The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2
Author(s)	山崎, 哲
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45300
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

【56】

氏　　名	山　崎　　哲（やま さき さとる）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　１８４８４　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	Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2 **(EGF 受容体のシグナル伝達および活性型 ErbB2 による形質転換においてアダプター分子 Gab1 は役割を果たす)**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　平野　俊夫 （副査） 教　授　高井　義美　　教　授　祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

細胞外からのサイトカインや増殖因子による刺激は、細胞膜に存在する受容体から細胞質、核内へと伝達されることで、細胞の増殖や分化を引き起こすことが知られている。受容体は、刺激依存的にシグナル伝達分子群をチロシンリン酸化することでシグナルを下流へ伝達していることが明らかにされており、近年、チロシンリン酸化されるシグナル伝達分子のなかに足場アダプター分子と呼ばれる分子群が同定され、シグナル伝達において役割が果たすことが報告されている。足場アダプター分子の一つである Gab1 遺伝子欠損マウスは 12.5 日胚から 17.5 日胚の間に死亡し、心臓・胎盤・皮膚における形成異常が観察された。この Gab1 欠損マウスの表現型は PDGF、HGF、EGF をはじめとするシグナル分子欠損マウスで報告されている表現型と類似していた。このことから Gab1 がこれらのシグナル伝達で役割を果たしていることが予想された。本研究では、Gab1 のシグナル伝達における役割を詳細に解析することを目的とした。

【方法ならびに成績】

生化学的な手法を用いた解析を行うために SV40LT 抗原で不死化させた Gab1 欠損細胞株およびコントロールの細胞株を樹立した。これらの細胞株の増殖因子またはサイトカインに対する応答性を MAP キナーゼ ERK のリン酸化を活性化の指標に検討した結果、Gab1 欠損細胞株において EGF、PDGF、および IL-6 刺激依存的な活性化が低下しており、Gab1 がこれらのシグナル伝達に役割を果たしていることが示唆された。次に受容体から ERK 活性化に至るどの段階で Gab1 が役割を果たしているかを明らかにする目的で ERK の上流で機能する MEK、Raf-1、および Ras の EGF 刺激依存的な活性化を検討した。その結果、Gab1 欠損細胞株では MEK、Raf-1、および Ras 全ての EGF 刺激依存的な活性化が低下していた。この Ras の活性化低下が GAP 活性あるいは GEF 活性の変化に依存するかどうかを検討した結果、Gab1 欠損細胞株では刺激依存的な GEF 活性の上昇が低下しており、GAP 活性はコントロールの細胞株と差が無かったことから、Gab1 は刺激依存的な GEF 活性の制御に役割を果たしていることが示唆された。次にシグナル伝達に役割を果たす Gab1 の領域を明らかにする目的で４種類の変異体、PH ドメインを欠失させたΔ

PH、MBD を欠失させたΔMBD、3 箇所の PI-3K の会合モチーフに変異を導入した F447/472/589、および 2 箇所の SHP-2 会合モチーフに変異を導入した F627/659 を作製し、Gab1 欠損細胞株に導入した。これらの Gab1 変異細胞株の EGF 刺激依存的な ERK 活性化を検討した結果、MBD および SHP-2 の会合モチーフがシグナル伝達に重要で、PH ドメインも一部役割を果たしていることが示唆された。さらに活性型 ErbB2 による細胞の形質転換における Gab1 の役割を明らかにする目的で、Gab1 欠損細胞およびコントロールの細胞に活性型 ErbB2 を導入した細胞株を作製した。軟寒天コロニー形成実験、およびヌードマウスでの腫瘍形成実験を行った結果、Gab1 欠損細胞株ではコロニー形成数、造腫瘍能が抑制されていることが示された。Gab1 変異細胞株を用いてさらに解析を行ったところΔMBD、ΔPH、および F627/659 で軟寒天中でのコロニー形成が抑制されていることが示された。これらのことから活性型 ErbB2 による細胞の形質転換において Gab1 が役割を果たしていること、そのシグナル伝達においては MBD、PH ドメイン、および SHP-2 との会合モチーフが重要であることが示唆された。

【総括】

不死化させた Gab1 欠損細胞株を作製し解析を行った結果、Gab1 は Ras より上流で EGF 刺激依存的な GEF 活性の上昇に役割を果たしていることが示された。さらに活性型 ErbB2 依存的な軟寒天中でのコロニー形成やヌードマウスでの腫瘍形成が Gab1 の欠損により抑制されることが示された。これらのことから Gab1 は EGF および Erb2 依存的な細胞の増殖およびガン化におけるシグナル伝達に役割を果たしていることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

細胞は細胞外から受けた刺激を核内まで伝達させることで増殖や分化の調整を行っていることが知られている。細胞の増殖や分化は厳密な制御を受けており、この制御の破綻がガン化や細胞死の誘導などの生体に不都合な反応を引き起こす原因になることが明らかになっている。以前より、増殖因子やサイトカインによる刺激が、増殖や分化に関わる Ras-MAP キナーゼ経路を活性化することが知られていたが、近年、このシグナル伝達過程に新たに Gab ファミリータンパク質の関与が報告された。申請者は解明されていなかった Gab ファミリー分子のシグナル伝達機構を明らかにする目的で、Gab1 遺伝子欠損マウスの線維芽細胞を不死化させた Gab1 欠損細胞株を作製し、これを用いて生化学的な解析を行った。Ras-MAP キナーゼ経路に含まれるシグナル伝達分子の増殖因子 EGF 刺激依存的な活性化を、野生型細胞と Gab1 欠損細胞で比較することで、Gab1 が Ras より上流で機能していることを明らかにし、さらに Sos による Ras 活性化の制御に役割を果たしていることを明らかにした。Gab1 の主要な機能領域の変異体の作製および検討により、このシグナル伝達に役割を果たす Gab1 の領域が、細胞膜への局在化に必要な領域、受容体との間接的な会合に必要な領域、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 と会合する領域であることを明らかにした。また、軟寒天コロニー形成実験およびヌードマウスの腫瘍形成実験を行うことで、活性型 ErbB2 による細胞のガン化が Gabl 欠損細胞において抑制されることを示し、EGF のシグナル異常が引き起こす細胞のガン化において Gab1 が役割を果たしていることを明らかにした。本研究は EGF による Ras-MAP キナーゼ経路の活性化における Gab1 の分子機構を明らかにし、このことは今後、細胞のガン化を理解する上で役立つことが期待できることから、学位に値するものと認める。