

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770165

研究課題名（和文）血球における受容体チロシンキナーゼによるシグナル伝達

研究課題名（英文）Role of receptor tyrosine kinases in hematopoietic cells

研究代表者

真嶋 隆一（MASHIMA RYUICHI）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 00401365

研究成果の概要：本研究は血球細胞に発現する受容体チロシンキナーゼ下流のシグナル伝達機構の解明を目的として、特に Flt3 の基質分子の探索と、その機能解明を行った。検討の結果、Flt3 の基質分子として、他の受容体チロシンキナーゼの基質としても知られる Dok-1 が、その候補と考えられた。そこで、Flt3 下流における Dok-1 のチロシンリン酸化を強制発現系にて確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内・細胞間情報伝達、チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

血球の分化と増殖にはチロシンキナーゼシグナルが重要である。そのようなシグナルを担う受容体チロシンキナーゼとして c-kit、M-CSF 受容体、および Flt3 が知られており、これらは 1 次構造上の類似性

から PDGF 受容体を含めた受容体チロシンキナーゼファミリーを構成している。Flt3 は、c-kit とともに血球分化の初期段階に発現して造血幹細胞の増殖と分化の制御に重要であることが知られている(1)。例えば、Flt3 ノックアウトマウスの解析では分化初期段階の B 細胞数が減少すること、

またこのマウスより得られた骨髄細胞を用いた移植実験では T、B、およびミエロイド系細胞の増殖が抑制されることが報告されている(2)。一方 M-CSF 受容体と PDGF 受容体の発現量は、高度に分化した血球細胞で上昇することが知られている。例えば、M-CSF 受容体は単球とマクロファージに高発現している。また、PDGF 受容体 α 鎖はインターフェロン γ により単球において発現上昇すること(3)、また PDGF 受容体 β 鎖は単球がマクロファージへ分化する際にその発現が上昇すること(4)が報告されている。すなわち Flt3 と c-kit、および M-CSF 受容体と PDGF 受容体は血球分化の初期と後期に発現する受容体チロシンキナーゼと考えられる。

Flt3 を含めた受容体チロシンキナーゼ下流では、活性化された受容体チロシンキナーゼと種々のアダプター分子が会合することが知られている。従って、この現象が下流で惹起される様々なシグナル伝達機構の初発反応であると考えられている。しかしながらリガンド刺激依存的に活性化された Flt3 が、安定な複合体を形成しない他の分子を基質としてリン酸化し、これによりシグナルが伝達されることは十分考えられる。例えば、活性化された Flt3 が STAT5 のチロシンリン酸化を誘導することが既に報告されている(5)。こうした理由により、本研究では Flt3 の活性化に伴い生じるリン酸化タンパク質の同定を試みた。

Dok-1(Downstream of tyrosine kinases-1)は、チロシンキナーゼシグナル下流において Ras の抑制因子 p120 rasGAP と会合する、チロシンリン酸化を受けやすい約 62 kDa のアダプタータンパク質として、1997 年に同定さ

れた(6, 7)。Dok-1 の一次構造は、N 末端側から順に PH (Pleckstrin Homology) ドメイン、PTB (Phosphotyrosine Binding) ドメイン、および多様な SH2 標的配列(その配列中のチロシン残基のリン酸化によって特定の SH2 ドメインの結合標的となり得る数残基のアミノ酸配列)を含む C 末端側の領域から成っている。現在では、Dok-1 と一次構造上の類似性が認められるファミリー分子として Dok-2 から Dok-7 までが発見されており、その中でも Dok-2 は Dok-1 との類似性が最も高い(8, 9)。Dok-1 と Dok-2 は主に造血系細胞に高発現していることが知られている。これらの細胞の中には Flt3 を発現するものがあるが、これまでに Flt3 下流における Dok-1 と Dok-2 を介したシグナル制御について研究した例は報告されていない。

2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ、本研究では Flt3 下流でチロシンリン酸化される基質分子の探索を行うことを目的とした。また、同時に他の受容体チロシンキナーゼ下流においてチロシンリン酸化されることが既に知られている Dok-1 と Dok-2 についても注目し、Flt3 下流におけるシグナル制御への関与を明らかにすることも研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 基質分子の探索

Flt3 強制発現細胞を用いて、Flt3L 刺激依存的な基質分子のチロシンリン酸化を検討した。基質分子の検出には抗リン酸化チロシン抗体を用いた。

(2) Flt3 下流における Dok-1/2 のチロシン

リン酸化の検討

Flt3 強制発現細胞を用いて、Dok-1 およびその類縁分子である Dok-2 のチロシンリン酸化を、抗リン酸化チロシン抗体を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 実験結果

研究開始当初の背景を踏まえて、最初に Flt3 下流においてチロシンリン酸化を受ける分子を探索した。まず、Flt3 を内在性に発現する培養細胞株 ML-1 細胞を Flt3L により刺激し、細胞内でチロシンリン酸化されるタンパク質の同定を試みたが、顕著にリン酸化されたタンパク質は検出されなかった。この一つの理由として、ML-1 細胞表面における Flt3 の発現量が少ないため、Flt3 下流で本来基質となるべきタンパク質のごく一部分のみがチロシンリン酸化されている可能性が考えられた。そこで血球細胞に Flt3 遺伝子を導入し、細胞表面上に機能的な Flt3 を高発現する安定発現細胞の作製を計画したが、目的とした細胞株の樹立には至らなかった。そのため、Flt3 を HEK293T 細胞に一過性に過剰発現させ、再度、Flt3L 刺激依存的なチロシンリン酸化タンパク質の探索を行った。しかしながら、この場合にも ML-1 細胞の際と同様に、Flt3L 刺激により特徴的にチロシンリン酸化されるタンパク質は、Flt3 自身を含めて、検出が困難であった。

そこで、既に報告された文献を基に、Dok-1 およびこの類縁分子である Dok-2 が Flt3 下流でチロシンリン酸化を受ける可能性を検討した。Flt3 発現細胞である ML-1 細胞を用いた予備的な探索実験では、Flt3L 刺激依存的な Dok-1 および Dok-2 の顕著なチロシンリン酸

化は認められなかった。このため、HEK293T 細胞を使用した一過性強制発現系を用いて Flt3 シグナル依存的な Dok-1 と Dok-2 のチロシンリン酸化を検討することとした。常法に従い HEK293T 細胞に FLAG 標識した Flt3 と、同じく FLAG 標識した Dok-1 もしくは Dok-2 の発現プラスミドを導入し、その二日後に Flt3L を培養液に添加した。その結果、Dok-1 のチロシンリン酸化量は Flt3L 刺激後 2 分で刺激前に比べて亢進し、その後、時間経過とともに低下した。Dok-2 のチロシンリン酸化量も Dok-1 と同様の時間変化を示した。これらの結果から、Flt3L 刺激依存的に Dok-1 及び Dok-2 のリン酸化が亢進することが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、少なくとも一過性の強制発現系においては Dok-1 及び Dok-2 が Flt3 下流でチロシンリン酸化されることが明らかになった。

(2) 考察

これまでの生化学的な解析結果から、Dok-1 は、SH2 ドメインの標的配列として知られている 295 番と 360 番のチロシン残基のリン酸化依存的に p120 rasGAP に会合することが明らかになっている(10)。これらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した場合には Dok-1 依存的な Erk 活性化の抑制が減弱するため、Dok-1 による Erk シグナルの抑制機構として、チロシンリン酸化依存的な p120 rasGAP のリクルートが重要であると考えられている。Dok-1 と一次構造上類似性が高い Dok-2 も、Dok-1 と同様に Erk シグナルを抑制する。Dok-2 の場合には 276 番と 304 番のチロシン残基のリン酸化に依存して Dok-1 と同様に p120 rasGAP と会合する(11)。これらの二つのチロシン残基をフェニルアラニンに置

換した Dok-2 変異体では、p120 rasGAP との会合が見られないこと、またチロシンキナーゼ依存的な Erk 活性化に対する、Dok-2 依存的な抑制効果が減弱することから、Dok-2 による Erk シグナルの抑制においても p120 rasGAP との会合が重要であると考えられている。本研究では、Flt3 依存的にリン酸化される Dok-1/2 のチロシン残基の同定には至っていないが、Flt3 シグナルの下流においても、Dok-1/2 に存在する p120 rasGAP 会合能を有する SH2 標的配列がチロシンリン酸化された結果、Ras-Erk シグナルが抑制的に制御されている可能性が考えられた。

以上の知見を踏まえて、現在、Dok-1/2 が Flt3 の下流シグナルを抑制する機能を有するか否か、特に Erk シグナルへの関与を中心に検討している。予備的な実験結果では、Flt3L 刺激時の Erk 活性化は、Dok-1/2 二重欠損マウス由来の Flt3L 誘導性樹状細胞において、野生型由来の細胞に比べて亢進していた。そのため今後は、血球細胞で重要な受容体チロシンキナーゼを介したシグナル伝達機構の全体像を解明する一端として、Flt3 下流シグナルを Dok-1 と Dok-2 がどのように制御しているのか、より詳細に明らかにして行く予定である。

(3) 参考文献

1. Lyman SD, et al. Blood 1998; 91:1101-34.
2. Mackaretschian K, et al. Immunity 1995; 3:147-61.
3. Krettek A, et al. Atherosclerosis 2001; 156:267-75.
4. Inaba T, et al. J Biol Chem 1993; 268:24353-60.

5. Zhang S, et al. J Exp Med 2000; 192:719-28.
6. Yamanashi Y, et al. Cell 1997; 88:205-11.
7. Carpino N, et al. Cell 1997; 88:197-204.
8. Di Cristofano A, et al. J Biol Chem 1998; 273:4827-30.
9. Jones N, et al. Oncogene 1998; 17:1097-108.
10. Songyang Z, et al. J Biol Chem 2001; 276:2459-65.
11. Lock P, et al. J Biol Chem 1999; 274:22775-84.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真嶋 隆一 (MASHIMA RYUICHI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号 00401365

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし