



Grb2/Ash Binds Directly to Tyrosines 1068 and 1086 and Indirectly to Tyrosine 1148 of Activated Human Epidermal Growth Factor Receptors in Intact Cells

奥谷, 俊夫

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-04-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1922

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001922>

※ 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)	奥 谷 俊 夫 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博第1450号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成7年4月12日
学位論文題目	Grb2/Ash Binds Directly to Tyrosines 1068 and 1086 and Indirectly to Tyrosine 1148 of Activated Human Epidermal Growth Factor Receptors in Intact Cells (Intact CellsにおいてGrb2/Ashは活性化されたヒト上皮成長因子受容体の1068位と1086位のチロシンに直接結合し、1148位のチロシンには間接的に結合する。)
審査委員	主査 教授 春日 雅 人 教授 千原 和 夫 教授 片岡 徹

論文内容の要旨

I. 緒言

レセプターチロシンキナーゼ (RTK) は細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている。リガンドがRTKの細胞外ドメインに結合すると、レセプター自体のチロシンキナーゼ活性が上昇し、自己分子内のチロシン残基がリン酸化される。このリン酸化チロシン残基にSrc homology 2 (SH2) ドメインを有する蛋白が結合して増殖シグナルが伝達されることが考えられている。SH2ドメインを有する蛋白には、酵素活性を有するphospholipase α 1やRas GTPase活性化蛋白などと、catalyticドメインを持たないGrb2/Ash, Shc, phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) の85-kDaサブユニットなどがある。このうち、Grb2/Ashは1つのSH2ドメインと2つのSH3ドメインから成る蛋白で、Rasのguanine nucleotide exchange factorであるSos蛋白と複合体を形成しており、Rasの活性化に重要な働きを担っている。近年、SH2ドメインとリン酸化チロシンの結合には特異性が存在し、リン酸化チロシン近傍のアミノ酸配列が決定因子となることが示されている。RTKのひとつである上皮成長因子レセプター (EGFR) は、992, 1068, 1086, 1148, 1173位の5個のチロシン残基が自己リン酸化を受けることと、EGFの刺激によりEGFRにGrb2/AshとSosの複合体が結合し、Rasの活性化が生じることが示されているが、Grb2/AshがEGFRのどのリン酸化チロシンに結合するのかは明らかでない。そこで本研究では、Grb2/AshのEGFRへの結合部位を明らかにしようとした。

II. 材料および方法

(1) 変異型EGFRの作製

ヒトEGFR cDNA (東大医科研 渋谷正史教授より供与を受けた) をM-13に組み込み、リン酸化を受けるチロシンのうち4個もしくは5個をフェニルアラニンに置換した変異EGFRをKunkel法により構築した。これらのcDNAをeukaryotic expression vectorであるpRc/CMVに組み換え、シーケンスを確認した後、リン酸カルシウム法にてCHO細胞にトランスフェクションした。次にGeneticin耐性のコロニーから、細胞表面への 125 I-EGFの結合量を測定し、EGFRを過剰発現したク

ローンを選別した。各種変異EGFRの発現量は、LIGAND解析の結果 2.0×10^4 から 3.0×10^5 個/cellまでの範囲にあった。CHO細胞は10%ウシ胎児血清を含むHam's F-12で継代した。

(2) 免疫沈降法と免疫ブロット法

各細胞株をEGFで刺激後、lysis buffer (20mM Tris-Cl (pH 8.0), 137mM NaCl, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 2mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, $10 \mu\text{g/ml}$ aprotinin, $10 \mu\text{M}$ leupeptin) で可溶化し、抗EGFR抗体で免疫沈降した。この免疫沈降物をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、ニトロセルロースにトランスファーし、抗Grb2/Ash抗体で免疫ブロックした。粗細胞膜分画は、NP-40を除いたlysis bufferで細胞を破碎後、15,000rpmで15分間4℃にて遠心してできた沈降物を、NP-40を含むlysis bufferに可溶化して得た。

(3) in vitro結合実験

各細胞株より免疫沈降したEGFRを、 MnCl_2 とATPの存在でin vitroでリン酸化し、parentのCHO細胞のlysateとインキュベートした後、レセプターに結合したGrb2/Ashを抗Grb2/Ash抗体で免疫ブロットした。さらにEGFRのリン酸化チロシン残基とC担4個のアミノ酸を含む5merのペプチド、およびそれに加えN端の4個のアミノ酸も含む9merのペプチドを合成し、in vitroでリン酸化したEGFRへのGrb2/Ashの結合に及ぼすこれらのペプチドの制御効果も検討した。

III. 結果

(1) 野生型EGFRを発現するCHO細胞 (WT-1) をEGFで刺激後、lysateを抗EGFR抗体で免疫沈降すると、Grb2/Ashが共沈した。逆にlysateの粗細胞膜分画を抗Grb2/Ash抗体で免疫沈降すると、約175kDAのEGFRが共沈した。

(2) 野生型EGFRへのGrb2/Ashの結合は、刺激後1-2分で最大となり以後漸減した。また結合はEGFの濃度依存性であり、1nMのEGF刺激から有意な増加を認め、10-30nMでplateauとなった。

(3) 各種変異株のintact cellにおけるEGFRへのGrb2/Ashへの結合量は、WT-1を100%とすると、992, 1068, 1086, 1148, および1173位のチロシンのみを残基させた変異株では、各々 $12.0 \pm 3.5\%$, $85.6 \pm 4.5\%$, $56.2 \pm 5.2\%$, $48.6 \pm 12.7\%$ および $17.5 \pm 4.9\%$ (5回の実験のmean \pm SEM) であり、5個全部をフェニルアラニンに置換した変異株では、ほとんど結合を認めなかった。

(4) In vitroでリン酸化した各種変異レセプターへのGrb2/Ashの結合実験では、1068位および1086位のチロシンのみを残存させた変異株にはGrb2/Ashの結合を認めたが、その他の変異レセプターにはほとんど結合しなかった。

(5) 1068位と1086位のリン酸化チロシン残基を含むペプチドには、In vitroでリン酸化した野生型EGFRへのGrb2/Ashの結合を濃度依存性に抑制した。この抑制作用は、9merのペプチドの法が5merより10倍以上強く、また1068位のチロシンを含むペプチドの法が1086位のチロシンを含むものよりも強かった。

IV. 考察

本研究の結果より、intact cellにおいてGrb2/Ashは、EGFRの1068位と1086位の自己リン酸化チロシン残基に直接結合し、1148位のチロシナ残基には間接的に結合することが示された。これまでに変異導入により受容体の自己リン酸化チロシンを除去したり、合成ペプチドを用いる実験などから、リン酸化チロシンとSH2ドメインの結合には特異性が存在し、リン酸化チロシンの近傍のアミノ酸配

列が決定因子となっていることが明らかにされてきた。例えばPI3-Kの85-kDaサブユニットの場合、血小板由来成長因子受容体やinsulin receptor substrate-1(IRS-1)などとの結合には、pYXXM (Xはどんなアミノ酸でもよい) というモチーフが必要であることが示されている。Grb2/Ashの場合、リン酸化チロシンのC端側に続く3個のアミノ酸をいろいろ置き換えたペプチドのライブラリーを用いた実験で、Grb2/AshのSH2ドメインはpY(Q/Y)NYという配列に結合することが示されているが、EGFRにはそのような配列は認められない。また、permeabilized cell systemにおいて、1068位のチロシンを含むリン酸化ペプチドが、Grb2/AshのEGFRへの結合とEGFによるRasの活性化を抑制することが示されているが、完全なin vivoの系ではなく、過剰なリナ酸化ペプチドによりGrb2/Ashの他の部位への結合が阻害された可能性も否定できない。

Grb2/Ashと結合する蛋白としては、EGFRの他に、Shc, IRS-1, protein tyrosine phosphatase α (PTP α) などが報告されている。そのうちin vitroとin vivoの両方で証明されているGrb2/Ashの結合部位は、EGFRの1068と1086位、PTP α の789位があり、それらのアミノ酸配列はそれぞれPVPEpYINQS, QNPVpYHNQP, AFSDpYANFKである。またIRS-1の895位のリン酸化チロシンへのGrb2/Ashの結合はin vitroだけで証明されており、そのアミノ酸配列はSPGEpYVNIEである。Shcの場合、Grb2/Ashと結合する部位として317位のチロシンが推定されており、そのアミノ酸配列はDDPSpYVNVである。これらのことより+2位にアスパラギンがくるpY ϕ N (ϕ は疎水性のアミノ酸) という配列が、Grb2/AshのSH2との結合の特異性を決定する因子の1つであると考えられる。さらに今回の実験で5merより9merの合成ペプチドの方が阻害作用が強かったことより、-2位のプロリンや-1位の陰性アミノ酸もGrb2/Ashとの結合の親和性を高める作用を持つと考えられる。

Grb2/Ashは、EGFRの1148位のチロシンには間接的に結合するが、間に介在する蛋白としてShcが挙げられる。Shcは活性化されたEGFRと結合し、EGF刺激にてチロシンリン酸化され、Grb2/Ashと複合体を形成する。また我々は以前にEGFRの1148位のチロシンがShcの主たる結合部位であることを報告している。これに対して、in vitroでの結合実験とペプチドによる阻害実験により、Grb2/AshはShcを介して1173位と992位に間接的に結合するとする報告がみられる。しかし我々の結果ではGrb2/Ashは992位や1173位にはあまり結合しなかった。この違いは、in vivoとin vitroの実験系の違いによるものかもしれない。in vivoにおいては、それらの部位にGrb2/Ashより高い親和性を有する蛋白が結合するためであろうと考えられる。

V. 結語

Grb2/AshはEGFRの1068位と1086位の自己リン酸化チロシン残基に直接結合し、1148位のチロシンにはチロシンリン酸化蛋白を介して結合する。EGFRの1148位はShcの主たる直接の結合部位であることから、Grb2/Ashはチロシンリン酸化されてShcを介して1148位のチロシンに結合すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Grb2/Ashは1つのSrc homology 2 (SH2) ドメインと2つのSH3ドメインから成る蛋白で、SH3ドメインを介してRasのguanine nucleotide exchange factorであるSos蛋白と複合体を形成し、またSH2ドメインを介してレセプター型チロシンキナーゼ分子内の自己リン酸化チロシン残基に結合することにより、増殖や分化のシグナルをRas蛋白に伝達する機能を担っている。レセプター型

チロシンキナーゼのひとつである上皮成長因子レセプター（EGFR）にもGrb2/Ashが結合するが、Grb2/AshがEGFRのどのリン酸化チロシンに結合するのかについては十分には明らかにされていない。そこで本研究では、Grb2/AshのEGFR内の結合部位を明らかにしようとした。

本研究では、ヒトEGFRの992, 1068, 1086, 1148, および1173位の自己リン酸化チロシン残基のうち4個もしくは5個をフェニルアラニンに置換した変異レセプターを構築し、CHO細胞に過剰発現させた。それらの細胞株を用いて、抗EGFR抗体で免疫沈降し、抗Grb2/Ash抗体で免疫ブロックすることにより、*in vivo*と*in vitro*におけるGrb2/AshのEGFRへの結合について解析した。

各種変異株のintact cellにおけるEGFRへのGrb2/Ashへの結合量は、野生型レセプターを発現するCHO細胞を100%とすると、992, 1068, 1086, 1148, および1173位のチロシンのみを残基させた変異株では、各々12%, 86%, 56%, 49%および18%であった。すなわちGrb2/Ashの主たる結合部位は1068, 1086および1148位のチロシンであることが判明した。

*In vitro*でリン酸化した各種変異レセプターへのGrb2/Ashの結合実験では、1068位および1086位のチロシンのみを残基させた変異株にはGrb2/Ashの結合を認めたが、その他の変異レセプターにはほとんど結合しなかった。また1068位と1086位のリン酸化チロシン残基を含む合成ペプチドのみが*In vitro*でリン酸化した野生型レセプターへのGrb2/Ashの結合を濃度依存性に抑制した。

以上より、Grb2/AshはEGFRの1068位と1086位のチロシンには直接結合し、1148位のチロシンには間接的に結合することが明らかになった。近年、細胞内の増殖シグナル伝達が分子レベルで解明されつつあるが、本研究の結果を考えあわせると、*in vitro*と*in vivo*の両方の系で検討することで、より正確な結果が得られる場合があると思われる。

本研究はGrb2/Ash蛋白について、その上皮成長因子レセプター内の結合部位を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったintact cellにおける上皮成長因子レセプターとGrb2/Ashの結合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、医学博士の学位を得る資格があると認める。