

Title	Regulation of Platelet-derived Growth Factor Receptor Activation by Afadin through SHP-2 IMPLICATIONS FOR CELLULAR MORPHOLOGY
Author(s)	中田, 信輔
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48911
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	中 田 信 輔
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 21809 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Regulation of Platelet-derived Growth Factor Receptor Activation by Afadin through SHP-2 <i>IMPLICATIONS FOR CELLULAR MORPHOLOGY</i> (SHP-2 を介したアフアディンによる血小板由来増殖因子受容体の活性制御：細胞形態への影響について)
論文審査委員	(主査) 教 授 高井 義美 (副査) 教 授 中村 敏一 教 授 岡田 雅人

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

血小板由来増殖因子 (PDGF) により、PDGF 受容体は細胞内領域で自己リン酸化され、Ras-ERK、c-Src などのシグナル伝達系が活性化される。Ras-ERK シグナル伝達系の活性化は細胞周期、細胞増殖を促進する以外に、細胞形態の制御にも関与している。一方、これまでにアクチン結合蛋白質であるアフアディンが細胞間接着分子ネクチンの細胞内領域に結合し、ネクチンによる細胞間接着形成において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。本研究では、アフアディンの新しい役割として PDGF による細胞内シグナル伝達と細胞形態の制御への関与を検討した。

[方法ならびに成績]

I. NIH3T3 細胞における PDGF 刺激による PDGF 受容体、Ras、ERK の活性化

コントロールとアフアディンノックダウン NIH3T3 細胞を PDGF 刺激後、PDGF 受容体および ERK のリン酸化をウエスタンブロット法で、Ras の活性化を Pu11-down 法で検出した。その結果、コントロール細胞と比較して、アフアディンノックダウン細胞では PDGF 受容体のリン酸化が早期に亢進し、その後もリン酸化が持続した。同様の結果が、PDGF 受容体下流の Ras の活性化および ERK のリン酸化についても認められた。このことから、アフアディンは PDGF 受容体のリン酸化制御を介して、Ras、ERK シグナルの伝達を制御していると考えられた。

II. アフアディンとチロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 との相互作用

上述の結果より、アフアディンが PDGF 受容体のリン酸化を負に制御していることから、この制御機構に脱リン酸化酵素が関与しているのではないかと考え、PDGF 受容体に対する脱リン酸化酵素の一つである SHP-2 とアフアディンとの関係について検討した。NIH3T3 細胞を用いてアフアディンと SHP-2 の結合を抗 SHP-2 抗体による免疫沈降法で検討したところ、コントロール細胞ではアフアディンおよび PDGF 受容体が SHP-2 と共沈したが、アフアディンノックダウン細胞ではアフアディンだけでなく、PDGF 受容体も SHP-2 と共沈しなかった。このことから、ア

ファディンは SHP-2 と結合するだけでなく、SHP-2 と PDGF 受容体の結合にもアファディンが必要であった。また、コントロール細胞とアファディンノックダウン細胞において、PDGF 刺激後における SHP-2 の脱リン酸化酵素活性を調べた。SHP-2 の脱リン酸化酵素活性は、アファディンノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して低下しており、アファディンが SHP-2 の脱リン酸化酵素活性にも必要であった。

III. c-Src によるアファディンのチロシンリン酸化と SHP-2 との関係

c-Src は PDGF 刺激により活性化され、アファディンのチロシン残基 (Tyr¹²³⁷) をリン酸化し、このチロシン残基のリン酸化は、SHP-2 とアファディンの結合に必要であった。また、SHP-2 の C 末側の SH2 領域が SHP-2 とリン酸化アファディンとの結合に必要であった。NIH3T3 細胞を PDGF 刺激後、抗 SHP-2 抗体による免疫沈降実験を行ったところ、Src 阻害薬である PP2 で前処理した場合、アファディンのリン酸化が阻害され、SHP-2 とアファディンの共沈が減少すると共に、SHP-2 と PDGF 受容体の共沈も減少した。このことから、c-Src によるアファディンのチロシンリン酸化は、アファディンと SHP-2 の結合だけでなく、SHP-2 と PDGF 受容体との結合においても重要である。

IV. アファディンによる Ras、ERK シグナル伝達系の活性制御と細胞機能との関連

PDGF 刺激後、アファディンノックダウン細胞、SHP-2 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比較して、PDGF 受容体、Ras、ERK の活性化が亢進していたが、BrdU 取り込み量はこれらの細胞間で有意差はなく、細胞増殖への影響は認められなかった。PDGF 刺激後の細胞運動について比較したところ、コントロール細胞では、刺激の方向に向かって運動先端を形成したが、アファディンノックダウン細胞では運動先端が形成されなかった。しかし、MEK 阻害薬によりアファディンノックダウンによる ERK の活性亢進を抑制したところ、アファディンノックダウン細胞においても運動先端が形成された。このことから、アファディンによる PDGF 受容体や Ras-ERK シグナル伝達系の活性制御は、PDGF による細胞の運動先端の形成に必要である。

[総 括]

PDGF 刺激により活性化された。c-Src によりチロシンリン酸化されたアファディンは、PDGF 受容体に対する脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合し、SHP-2 の脱リン酸化酵素活性および SHP-2 と PDGF 受容体との結合を促進することにより、PDGF 受容体を脱リン酸化させ、Ras-ERK シグナル伝達系を制御した。このような、アファディンによる Ras-ERK シグナル伝達系の厳密な制御が、PDGF 刺激による細胞の運動先端の形成において重要である。

論文審査の結果の要旨

血小板由来増殖因子 (PDGF) により、Ras-ERK シグナル伝達系が活性化される。Ras-ERK シグナル伝達系の活性化は細胞周期、細胞増殖を促進する以外に、細胞形態の制御にも関与している。

本研究では、アファディンの新しい役割として PDGF による細胞内シグナル伝達と細胞形態の制御への関与を検討した。アファディンは PDGF によって活性化された c-Src によりチロシンリン酸化され、脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合して PDGF 受容体の脱リン酸化を促進すると共に、PDGF 刺激による Ras-ERK シグナル伝達系の活性亢進を制御した。さらにアファディンによる PDGF 受容体や Ras-ERK シグナル伝達系の活性制御は、PDGF による細胞の運動先端の形成に必要であった。以上の結果からアファディンによる SHP-2 を介した PDGF 受容体のリン酸化制御や Ras-ERK シグナル伝達系制御は、PDGF による細胞の運動先端の形成において重要である。

本研究は PDGF などの増殖因子による細胞運動制御のメカニズム解明において大きく貢献するものと考えられる。したがって、博士 (医学) の学位授与に値する。