に誘導された Dock180 がユビキチン化される事、このユビキチン化は Dock180/Rac1 のシグナル経路を抑制的に制御している事、更には、Elmo1 はそのユビキチン化を抑制する事を介して Dock180/Rac1 のシグナル経路を正に制御している事が考えられる。

以上の学位論文の発表内容に対し、田中一馬教授から Dock180 のユビキチン化の生物学的意味について、更には  $\Delta 531$  mutant が Dock180 のユビキチン化を抑制するにも関わらず、細胞運動はなぜ亢進させ得ないのかについての質問があった。次いで畠山鎮次教授から Dock180 の E3 ligase が同定されているか、また同定されていないとしたら具体的に実験を行った候補について、また Dock180 のユビキチン化は何番目のリジンを紹介しているのか、ユビキチン化が分解制御ではなく endocytosis に関わっている可能性、あるいは GGA complex との相互作用の可能性、また Elmo1 のノックアウトマウスが存在するか、またその表現形についての質問があった。また、笠原正典教授から Elmo1 の Dock180 に対する制御ではなく Elmo1 自身の制御機構について何が分かっているのかについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の実験データや参考文献を引用し、田中教授の質問に対しては、Dock180 は半減期が比較的長いタンパク質でユビキチン化によって細胞内全体の Dock180 の量が大きく変化するとは考えにくいため、Dock180 のユビキチン化は局所的な Dock180 のユビキチン化に関与している可能性が考えられると解答した。また、畠山教授の質問に対しては、Dock180 の E3 ligase は判明しておらず、Cbl に関しては具体的に実験を行ったが Dock180 をユビキチン化する事は出来なかった事、その他には NEDD4 等が候補となりうる事、また Dock180 は MG-132 処理で安定性が増加する事から、K48 のユビキチン化を介したプロテアソーム系の分解は受けていると考えられるが、その他のリジン残基については検討していないので不明であるが、エンドサイトーシス等の現象も含め関与している可能性は十分に考えられる事、また Elmo1 のノックアウトマウスは作成されておらず、細胞レベルでの Elmo1 のノックダウンでは明らかな表現形は観察されない旨を解答とした。笠原教授の質問に対しては、神経系に発現している RhoG が Elmo1 の N 末領域に結合して Elmo1 を制御すること、それを介して Rac1 を活性化している旨を解答した。

この論文は、Elmo1 の Dock180 に対する新しい機能を発見した点で高く評価され、Dock180/Rac1 のシグナル経路やそれを介した細胞運動や食食作用の更なる解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、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。