

細胞内情報伝達におけるシグナルの発生とその受け渡し

竹 縄 忠 臣*

チロシンキナーゼ情報伝達系

生物は外界の刺激に応答して蛋白質の活性を制御する方法として蛋白質のリン酸化を取り入れ、蛋白質のリン酸化を行う酵素(蛋白質酸化酵素)を創生した。蛋白質酸化酵素はアミノ酸のセリン/スレオニンをリン酸化するセリン/スレオニンキナーゼとチロシンをリン酸化するチロシンキナーゼがある。セリン/スレオニンキナーゼが主にホルモンなどの短い時間で生理活性を引き起こす情報伝達に働くのに対し、チロシンキナーゼは長い時間かかって生じる生理作用、細胞増殖や分化の情報伝達に重要な役割を果たす。チロシンキナーゼはセリン/スレオニンキナーゼに遅れて発見されたが、すでにセリン/スレオニンキナーゼが直接標的蛋白質のセリン/スレオニンをリン酸化して活性を制御することで生理機能発現を導くことが分かっていたので、チロシンキナーゼ系の情報伝達も同じように直接標的蛋白質をリン酸化して、シグナルを伝達しているのではないかと考えられた。しかし、チロシンリン酸化される蛋白質は見つかるものの、それらの蛋白質には直接、増殖や分化に結びつくようなものがなく、研究は暗礁に乗り上げていた。そのような最中、1980年代半ば、情報伝達に関与する蛋白質の遺伝子が次々に取られた。その中にホスホリパーゼC γ RasGAPやCrkがあった。これらの蛋白質は癌遺伝子Srcの産物が持つアミノ酸配列とよく似た領域(SH2/SH3ドメイン)を持っており、このような領域が何をしているのか興味を持たれた。一つの突破口をひらいたのはロックフェラー大学の花房らのグループであった。花房らは癌遺伝子

Crkを見つけ、その作業機序を調べていた。CrkはSH2/SH3ドメインのみしか存在しないにもかかわらず細胞内のチロシンキナーゼ活性が上昇し、細胞を癌化に導く、変わった癌遺伝子であった。これらの事実はSH2/SH3ドメインそのものがチロシンキナーゼおよび細胞増殖に関与した役割を果たすことを示していた。そこでCrkのSH2ドメインでアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、多くのチロシンリン酸化蛋白質が結合してきたので、SH2ドメインはチロシンリン酸化部位を認識する領域であると結論した。その後の研究でこれらのドメインがチロシンキナーゼ系情報伝達での情報の受け渡しに重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。多くの研究によりSH2ドメインはチロシンリン酸化部位を含むアミノ酸配列を認識して結合すること、各々のSH2ドメインには特異性があり、その特異性はリン酸化チロシンのC末側3個までのアミノ酸でほぼ決定されることが分かっていた。またSH3ドメインはプロリンに富む配列を認識して結合するということが解明された。今日ではどのような部位にどのようなSH2ドメイン蛋白質が結合するかも分かっている(図1)。情報伝達に関与する蛋白質の中にはSH2ドメインとSH3ドメインを両方併せ持つ物が多く、これらのSH2/SH3ドメインを持つ蛋白質は細胞膜の受容体上のチロシンリン酸化部位にSH2ドメインで結合し、情報を受取り、SH3ドメインで下流の蛋白質と結合してシグナルを伝えていると考えられる。つまり、チロシンキナーゼ系情報伝達ではチロシンリン酸化のシグナルがこのようなアダプター蛋白質を介して、多くの機能分子に伝えられ、同時多発的にシグナルを下流に伝えるというシステムをとる。よって、チロシンリン酸

*東京大学医科学研究所

化の意義はリン酸化を介して、直接機能を変化させるということよりは、むしろ受容体などに多くのシグナル分子を集めることにある (図2)。

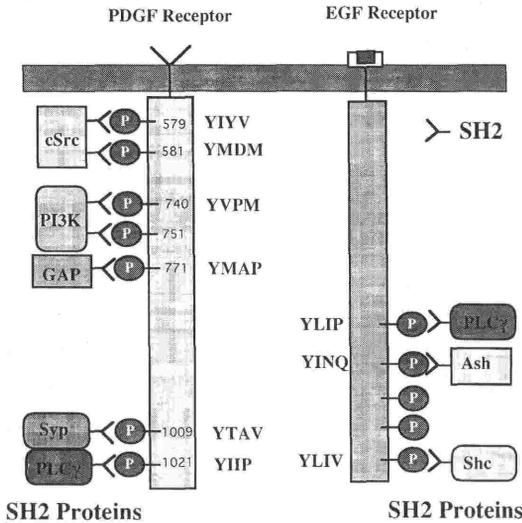


図1 SH2ドメイン結合部位
EGF受容体とPDGF受容体を例にとり、各種蛋白質のSH2ドメインがどのようなチロシンリン酸化部位に結合するかを示した。

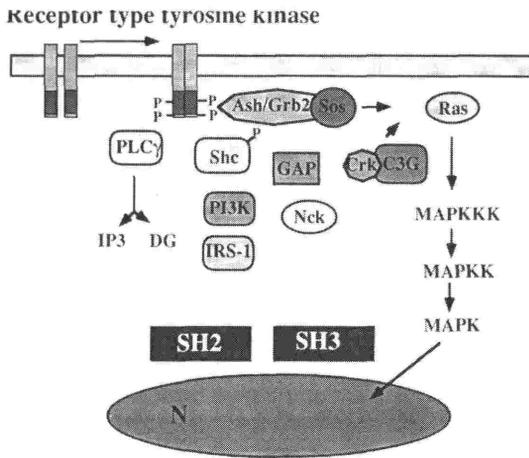


図2 チロシンキナーゼ情報伝達系
チロシンキナーゼ受容体は刺激を受けると、自己リン酸化を生じる。そのリン酸化部位にSH2ドメインをもつ蛋白質 (アダプター分子) が結合する。更にSH3ドメインを介して、プロリンに富む配列を持つ蛋白質を結合して下流へシグナルを送る。

アダプター蛋白質, Ash/Grb 2

われわれは1980年初期、PLC γ 2を見つけ、その分子中にあるSH2/SH3ドメインの生理的役割に興味を持った。PLC γ 2が持つSH2/SH3ドメインをラットの線維芽細胞に発現させたところ、細胞内のチロシンキナーゼ活性が上昇し、増殖速度も増したことから細胞の増殖に関与したドメインではないかと考えた。そこで新しいSH2/SH3ドメインをもつ蛋白質を見つけるプロジェクトを始め、SH2/SH3をもつ新しい蛋白質を取った。これをAshとなづけたが、Schlessingerらも同じものを取りGrb2となづけた。Ash/Grb2のSH2はpYXNXの配列を認識して結合し、SH3ドメインを介してプロリンに富む蛋白質と結合して、下流にシグナルを送っている。Ash/Grb2は線虫で発見されたSem5と構造的に類似していたことから、当初より受容体型チロシンキナーゼの下流にあってRasへシグナルを伝えている分子だと思われていたが、すぐにAsh/Grb2のSH3に結合する蛋白質としてSos (RasのGDP/GTP exchange factor) がとられた。その結果、Ash/Grb2はチロシンキナーゼのシグナルをSosを介してRasへと変え、細胞増殖へと導く要の分子であることが分かった。Ash/Grb2は直接チロシンキナーゼ受容体のチロシンリン酸化部位pYXNXに結合する場合と更にShcという別のアダプター蛋白質を介して結合する場合がある。われわれはAsh/Grb2の抗体を細胞内に注入した場合に、EGFやPDGF刺激で生じるDNA合成が抑制されるのみならず、アクチンのラッピングも抑制されたことからAsh/Grb2の下流にはRasへ行くシグナルの他に細胞骨格系へいくシグナルがあるに違いないと考えた。

Ash/Grb 2の下流分子, N-WASP

われわれはSosのほかにSH3に結合する下流シグナル分子を見つけるため、SH3ドメインのアフィニティークロマトグラフィーによりAshに結合する蛋白質を牛脳より精製した。最終的に6個の蛋白質を精製し、部分アミノ酸配列を決めた。150 kDaの蛋白質がSos, 110 kDaがc-Cbl, 100 kDaがdynamin, 55 kDaがtubulinであった。分子量150 kDa (p150) と65 kDa (p65) の蛋白質が

未知であったのでその遺伝子をとることにした。p65のcDNAを牛の脳のライブラリーより単離したところ、p65は脳に強く発現し、Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) と似た蛋白質であったのでN-WASPとなづけた。p65はPHドメイン、カルモジュリン結合部位、G蛋白結合部位 (GDB/CRIB)、プロリンに富む部位とコフィリン様部位を持つ、多機能ドメイン蛋白質であった。チロシンキナーゼの下流にあって、AshにN-WASPは結合し、G蛋白質のCDC42で活性化された。N-WASPとAshの複合体はEGF刺激に関係なく生じたが、N-WASP, Ash, EGF受容体との複合体形成はEGF刺激に依存して生じた。その結果N-WASPの持つコフィリン様活性が上昇、アクチン線維は断列し、再構成されて細胞膜上にマイクロスパイクが形成された。N-WASPは細胞膜上にアクチンのマイクロスパイク形成のシグナルを担っていると考えられた (図3)。

Ash/Grb 2 の下流分子、PIP 2 ホスファターゼ

一方、p150のcDNAを牛脳ライブラリーより単離したところシナプトジャンニンと高い相同性を示した。p150には主に3つのドメイン、Sac 1, OCRL, プロリンに富む領域より成っていた。Sac 4

1はアクチン骨格の再構成に関係しているものとして酵母で見出された蛋白質である。

OCRL (Lowe's Oculocerebrorenal syndrome) は伴性劣勢遺伝で起こる先天性疾患であるLowe症候群で欠失していた遺伝子としてとられたものであり、MajerusらによりOCRLはPIP2ホスファターゼをコードしていることがわかった。プロリンに富む領域はAsh/Grb2が結合する領域である。p150はチロシンキナーゼの下流にあってAsh/Grb2と結合し、アクチン線維の再構築に関係しているものと推定された。

実際にp150を動物細胞に発現させるとアクチン線維の断列が生じ、多核の細胞が生じた。これらの事実はp150はPIP2の分解を介して細胞骨格の調節に関与していることを示している。

細胞を増殖因子で刺激した際に生じる細胞骨格系の再構築はまずアクチン線維が断片化された後に、いろんな形のアクチン線維に再構築されると考えられている。その際に起こるアクチン線維重合/脱重合はアクチン調節蛋白質で行われているが、これらの蛋白質はイノシトールリン脂質、PIP2によりその機能を調節されている。つまり調節蛋白質中のPIP2量の増加は細胞骨格の構築に向い、減少は細胞骨格の断列に向かう。よって、結合しているPIP2が如何にして代謝されるのかわかることは極めて大切である。今日まで、Goldschmidt-Clermontらによって唱えられた経路、“アクチン調節蛋白質に結合しているPIP2はチロシンリン酸化されたPLC γ によって分解される”が唯一の経路だと考えられてきた。新たにわれわれはPIP2ホスファターゼによってアクチン調節蛋白質に結合しているPIP2が切れることを証明した。これらの結果よりチロシンキナーゼの活性化を受けて、p150とAsh/Grb2の複合体が受容体のチロシンリン酸化部位に移動し、PIP2ホスファターゼが活性化されるとアクチン調節蛋白質に結合しているPIP2を分解し、ゲルソリンやコフィリンなどの切断活性が上昇する、その結果アクチン線維の断片化が起こると考えた (図4)。

今日までの研究成果より、チロシンキナーゼ情報伝達系ではAsh/Grb2のようなアダプター蛋白質が受容体のチロシンリン酸化部位で情報を受取り、同時多発的に下流のさまざまな分子に伝えることで、増殖、細胞骨格構築という複雑な生理事

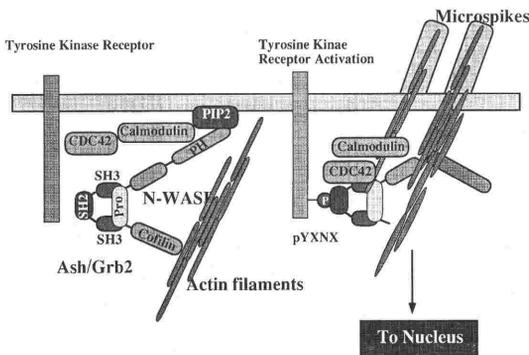


図3 N-WASPによるマイクロスパイク形成

細胞が刺激されていない状態では、N-WASPはAsh/Grb2と複合体を形成しているが、チロシンキナーゼ受容体とは結合していない。チロシンキナーゼが活性化されると、N-WASPとAsh/Grb2の複合体は受容体のチロシンリン酸化部位に移動し、活性化される。その結果、N-WASPの持つコフィリン様活性が活性化され、アクチンフィラメントの断列が生じる。アクチンフィラメントは何らかのメカニズムでマイクロスパイクへと構築される。

用を発現していると推測された。

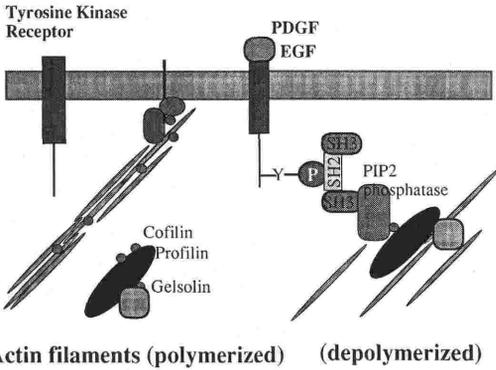


図4 PIP2ホスファターゼによるアクチン線維再構築

刺激されていない細胞ではPIP2がアクチン調節蛋白質に結合しており、コフィリン、ゲルソリンなどの作用が抑制され、アクチンフィラメントは重合状態にある。チロシンキナーゼが刺激されると、p150とAsh/Grb2の複合体はチロシンリン酸化部位に移動し、PIP2ホスファターゼ活性が上昇する。すると、アクチン調節蛋白質に結合していたPIP2が分解され、アクチンフィラメントは重合に転じる。

文献

- 1) Kock CA, Anderson D, Moran MF et al: SH 2 and SH 3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252: 668-674, 1991
- 2) 竹縄忠臣編: 情報伝達における分子間相互作用, 実験医学 Vol. 13, No 6, 1995
- 3) Matsuoka K, Shibata M, Yamakawa A, et al: Cloning of Ash, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH 3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9015-9019, 1992
- 4) Lowenstein EJ, Daly RJ, Datzner AZ, et al: The SH 2 and SH 3 domain-containing protein GRB 2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70: 431-442, 1992
- 5) Matsuoka K, Shibasaki F, Shibata M, et al: Ash/Grb-2, a SH 2 /SH 3-containing protein, couples to signaling for mitogenesis and cytoskeletal reorganization by EGF and PDGF. *EMBO J* 12: 3467-3473, 1993
- 6) Takenawa T, Miura K, Miki H, et al: Signal transductions of SH 2 /SH 3: Ash/Grb 2 downstream signaling. *Adv Pharmacol* 36: 139-153, 1996
- 7) Miki H, Miura K, Takenawa T: N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP 2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*, 1996 (in press)