

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 **Functional Analysis on Domains of Crk-associated Substrate in Actin Stress Fiber Organization, Cell Migration and Transformation.**

和訳 アクチンストレスファイバーの形成, 細胞運動および形質転換
における Crk 結合基質の蛋白質ドメインの機能解析

指導教官 高戸 毅 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 11 年 4 月入学
医学博士課程
外科学専攻
氏名 黄 錦鴻

I 緒言

Cas(Crk associated substrate) はもともと癌遺伝子 *v-src*, *v-crck* による形質転換に伴ってチロシンリン酸化するタンパク質としてクローニングされたが, その後インテグリン刺激によってチロシンリン酸化を受け, さまざまなシグナルを伝えていることが判明した。Cas は N 末端に SH3 領域, 続いて YxxP モチーフ (YQxP モチーフ 4 つ, YDxP モチーフ 9 つなど) が 15 回繰り返り出現する基質領域 (substrate domain), Src 結合領域からなっており, さまざまなシグナル分子を結合するドッキングタンパク質の 1 つと考えられている (図 1)。Cas の SH3 は, チロシンキナーゼである FAK, CAK(PYK2), チロシンホスファターゼである PTP-PEST, 交換因子 C3G などと結合する。基質領域に 15 回繰り返り出現する YxxP モチーフはチロシンキナーゼの基質となり, 特にこのうち 9 回繰り返す YD x P モチーフは, Crk および Nck の SH2 の結合コンセンサスであるため, リン酸化によりこれらの分子と実際に結合する。その下流にある Src 結合領域は, YDYV モチーフとプロリン豊富配列を持ち, それぞれ, Src, Fyn など Src ファミリーのチロシンキナーゼの SH2 と SH3 に結合する。Src はこの領域に結合することによって, 基質領域の Src によるチロシンリン酸化が効率よく行われる。

II 研究目的

Cas はインテグリンが刺激された際に, Src および FAK の働きにより, 接着斑に引き寄せられてリン酸化を受けていると考えられている。細胞によっては, Src ファミリーの他のチロシンキナーゼである Fyn や FAK ファミリーの PYK2 が Cas の細胞内局在やチロシンリン酸化に関与している場合もある。接着斑に局在する Cas はそこでドッキングタンパク質として Crk, Fak, PTP-PEST などのタンパク質と結合し, 巨大なシグナル複合体を形成し, 細胞の接着, 移動を制御する。一方, Cas は Src の基質で

あることから、Src の SH2 領域と結合し、*v-Src* による形質転換においても Cas と Src が協調的に働くことが予想されていた。さらに Cas のノックアウトマウスに由来する線維芽細胞においては、細胞を横切るような長いストレスファイバーの形成は認められず、細胞の移動能も阻害されていた。Cas-/- の細胞に活性型 Src を入れると、野性型の細胞や Cas を入れ直した細胞の場合と異なり、形態的に不完全な形質転換を示し、ソフトアガーにおける足場非依存性の増殖も認められなかった。つまり、Cas は、細胞のストレスファイバーの形成、移動と Src による形質転換に必須であり、これらの生物過程を制御する一連のシグナルの拠点のような役割を果たしているものと思われる。Cas から下流へのシグナルは Cas に結合する多くのタンパク質のうちの1つを介しているのではなく、複数のタンパク質が同じ方向あるいは微妙に異なる方向へのシグナルを伝えているだろう。Cas がどのドメインを介してどのようにそれぞれのシグナルを伝達するか、どうやって異なる方向へのシグナルを伝えるか、またこれらのシグナルがどのようにアクチン制御やそのほかの生命現象につながるかの解明することが本研究の主目的である。

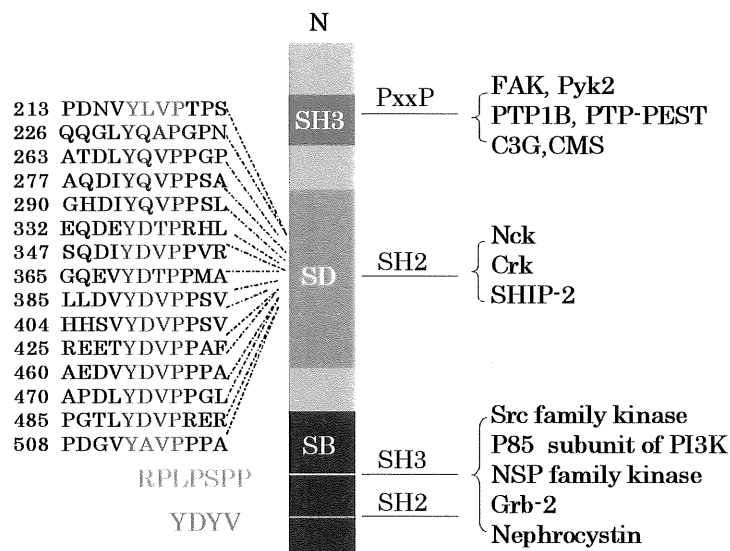


図 1. Cas の主要ドメインおよび各ドメインの結合蛋白質

III 研究方法

Cas のドメイン機能を明らかにすることを目的として Cas 蛋白質の種々の欠損変異体を作製し(図 2), Cas を欠失する線維芽細胞に導入して発現させることにより, Cas の機能ドメインのうち細胞がん化に不可欠な領域を同定するとともに, アクチンストレスファイバーの形成と細胞移動能などがこれらの変異体によりどれだけ正常化するかを調べた。Cas のノックアウトマウスより樹立した Cas 欠失線維芽細胞及びこれに活性型 Src を導入した線維芽細胞に, Cas 全長, Cas の上流の SH3 を取り去った変異体 (Δ SH3) その下流に存在する基質ドメイン全体の欠損変異体 (Δ SD) その中に 9 つ存在する YDxP モチーフをすべて取り去った変異体 (Δ YDxP), 4 つ存在する YQxP モチーフの欠損変異体 (Δ YQxP), C 末の Src 結合ドメインの欠損変異体 (Δ SB) などの 9 つの変異体のそれぞれを発現ベクターで導入してブラストサイジン選択により既に各々複数の安定発現株を分離した。Cas 欠失線維芽細胞では、これ

らの変異体によりアクチンストレスファイバーの形成と細胞移動能がどれだけレスキューされているか、またこれに活性型 Src を導入した線維芽細胞で軟寒天培地によるコロニー形成能がどれだけレスキューされているか、を解析した。

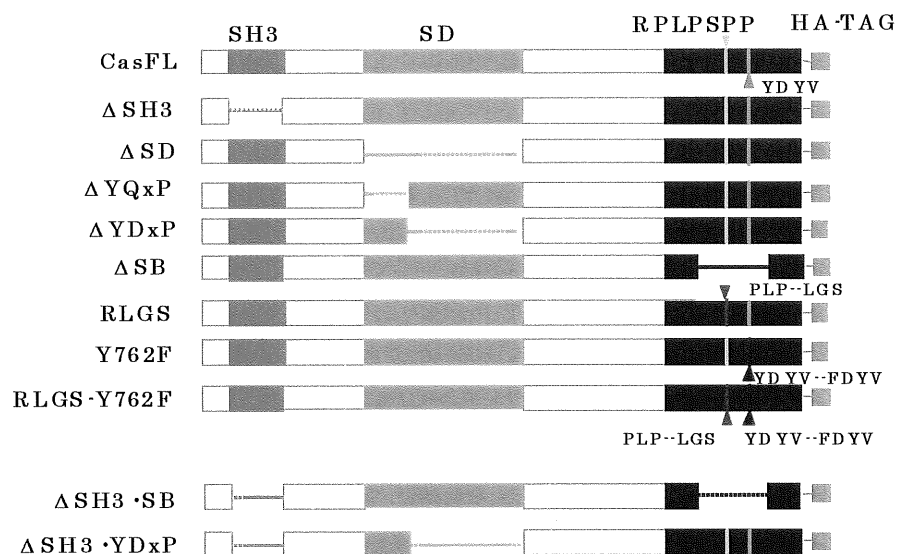


図 2. Cas の種々の領域欠損変異体

IV 結果および検討

表 1. Cas の変異体により Cas 欠失線維芽細胞のストレスファイバーの形成、細胞運動および足場非依存性の増殖能の回復

<i>Cell Lines</i>	<i>Actin Stress Fibers</i>	<i>Cell Migration</i>	<i>Soft Agar Colonies</i>
<i>Cas</i> ^{-/-}	-	-	-
CasFL	+	+	+
ΔSH3	++	+	+
ΔSD	-	-	N
ΔYQxP	±	-	N
ΔYDxP	-	-	+
ΔSB	++	-	-
Y762F	+	+	+
RLGS	+	-	-
RLGS-Y762F	++	-	-
ΔSH3·SB	++	-	N
ΔSH3·YDxP	N	N	+

“-”レスキューされていない; “+” レスキューされている; “++” 過剰にレスキューされている. “N”解析されていない.

表 1 と図 3 に示されたように、ストレスファイバーの形成、細胞運動と Src 形質転換に関わる Cas の各ドメインの役割が明らかになった。Cas の各ドメインは微妙に異なる形でそれぞれの細胞機能のシグナリングを制御していることが分かった。

1. 基質領域に9回繰り返しているYDxPモチーフはCrkIIとの結合を介して、ストレスファイバーの形成と細胞の運動を制御していることがわかった(表1)。
2. YDxPモチーフは細胞の運動にとっても重要であるが、この場合、Src結合領域の役割も不可欠である(図3)。他の変異体と比べて、Src結合領域の欠失変異体のチロシンリン酸化はかなり低くなっていることが認められ、また、接着斑に局在せず、主として細胞質に存在することが認められた。このことから、CasがSrcによりチロシンリン酸化を受け、接着斑に引き寄せられることは細胞の運動にとって不可欠であることが示された。
3. ストレスファイバーの形成と細胞の運動に関わっているRhoファミリーGTPaseのシグナルはCasの上流ではなく、下流にあることが示唆された。
4. SH3ドメインの欠失変異体は細胞のストレスファイバーの形成能と細胞運動能ともに影響がほとんどなく、Fakとの結合も保持された。これまでに提唱されていたようにCasがSrc結合領域を介してFakと間接的に複合体を作る可能性が示唆された(図3)。
5. Cas-/-の細胞に活性型SrcとCasのそれぞれの領域の変異体を共発現し、ソフトアガーにおける足場非依存性の増殖能を調べることで、Srcによる形質転換能におけるCas各領域の機能を解析した。Src結合領域の欠失変異体は他の変異体と異なりソフトアガーにおける足場非依存性の増殖は認められなかった。つまり、活性型Srcによる形質転換や足場非依存性の増殖能を獲得に際して、Src結合領域が必要であることが示唆された。更に、活性型SrcによるCasのそれぞれの領域の変異体のチロシンリン酸化を調べた結果、Src結合領域の欠失変異体においてリン酸化が著明に低下していることが分かった。活性型Srcによる形質転換や足場非依存性の増殖のメカニズムは複雑であるが、SrcによるCasのチロシンリン酸化が不可欠であることが始めて証明された(表1)。

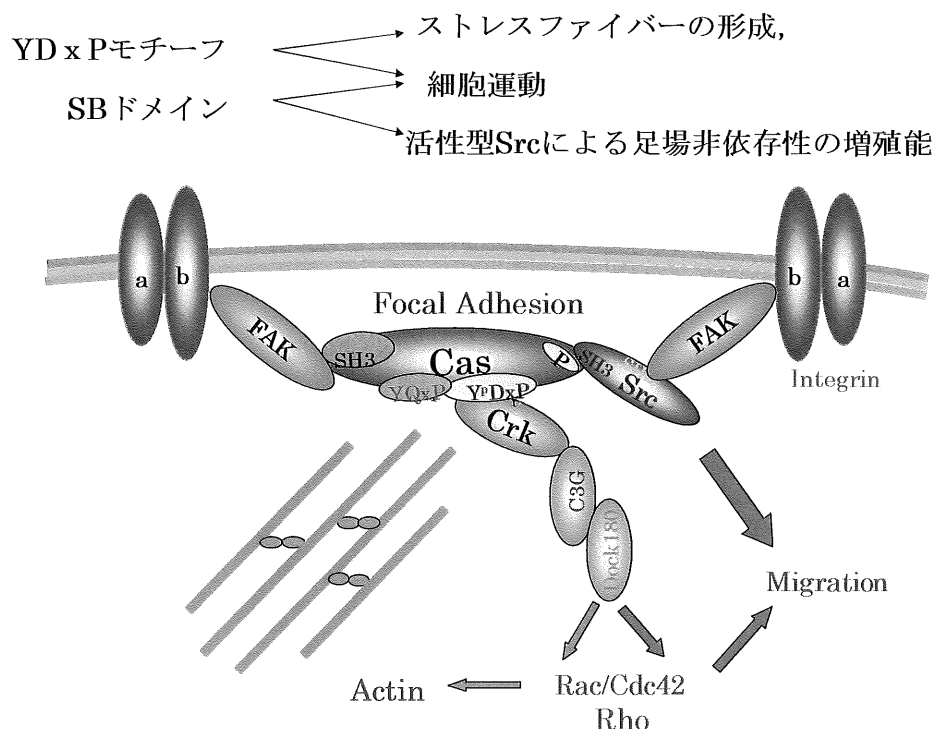


図3. Casの各ドメインによりストレスファイバーの形成および細胞運動のシグナリング模式化図