

学位論文題名

Arf 制御タンパクとアダプタータンパクの 結合状態に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 細胞の接着や移動は、癌細胞の浸潤そして転移、発生過程から器官形成、生体防御、創傷治癒など生体の恒常性維持における細胞そして組織のダイナミクスの基盤である。細胞表面に存在するインテグリンは、細胞接着とそれに続く細胞内へのシグナル伝達に不可欠な役割を果たしている。

Nck ファミリータンパクは、Nck1 と Nck2/Grb4 で構成されており (Nck1/2), N 末端から 3 つの SH3 ドメインと 1 つの SH2 ドメインのみから成る既知の触媒活性のないアダプタータンパクである。Nck1/2 の SH2 ドメインは、リン酸化チロシンと結合し、SH3 ドメインは、細胞骨格の制御に関与する WASP/N-WASP や PAK などのプロリンリッチ領域と結合する。それゆえに、Nck1/2 は受容体型チロシンキナーゼなどにより惹起される情報伝達系の下流に位置し、細胞骨格との連携を仲介していると考えられている。

一方、GIT ファミリータンパクは、GIT1 と GIT2/PKL で構成されており (GIT1/2), 細胞接着の制御、細胞内タンパク輸送、そしてシナプス形成などに関与すると報告されている。その構造は、低分子量 G タンパク Arf GAP ドメイン、Paxillin 結合配列などを含む様々なタンパク相互作用ドメインを有している。また、GIT1 は、Rac1/Cdc42 グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である PIX と直接結合し、複合体を形成し機能しているとされる。

最近の報告では、Nck1/2 は、GIT1/2 の必須の結合分子であることは認知されているが、GIT1/2 がどのように Nck1/2 と結合しているかは議論の余地が残されている。互いに多くの結合タンパクを有している Nck1/2 と GIT1/2 の結合について、どのように時空間的に制御され、細胞機能に寄与しているかを解明することは、極めて重要であると考えられる。

【材料と方法】 使用したプラスミドは、Myc あるいは Flag を標識した野生型 Nck1, β PIX, PAK2, GIT1, FAK である。Nck1, GIT1, FAK に対する点変異体および Nck1 部分欠損変異体、FRNK は、それぞれの野生型コンストラクトをテンプレートとして作成した。使用細胞は COS7 細胞と PC12 細胞である。培養細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine 2000 あるいは FuGENE6 を用いた。抗体は、Flag, Myc, GIT1, Nck1, Nck1/2, β PIX, Paxillin, FAK, Pyk2, リン酸化チロシンに対する抗体を各社より購入した。ステルス RNAi は、BLOCK-iT RNAi デザイナーを用いた。各種処理を行った培養細胞は、可溶化バッファーにて溶解し、免疫沈降あるいはプルダウンアッセイを行い、ウェスタンブロット法に供した。細胞染色は、siRNA を導入した COS7 細胞を回収し、フィブロネクチンコートしたカバースリップに伸展させ、固定、透過化、ブロッキングを行った後、抗体などを用いて染色し、鏡検した。

【結果と考察】 COS7 細胞において、内因性 GIT1 と Nck1 の結合が接着依存性であることを見出した。すなわち、COS7 細胞の接着状態 (Adhesion) あるいは浮遊状態 (Suspension) の細胞溶解液を用意し、抗 Nck1 抗体によって免疫沈降を行った。その結果、接着状態の時にだけ GIT1 の Nck1 との共沈を検出した。さらに、Nck1 の SH2 ドメインの GST 融合タンパクを用いたプルダウンアッセイにおいて、GIT1 は細胞接着時に沈降した。また、GIT1 のチロシンリン酸化は、FAK および Src の協調作用による報告を考慮し、FAK に対する siRNA を COS7 細胞に導入した結果、GIT1 のチロシンリン酸化レベルは減少した。さらに、同様の実験系において、Nck1/2 に対する siRNA を導入すると、GIT1 のチロシンリン酸化レベルは減少した。すなわち、Nck1/2 は GIT1 の接着定常状態におけるチロシンリン酸化レベルの維持に寄与していることが示唆された。

次に、COS7 細胞の過剰発現系実験により、GIT1 と Nck1 の直接結合の可能性が示唆された。さらに、Nck1 自体にはキナーゼ活性は無いにもかかわらず、野生型 Nck1 あるいは SH2 ドメインのみの過剰発現により GIT1 のチロシンリン酸化レベルの上昇が誘導された。さらに、GIT1 の Nck1 との結合サイトが、392 番目のチロシン (Y392) であることを明らかにした。本系においては、FAK が GIT1 の Y392 に対するキナーゼであることを示唆した。すなわち、一連の実験結果は、GIT1 の Y392 のリン酸化には、Src との結合による FAK の活性化ループ機構よりも、FAK 自身のキナーゼ活性によって GIT1 の Y392 がリン酸化され、そのサイトは Nck1 の SH2 ドメインと結合することが示唆された。

さらに、GIT1 あるいは Nck1/2 に対する siRNA を導入した COS7 細胞の形態変化について検討した。すなわち、siRNA 導入後 96 時間後にトリプシン処理にて回収し、フィブロネクチンコートしたカバースリップへ再播種して 4 時間後に、Paxillin そして重合化アクチンに対して細胞染色を行った。その結果、GIT1 のノックダウンにおいて、ラメリポディアの形成が促進し、Paxillin の先端端の局在が著しく増強した。また、Nck1/2 に対する siRNA の導入によって、GIT1 の焦点接着斑と先端端への局在が妨害された。すなわち、GIT1 の存在がラメリポディアの形成にネガティブに作用していることが示唆された。そして、Nck1/2 の存在が、GIT1 の焦点接着斑と先端端へのリクルートに影響を与えることが示唆された。これまでの報告では、GIT1 と GIT2 の局在は、Nck1/2 の存在に影響されないと示されていたが、その実験系は、GIT1/2 を焦点接着斑に局在させるために活性化型 Rac を過剰発現させており、GIT1/2 とともに過剰発現であった。すなわち、本実験結果との不一致は、これらの過剰発現と接着形成してから観察までの時間差によると考えられる。

また、Pyk2 と FAK は、FAK ファミリーを構成している。共に非受容体型チロシンキナーゼであるが、FAK はインテグリンによる細胞接着に依存して活性化し、一方、Pyk2 は神経系細胞の脱分極などの細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によっても活性化する。本実験系では、Pyk2 が GIT1 の新規キナーゼであることを、内因性レベルで示した。

【結論】 GIT1 と Nck1 の結合が、細胞接着に依存していること、その結合様態についての詳細を示した。さらに、siRNA 実験の結果から、細胞接着形成時において、GIT1 が焦点接着斑に局在するために Nck1/2 の存在が必要であることが示唆された。また、新規 GIT1 キナーゼとして Pyk2 を同定した。これらの成績は、細胞生物学的に極めて重要とされる GIT1 と Nck1 の結合様態および GIT1 のチロシンリン酸化の制御を理解する上で有用であろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 博 美

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 田 中 伸 哉

学 位 論 文 題 名

Arf 制御タンパクとアダプタータンパクの 結合様態に関する研究

アダプタータンパク質は SH2 そして SH3 ドメインだけで構成される触媒活性を持たないタンパクである。それらには Nck, Crk, Grb2 ファミリーが知られ、それぞれのドメインは、特定のアミノ酸配列を認識する。申請者は、そのうちの Nck を研究対象とした。一方、低分子量 G タンパク質に属する Arf の制御タンパクのひとつの Arf GAP である GIT ファミリータンパク質を研究対象分子の中心として研究を展開している。

これらのアダプタータンパク質 Nck 及び Arf GAP の GIT タンパク質は、共に多様な分子間相互作用に関わり、細胞内シグナルの伝達制御に深く関わる分子である。申請者は、細胞の接着状態により影響を受ける Nck1/GIT1 分子間の相互作用に着目し、その相互作用に関わる分子機構及び生理的意義の解析及び検討を行った。その結果、両分子は GIT1 におけるリン酸化チロシンと Nck1 分子内の SH2 ドメインとの相互作用により複合体を形成し、GIT1 のリン酸化レベルは足場依存的に活性制御を受ける FAK により調節されていることを示した。さらに、触媒活性の持たない Nck もまた GIT1 のチロリンリン酸化レベルの維持に関与していることを示した。また、GIT1 の細胞内局在は Nck 分子の共存による影響を受け、Nck1/GIT1 分子間相互作用が細胞運動能及び細胞形態の調節に関わることを述べている。

公開発表の審査において、申請者はおよそ 20 分に渡り、スライドを用いながら発表した。その後の質疑応答時間はおよそ 15 分であった。その内容の一部を以下に示す。GIT と Nck の複合体の形成に関連して、1) GIT1 と Nck1 分子の複合体の意義について、2) Nck と GIT 分子の直接結合は、細胞において一般的であるのか、あるいは細胞種に特異的と考えるのか、3) これまで報告されてきた Nck と GIT 分子を含めた複合体と、Nck と GIT の直接結合による複合体の量比についての検討はしているのか、4) siRNA を用いた GIT1 のノックダウンにおいて変化する Paxillin との共局在分子は存在するのか、およびその検討方法についての質問があった。また、GIT と Nck の結合に関する生理学的意義に関連して、1) 癌細胞などとの関連性について、2) GIT1 のノックアウトマウスは報告されているのか、および、Nck のノックアウトマウスの報告との本研究との関連についての質問があった。申請者は、過去の文献を引用し、GIT1 のノックアウトマウスは 60% は生後まもなく死亡し、その残りは一見正常に成長するが、恐れを感じないなどの情動行動すなわち高次機能への異常が示唆されていること。Nck のノックアウトマウスでは Nck1 と Nck2 のそれぞれをノックダウンしても、残された Nck がそれを補うようだが、両者をノックアウトすることで胎生致死（胎生 9.5 日）となり、得られた MEF 細胞では細胞の伸展に重要であるラメリポディアの形成不全が観察されると回答した。その他、いずれの質問に対しても、申請者は、過去の文

献を引用し、概ね妥当な回答と討論がなされた。

この論文は、これまでの Nck 及び GIT ファミリー分子に関する知見に基づき、研究全体の方向性を定め計画的な実験が遂行されている。GIT2 分子等に関する既報の再検証データを一部含むが、Nck1/GIT1 複合体に関する新知見を明らかにした。最近、GIT1 は神経系の発達において不可欠であるとの報告がノックアウトマウスからも示されるようになった分子でもあり、諸説報告されてきた GIT1 と Nck の結合様態について、過剰発現系だけでなく、内在性レベルにおいても実験結果を示したことの重要性は大きい。恒常的に Nck の SH3 ドメインを介した結合ではなく、SH2 ドメインとの足場依存的な結合で制御されているとなれば、これまでに報告されてきた一部の論文の解釈に修正が必要となるインパクトのある報告であり、評価される論文である。

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。