OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Gab 1 Acts as an Adapter Molecule Linking the Cytokine Receptor gp130 to ERK Mitogen-Activated Protein Kinase
Author(s)	吉田, 雄一
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41827
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏名	吉田雄一（よしだゆういち）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 15253 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	Gab 1 Acts as an Adapter Molecule Linking the Cytokine Receptor gp130 to ERK Mitogen-Activated Protein Kinase （サイトカイン受容体gp130を介するシグナル伝達におけるアダプター分子Gab 1の機能解析）
論文審査委員	（主査） 教授 平野 俊夫 （副査） 教授 長田 重一　教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

gp130はIL－6ファミリーサイトカイン受容体の共通コンポーネントである。刺激によりgp130は2量体化を起こすと共に、細胞膜近傍に会合しているチロシンキナーゼJAK（Janus kinase）によりgp130内のチロシン残基がリン酸化される。さらに、gp130のチロシンリン酸化に伴い、転写因子STAT 3（signal transducer and activator of transcription 3）やリン酸化チロシン脱リン酸化酵素SHP－2（SH 2 containing tyrosine phosphatase-2）といった様々なSH 2ドメインを有するアダプター分子が会合し、チロシンリン酸化される。これまで、gp130内の細胞膜寄りのチロシン759に、SHP－2が会合し、このチロシン759をフェニルアラニンに置換した場合にSHP－2のチロシンリン酸化とgp130刺激依存性のMAP kinase ERKの活性化が抑制されることが明らかになっている。しかしながら、SHP－2の脱リン酸化酵素としての基質は不明であった。そこで、gp130刺激依存性にSHP－2と会合してくる、分子量110kDaのチロシンリン酸化蛋白（pp110）に注目し、その解析を行った。

【方法ならびに成績】

1．pp110の同定

HepG 2細胞をIL－6で刺激し、抗SHP－2抗体で免疫沈降した場合に、分子量110kDaのリン酸化蛋白pp110が免疫沈降された。また、同様に、抗PI3-Kinase p85抗体で免疫沈降した場合においても、110kDaのリン酸化蛋白を認めた。pp110は刺激依存性にSHP－2と会合してくることよりSHP－2の脱リン酸化の基質である可能性が予想された。一方、SHP－2のショウジョウバエホモローグCSW（Corkscrew）の脱リン酸化の基質DOS（Daughter of Sevenless）がクローニングされ、DOSの哺乳類ホモローグとしては、アダプター分子Gab 1（Grb 2-associated binder-1）が存在していることがわかった。Gab 1はGrb 2と会合してくる分子としてクローニングされた分子で、N末にPHドメイン、C末にSHP－2やPI 3-kinaseとの結合モチーフ及びリン酸化チロシン結合ドメインであるMBDを有した蛋白であり、その分子量は、pp110とほぼ同じ115KDであった。そこでhuman Gab 1のC末に対するポリクローナル抗体を作製し、pp110が抗Gab 1抗体にて免疫沈降されうるか検討した。この結果、pp110は抗Gab 1抗体にて免疫沈降され、Gab 1のリン酸化と並行してSHP－2とp85がそれぞれ免疫沈降された。以上よりリン酸化されたGab 1にSHP－2、p85が会合し複合体を形成していることが明らかになった。また、Gab 1はIL－6以外のIL-3、IFN α、γといった様々なサイトカイン刺激によっても、リン酸化を受けることが明らかになった。

2．Gab 1のリン酸化に必要なgp130細胞内領域の決定

Gab 1のリン酸化に必要なgp130内の細胞内領域を決定するために、G－CSF receptorの細胞外ドメインとgp130細胞膜及び細胞内領域のキメラレセプターを安定導入した293T細胞を用い検討した。gp130の細胞内領域すべてを含むG277細胞、及びサイトカインレセプターに共通なBOX 1、BOX 2領域までを含むG68細胞およびgp130内のチロシン残基すべてをフェニルアラニンに置換したFall細胞を用いた結果、Gab 1はG277細胞、G68細胞およびFall細胞でも同じくリン酸化を受けた。以上より、Gab 1のリン酸化にはgp130細胞内のチロシン残基は全く必要がない事が示された。従って、Gab 1は、おそらくgp130の細胞膜近傍に会合している、JAKにより、直接リン酸化を受けているものと予想された。

3．SHP－2の脱リン酸化基質としてのGab 1の役割

Gab 1のショウジョウバエホモローグのDOSはSHP－2のショウジョウバエホモローグCSWの基質である。そこで、Gab 1がSHP－2の脱リン酸化の基質になりうるか検討した。HepG 2細胞をIL－6で刺激し抗Gab 1抗体で免疫沈降することによりリン酸化Gab 1を作製した。これに、GST－SHP－2 WT及び酵素活性のないGST－SHP－2C／Sを加え、in vitro phosphatase assayを行った。リン酸化Gab 1はGST－SHP－2C／Sによっては、脱リン酸化は受けないが、GST－SHP－2WTを加えることにより著明に脱リン酸化を受けた。以上、Gab 1がSHP－2の基質となっている可能性が示唆された。

4．Gab 1のgp130シグナルにおける役割

Gab 1の下流シグナルに対する役割を明らかにするために、gp130刺激依存性のMAP kinaseの活性化に対する影響について検討した。G277細胞を用いERK 2、JNK 1、P38といったMAP kinaseの活性化に対するGab 1の関与について検討した。G277細胞に、Flag tagを付加したERK 2、JNK 1、P38といったMAP kinaseと、さらにGab 1を一過性に発現させ、刺激後Flag tagに対する特異抗体による免疫沈降物を用い、in vitro kinase assayを行った。JNK 1、P38に関しては、Gab 1によるkinase活性の変化は刺激の有無に関わらず認められなかった。一方、ERK 2に関しては、Gab 1を発現させることによりgp130刺激依存性にkinase活性は著明に増強した。以上より、Gab 1がMAP kinase ERKの上流に位置し、下流へシグナルを伝えていることが明らかになった。また、これらのGab 1を介するERKの活性化はgp130内のSHP－2が結合できないチロシン759をフェニルアラニンに置換したG133F 2細胞を用いた場合や、Dominant negative PI 3-Kinaseを発現させた場合、さらにはDominant negative Rasを発現させた場合においても著明に抑制された。以上より、Gab 1を介するERKの活性化にはSHP－2のリン酸化やPI 3-kinaseの活性化及びRasの活性化が深く関与していることが示唆された。

【総括】

gp130刺激依存的に、SHP－2に会合してくる分子量110kDaのチロシンリン酸化蛋白を見い出し、その蛋白をGab 1と同定した。Gab 1は、リン酸化を受けるとSHP－2以外にPI 3-Kinaseとも会合し、さらにMAP kinase ERKの上流に位置していることを明らかにした。以上より、Gab 1がgp130シグナルにおいて、Ras、PI 3-Kinaseといった下流分子を複雑に制御していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、IL 6ファミリーサイトカイン受容体の共通コンポーネントであるgp130の刺激依存的に、リン酸化チロシン脱リン酸化酵素SHP－2（SH 2 containig tyrosine phosphatase－2）に会合してくる分子量110kDaのチロシンリン酸化蛋白を見い出し、その蛋白をアダプター分子Gab 1（Grb 2-assocated binder-1）と同定し、さらにgp130シグナルにおいて、Gab 1がMAP kinase ERKの活性化に至るシグナルに関与していることを示したものである。

これまで、gp130内の細胞膜寄りのチロシン759に、SHP－2が会合し、このチロシン759をフェニルアラニンに置換した場合にSHP－2のチロシンリン酸化とgp130刺激依存性のMAP kinase ERKの活性化が抑制されることが明らかになっていた。しかしながら、SHP－2の脱リン酸化酵素としての基質は不明であった。本研究は、Gab 1がS

HP－2の基質となりうることを示しただけでなく、gp130刺激依存性のMAP kinase ERKの活性化に必須の分子であることをはじめて明らかにした点で意義深い。それらを示すため本論文は、緻密に計画され、正確な分子生物学的手法に裏付けられた実験に基づいており、また総じて実験医学としての独創性に富んでいるため、博士（医学）の学位授与に値すると判断した。