

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 14 年度 博士課程 進学

氏 名 石 濱海

指導教員名 福井泰久

論文題目

Role of Gab1 in secretion systems of signet ring cell carcinomas
(印環細胞がんの分泌系における Gab1 タンパク質の役割に関する研究)

序論

印環細胞癌は低分化型腺癌の一種である。腺癌はその組織形態の違いにより、高分化型腺癌と低分化型腺癌に分類される。高分化型腺癌に対し、印環細胞癌は脱分化した癌で、細胞極性、細胞接着能が失われており、足場非依存的に増殖する 경우가多く、浸潤転移能の高い、より悪性の癌である。印環細胞癌は外科手術による治療は困難であり、化学療法も確立されていないため、實際上治療法のない癌といえる。印環細胞癌の特徴としては細胞同士の相互作用の欠失と分泌系の亢進が知られている。当研究室の研究結果により、印環細胞癌において、receptor tyrosine kinase である ErbB2/3 が恒常的に活性化していることが示されている。さらに、その下流シグナル経路として p38MAPK pathway が印環細胞癌の細胞同士の相互作用を制御することも分かっている。しかし、分泌系の亢進についてはまだ分かっていた。

本研究は印環細胞癌の分泌系の亢進の解明を目的として開始された。その結果、印環細胞癌において Gab1 が分泌系の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

1. Gab1 が NUGC4 細胞のムチン分泌系を制御する

印環細胞癌細胞株 NUGC4 を PI3-kinase の阻害剤である LY294002 で処理すると、一部印環細胞癌としての性質が抑制される。形態はやや平たくなり、ムチンなどの分泌系の亢進が抑えられる。p38MAPK の阻害剤である SB203580 で処理した場合は細胞の平坦化は起こるが、分泌系の亢進が抑えられない。これにより、印環細胞癌の分泌系の亢進は PI3K-p38MAPK 以外のシグナル伝達経路に制御されることが考えられる。印環細胞癌の分泌系の亢進に関わる分子を探すために、PI3-kinase の結合蛋白質を検索した。PI3-kinase の p85 subunit を認識する抗体を用いて免疫沈降と銀染色を行った結果、印環細胞癌細胞 NUGC4 から、PI3-kinase と結合する Gab1 (Grb2-associated binder 1) 蛋白質が検出された。さらに、NUGC4 細胞において、Gab1 が恒常的にチロシンリン酸化されていることが分かった。Gab family 蛋白質は哺乳類の Gab1, Gab2, Gab3, ショウジョウバエの DOS と線虫の Soc1 からなる adaptor protein family である。Gab1 蛋白質は N 末端に PH domain を、真中に proline-rich domain を、C 末端に多数のチロシンリン酸化部位を有している。Gab1 蛋白質は PI3-kinase や SHP2 などのシグナル分子と結合して、EGF, NGF, IGF, IL6 などのサイトカイン、増殖因子の誘導するシグナル伝達に役割を果たしていることが報告されている。NUGC4 以外の印環細胞癌株についても調べたところ、HSC39 細胞では同様に Gab1 が PI3-kinase と結合し、恒常的にチロシンリン酸化されていた。一方、KATOIII 細胞では Gab1 がチロシンリン酸化されていなかったが、Gab2 がリン酸化され、PI3-kinase と結合していた。これらの結果は、印環細胞癌のシグナル伝達において、Gab ファミリーが何らかの機能を果たしているを示している。Gab1 の機能を解析するために、pSUPER RNAi system を用いて、Gab1 発現を knock down させた NUGC4 細胞の Gab1 RNAi 細胞株 (Gab1_i 細胞) を作成した。この細胞株は野生型と比べて、形態変化が見られなかったが、ムチン蛋白質である Muc1 と Muc4 を指標に分泌系を調べた結果、分泌亢進が著しく抑えられていた。また、Gab1 RNAi の標的遺伝子配列を置換し、RNAi から knock down されないようにした Gab1 遺伝子と Gab1 RNAi 発現ベクターを共発現させた細胞株 (Gab1_m_i 細胞) では、内在性の Gab1 発現が RNAi により knock down されても、変異遺伝子により Gab1 が発現するため、RNAi によるムチン分泌の抑制が起らなかった。また、同様にして発現させた PI3-kinase と結合できない変異 Gab1 遺伝子は分泌を回復させることができなかった。これらの結果により、Gab1 が印環細胞癌細胞 NUGC4 の分泌系を制御することが示唆された。

2. ErbB2/3-Gab1 のシグナル伝達

NUGC4 細胞では receptor tyrosine kinase の一つ ErbB3 が恒常的にチロシンリン酸化されており、ErbB2/3 のシグナル経路が活性化している、また Gab1 も恒常的にチロシンリン酸化されていることが分かっていたため、ErbB2/3 によって Gab1 がリン酸化されるのではないかと考え、これを検討した。293 細胞に ErbB2, ErbB3 と Gab1 の遺伝子を過剰発現させた。活性型の ErbB2 を発現させた場合は野生型の ErbB2 と比べて、ErbB3 及び Gab1 のチロシンリン酸化の亢進が見られ、ErbB2/3-Gab1 のシグナル経路があることが示唆された。この結果は ErbB2/3 のリガンドである Heregulin で野生型の ErbB2/3 を刺激した場合も同様であった。また、Gab1 が ErbB3 のチロシンリン酸化依存的に結合すること、この時 Gab1-PI3-kinase の結合が亢進することが分かった。これらの結果が過剰発現系でなくても正しいことは乳がんの MCF7 細胞を用いて heregulin 刺激実験を行うことにより確認した。これらの結果により、Gab1 が細胞外よりの刺激に対して ErbB2/3 複合体の ErbB3 と結合し ErbB2/3 複合体によりチロシンリン酸化されることが示された。

3. Gab1 の作用点の解析

新たに合成された膜タンパク質は一般に、小胞体(ER)、ゴルジ体を経てトランスゴルジ網(TGN)へと輸送される。TGN へ到達した膜タンパク質はそこで選別を受け、異なる輸送小胞に積み込まれることにより細胞膜、エンドソーム、リソソームなどのオルガネラへ輸送されることになる。ムチンは O-型糖タンパク質で、ゴルジ体で糖鎖（最後はシアル酸）を付加されてから細胞膜へ輸送されることが知られている。Muc1 の糖鎖付加は $\text{GalNAc} \rightarrow \text{Gal} \beta 1,3\text{GalNAc} \rightarrow \text{SA} \alpha 2,3\text{Gal} \beta 1,3\text{GalNAc}$ というプロセシングが分かっている。Gab1 のムチン分泌の制御を調べるために、糖鎖を特異的に認識結合、架橋形成するタンパク質であるレクチンを用いて免疫染色を行った。レクチン PNA と MAL2 はそれぞれ Muc1 のシアル酸付加前と付加後の糖鎖 $\text{Gal} \beta 1,3\text{GalNAc}$ と $\text{SA} \alpha 2,3\text{Gal} \beta 1,3\text{GalNAc}$ を認識する。MAL2 の染色の結果、野生型 NUGC4 細胞はムチンがシアル酸付加されてから細胞膜へ輸送されるが、Gab1_i 細胞ではムチンがシアル酸付加されるにも関わらず細胞内に留まって細胞膜には輸送されないことが分かった。PNA では両者とも同様に細胞内が染色された。これらの結果により、Gab1 が TGN において分泌系を制御することが示唆された。次に、Gab1 の局在を検討した。TGN タンパク質である TGN38 と Gab1 免疫染色により、NUGC4 細胞では Gab1 と TGN38 が共局在が見られた。また、MCF7 細胞に heregulin 刺激を加えると、Gab1 が TGN へ

の移行が観察された。これらの結果により、Gab1 は活性化に伴って TGN に移行し分泌系を制御することが示唆された。NUGC4 細胞では Gab1 が恒常的に活性化されているために刺激によらず TGN に局在したものと思われる。

まとめ

本研究によって、初めてアダプタータンパク質である Gab1 が細胞の分泌系を制御することが見出された。Gab1 が活性化した ErbB2/3 heterodimer にチロシンリン酸化され、この活性化された Gab1 が PI3-kinase と結合し、TGN へ移行して、分泌系を制御する。本研究で得られた新たな知見は印環細胞癌の治療及び細胞の分泌系の制御の解明に大きく寄与することが期待される。