



# Inhibition of the Motility and Growth of B16F10 Mouse Melanoma Cells by Dominant Negative Mutants of Dok-1

細岡, 哲也

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2437

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002437>

※ 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。



【 7 8 】

氏 名・(本 籍) 細岡 哲也 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第 1 4 0 0 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 1 4 年 3 月 3 1 日

【学位論文題目】

**Inhibition of the Motility and Growth of B16F10 Mouse  
Melanoma Cells by Dominant Negative Mutant of Dok-1**

(Dok-1 の優性阻害型変異体は B16F10 マウスメラノーマ細胞の  
細胞運動及び細胞増殖を阻害する)

審 査 委 員

主査 教授 春日 雅人

教授 市橋 正光

教授 前田 盛

## I. 緒言

Dok-1 は、v-Src などの活性化型チロシンキナーゼの基質として以前より知られていた蛋白質である。Dok-1 は N 末端に PH ドメインをその C 末端側に PTB ドメインを有しており、それぞれ細胞膜のイノシトールリン脂質およびリン酸化チロシンを含む NPXY モチーフとの結合に重要であると考えられている。C 末端側にはレセプター型および非レセプター型チロシンキナーゼによってリン酸化されるいくつかのチロシン残基が存在し、これらがリン酸化されると Ras GTPase-activating protein (以下 RasGAP) やアダプター蛋白である NCK の SH2 ドメインと結合する。これらの結合を介して Dok-1 が細胞運動や細胞増殖の制御に関わっていることが次第に明らかになってきたが、その生物学的な役割の詳細については未だ不明な点が多い。

## II. 方法

myc-tag で標識した野生型 Dok-1(DokWT) に加え、PH ドメインを欠失した変異体 (DokΔPH)、PH ドメインのみの変異体 (DokPH) および PH ドメインと PTB ドメインから成る変異体 (DokPH+PTB) をコードする cDNA を作成した。これらを高転移性マウスメラノーマ細胞株 (B16F10) に導入し、恒常的強発現細胞を樹立した。これらの細胞について細胞接着能や細胞運動能および細胞増殖能について比較するとともに Ras および Rho 活性について比較検討した。

## III. 結果および考案

1) 樹立細胞株における野生型および変異型 Dok-1 蛋白質の発現量: 各種恒常的強発現細胞株において、外因性および内因性の Dok-1 蛋白量を、myc-tag および Dok-1 に対する特異抗体を用いたイムノブロット法にて検討した。DokWT、DokΔPH および DokPH+PTB の発現量は内因性 Dok-1 蛋白の約 2 倍、DokPH の発現量は約 5 倍であった。また、各細胞株間で内因性 Dok-1 蛋白の発現量に差はなかった。

2) Dok-1 の C 末端チロシンリン酸化部位欠損変異体の優性阻害型変異体としての作用: B16F10 細胞をフィブロネクチンをコートした培養皿上に接着させると内因性 Dok-1 のチロシンリン酸化が認められた。同様に、DokWT も接着依存性にチロシンリン酸化したが、DokΔPH はチロシンリン酸化しなかった。以上のことから Dok-1 のチロシンリン酸化は細胞基質間接着依存性であり、かつ Dok-1 の PH ドメインを必要とすると考えられた。このことは我々が以前に Chinese hamster ovary 細胞において見いだした知見と一致するものであった。次に樹立した各細胞株をフィブロネクチン上に接着させた時の内因性 Dok-1 のチロシンリン酸化の程度ならびに Dok-1 蛋白の細胞内局在について比較検討した。DokPH+PTB および DokPH の強発現細胞では、コントロール細胞と比べて内因性 Dok-1 のチロシンリン酸化はそれぞれ約 60% および約 80% に抑制されていた。また、これに伴い細胞膜分画における内因性 Dok-1 と RasGAP との結合も著明に減少していた。これらの Dok-1 変異体の強発現は、Focal adhesion kinase や p130CAS の細胞基質間接着依存性チロシンリン酸化には影響を与えなかったことから内因性 Dok-1 蛋白に対して特異的な抑制効果を持つと考えられた。細胞分画法によ

る検討では、DokPH+PTB および DokPH はいずれも細胞骨格分画や膜分画に好んで局在したが、膜分画への移行性は DokPH の方がより高かった。DokPH+PTB および DokPH 強発現細胞において、内因性 Dok-1 は膜分画、細胞骨格分画および膜骨格分画のいずれにおいても減少していたが、細胞骨格分画における減少は DokPH+PTB 強発現細胞の方がより顕著であった。以上のように、DokPH+PTB および DokPH は内因性 Dok-1 のチロシンリン酸化および正常な細胞内局在を阻害することから、これらの変異体は優性阻害型変異体として機能すると考えられた。一方、DokΔPH はこのような阻害効果を持たないことから機能喪失型変異体として機能すると考えられた。

3) 細胞伸展に及ぼす Dok-1 変異体の効果: 樹立した各細胞株について、フィブロネクチン上に再接着させた時の形態を観察することにより細胞伸展能を検討した。接着から 30 分後、コントロール細胞と DokWT および DokΔPH 強発現細胞の間に伸展状態の差はなかったが、DokPH+PTB および DokPH 強発現細胞では、細胞周辺が明るく円形でラッフル形成のない非伸展細胞の割合が有意に多かった。DokPH+PTB 強発現細胞では 45%、DokPH 強発現細胞では 30% が非伸展細胞であった。接着から 60 分後ではいずれの細胞株の間にも伸展能に有意な差を認めなかった。以上より、Dok-1 の機能阻害によって B16F10 細胞の伸展が遅延すると考えられた。

4) 細胞運動に及ぼす Dok-1 変異体の効果: 樹立した各細胞株の運動能を Boyden chamber 法を用いて検討した。フィブロネクチン、ヒトロネクチンおよび type 4 コラーゲンのいずれを細胞外基質として用いた場合にも、DokPH+PTB 強発現細胞ではコントロール細胞と比べて著明に運動能の低下を認めた。DokPH+PTB 強発現細胞程顕著ではないが、DokPH 強発現細胞でも運動能の有意な低下を認めた。一方、DokWT および DokΔPH 強発現細胞はコントロール細胞とほぼ同等の運動能を有していた。

5) 細胞増殖に及ぼす Dok-1 変異体の効果: 樹立した各細胞株について、通常濃度 (10%) あるいは低濃度 (0.5%) の血清存在下での細胞増殖能を検討した。いずれの条件においても DokPH+PTB 強発現細胞ではコントロール細胞と比べて著明に細胞増殖が抑制されていた。DokPH および DokΔPH 強発現細胞でも細胞増殖は軽度ながらも有意に抑制されていた。以上より、Dok-1 の機能を阻害することにより B16F10 細胞の増殖能は抑制されると考えられた。

6) Dok-1 変異体の Ras 活性に及ぼす影響: Dok-1 は細胞増殖や細胞運動に重要である Ras の活性を正または負に調節すると考えられている。そこで、樹立した各細胞株について定常状態での Ras 活性を pull-down 法にて検討したところ、DokPH+PTB 強発現細胞ではコントロール細胞と比べて著明な Ras 活性の低下を認めた。DokPH 強発現細胞では Ras 活性に有意な変化を認めなかった。以上より、Dok-1 の優性阻害型変異体による細胞運動および増殖抑制の分子機構の 1 つとして Ras 活性の抑制が考えられたが、一方で Ras 活性の低下を認めない DokPH 強発現細胞においてもこれらの細胞機能の抑制を認めたことから、Dok-1 の下流における Ras 非依存性情報伝達経路の存在が示唆された。

7) Dok-1 変異体の Rho 活性に及ぼす影響: 樹立した各細胞株間で細胞運動に重要と考えられている Rho の活性を pull-down 法を用いて比較検討した。しかしながら、

DokPH+PTB 強発現細胞においても、細胞基質間接着および LPA 依存性の Rho 活性化は正常に認められた。

#### IV. 結論

Dok-1 は B16F10 高転移性マウスメラノーマ細胞において、Ras 活性を維持することにより、細胞運動だけでなく細胞増殖をも正に調節していると考えられた。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1403号	氏名	細岡 哲也
論文題目	<p>Inhibition of the Motility and Growth of B16F10 Mouse Melanoma Cells by Dominant Negative Mutants of Dok-1</p> <p>Dok-1 の優性阻害型変異体は B16F10 マウスメラノーマ細胞の細胞運動および細胞増殖を阻害する</p>		
審査委員	<p>主 査 春日 雅人</p> <p>副 査 市橋 正光</p> <p>副 査 前田 盛</p>		
審査終了日	平成14年1月28日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

<p>Dok-1は、v-Srcなどの活性化型チロシンキナーゼの基質として知られていた蛋白質であり、N末端よりPHドメインとPTBドメインを、C末端側には多くのチロシン残基を有している。これらがリン酸化されるとRas GTPase-activating protein（以下RasGAP）やアダプター蛋白であるNCKと結合する。これらの結合を介してDok-1が生物学的役割を担っていることが次第に明らかになってきたが、詳細については不明な点が多い。そこで、本研究はDok-1の生物学的役割とその分子機構を明らかにすることを目的としている。</p> <p>野生型Dok-1に加え、PHドメインを欠失した変異体（DokΔPH）、PHドメインのみの変異体(DokPH)およびPHドメインとPTBドメインから成る変異体(DokPH+PTB)を高転移性マウスメラノーマ細胞株(B16F10)に導入した恒常的強発現細胞を樹立した。B16F10細胞をフィブロネクチン上に接着させると内因性Dok-1のチロシンリン酸化が認められた。これはCHO細胞において認められた所見と同様であった。次に樹立した各細胞株をフィブロネクチン上に接着させた時の内因性Dok-1のチロシンリン酸化の程度ならびにDok-1蛋白の細胞内局在について比較検討した。DokPH+PTBおよびDokPHの強発現細胞では、コントロール細胞と比べて内因性Dok-1のチロシンリン酸化はそれぞれ約60%および約80%に抑制されていた。また、これに伴い内因性Dok-1とRasGAPとの結合も著明に減少していた。細胞分画法による検討では、DokPH+PTBおよびDokPHはいずれも細胞骨格分画や膜分画に好んで局在した。DokPH+PTBおよびDokPH強発現細胞において、内因性Dok-1は膜分画、細胞骨格分画および膜骨格分画のいずれにおいても減少していたが、細胞骨格分画における減少はDokPH+PTB強発現細胞の方がより顕著であった。以上のように、DokPH+PTBおよびDokPHは内因性Dok-1のチロシンリン酸化および正常な細胞内局在を阻害することから、優性阻害型変異体として機能すると考えられた。一方、DokΔPHはこのような阻害効果を持たないことから機能喪失型変異体として機能すると考えられた。</p>
---

<p>フィブロネクチン上に再接着させた時の細胞伸展能の検討では、コントロール細胞と比べてDokPH+PTBおよびDokPH強発現細胞では有意に細胞伸展が遅延していた。また細胞伸展の遅延はDokPH+PTB強発現細胞の方がより顕著であった。Boyden chamber法を用いた細胞運動能の検討では、DokPH+PTB強発現細胞ではコントロール細胞と比べて著明に運動能の低下を認めた。DokPH+PTB強発現細胞程顕著ではないが、DokPH強発現細胞でも運動能の有意な低下を認めた。通常濃度あるいは低濃度血清存在下での細胞増殖能の検討では、DokPH+PTB強発現細胞ではコントロール細胞と比べて著明に細胞増殖が抑制されていた。DokPH強発現細胞でも細胞増殖は軽度ながらも有意に抑制されていた。以上の結果は、Dok-1の機能阻害によってB16F10細胞の伸展能、運動能および増殖能が低下することを示唆している。</p> <p>Dok-1は細胞増殖や細胞運動に重要であるRasの活性を正または負に調節すると考えられている。そこで、樹立した各細胞株について定常状態でのRas活性をpull-down法にて検討したところ、DokPH+PTB強発現細胞ではコントロール細胞と比べて著明なRas活性の低下を認めた。DokPH強発現細胞ではRas活性に有意な変化を認めなかった。以上より、Dok-1の優性阻害型変異体による細胞運動および増殖抑制の分子機構の1つとしてRas活性の抑制が考えられた。一方、Ras活性の低下を認めないDokPH強発現細胞においてもこれらの細胞機能の抑制を認めたことから、Dok-1の下流におけるRas非依存性情報伝達経路の存在が示唆された。</p> <p>本研究の要点は、Dok-1がB16F10細胞において、Ras活性を維持することにより細胞運動および細胞増殖を正に調節していることである。</p> <p>本研究は従来ほとんど知られていなかったDok-1の細胞運動および細胞増殖における正の調節を明らかにしたものであり、Dok-1の生物学的役割にお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られる。よって、本研究者は博士（医学）の学位を取る資格があると認める。</p>
---