Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-07-25

# Molecular cloning of p125^Nap1, a protein that associates with an SH3 domain of Nck

北村, 忠弘

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1996-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1555
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001555

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　北村忠弘（きたむら ただひろ）　（大阪府）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）
学位記番号　博い第1040号
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付　平成8年3月31日

学位論文題目　Molecular cloning of p125$^{Nap1}$, a protein that associates with an SH3 domain of Nck
（NCKのSH3ドメインに結合する蛋白p125$^{Nap1}$のクローニング）

審査委員　主査　教授　春日雅人
教授　山村博平　教授　片岡　徹

## 論文内容の要旨

### 緒言

インスリンの結合によりインスリン受容体チロシンキナーゼが活性化されると，その内因性基質であるIRS-1のチロシン残基がリン酸化を受け，さらにそのリン酸化チロシン残基を認識して種々のSH2ドメイン含有蛋白が結合する。現在までにIRS-1に結合が報告されているSH2ドメイン含有蛋白には，P13-キナーゼの85kDa調節サブユニット（P85），チロシン脱リン酸化酵素であるSyp，SH2及びSH3ドメインのみから構成されるいわゆるアダプター蛋白と考えられるGrb2及びNCKがある。

NCKは1つのSH2ドメインと3つのSH3ドメインからなるアダプター蛋白であり，種々の増殖因子刺激によって，チロシンリン酸化蛋白と結合し，またNCK自身もセリンリン酸化される。NCKには内在性の触媒ドメインを認めないこと，また，NCKと類似の構造を有するGrb2がそのSH3ドメインに結合するSosを介して低分子量G蛋白質Rasの活性化に関与することなどから，NCKもそのSH3ドメインに結合する分子を介して細胞内情報を伝達すると推定されている。NCKのSH3ドメインに結合する蛋白として，cbl，SosそしてWASPの報告があるが，それらの蛋白を介した情報伝達機構は未だ明らかではない。そこで今回，我々は，NCKの関与する細胞内情報伝達の詳細を明らかにするため，NCKのSH3ドメインに結合する新たな蛋白の同定を試みた。

### 方法

1．各種SH3ドメイン含有GSTfusion蛋白の作成及びSH3ドメインに結合する蛋白の分離精製

ヒトNCKcDNAの全長，アミノ末端から1番目のSH3ドメイン（アミノ酸1-98），2番目のSH3ドメイン（アミノ酸110-164），3番目のSH3ドメイン（アミノ酸194-251）（以後NCKfull，NCKSH3（1），-（2），-（3）と表記），及びヒトGrb2cDNAのアミノ末端及びカルボキシル末端のSH3ドメイン（アミノ酸1-58及び159-217），ニワトリv-CrkのSH3ドメイン（アミノ酸369-429），P13-キナーゼの調節サブユニット（p85α）のSH3ドメイン（アミノ酸1-86）（以後Grb2SH3（1），-（2），v-Crk SH3，p85αSH3と表記），をそれぞれ含有するGSTfusion蛋白を作成し，これらをGlutathione-

Sepharoseビーズ上に固相化し，これとウシ大脳可溶化分画とを孵置した蛋白を，SDS-PAGEにて分析した。

2．Nap1cDNAのクローニング

マウスMMH19cDNAの862から1420塩基にあたる559塩基のフラグメントをPCRにて増幅し，これを〔$^{32}$P〕dCPTにて標識したプローブを用いてラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。

3．Nap1及びHA-tagged NCKの発現ベクターへの組み込み

Nap1全長cDNAはSR $\alpha$プラスミドベクターに（SR $\alpha$-p125$^{Nap1}$），ヒトNCK全長cDNAはinfluenza virus hemagglutinin（HA）エピトープをPCRにて付加した後，SR $\alpha$プラスミドベクターに挿入した（SR $\alpha$-HA-NCK）。

4．抗体

Nap1のカルボキシル末端に相当するペプチド（HAVYKQSVTSSA）をウサギに免疫して抗Nap1ポリクローナル抗体を得た。

成績及び考察

NCKのSH3ドメインに結合する蛋白を同定するためにまず，GSTfusion蛋白として発現させたNCKfull，NCKSH3（1），Grb2full，Grb2SH3（1），Grb2SH3（2），及びp85 $\alpha$SH3をビーズ上に固相化し，これとウシ大脳可溶化分画を孵置した後，結合する蛋白をSDS-PAGEにて分離後，銀染色法にて検出した。NCKfull及びNCKSH3（1）には，他のSH3ドメインを有するGSTfusion蛋白には結合しない125kDa及び140kDaの蛋白が認められた。

この125kDaのバンドをゲルより抽出し，エンドプロテアーゼLys-Cによる限定分解断片のアミノ酸シークエンスを行い，8個のペプチドのアミノ酸配列を決定した。このアミノ酸配列をもとにデータベースの検索を行ったところ，4個のペプチドのアミノ酸配列をコードし得るcDNAクローンMMH19が見い出された。MMH19はその部分塩基配列のみが報告されている機能未同定のマウスcDNAである。そこでPCRにて増幅したMMH19のcDNA断片をプローブとしてラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングし，全長cDNAを単離し，この蛋白をNap1（NCK-associated protein 1）と名付けた。

Nap1のアミノ酸配列中には既知のfunctional domainを認めなかったが，ヒト慢性骨髄性白血病細胞より構築されたcDNAライブラリーから単離された遺伝子であるHem-1cDNAと59%のアミノ酸相同性を呈していた。また，Nap1は，Hem-1のラット及びショウジョウバエのホモログと考えられるHem-2，D-Hemともそれぞれ94%，60%の相同性がみとめられた。また，SH3ドメインとの結合に必須であるとされるいわゆるproline-rich motifはNap1には認められなかった。

Nap1cDNAを蛋白発現ベクターに挿入し，COS7細胞への遺伝子導入を行い，抗Nap1ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットに供したところ，遺伝子を導入しないCOS7細胞では内因性のNap1と考えられる弱い125kDaのバンドを認めたが，遺伝子導入を行ったCOS7細胞では過剰発現したNap1のバンドが検出された。

intact cellにおいてもNap1とNCKが結合をするか否かを確認するため，HA-epitope tagにて標識したNCKのcDNAをCOS7細胞に導入し，抗HA抗体で免疫沈降後，抗Nap1抗体でのウエスタンブロットに供した。NCKを導入した細胞でのみ125kDaのNap1バンドが検出され，Nap1とNCKがintact cellにおいても結合することが明らかとなった。

以上の結果より，Nap1は，NCKとin vitroでもintact cellにおいても結合しているが，そのアミ

ノ酸配列中に，SH3ドメイン結合蛋白上に存在するproline-rich motifを認めなかったことより，Nap1は他の未同定の分子を介して，NCKと間接的に結合している可能性が示唆された。すでにNCKと直接の結合が確認されている分子には，Sos，Dynamin，WASP等が存在するが，これらの分子がNCKSH3（2）及びNCKSH3（3）との結合が報告されているのに対し，Nap1はNCKSH3（1）に特異的に結合することから，Nap1がこれらの分子を介してNCKと結合するという仮説は否定的である。一方，Nap1とともに今回NCKのSH3ドメインとの結合が確認された140kDaの蛋白は，1）Nap1同様NCKSH3（1）に特異的に結合する，2）銀染色の結果から，ほぼ同量のNap1と140kDaの蛋白がNCKに結合する，という2つの理由からNap1とNCKの間に介在する分子である可能性が高いと考えられた。今後，Nap1の特性の検討とともに，この140kDaの蛋白の遺伝子クローニングが，NCKの新たな機能の解明に寄与するものと期待される。

結語

各種のSH3ドメインを有するGSTfusion蛋白を用いてNCKのSH3ドメインに特異的に結合する125kDaおよび140kDaの2つの蛋白を同定した。このうち125kDaの蛋白を精製し，その部分アミノ酸配列より全長cDNAを単離し，この蛋白をNap1と名付けた。Nap1には既知のfunctional domainは認めなかったが，Hem family遺伝子群と高いアミノ酸相同性を示した。Nap1に対する特異抗体を用いた検討により，Nap1はNCKとin vitroでもintact cellにおいても結合することが明らかとなったが，Nap1のアミノ酸配列中にいわゆるproline-rich motifが存在しないこと，recombinantのNap1とNCKとの直接の結合を再現できなかったことより，Nap1はNCKと直接には結合しておらず，他のproline-rich motifを含有する蛋白を介して間接的に結合する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

インスリンの結合によりインスリン受容体チロシンキナーゼが活性化されると，その内因性基質であるIRS-1のチロシン残基がリン酸化を受け，さらにそのリン酸化チロシン残基を認識して種々のSH2ドメイン含有蛋白が結合する。現在までにIRS-1に結合が報告されているSH2ドメイン含有蛋白には，P13-キナーゼの85kDa調節サブユニット（P85），チロシン脱リン酸化酵素であるSyp，SH2及びSH3ドメインのみから構成されるいわゆるアダプター蛋白と考えられるGrb2及びNckがある。NckはC末端側の1つのSH2ドメインとN末端側の3つのSH3ドメインから構成される蛋白であり，チロシンリン酸化されたIRS-1とそのSH2ドメインにて結合する。そしてさらにそのSH3ドメインに結合する分子を介して細胞内情報を伝達すると推定されているが，その詳細は明らかではない。本研究では，このNckのSH3ドメインに結合する分子を解明すべく，NckのSH3ドメインを有するGSTfusion蛋白を用いて，ウシ大脳可溶化分画からこれに特異的に結合する125kDa及び140kDaの2つの蛋白を同定した。このうち125kDaの蛋白を分離精製し，アミノ酸シークエンスの結果得られた部分アミノ酸配列より全長cDNAをクローニングしたところ，この蛋白は現在まで報告されていない新しい蛋白であり，これをNap1（Nck-associated protein 1）と名付けた。Nap1には既知のfunctional domainを認めなかったが，血球系細胞にのみ限局的に発現しているHem family遺伝子群と高いアミノ酸相同性を示し，Nothern blottingの結果，Nap1は種々の臓器に広範囲に発現していることが明らかとなった。さらに，Nap1に対する特異抗体を用いた検討により，Nap1はNckとin vitroでもintact cellにおいても結合することが明らかとなった。しかし，Nap1のアミノ酸配列中にいわゆる

proline-rich motifが存在しないこと，recombinantのNap1とNckとの結合を再現できなかったことより，Nap1はNckと直接には結合しておらず，他のproline-rich motifを含有する蛋白を介して間接的に結合する可能性が示唆された。本研究は，Nckについて，その下流の情報伝達機構を研究したものであるが，従来ほとんど不明であったNckのSH3ドメインに結合する新しい分子をクローニングし，Nckの関与する情報伝達機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。