

Title	Activation of gp130 Transduces Hypertrophic Signal Through Interaction of Scaffolding/Docking Protein Gab1 With Tyrosine Phosphatase SHP2 in Cardiomyocytes
Author(s)	中岡, 良和
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45287">https://hdl.handle.net/11094/45287</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏 名 なか 中 おか 岡 よし 良 かず 和

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 8 4 7 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Activation of gp130 Transduces Hypertrophic Signal Through Interaction of Scaffolding/Docking Protein Gab1 With Tyrosine Phosphatase SHP2 in Cardiomyocytes  
(gp130 の活性化による心筋細胞肥大はスキヤッフオールディング/ドッキング蛋白質 Gab1 とチロシン脱リン酸化酵素 SHP2 の相互作用を介する)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 川 瀬 一 郎

(副査)

教 授 平 野 俊 夫 教 授 堀 正 二

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

Grb2 associated binder-1 (Gab1) は分子内に Pleckstrin homology ドメイン、Grb2 との結合に関わるプロリンに富むドメインと多数のチロシン残基を有するスキヤッフオールディング/ドッキングタンパク質である。Gab1 は様々なサイトカインや増殖因子による刺激でチロシンリン酸化を受け、Src homology 2 (SH2) ドメインを有するシグナル伝達分子をリクルートしてシグナルの増減に関わる。最も重要な Gab1 の会合分子の 1 つがチロシン脱リン酸化酵素の SHP2 (SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase) であり、この分子との会合を介して Gab1 は mitogen-activated protein kinase (MAPK) の extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) などの活性化を調節することが報告されている。Gab1 は心臓形成期の胎生 11.5-13.5 日では心臓に特異的に発現し、Gab1 欠損マウスは心室筋の低形成などを呈して胎生 17.5 日前後で致死となることから心臓の発生には必須の分子と考えられていたが、生後の心筋細胞での Gab1 の役割は明らかではなかった。本研究では、新生仔ラット培養心筋細胞を用いて肥大シグナルにおける Gab1 の役割を検討した。心筋細胞の肥大には G 蛋白質共役型受容体を介するシグナルで縦横方向に均等な形態の心筋細胞肥大が誘導されるものと、gp130 を受容体とする interleukin-6 サイトカインファミリーの Leukemia inhibitory factor (LIF) や cardiotrophin-1 によるシグナルで心筋細胞が縦長に伸長する eccentric な形態の肥大が誘導されるものと 2 種類あるが、その質的差異の発現過程における Gab1 の関与についても解析を行った。

### 【方法ならびに成績】

新生仔ラット培養心筋細胞において Gab1 と SHP2 のチロシンリン酸化を誘導する肥大アゴニストを同定する目的で、LIF と G 蛋白質共役型受容体アゴニストの norepinephrine, endothelin-1 及び angiotensin II で心筋細胞を刺激した。免疫沈降法を用いて Gab1 と SHP2 のチロシンリン酸化を調べると、LIF のみが Gab1 と SHP2 の両者に対して強いチロシンリン酸化を誘導した。LIF による Gab1 と SHP2 のチロシンリン酸化は 5~10 分にピークを認め、濃度依存的なチロシンリン酸化が認められた。また、Gab1 は LIF 刺激依存性に SHP2 と PI3-K サブユニットの p85

と会合することが観察された。LIF-gp130 シグナル依存性の心筋細胞肥大での Gab1 の機能解析を行うため、野生型 Gab1 (Gab1 WT) と SHP2 と会合不能の変異型 Gab1 (Gab1 $\Delta$ SHP2) を強制発現する 2 種類のアデノウイルスベクターを作成した。コントロールには  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) を発現するアデノウイルスを使用した。上記 3 種類のアデノウイルスを心筋細胞に感染させて LIF 刺激後の Gab1 と SHP2 の会合を免疫沈降法で検討すると、 $\beta$ -gal 発現細胞と Gab1 WT 発現細胞では Gab1 と SHP2 の会合が認められたが、Gab1 $\Delta$ SHP2 発現細胞では Gab1 と SHP2 の会合は認められなかった。心筋細胞を LIF で 24 時間刺激した後、各細胞の長軸径と短軸径を計測したところ、 $\beta$ -gal 発現細胞に比して Gab1 WT 発現細胞では長軸方向の伸長が有意に促進されていたのに対して、Gab1 $\Delta$ SHP2 発現細胞では伸長が有意に抑制されており Gab1-SHP2 の会合が LIF-gp130 依存性の心筋細胞伸長に関与することが明らかとなった。近年、LIF-gp130 シグナルによる MAPK kinase の MEK5 とその下流の extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) 経路の活性化が心筋細胞の伸長過程において重要な役割をすることが報告されていたため、上記 3 種類のアデノウイルスに感染した心筋細胞で LIF 刺激後の ERK5 の活性化を検討した。 $\beta$ -gal 発現細胞に比して Gab1 WT 発現細胞では ERK5 の活性化が有意に増強し遷延していたが、Gab1 $\Delta$ SHP2 発現細胞では ERK5 の活性化がほぼ抑制されており、ERK5 の活性化と心筋細胞の長軸方向の伸長に相関が認められた。そこで Gab1 WT を発現するアデノウイルスと ERK5 の dominant-negative 変異体を発現するアデノウイルスを心筋細胞に二重感染させて LIF 刺激を行ったところ、LIF による心筋細胞の伸長は完全に抑制された。これより Gab1-SHP2 の複合体は LIF-gp130 シグナルの下流で ERK5 の活性化を通して心筋細胞の伸長を誘導することが明らかとなった。

#### 【総括】

本研究を通じて、Gab1 がラット新生仔培養心筋細胞において LIF-gp130 を介した肥大シグナルにより特異的にチロシン酸化を受けて SHP2 と複合体を形成し、その結果 ERK5 を活性化して心筋細胞の長軸方向への伸長を来たすことが明らかとなった。従来詳細が不明であった G 蛋白質共役型受容体を介する心筋細胞肥大と gp130 を介する心筋細胞肥大の質的差異の発現過程において Gab1-SHP2 に依存するシグナル伝達系が重要であることが示唆された。今後、*in vivo* での心肥大における Gab1 の役割を明らかにすることが容量負荷時の心筋リモデリングの分子メカニズムの解明につながるものと期待される。

### 論文審査の結果の要旨

Gab1 は様々な細胞外からの刺激によりチロシン酸化を受けて、シグナル伝達の調節をする Scaffolding/docking protein である。Gab1 欠損マウスは胎生致死で心臓形成異常を呈することから心臓の発生で重要な役割を果たすことが示唆されていたが、生後の心臓における Gab1 の生理的役割は明らかではなかった。新生仔ラット心筋培養細胞を用いて、gp130 を受容体とする Leukemia inhibitory factor (LIF) 及び G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) アゴニストである Norepinephrine, Endothelin-1, Angiotensin II で刺激すると、Gab1 と SHP2 は LIF 刺激時のみチロシン酸化とその会合が認められた。gp130 依存性の心筋細胞肥大は GPCR 刺激による肥大とは異なり、縦長に伸長した特徴的な形態を呈することが知られているが、この肥大の質的差異の発現に Gab1 と SHP2 の会合形成が関与するかを本研究では野生型 Gab1、SHP2 との結合不能の変異体 Gab1 (Gab1 F627/659)、 $\beta$ -galactosidase (コントロール) を発現するアデノウイルスベクターを作成して検討した。LIF 刺激により野生型 Gab1 を発現する細胞ではコントロールに比べ心筋細胞の伸長が促進され、反対に Gab1 F627/659 発現細胞では伸長が抑制されていた。さらに下流のシグナル伝達経路では ERK5 の活性化が心筋細胞の長軸方向への伸長と相関を示していた。ERK5 の dominant-negative 変異体を発現するアデノウイルスと野生型 Gab1 を発現するウイルスと共感染して LIF 刺激すると、心筋細胞の伸長は抑制されていた。Gab1 は SHP2 との会合を介して ERK5 の活性化を誘導することで心筋細胞の伸長に重要な役割を演じることを明らかにした。

以上より、本論文は心筋細胞の gp130 を介する心筋細胞の肥大過程における Gab1 の特異的な役割に関して新たな知見を生み出したものであり、学位授与に値すると考える。