



Title	Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T-and B-cell antigen receptors
Author(s)	西田, 圭吾
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42629
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	にし だ せい 吾
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 5 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 13 年 3 月 23 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-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T-and B-cell antigen receptors. (Gab ファミリー分子はサイトカイン、成長因子、T・B細胞抗原受容体の下流で機能する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 長田 重一 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

SHP-2 はリン酸化チロシン脱リン酸化酵素であり、gp130を含め多くのサイトカイン、成長因子の刺激でリン酸化され、MAP キナーゼ ERK をポジティブに制御していると考えられている。我々は gp130刺激依存的に SHP-2 と会合する分子量110KDa (pp110) 及び、100KDa (pp100) のチロシンリン酸化蛋白を見出し、SHP-2 の基質としての可能性を検討している。pp100は既に同研究室において Gab 1 と同定されている。Gab 1 は PH ドメイン及び、SHP-2、PI-3 Kinase p85、Grb 2 といった SH 2・SH 3 含有のシグナル分子との結合配列を有するアダプター分子である。また gp130刺激依存的に SHP-2、p85と三者複合体を形成し、ERK 活性化を促すことが明らかとなっている。そこで、今回 Gab 1 とは分子量の異なる gp130刺激依存的に SHP-2 と会合する分子量100kDa のチロシンリン酸化蛋白に注目し、その解析を行った。

【方法ならびに成績】

1) pp100の同定

BAF-B03細胞を gp130で刺激し、抗 SHP-2 及び抗 PI-3 Kinase p85抗体でそれぞれ免疫沈降した場合に、分子量100kDa のチロシンリン酸化蛋白 pp100が免疫沈降された。また、GSTGrb 2 を用いて pull down assay を行ったところ、SHP-2、p85で免疫沈降した場合と同様に pp100が検出された。以上の生化学的性質から、この pp100 が Gab 1 とホモロジーが高い分子であることが予想された。そこで Gab 1 遺伝子をもとにデータベース検索を行ったところ Gab 1 とアミノ酸レベルで34%と高い相同性を示すクローン (KIAA0571) の存在を見出した。KIAA 0571は Gab 1 の有する SHP-2、p85の結合モチーフが全て保存されていたが、N末端の PH ドメインは欠失していた。そこで U266細胞より調製した cDNA ライブラリーを用い、5' RACE 法にて KIAA0571の 5' 末端をクローニングしたところ、Gab 1 の PH ドメインと76%と相同性を示すクローンの単離に成功し、Gab 2 とした。次に、この Gab 2 遺伝子が pp100であるかどうか検討するために C 末に対するポリクローナル抗体を作製した。この結果、SHP-2、p85抗体で免疫沈降される pp100に、抗 Gab 2 抗体が反応することが分かった。また、Flag タグを付加させた Gab 2 cDNA を 293T に強制発現させ、gp130刺激 BAF-B03細胞の pp100と分子量を比較したところ、同様の移動度を示した。以上より、gp130刺激依存的に SHP-2、p85と会合する pp100が Gab 2 であることが示された。

2) Gab 2 のリン酸化に必要な gp130細胞内領域とチロシンキナーゼの決定

Gab 2 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 BAF-B03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細胞を用いた結果、Gab 2 は G277細胞、G68細胞いずれの細胞においてもリン酸化を受けた。また Gab 2 を直接リン酸化するキナーゼを調べるために、293T 細胞に Jak 1 と Gab 2 を共発現させ、リン酸化の有無を調べた結果、Gab 2 は Jak 1 によりリン酸化されることが分かった。以上より Gab 2 は、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 2 の役割

Gab 2 が SHP-2 の基質となりうるか *in vitro* の系を用いて検討した。BAF-B03細胞を IL-3 で刺激し、抗 Gab 2 抗体で免疫沈降することによりリン酸化 Gab 2 を調製した。この免疫沈降物に GST と SHP-2 の脱リン酸化酵素活性を含む領域との融合蛋白 (GSTSHP-2) 及び酵素活性の消失させた融合蛋白 (GSTSHP 2 C/S) をそれぞれ加え、*in vitro* phosphatase assay を行った。リン酸化 Gab 2 は GSTSHP-2 と反応させた場合のみ脱リン酸化された。以上、Gab 2 が SHP-2 の基質となっている可能性が示された。

4) Gab 1、2 の成長因子・抗原受容体シグナルにおける役割

gp130以外のシグナル伝達においても Gab 1、2 が関与しているかどうかを検討した。様々な細胞を成長因子として PDGF、SCF、T・B 細胞抗原受容体刺激として抗 CD3 抗体、抗 IgM 抗体、またサイトカインとして IL-2、IL-3、TPO、EPO の刺激を行い Gab 1、2 それぞれの特異的な抗体を用い、免疫沈降しチロシンリン酸化認識抗体によりウエスタンブロットにてリン酸化の有無を決定した。Gab 1 は IL-3、TPO、EPO、SCF、PDGF、TCR、BCR、一方、Gab 2 は IL-2、IL-3、TPO、EPO、SCF、TCR の刺激でチロシンリン酸化された。また gp130刺激と同様に T・B 細胞抗原受容体刺激においても SHP-2 と p85がそれぞれ会合することが明らかとなった。これらの結果より、Gab 1、2 はサイトカイン・成長因子・T・B 細胞抗原受容体といった様々な受容体の下流で機能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100kDa のチロシンリン酸化蛋白を見出し、その蛋白を Gab 2 と同定した。Gab 2 は、既に報告されていた Gab 1 と様々な機能領域が保存されており、ショウジョウバエの DOS とともに Gab ファミリーを形成していることが考えられた。また Gab ファミリー分子はサイトカイン刺激だけでなく、成長因子や T・B 細胞抗原受容体刺激においてもチロシンリン酸化を受け、SHP-2、PI 3 Kinase p85 と会合し、MAP キナーゼの活性化を制御しているアダプター分子であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、IL6 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 containing tyrosine phosphatase-2) 及び、PI-3 キナーゼ、p85に会合してくる分子量100kDa のチロシンリン酸化蛋白質を見出し、その分子をアダプター分子 Gab 2 (Grb2-associated binder2) と同定した。この Gab 2 は既に報告されていた Gab 1 と相同性を有しており、Gab ファミリーを形成していることが考えられた。また、gp130シグナル伝達において、Gab 2 が Gab 1 と同様に MAP キナーゼ ERK の活性化を引き起こすことを示した。さらに、Gab ファミリー分子がサイトカイン刺激だけでなく、増殖因子やリンパ球細胞の抗原受容体刺激においてもチロシンリン酸化を受け、SHP-2 及び、PI-3 キナーゼ、p85と会合することを明らかにした。これまで、SHP-2 がサイトカインを含め増殖因子・抗原受容体刺激においてチロシンリン酸化され、MAP キナーゼ ERK を活性化することが知られていた。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 ファミリー分子が SHP-2 の基質となりうることを示しただけでなく、様々な受容体の下流で機能する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。