

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	上皮細胞増殖因子受容体からの細胞内情報伝達機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	豊田雅士
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第3953号, 授与年月日:1998年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第3953号, Conferred date:1998/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

上皮細胞増殖因子受容体からの
細胞内情報伝達機構に関する研究

指導教官 半田宏教授

東京工業大学大学院
生命理工学研究科
バイオテクノロジー専攻

氏名 豊田雅士

目次

第1章 序 論	1
I. 緒 言	1
II. 実験の目的および概要	3
第2章 上皮細胞増殖因子受容体からの 細胞内情報伝達における Shc の役割	10
I. 上皮細胞増殖因子による Shc のチロシンリン酸化と 317 番目のチロシン残基	10
(a) はじめに	13
(b) 実験材料と実験方法	13
(c) 実験結果	16
(d) 考察	18
II. Shc の新たなチロシンリン酸化部位の同定	23
(a) はじめに	23
(b) 実験材料と実験方法	26
(c) 実験結果	26
(d) 考察	28
III. 上皮細胞増殖因子受容体からの細胞内情報伝達における Shc の新たなチロシンリン酸化部位(239Y/240Y)の役割	32
(a) はじめに	32
(b) 実験材料と実験方法	32
(c) 実験結果	35
(d) 考察	38
IV. まとめ	46
第3章 A431 細胞の上皮細胞増殖因子による 細胞増殖抑制における細胞内情報伝達機構	48
I. A431 細胞の上皮細胞増殖因子(EGF)による細胞増殖抑制	48
(a) はじめに	48
(b) 実験材料と実験方法	49
(c) 実験結果	50
(d) 考察	51
II. A431 細胞の EGF による細胞増殖抑制における PI-3 kinase inhibitor および Protein kinase inhibitor の効果	55

(a)はじめに	55
(b)実験材料と実験方法	55
(c)実験結果	58
(d)考察	63
III. A431 細胞における EGF による細胞増殖抑制における	
conventional PKC inhivitor および PKCd inhibitor の効果	65
(a)はじめに	65
(b)実験材料と実験方法	68
(c)実験結果	68
(d)考察	73
IV. A431 細胞における EGF による細胞増殖抑制における	
ドミナントネガティブ Ras の効果	75
(a)はじめに	75
(b)実験材料と実験方法	75
(c)実験結果	76
(d)考察	78
V. まとめ	79
第4章 総括	82
参考文献	84
略語一覧	95
謝辞	96

第1章 序 論

I. 緒言

細胞は、増殖因子やサイトカインをはじめとする様々な細胞外因子により、その増殖、分化、あるいは死をも制御されている(1)。これらの細胞外情報を細胞内情報伝達系へ入力するスイッチとして機能している代表的な分子がチロシンキナーゼである(1,2)。チロシンキナーゼは、タンパク質のチロシン残基を特異的にリン酸化する酵素であり、受容体型および非受容体型に分類され、その大部分は細胞膜あるいは細胞膜直下に存在する。チロシンキナーゼは、細胞外リガンドにより活性化されると、チロシンキナーゼ自身あるいはその近傍に存在するタンパク質をリン酸化することにより、細胞内への情報伝達を開始する。チロシンリン酸化されたタンパク質は、細胞内タンパク質群の細胞膜におけるドッキングサイトとして機能する (3,4)。チロシンリン酸化部位へ集合し活性化される分子には様々な酵素や転写因子がある。そのほかに他の機能分子との結合を仲介するアダプター分子群が存在し、多様な機能発現に一役かっている。

上皮細胞増殖因子(EGF)は、1960年代より長年研究されてきた増殖因子であり、生物活性としては上皮細胞や繊維芽細胞をはじめとするさまざまな細胞を増殖させるということが一般的である。また細胞骨格系に働いて、その形態変化や運動能を高めるということも知られている。1984年その受容体(EGFR)が発見され、分子内にチロシンキナーゼ活性をもつ受容体であることがわかった(5)。その後いくつかの受容体型チロシンキナーゼが同定されてきたが、それらはサブファミリーごとに共通の構造的特徴をもっている(図1)。こうした構造の違いは主として細胞外のリガンド結合領域に見られるもので、細胞内領域には共通して保存されたチロシンキナーゼ領域が存在する。したがって、これらの受容体からの細胞内情報伝達経路には共通性がみられる。こうした情報伝達機構の解析により、細胞の癌化や細胞の生理機能に受容体型チロシンキナーゼシグナルが深く関与していることが明らかにされてきた。

発現する細胞種や下流シグナリング分子の発現程度により違った生理機能を持ち、個々の細胞が各々の個性を持ちながら恒常的な組織を形づくりを維持していく上で重要な役割を果たしているものと思われる。細胞の癌化に参与している例は、ヒト EGFR がニワトリ赤芽球ウイルスである v-erbB 癌遺伝子産物の相関性が示されて以来数多く報告されている(5-7)。われわれの研究室においても、ヒト脳腫瘍において EGFR 遺伝子が再構成をともない増幅している例を見出した(8,9)。

EGFR は、ErbB2、ErbB3、ErbB4 とともにファミリーを形成している(図 2)。EGFR のリガンドは、これまでに EGF 他、TGF α 、amphiregulin、HB-EGF、BTC が知られている。ErbB2 のリガンドは不明であるが、ErbB3、ErbB4 のリガンドは NDF(neuron differentiation factor)であることが報告されている。ErbB2 は ErbB3、ErbB4 とヘテロ二量体を形成し、情報伝達を促進する作用があると考えられている。EGFR ファミリーは、上皮だけではなく血球細胞を除くさまざまな組織に、発生の段階から成体まで広く発現が認められ、これらの細胞のリガンド依存性の増殖シグナル伝達にかかわっている。

EGFR は、リガンドと結合すると、コンフォメーションを変化させ、2つの分子が会合し、二量体(dimer) を形成することにより活性化する(図 3)。活性化したチロシンキナーゼは、自己のいくつかのチロシン残基をリン酸化するとともに細胞内の基質をリン酸化する(1)。自己リン酸化した EGFR は、そのチロシンリン酸化部位を特異的に認識する SH2 (Src homology 2) ドメインをもつ情報伝達分子(図 4)と結合し、それらの分子をチロシンリン酸化したり、コンフォメーションの変化をもたらしたり、また細胞膜近くにもってくることにより、細胞膜上の分子との相互作用の頻度を増すなどして情報を伝達する。これらが酵素活性をもっていればそれを上昇させ、チロシンリン酸化部位をもっていればつぎにそこに結合する分子へ情報を伝えることができる(図 3)。

EGFR の自己リン酸化部位は、キナーゼドメインより C 末端側にあり、強いリン酸化のおこる部位が 3 つ(チロシン[Y]1068, Y1148, Y1173)、弱いリン酸

化部位が 2 つ(Y992, Y1086) があることが報告されている(10-12)(図 2)。Y1068 は Grb2 の SH2 ドメインと、Y1148 は Shc の PTB(phosphotyrosine binding)/PI(phosphotyrosine interaction)ドメインと、Y1173 は Shc の SH2 ドメインおよび PLC- γ の SH2 ドメイン、Y992 は PLC- γ の SH2 ドメイン(in vivo でははつきりしない)、Y1086 は Stat1/3 の SH2 ドメインが結合することが明らかとなっている。他に自己リン酸化した EGFR と結合する分子は Jak1、Cbl、Nck、Crk、Syp2、Gab1 などが知られており、明らかな結合はみられないがチロシンリン酸化される分子には GAP/p190/p62 複合体があることが報告されている。

さらに EGFR により活性化した分子が次々と細胞内の情報伝達分子と相互作用し情報伝達経路が流れる。これまでの多くの知見からどのような情報伝達経路が起こっているのかについての大枠は明らかとなってきている。

EGFR からの情報伝達経路は、他の系における情報伝達経路と共通部分が多い。こうした経路がそれぞれの系において生物学的意義や生理機能の発現にどのような影響を与えているかについての詳細はいまだ明らかではない。これは、それぞれの経路におけるクロストークがあり複雑なネットワークの結果として表われると考えられているからである。

したがってこのような細胞内情報伝達に関与する分子の分子間の相互作用を明らかにするとともに、それらの生理機能に果たす役割についての検討が重要と考えられる。またこうした研究は結果としてさまざまな病気の解明そして将来的には薬剤や治療法の開発につながっていくものと考えられる。

II. 実験の目的および概要

こうした背景のもと、私は EGFR からの細胞内情報伝達について以下の 2 点より解析した。

一つは、細胞内情報伝達のかなめに存在するアダプタータンパク質 Shc に注目し、Shc を介する情報伝達経路の全貌を明らかにすることを目的とし、細胞レベルで詳細な検討を行った。Shc は、EGF 刺激依存的に 317 番目チロシン残

基(Y)がリン酸化され、そこで Grb2 と結合し Grb2-Sos と複合体を形成、繊維芽細胞の増殖に重要な Ras を活性化する。そこで Y317 をフェニルアラニン残基(F)に置換した変異体を作成して、EGF 刺激依存的なリン酸化反応をみたところ Shc のリン酸化はまだ残っていた。そこで新たなリン酸化部位の検討を行い、その結果新しいリン酸化部位 Y239/Y240 を同定した。この部位および Y317 を組み合わせてフェニルアラニン残基に置換した変異体を作成し、Shc を介する経路が特異的に活性化する自己リン酸化部位を欠失した変異型 EGFR 発現細胞に導入した。EGF による増殖は、Y317F Shc、Y239/240F Shc の発現で顕著に抑制された。このとき wild type Shc と Y239/240F Shc 発現細胞では、Shc は Grb2 と結合し MAPK(mitogen-activated protein kinase)の活性化をおこした。しかし Y317F Shc 発現細胞では、それが認められなかった。さらに EGFR 発現細胞にも Shc 変異体を発現させたところ、Y239/240/317F Shc 発現細胞で EGF による増殖が顕著に抑制された。これらの結果から、Shc-Grb2 複合体から Ras を介する経路以外の新しい経路が Shc の Y239、Y240 から発せられ、EGF による増殖に重要であることが示唆された。

もう一つは、EGFR を高発現した細胞株 A431 細胞における EGF による増殖抑制機構について検討した。

A431 細胞は、EGFR を高発現した上皮系の細胞株で、高濃度の EGF 刺激により細胞の増殖が抑制され、EGF によるサイクリン依存性キナーゼインヒビター p21(WAF1/Cip1)の誘導発現が主に関与していることが知られている。しかし、EGFR から p21(WAF1/Cip1)の誘導発現に至る情報伝達についてはほとんどわかっていない。そこでいくつかのシグナル分子特異的阻害剤を用いて、A431 細胞の EGF による増殖抑制における情報伝達機構について検討した。その結果、EGF による p21(WAF1/Cip1)の誘導発現および増殖抑制は、PKC、とくに PKC δ が重要な役割をはたしていることが示唆された。さらに A431 細胞にドミナントネガティブ Ras 変異体を発現させたところ、EGF 依存的な MAPK の活性化は抑制されたが、p21(WAF1/Cip1)の誘導発現はほとんど抑制

されなかった。したがって、PKC の下流に MAPK 非依存性の経路があり、それが A431 細胞における EGF による p21(WAF1/Cip1)の誘導発現および増殖抑制に関与していると考えられた。

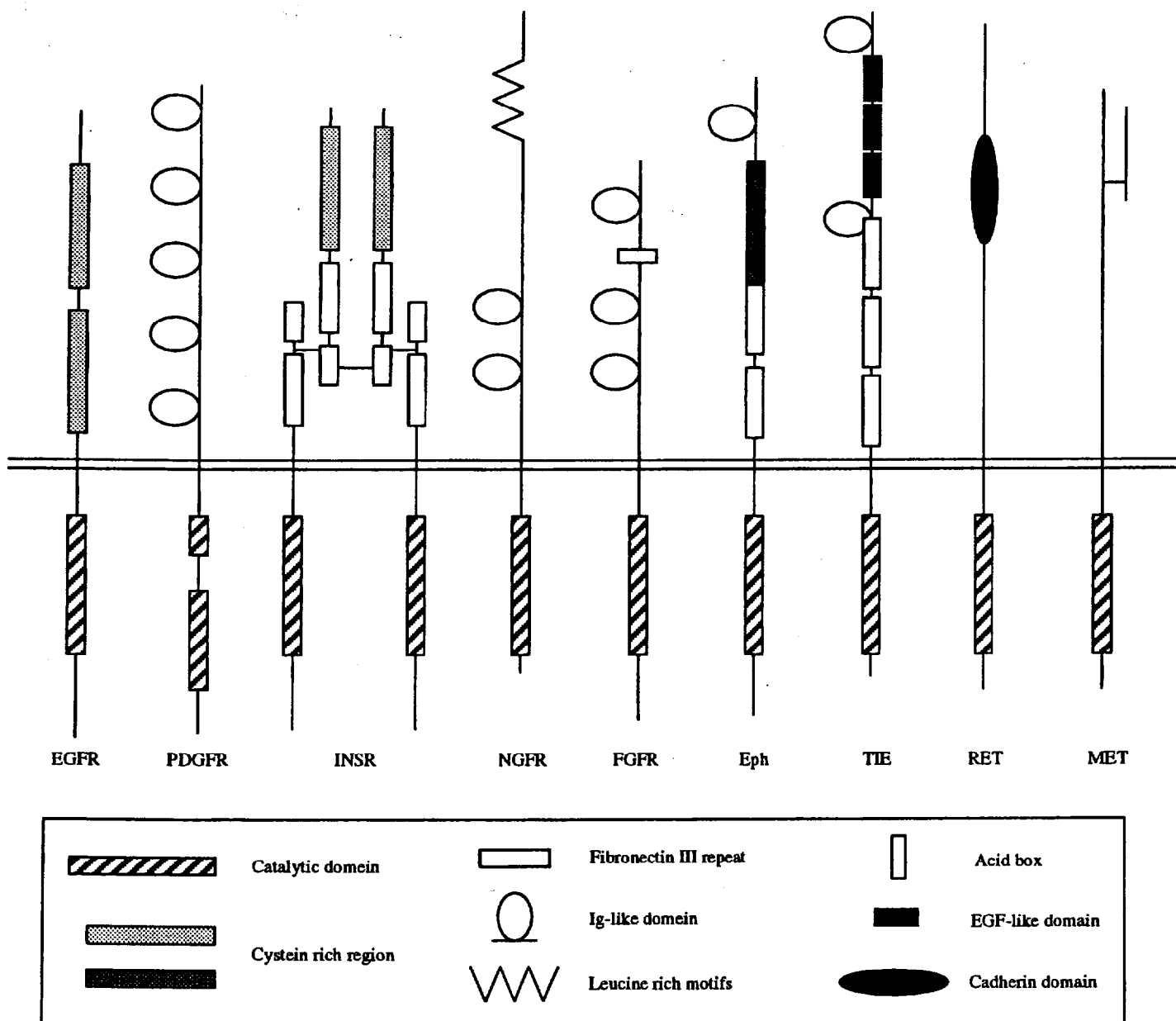


図 1 受容体チロシンキナーゼの構造

代表的な受容体チロシンキナーゼの構造を示した。EGFR, epidermal growth factor receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; INSR, insulin receptor; NGFR, nerve growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor
参考文献 (van der Geer *et al.*, 1994) の図を改変

A. Receptors

Ligands

EGFR — EGF, TGF α , amphiregulin,
HB-EGF, betacellulin, epiregulin

ErbB2 — ? ?

ErbB3 — NDF

ErbB4 — NDF, amphiregulin, HB-EGF

B.

Ligand binding domain

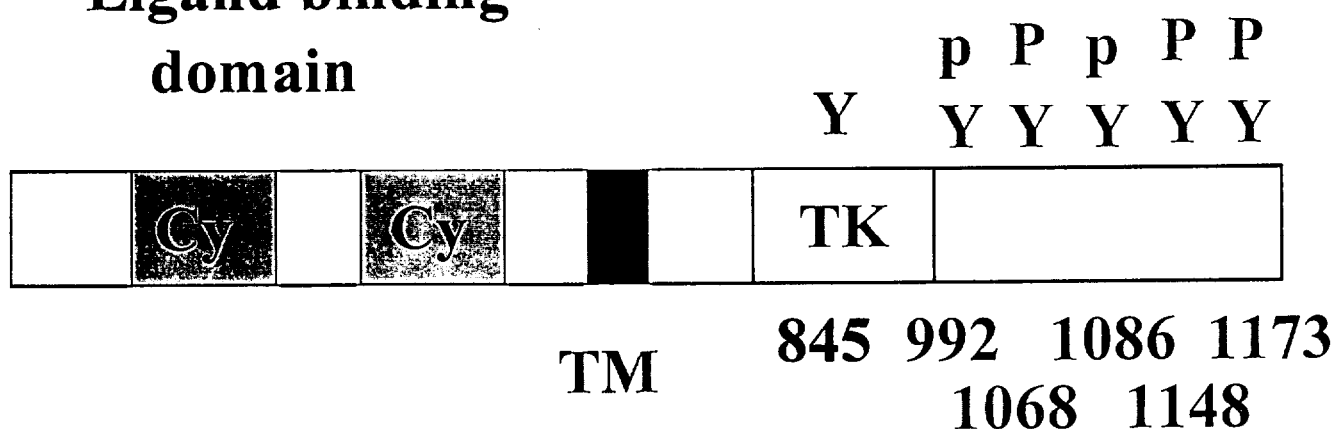


図2 EGFRファミリーとヒトEGFRの構造

A. EGFRファミリーとそのリガンド.

B. ヒトEGFRの構造と自己リン酸化チロシン部位. Cy, システインに富む領域; TM, 膜貫通ドメイン; TK, チロシンキナーゼドメイン. 赤字は強くリン酸化される部位. Y845はSrcのY416に相当する部位

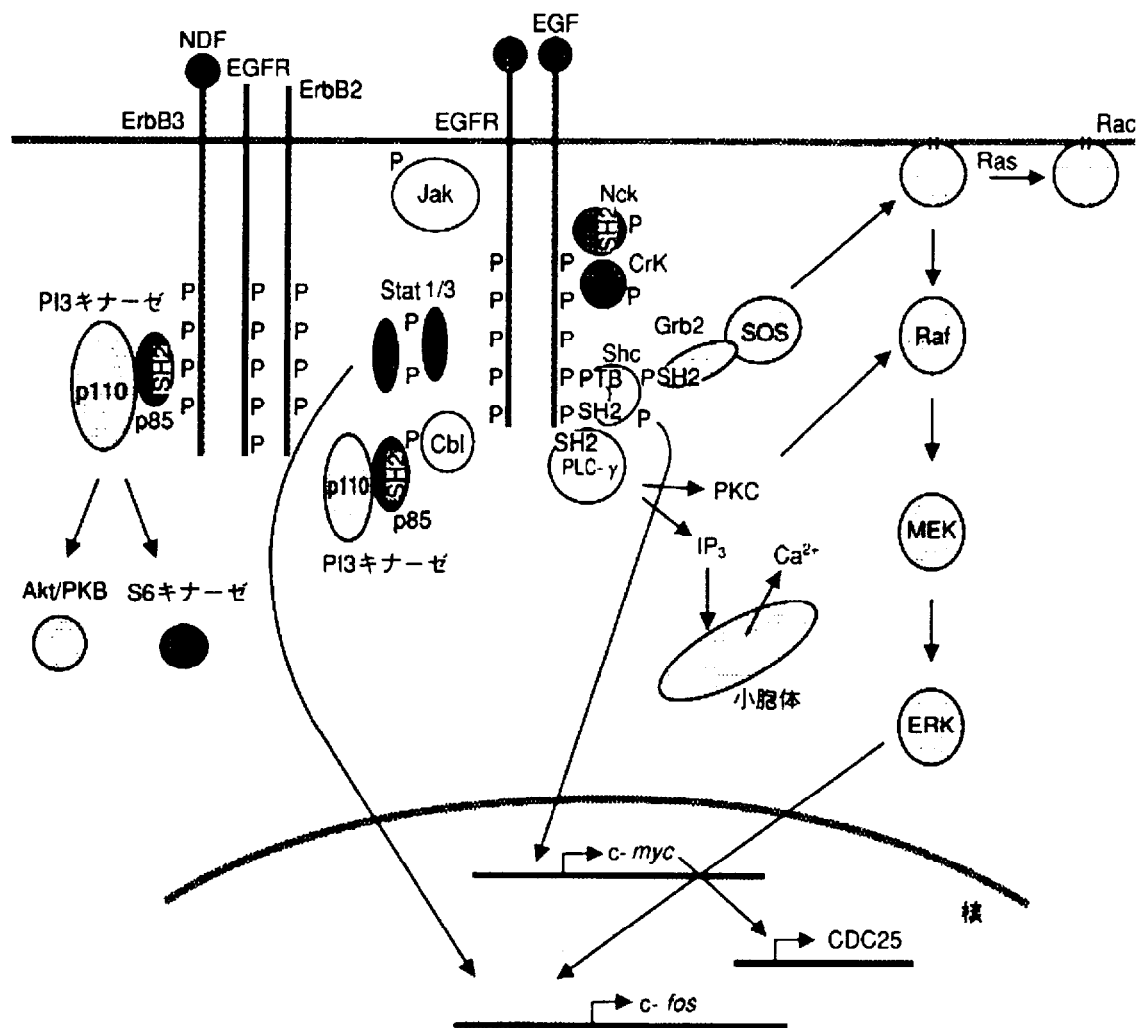


図3 EGFRからの細胞内情報伝達

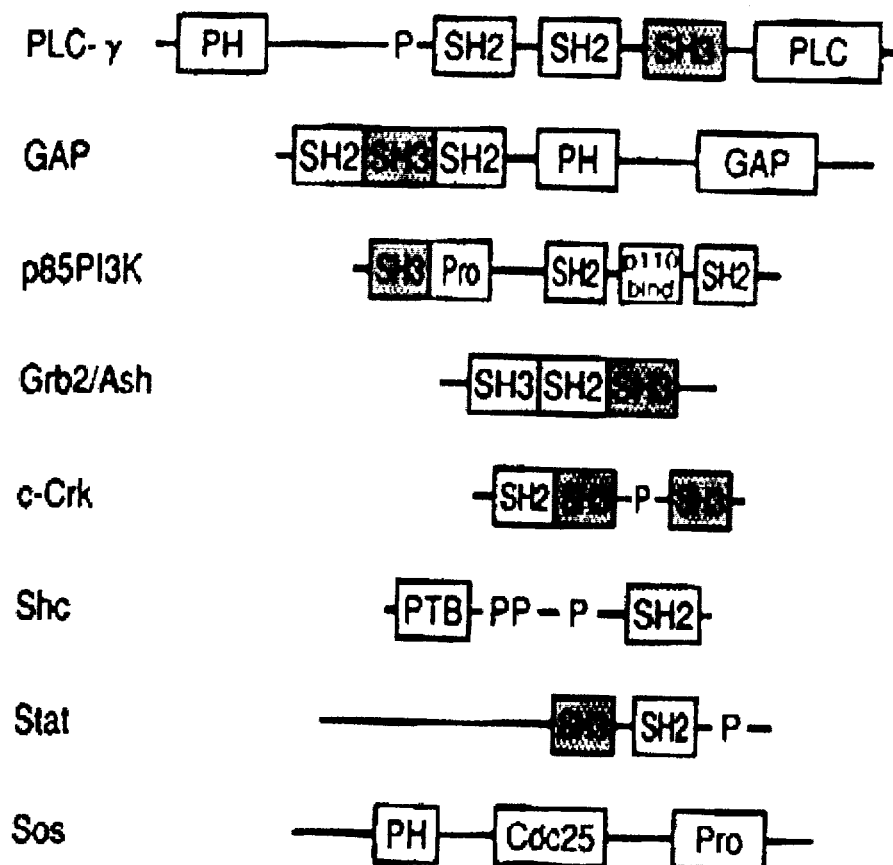


図4 SH2およびSH3を有する情報伝達分子
PH, plekstorin motif ; Pro, prorin rich domain

第2章 上皮細胞増殖因子受容体からの細胞内情報伝達における Shc の役割

I. 上皮細胞増殖因子による Shc のチロシンリン酸化と 317 番目チロシン残基

(a)はじめに

1989 年から 90 年にかけていくつかのシグナル伝達分子のなかに Src ファミリーチロシンキナーゼと相同性のある領域をもっていることが解明され、この領域を SH2、SH3 ドメインと呼ぶようになった。そしてこのような分子は、分子内の SH2 ドメインを介して自己リン酸化した上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)などのリン酸化チロシン残基に結合し、シグナルを送ることがわかり、SH2 ドメインの重要性が強く認識された。

1992 年 Pelicci らは、ヒト c-fes の SH2 ドメインをプローブとして用いてバーキットリンパ腫由来の cDNA ライブラリーよりスクリーニングして、SH2 ドメインをもつ新しい遺伝子を単離し *shc* (src homology and collagen)と名づけた(13)。

ヒト *shc* 遺伝子は、第1染色体長腕 1q21 に存在する。ゲノム遺伝子は 13 個のエクソンからなる。第1エクソンはタンパク質をコードせず、第2エクソン内に3つの ATG がありスプライシングの違いによって最初のメチオニンの違う分子量の異なる3種のタンパク質ができる(66kD, 52kD, 46kD)。shc 遺伝子はファミリーを成しており、現在マウスとヒトより *shcB/sck*, *shcC/N-shc* が同定されている(14,15)。またショウジョウバエにもホモログが見つかる(*dshc*)(16)。

Shc 52kD と 46kD は、N 端に PTB ドメイン(140 アミノ酸)、C 端に SH2 ドメイン(90 アミノ酸)をもっている(13,17,18)(図 5)。その間の領域は、 $\alpha 1$ コラーゲンにホモロジーがあり(50%)、グリシン(10.3%)、プロリン(20%)に富んでおり、CH (collagen homology) 1 領域と呼ばれている。Shc 66kD は、PTB ドメインより N 端にもう一つ、 $\alpha 1$ コラーゲンにホモロジーのある領域(20%ホモロジー、105 アミノ酸)をもち、これは CH2 領域と呼ばれている。

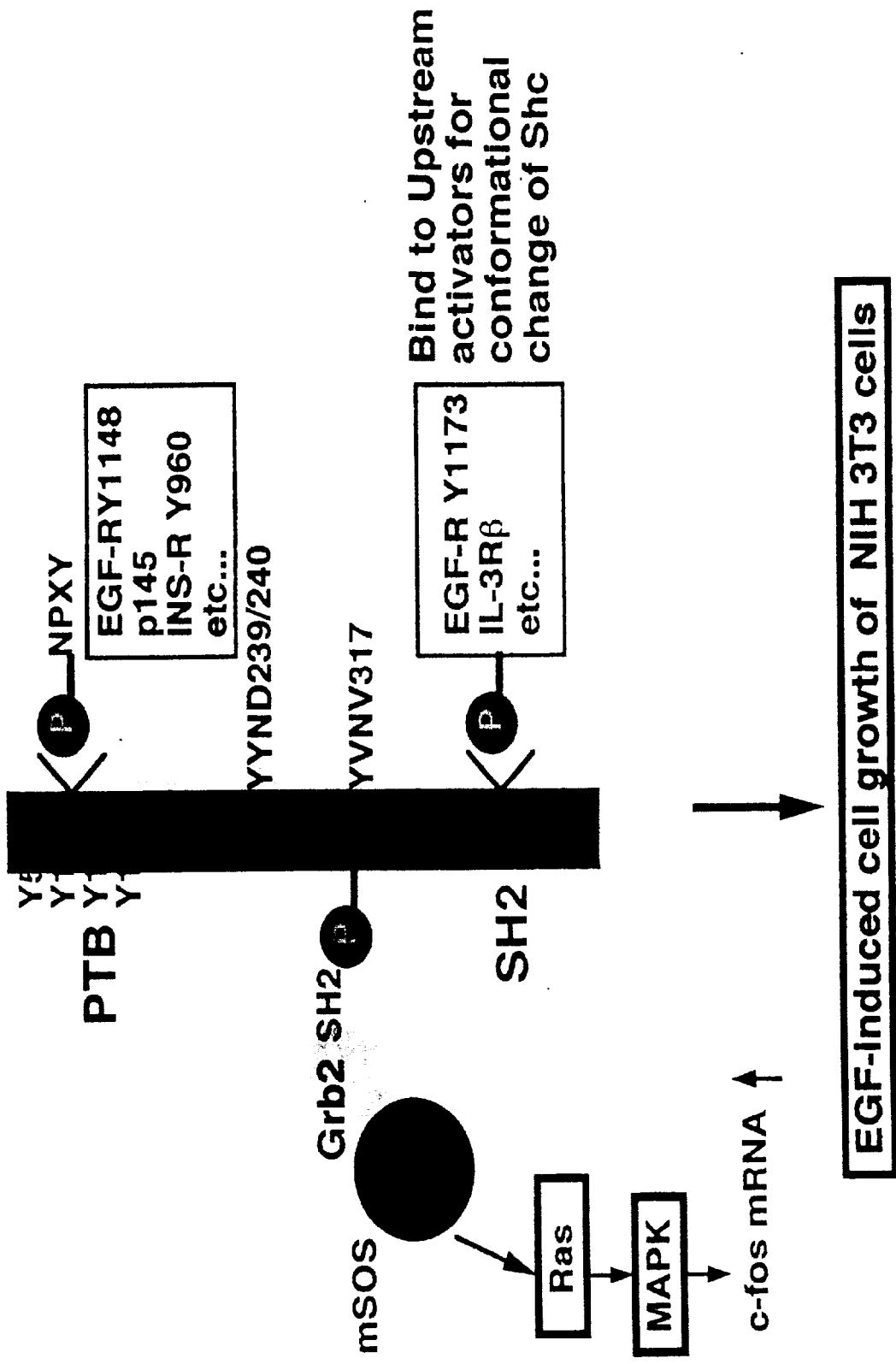


図5 Shcの構造とEGFRからの細胞内情報伝達

Shc 52kD と 46kD は、ほとんどすべての組織に発現しているが、中枢神経系での発現は少ない。Shc 66kD は、血液細胞など一部の細胞には発現していない。一方 ShcB/Sck と ShcC/N-Shc は、主に中枢神経系で発現している。

Shc は、分子内に酵素活性をもたないアダプター分子であり、分子内の SH2 ドメインや PTB/PI ドメインを介して、チロシンリン酸化したさまざまな受容体に結合することによりコンフォメーションの変化をおこし、チロシンリン酸化される(18-20)。EGFR がリン酸化し活性化されると、Shc は CH1 領域にチロシンリン酸化を受ける。その主なリン酸化部位は、317 番目のチロシン残基と考えられてきた。ここがリン酸化を受けると、pYXNX という、SH2 ドメインをもつもうひとつのアダプター分子 Grb2 の結合モチーフとなる。Grb2 は、Ras の GDP/GTP 交換因子タンパク質である mSOS と結合している(21-25)。リン酸化した Shc は、317 番目のチロシン残基を介して Grb2 の SH2 ドメインと結合し、Shc/Grb2/mSOS の複合体を形成する(26)。これが Ras の活性化を引き起こし、さらに下流の MAPK の活性化、核内転写因子である *c-fos* などの活性化を導く(図 3, 5) (27-32)。

このように Shc は Ras の活性化に関与し(19,33,34-38)、その Ras の活性化は、増殖因子刺激に対し非常に早く、繊維芽細胞の増殖に重要であると考えられている(39-42)。

当研究部では、これまでに EGFR からの細胞増殖シグナル伝達機構について研究してきた(19,33)。EGF 刺激によりリン酸化した EGFR は、細胞内においてさまざまなタンパク質と相互作用して情報を伝達する。こうした情報伝達分子との相互作用について、受容体の変異体を作製して各々の情報伝達としての役割について検討した。その中で、自己リン酸化部位を欠失した EGFR 変異体を発現した細胞株において、受容体の自己リン酸化は使わずにアダプター分子 Shc の 317 番目のチロシン残基がリン酸化し、Grb2 と結合する Shc-Grb2-Sos-Ras という経路が特異的に起こっていることを見い出した(33)。さらにこの変異株においても、EGF 刺激による細胞の増殖およびトランスフォー

メーションがおこることも確認した。このことは、EGFR からの細胞内情報伝達において Shc が重要であり、Shc からの Ras 活性化経路が EGF による増殖刺激に重要であることを示唆するものであった(33)。こうした経路はサイトカイン受容体や G タンパク質関連受容体などにおいても、重要な役割を担っていることが報告された(43)。さらに Shc が細胞接着からのシグナル伝達や細胞骨格分子との相互作用を示唆する報告があった(44)。

Shc は、317 番目のチロシン残基のリン酸化を介した Ras 経路の活性化が重要であった。そこで本研究では、このチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した Shc 変異体を作製し、これまでの実験系である NIH3T3 細胞に導入し、EGFR からの情報伝達の解析および生理機能との相関について Shc の果たす役割について詳細に検討した。

(b)実験材料と実験方法

1.実験材料

1-1. 試薬および抗体

EGF は、TOYOBO より購入した。ハイグロマイシンは、和光純薬工業より購入した。抗リン酸化チロシン抗体(PY20)は ICN 社、抗 EGFR 抗体(6F1)は医学生物学研究所、抗 EGFR 抗体(EGF-R1)は Amersham 社より各々購入した。免疫沈降に用いた抗 Shc 抗体は、UBI より購入した。ウエスタンブロットに用いた抗 Shc 抗体は、Transduction Laboratories 社より購入した。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は Amersham 社より購入した。

1-2. 細胞および細胞培養

EGFR を高発現させた NIH3T3 細胞(ER 細胞)は、東大医科研細胞遺伝学研究部にて確立した細胞株である(33)。細胞は、5%ウシ新生仔血清(NBCS)を含む Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) を使用して、37℃、CO₂ 5%条件下継代培養した。

1-3. プラスミド

GST 融合タンパク質発現用ベクターpGEX-2T は Promega 社より購入した。哺乳類細胞発現用ベクターとして SR α のプロモーターを持ち、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む pKU-Hyg を使用した。

2. 実験方法

2-1. Shc 変異体 cDNA の作製

Shc 変異体の作製は、PCR 法により作製した。Shc の 317 番目のチロシン残基(Y)のフェニルアラニン残基(F)への置換には、5'-CCCTCCTTTGTCAA CGTCCAGAACCTA-3' / 5'-GACGTTGACAAAGGAGGGATCATCAAAAA-3'をそれぞれプライマーとして変異を導入した。PCR より得られた断片を、pBluscript-WT-Shc(Xho I /EcoR I)と入れ替えた。これを、BamH I /EcoR I および Xho I /Xba I 断片で切り出し、pGEX-2T または pKU-Hyg へ組み込んだ。

2-2. In vitro kinase assay

ER 細胞を氷冷した lysis buffer (50mM Hepes [pH7.4], 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 10% glycerol, 0.5% Nonidet P-40, 10 μ g/ml aprotinin) にて可溶化後、EGF 1 μ g/ml を 25 $^{\circ}$ C、30 分インキュベートした。これを、あらかじめプロテイン G セファロースビーズを結合させた抗 EGFR 抗体(EGF-R1)とともに、4 $^{\circ}$ C にて 2 時間混和した。ビーズを wash buffer で洗浄後、精製した glutathione S-transferase(GST)-Shc および Shc 変異体 2 μ g と、phosphorylation buffer(20mM Hepes [pH7.5], 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 10% glycerol, 0.1% Nonidet P-40) 30 μ l に混和し、3 μ M ATP 10 μ Ci [γ -³²P]ATP を添加し、30 $^{\circ}$ C、30 分リン酸化反応を行った。反応終了後 sample buffer を加え煮沸後、SDS-PAGE にて分離し、ウエスタンブロット法にて解析した。

2-3. トランスフェクション

細胞を 6cm プレート約 80%飽和状態まで培養し、リン酸カルシウム法にて、各 Shc 変異体を導入した。トランスフェクション後 48 時間に、ハイグロマイシンを、ER 細胞の場合は 200 μ g/ml、mER 細胞の場合は 50 μ g/ml になるよう添加し約 2 週間培養した。この間 3 日おきに培養液を交換した。薬剤耐性細胞が出現した段階で、各変異体につきおよそ 20 個のクローンを拾い、ウエスタンブロットにて Shc の発現を確認した。

2-4. ウエスタンブロット

細胞を 6cm プレート約 80%飽和状態まで培養し、0.5%NBCS 含有 DMEM にて一晩飢餓状態とし、EGF100ng/ml にて 5 分刺激した。細胞は、PBS にて洗浄後、lysis buffer (50mM Hepes [pH7.4], 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1% TrionX100, 10% glycerol, 100mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 10mM Na₄P₂O₇, 1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin and 10 μ g/ml aprotinin)で可溶化し、微量高速遠心機で 15000rpm、10 分間遠心し、その上清を実験に使用した。上清中のタンパク質量は、Bio-Rad protein assay kit (Bio Rad 社) にて定量した。10 または 20 μ g サンプルに 1/4 量の 5x sample buffer(300mM Tris-HCl [pH6.8], 10% SDS, 50% glycerol, 500mM DTT, 0.1%BPB) を加え煮沸後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)にて分離した。泳動後タンパク質を nitrocellulose membrane へトランスファーし、これを 5%BSA を含む rinse buffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% TritonX100, 1mM Na₄P₂O₇) に 4℃で一晩浸した後、各種抗体と室温で 2 時間反応させた。rinse buffer で数回洗浄後、抗マウスまたは抗ウサギペルオキシダーゼ標識二次抗体と室温で 1 時間反応させた。wash buffer(10mM Tris-HCl, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% TritonX100, 1mM Na₄P₂O₇)にて洗浄後、ECL 試薬 (Amersham 社) を使用し、二次抗体を発光させ、フィルムに感光させた。

2-5. 免疫沈降

プロテイン A または G セファロースビーズに、使用する抗体を結合させる。つぎに、このビーズと、上記方法にて調製した細胞可溶液を、4℃にて 2 時間混和した。ビーズを wash buffer で洗浄後 sample buffer を加え煮沸後、SDS-PAGE にて分離し、ウエスタンブロット法にて解析した。

2-6. 増殖曲線

WT Shc または Y317F Shc を発現した ER 細胞を、3.5cm プレートに 2×10^4 個まき、翌日 0.5%NBCS/DMEM 培地に交換後 EGF 1ng/ml にて刺激した。刺激後 3 日および 5 日目に培地交換を行い、EGF を添加した。最初の EGF 刺激 3 日後、5 日後、7 日後に、トリプシン処理し細胞を剥がし、集積しチュルク計数板にて細胞数を数えた。

(c)実験結果

1. In vitro kinase assay

Shc は、Ras 経路の活性化に重要な役割を果たしてしていることから、そのリン酸化について検討した。EGFR を高発現した NIH3T3 細胞(ER 細胞)から EGFR を免疫沈降し、GST と融合させた Wild type(WT) Shc を基質として EGF 刺激による in vitro kinase assay を行った。その結果を図 6 に示した。

EGFR と Shc は、EGF 刺激依存的に強くリン酸化をうけた。このときの Shc のリン酸化部位はチロシン残基特異的であった。

そこで Shc の主要なリン酸化部位であり Ras 活性化経路に重要とされる Y317 をフェニルアラニン残基に置換させた変異体の GST との融合タンパク質を基質として EGF 刺激による in vitro kinase assay を行った。その結果を図 7A に示した。

Y317F Shc 変異体を基質としたとき、EGFR のリン酸化は WT Shc を基質としたときと比べほとんど変化は認められなかった。また Shc のリン酸化につい

ては、WT Shc よりリン酸化の程度は低いもののまだ十分リン酸化を受けていることが明らかとなった。

2.Y317F Shc 変異体発現細胞の樹立

in vitro において、317Y 以外に Shc にリン酸化部位がある可能性が明らかとなった。そこで実際 in vivo において同様なことがおこっているかどうかを確認するために、WT Shc および Y317F Shc を ER 細胞に発現させ、EGF 刺激依存的なリン酸化について検討することとした。

WT Shc および Y317F Shc cDNA を組み込んだハイグロマイシン耐性遺伝子を含むベクターpKU-Hyg を用いて、ER 細胞にリン酸カルシウム法にて導入した。ハイグロマイシンで細胞を選択し、耐性株について Shc の発現を調べた。

その結果それぞれ約 20 クローン拾い、このうち 3 から 4 クローンの高発現株を得た。これらの細胞の Shc の発現量は、ウエスタンブロットの解析結果から判断すると内在性 Shc の 10 倍以上認められた(図 8)。

3.in vivo における Shc のチロシンリン酸化

WT Shc および Y317F Shc を高発現した細胞株を用い、EGF 刺激依存的な Shc のチロシンリン酸化について検討した。

EGF 50ng/ml 5 分刺激後の細胞可溶化液を抗 Shc 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE で泳動後、抗リン酸化チロシン抗体でブロットした。その結果を図 7B に示した。

WT Shc 発現細胞では、EGF 刺激依存的な Shc のチロシンリン酸化が強く認められた。また Y317F Shc 発現細胞においても、リン酸化の程度はやや低いものの、EGF 刺激依存的なチロシンリン酸化は十分認められた。

この結果は、in vitro の結果をそのまま反映したものであった。

4.増殖曲線

Shc の 317Y のリン酸化は、Ras 経路の活性化をおこし、細胞の増殖に重要といわれている。そこで WT Shc および Y317F Shc 発現細胞における EGF による増殖活性について、EGF 刺激後の細胞数の変化を追うことで検討した。

その結果を図 9 に示した。

0.5% 血清条件下においては、WT Shc および Y317F Shc 発現細胞はいずれも細胞数の変化はほとんど認められなかった。一方 EGF 10ng/ml 刺激を加えると、刺激依存的な増殖活性を示し細胞数の増加を認めた。しかし WT Shc と Y317F Shc 発現細胞で、細胞数の変化における違いはほとんど認められなかった。

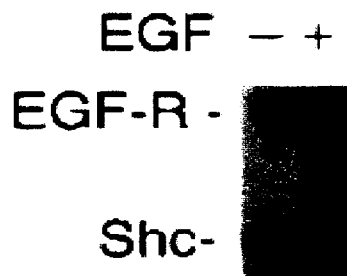
(d)考察

Shc はこれまで Ras 経路の活性化を引き起こし細胞の増殖に重要な役割を果たしていることがわかっている。そこで Shc の Ras 経路への橋渡しをしている 317 番目のチロシン残基(317Y)をフェニルアラニン残基に置換した変異体(Y317F Shc)を過剰発現させると、EGF による細胞増殖にドミナントネガティブに働くと考えられた。実際これまで Y317F Shc を過剰発現させ、それがドミナントネガティブとして働きうることが G-CSF や HGF の刺激による細胞増殖において報告されている(45,46)。また、後藤らは Shc の SH2 ドメインが EGF 依存的細胞増殖にドミナントネガティブとして働くことを示している(19)。

Ras 経路には 317Y の Shc のリン酸化が必須であることから、WT Shc と Y317F Shc の EGF 依存的リン酸化を *in vitro* および *in vivo* で検討した。結果は予想に反して、いずれにおいてもリン酸化は十分認められた。また Y317F Shc 発現細胞において EGF 依存的増殖活性も十分認められた。これは Y317F Shc が EGF 刺激に対する細胞増殖においてドミナントネガティブとして働いていないことを示すものである。

したがって今回の結果は、EGF 刺激における細胞増殖の系においては、Shc が 317Y とは異なる部位にリン酸化がおこり、そこから新たな情報伝達経路が働いていることを示唆するものと考えられた。

A



B

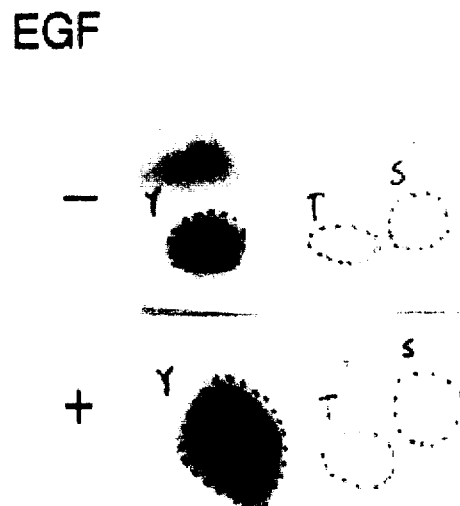


図6 in vitro でのEGF刺激によるShcのリン酸化

A. ShcのEGFRチロシナーゼによるリン酸化。

EGFR発現NIH3T3細胞の細胞可溶化液をEGF($1\mu\text{g/ml}$)ありなしで30℃、30分反応後、抗EGFR抗体で免疫沈降した。それに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とGST-Shcを加えて30℃、30分反応させ、SDS-PAGEにて泳動した。B. in vitro リン酸化Shcの2次元ホスホアミノ酸分析。Y, tyrosine; S, serine; T, threonine.

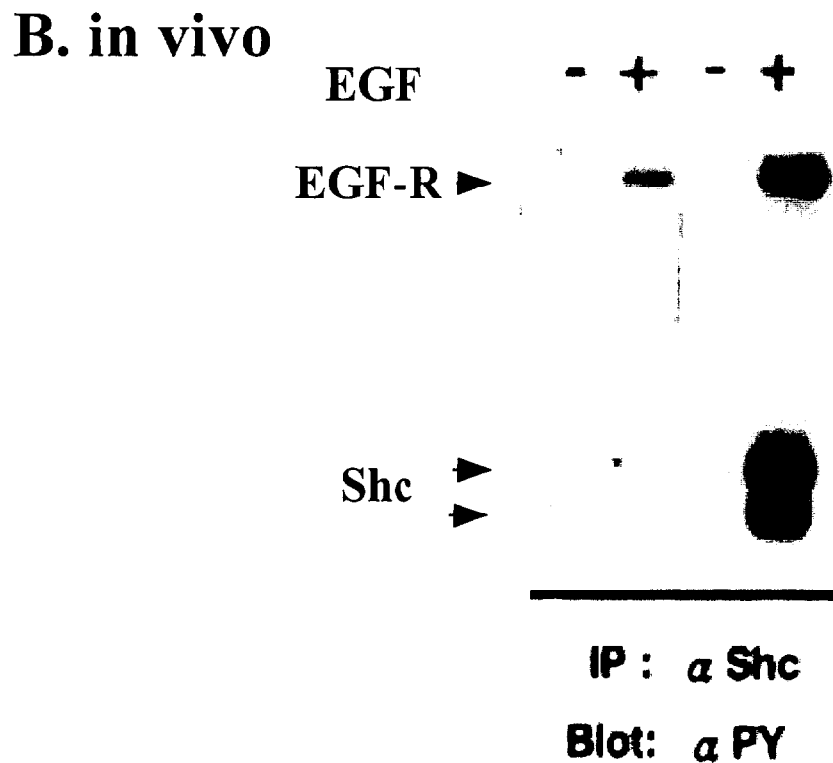
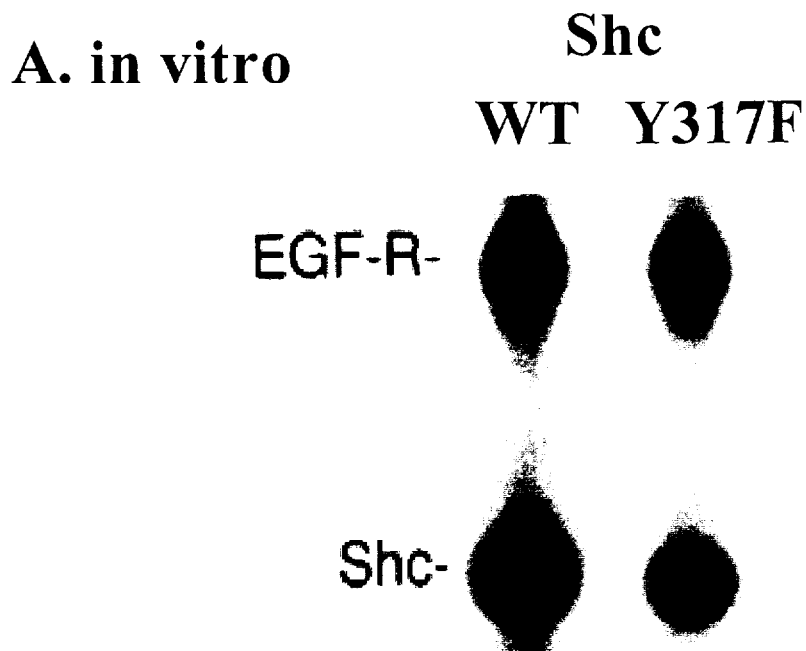


図7 EGF刺激によるWTおよびY317F Shcのリン酸化
A. EGFRチロシンキナーゼによるShcのin vitroリン酸化反応。
B. WTおよびY317F Shcを発現したEGFR発現NIH3T3細胞に、EGF 50ng/ml 5分刺激後のShcのチロシンリン酸化。細胞可溶化液を抗Shc抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体でプロットした。

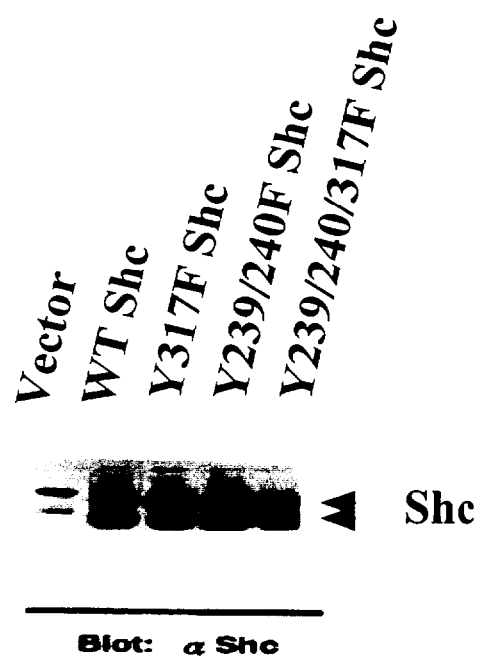


図8 EGFR発現NIH3T3(ER)細胞における各Shc変異体の発現
ER細胞にWTおよびY317F、Y239/240F、Y239/240/317F
Shc cDNAをトランスフェクションし、ハイグロマイシンに
より選択して得られた高発現細胞。

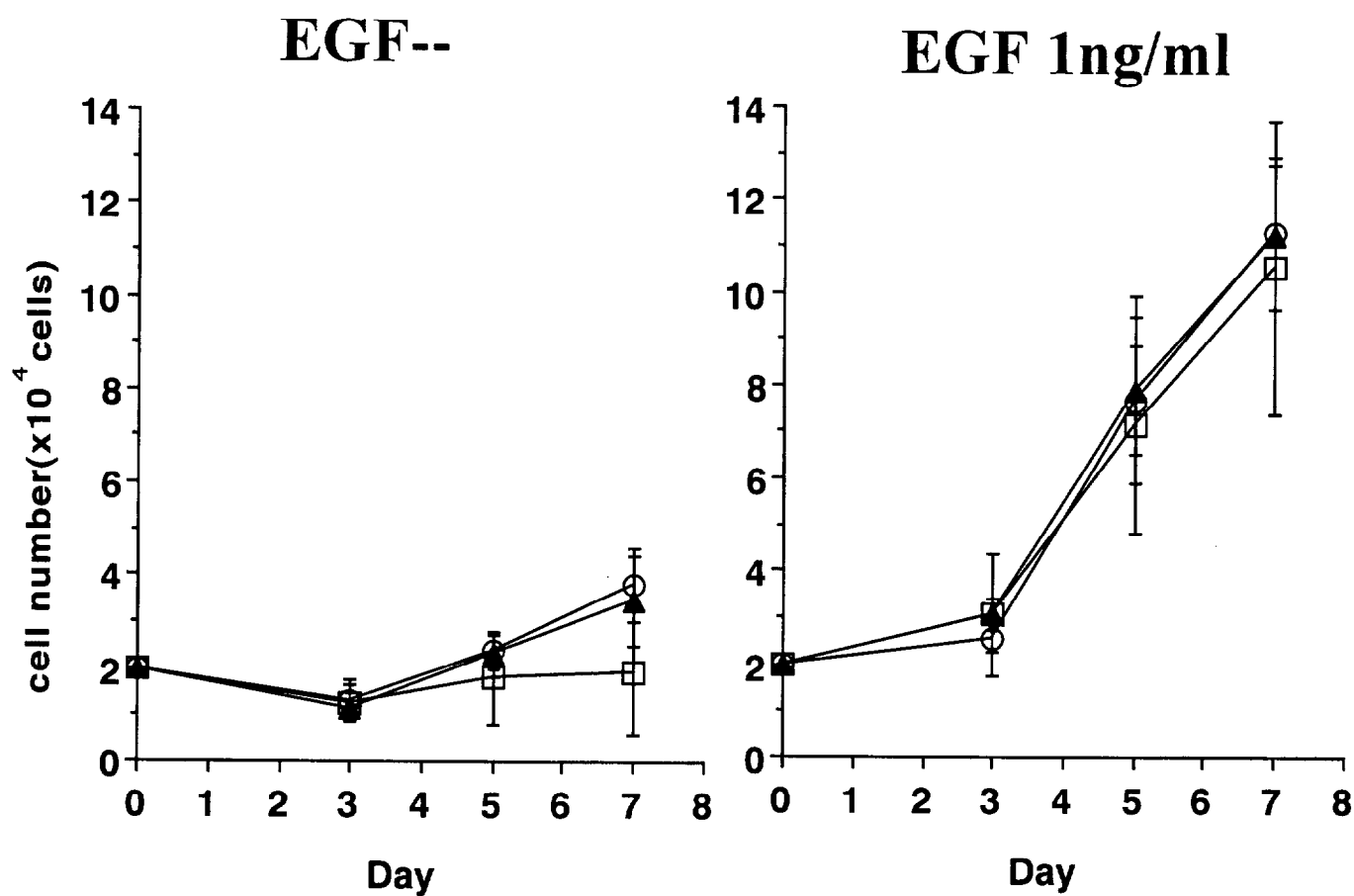


図9 EGF刺激による増殖曲線

WT(○)およびY317F(●) Shc発現ER細胞におけるEGF刺激後の細胞増殖曲線。□,vector control.

II. Shc の新たなチロシンリン酸化部位の同定

(a)はじめに

I 項で示したように、Shc の 317 番目のチロシン残基を変異させても EGF 依存的なチロシンリン酸化や生物学的活性に大きな影響は認められなかった。そこで Shc には 317 番目のチロシン残基のほかに新たなリン酸化部位、特にチロシン残基があり、生物学的な活性を持つような情報伝達系に働いているのではないかと考えられた。

そこで他のチロシンリン酸化部位の検索を行うこととした。Shc は、これまでにヒトのほかマウスおよびショウジョウバエでホモログとなるタンパク質がとられている(14-16)。これらのアミノ酸配列の相同性をみると、ヒト/マウス間で 96%、ヒト/ショウジョウバエ間で 46%であった(図 10)。このうち PTB ドメインおよび SH2 ドメインでは、ヒト/マウス間でそれぞれ 100%、98%、ヒト/ショウジョウバエ間で 51%、63%と比較的高い相同性を示している。一方、CH1 ドメインについては、相同性は低くおよそ 30%程度にとどまっている。しかしこれまでに知られている Shc の 317 番目のチロシン残基はこの CH1 ドメインにある。このことから Shc は情報伝達の上で上流にあるタンパク質とは PTB または SH2 ドメインと相互作用し、この CH1 ドメインを通して下流のタンパク質と相互作用し情報を伝えている可能性があると考えられた。そこでこの CH1 ドメインについて新たなチロシンリン酸化部位の検索を試みることにした。

ヒト Shc の 317 番目のチロシン残基は、マウスにおいて保存されているが、ショウジョウバエにおいては認められていない。さらにこのドメインのなかでチロシン残基を検索すると、239、240 番目に連続したチロシン残基がみられる。そしてこれに相同するチロシン残基は、マウスおよびショウジョウバエの Shc いずれにも保存されていることがわかった。さらにヒトの Shc ファミリー間においても、317Y の他 239/240Y に相当する残基が保存されていることが明らかとなった(15)(図 11)。

	p52	p46		
human	105	105	105	105
mouse	105	105	105	105
Drosophila	82	82	82	82
PTB				
human	210	210	210	210
mouse	210	210	210	210
Drosophila	183	183	183	183
human	313	313	313	313
mouse	309	309	309	309
Drosophila	270	270	270	270
human	418	418	418	418
mouse	414	414	414	414
Drosophila	341	341	341	341
SH2				
human	473	473	473	473
mouse	469	469	469	469
Drosophila	409	409	409	409

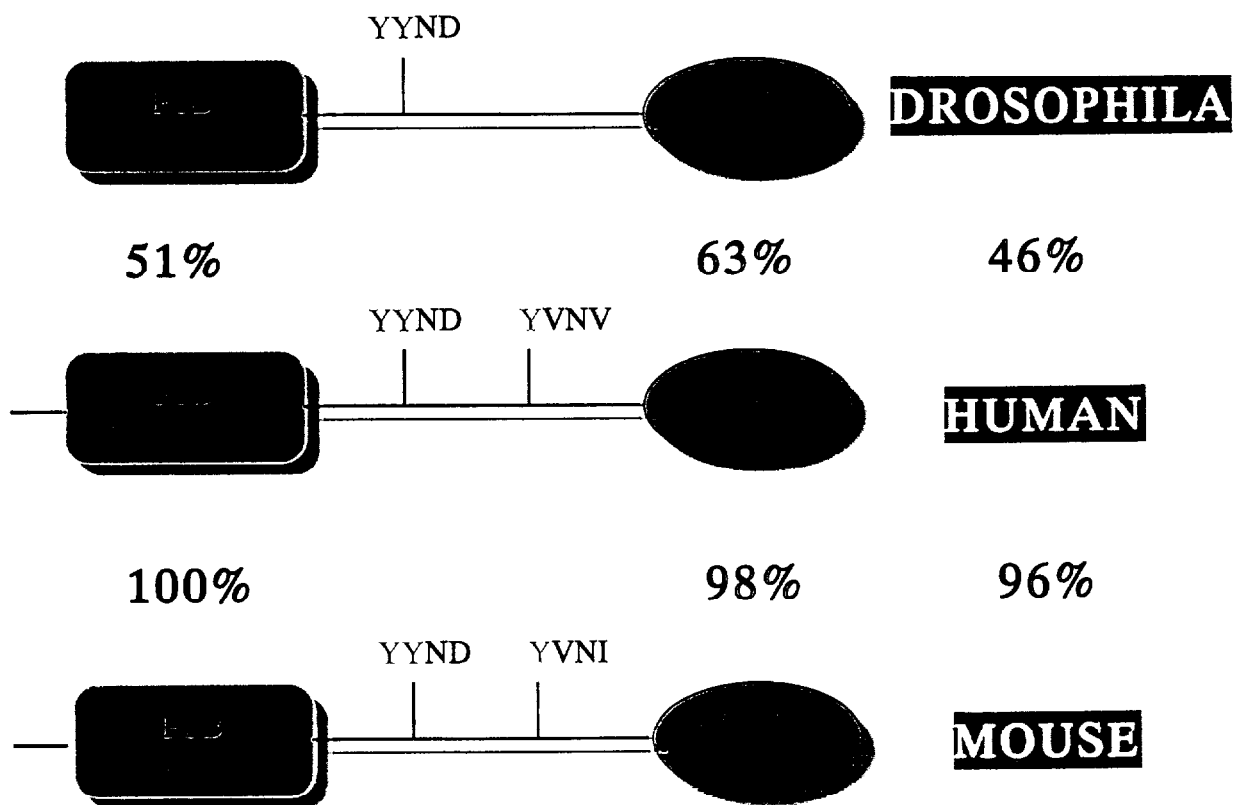


図10 ヒトとマウス、ショウジョウバエにおける Shcの構造とその相同性

N-Shc: M----- -SAARKGRPG DEPLPR---- ---PPRGAPN ASDQVLGPQV 33
 Shc : MNKLSGGGGR ATRVEGGQLG GHEWTRHGSF VNKPTRQWLH PNDKVMGGGV 50

 N-Shc: TVVKKLGGCI EVLRSMRSLD ESTTTOITRY AGRVCEAVP GAKGAFKRRK 83
 Shc : SKLVRYMGCV EYGOEMRALD ETRTOVTRH ASSLVCEAVP GAKGATRRRK 100

 N-Shc: PPSKMLSSIL QRENTQFAGN SSSLSISTAS EMLTPDSKQ GQANHEHME 133
 Shc : ECGRPLSSIL QRENTKFGN EITLTVSTSS EMLMAADCKQ PDANHEHMSY 150

 N-Shc: STAEQGDPT TDIVAVYAKN EYNNRACHYL ECDQGLAODV LGSIGQATFL 183
 Shc : STAEQGDPT AEIVAVYAKN EYNNRACHYL ECFEQLAODV ESTIGQATFL 200

 N-Shc: RFKQKLCQCT KIPALEDRNQ SLD-EPMTES EGDGSDHPYV NSIPSKMPPF 232
 Shc : RFKQYLRNPP KLVTPDRMA GFDGSANDEL EEPFPRHQYV NDFPGKEPPL 250

 N-Shc: GGFLDTTRKP RPHAVDTA-Q FAGKQDYTYQ GRRLGDTFGE DWQQTFLRQG 281
 Shc : GGVVDNRL-R EGAAFGAARP TAPNAQT--- FSHLGAE--L PVGQPVGGDP 294

 N-Shc: SSDIYSTREG KLVAVPTGEA PTIVNTQ--- ---QIPPOAW EAAVSSAESS 325
 Shc : EVRRQNPPFP PCFGRELFDG ESKVMVQNLD KARQAVGGAG EPNPAINGSA 344

 N-Shc: PKKGLGDMKP EDALKNOPL GEVLKKAASV ECISFVSPRA PDAKMLEELQ 375
 Shc : R-RQGLDMKP EDATAVPE- -EPQS----- -V/S--- -MAEQLR 374

 N-Shc: ASTYQGENE RKKALGDLKK DODELVKST TNPSSFVLGQ MNGGAKHLL 425
 Shc : GEPMFEGLE RRAALGDLK NGDFLYREST TTPGOYVLGQ LQSGQFHL 424

 N-Shc: LVDPECTINT KRAVEDSISL LNNHELESS EPTVSAGSELG HQQFVERKQ 475
 Shc : LVDPEGVLT KGRFESVSE EASYMDNE EPTISAGSELG HQQFVERKL 474

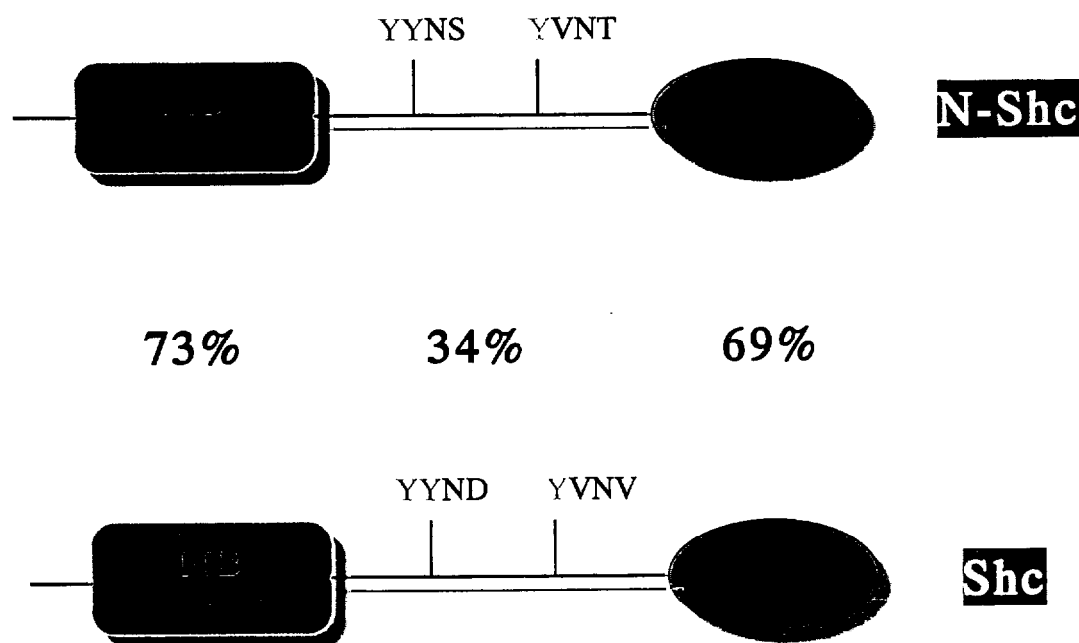


図11 ShcとN-Shcの構造と相同性

したがってこの Shc の 239/240Y が新たなリン酸化部位である可能性を考え検討をおこなった。

(b) 実験材料と実験方法

1. 実験材料

Ⅱ 項同項目参照。

2. 実験方法

2-1. Shc 変異体 cDNA の作製

Shc 変異体の作製は、PCR 法により作製した。Shc の 239 / 240 のチロシン残基のフェニルアラニン残基への置換には、5'-CCATCAGTTCTTTAATGACTTCCCGGGGAA-3'/5'-AAGTCATTATAGAAC TGATGGTCAGGTGGC-3'をそれぞれプライマーとして変異を導入した。PCR より得られた断片を、pBluscript-WT-Shc(Xho I / EcoR I)と入れ替えた。これを、BamH I / EcoR I および Xho I / Xba I 断片で切り出し、pGEX-2T または pKU-Hyg へ組み込んだ。

2-2. In vitro kinase assay

Ⅱ 項同項目参照

2-3. トランスフェクション

Ⅱ 項同項目参照

2-4. ウエスタンブロット

Ⅱ 項同項目参照

2-5. 免疫沈降

Ⅱ 項同項目参照

(c) 実験結果

1. in vitro kinase assay

Shc の新たなリン酸化部位と考えられる 239/240Y とこれに 317Y を加えた 3 つのチロシン残基をそれぞれフェニルアラニン残基に置換させた変異体の GST との融合タンパク質を基質として EGF 刺激による *in vitro* kinase assay を行った。その結果を図 12 に示した。

EGFR のリン酸化は、いずれの Shc 変異体においてもおこっており、WT Shc を基質としたときと比べほとんど違いは認められなかった。

一方 Shc のリン酸化については、Y239/240F Shc 変異体を基質としたときには十分リン酸化を受け、その程度は WT Shc より低く、Y317F Shc を基質としたときとほぼ同程度であった。さらに Y239/240/317F Shc 変異体を基質としたときには、Shc のリン酸化はほとんど認められなかった。

2. Y239/240F Shc および Y239/240/317F Shc 変異体発現細胞の樹立

in vitro において、317Y のほかに 239/240Y も Shc の主要なリン酸化部位である可能性が明らかとなった。そこで実際 *in vivo* において同様なことがおこっているかどうかを確認するために、Y239/240F Shc および Y239/240/317F Shc を ER 細胞に発現させ、EGF 刺激依存的なリン酸化について検討することとした。

Y239/240F Shc および Y239/240/317F Shc cDNA を組み込んだハイグロマイシン耐性遺伝子を含むベクター pKU-Hyg を用いて、ER 細胞にリン酸カルシウム法にて導入した。ハイグロマイシンで細胞を選択し、耐性株について Shc の発現を調べた。

その結果それぞれ約 20 クローン拾い、このうち 3 から 4 クローンの高発現株を得た。これらの細胞の Shc の発現量は、ウエスタンブロットの解析結果から判断すると内在性 Shc の 10 倍以上認められた(図 8)。

3. *in vivo* における Shc のリン酸化

Y239/240F Shc および Y239/240/317F Shc を高発現した細胞株を用い、EGF

刺激依存的な Shc のリン酸化について検討した。

EGF 50ng/ml 5 分刺激後の細胞可溶化液を抗 Shc 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE で泳動後、抗リン酸化チロシン抗体でプロットした。その結果を図 13 に示した。

Y239/240F Shc 発現細胞では、EGF 刺激依存的な Shc のチロシンリン酸化が認められた。このときのリン酸化の程度は、WT Shc 発現細胞と比べ低いものであったが、Y317F Shc 発現細胞での Shc のリン酸化とほぼ同程度であった。

一方 Y239/240/317F Shc 発現細胞においては、Shc の EGF 刺激依存的チロシンリン酸化はかなり減弱していた。

この結果は、in vitro の結果とおおよそ合致したものと考えられた。

(d) 考察

EGF 刺激により Shc は速やかにリン酸化を受ける。Shc は 317Y がリン酸化され機能的にもその部位が重要と考えられている。しかし前 I 項での検討結果からそれ以外にリン酸化部位のあることが示唆され、さらにそれにともない Shc に新たな機能がある可能性が考えられた。

アミノ酸においてリン酸化をうける可能性のあるのは、チロシン残基の他、セリン残基、スレオニン残基がある。これらの残基のある特異的な部位はそれぞれのリン酸化酵素によりリン酸化を受け、細胞内情報伝達で重要な役割を果たすことが知られている。Shc の一次構造を見るとリン酸化可能なこのような残基が幾つか認められる。EGF 刺激における Shc のリン酸化は in vitro の検討からチロシン残基特異的であった(図 6)。これは Shc が EGFR などのチロシンキナーゼのよい基質であり、そのリン酸化を介し情報伝達分子として機能していることを示している。一方 in vivo では 2 次元によるリン酸化マップによる検討から、主要なリン酸化部位は in vivo でのリン酸化パターンと同じであることが明らかとなった(47)。

そこで 317Y と異なる新たなリン酸化部位として 239/240Y に注目し、その

変異体を作成し検討した。その結果 *in vitro* において 239/240Y も Shc の主要なリン酸化部位であることを見い出した。さらにこのリン酸化部位は *in vivo* でも十分 EGF 依存的にリン酸化を受けていることもわかった。

今回新たに見い出した連続した Shc のチロシン残基 239/240Y が EGF 刺激にともなってどの様にリン酸化を受けるかについては、2 次元におけるリン酸化ペプチドマッピングを *in vitro* および *in vivo* で行うことにより確認している(47)。その結果この 2 つのリン酸化のパターンは、239Y、240Y がそれぞれ一つずつリン酸化されたものおよび両方ともリン酸化が入ったもののいずれも存在することが明らかとなった。そしてこのリン酸化パターンは、*in vitro* での結果と *in vivo* での結果において大きな差は認められなかった(47)。さらに後藤らによる IL-3 刺激における Shc のリン酸化のパターンともほぼ同様であった(48)。

したがって新たに見い出した Shc の 239/240Y のリン酸化は、EGF のみならずさまざまな系で起こる可能性があり、Shc がこれまで重要と考えられてきた細胞内情報伝達経路における役割にさらなる機能が加わることを示唆するものと考えられた。

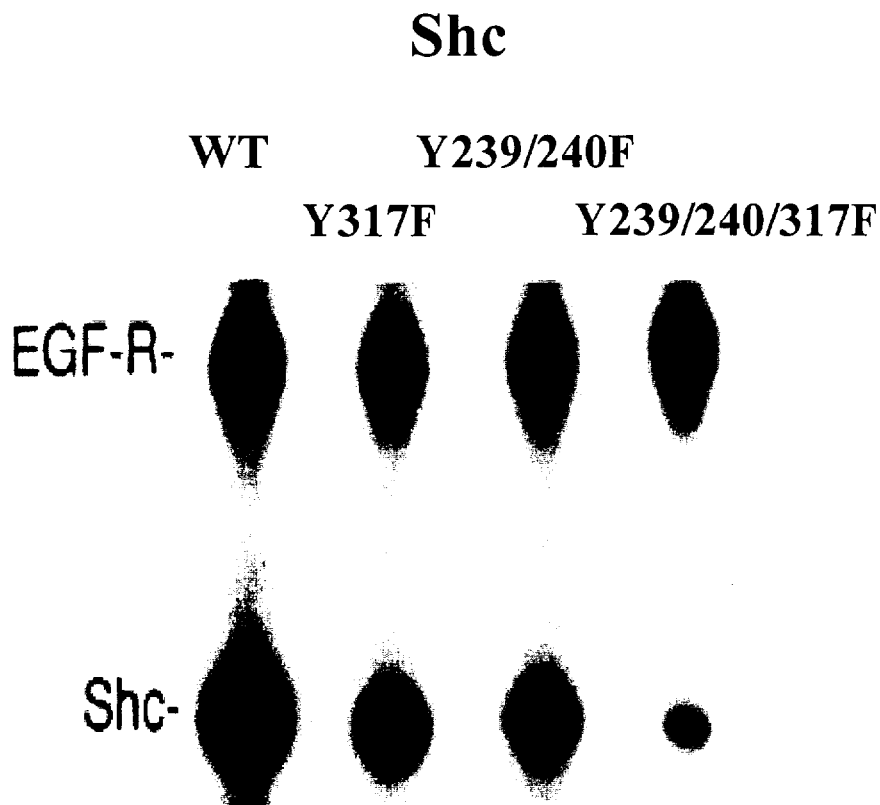


図12 in vitro でのEGF刺激によるShcのリン酸化
 ShcのEGFRチロシナーゼによるリン酸化。
 EGFR発現NIH3T3細胞の細胞可溶化液をEGF(1 μ g/ml)ありなしで30℃、
 30分反応後、抗EGFR抗体で免疫沈降した。それに[γ -³²P]ATPと各GST-
 Shc変異体を加えて30℃、30分反応させ、SDS-PAGEにて泳動した。

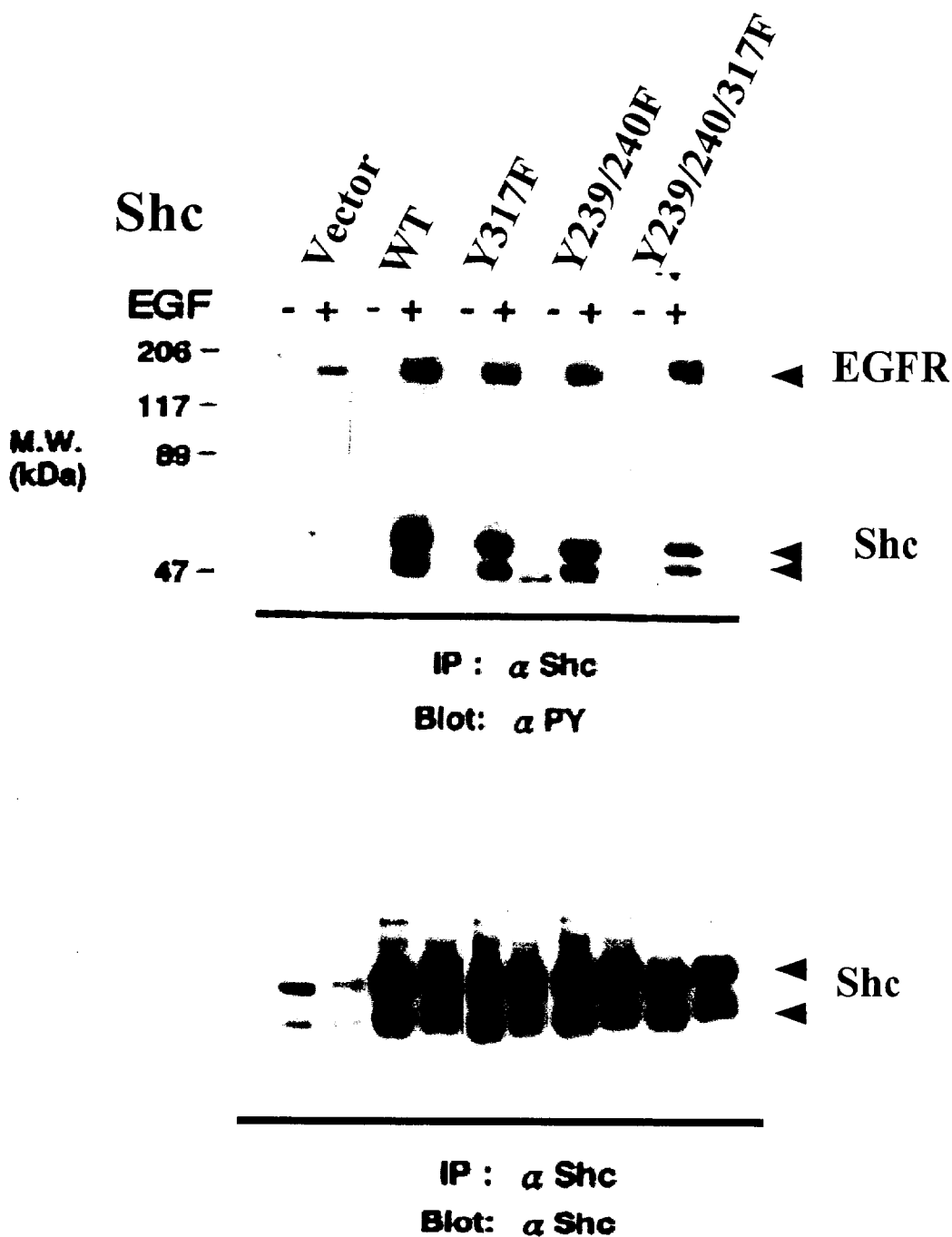


図13 EGF刺激によるShc変異体のチロシンリン酸化
WTおよび各Shc変異体を発現したEGFR発現NIH3T3細胞にEGF 50ng/ml 5分刺激後のShcのチロシンリン酸化。細胞可溶化液を抗Shc抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体(上)、抗Shc抗体(下)でプロットした。

Ⅲ. 上皮細胞増殖因子受容体からの細胞内情報伝達における Shc の新たなチロシンリン酸化部位(239Y/240Y)の役割

(a)はじめに

これまでの結果から、Shc のチロシンリン酸化部位として 317Y の他に、239/240Y があることが明らかとなった。

Shc は、細胞内情報伝達においてアダプター分子として重要な役割を果たしている。今回明らかになった 239/240Y の新しいリン酸化部位についても、その部位と相互作用するなんらかのタンパク質を介してこれまで知られている経路とは異なる情報伝達経路を活性化している可能性が考えられる。

そこでこの新たなリン酸化部位が 317Y を介した情報伝達経路と異なった経路を活性化しているのか、さらに新たな情報伝達経路があるとすればそれがどのような生物学的意味を持つのかについて検討した。

EGF 刺激では、細胞内でさまざまな情報伝達経路が働き、Shc を介する経路はその一つである。Shc の役割を検討するにあたっては、その経路が特異的に働く様な系で見たほうがわかりやすいと考えられる。後藤らは、自己リン酸化部位を欠失した EGFR を発現させた NIH3T3 細胞において、EGF 刺激依存的に Shc が特異的にリン酸化をうけ細胞増殖をもたらすことを示している(33)(図 14)。

そこでこの細胞に Shc 変異体を導入し、新たなリン酸化部位 239/240Y の情報伝達経路について検討することとした。

(b)実験材料と実験方法

1.実験材料

抗 Grb2 抗体、抗 MAPK 抗体は Transduction Laboratories 社、抗 active-MAPK 抗体は Promega 社よりそれぞれ購入した。³H-チミジンは Amersham 社より購入した。実験に用いた自己リン酸化部位を欠失した変異 EGFR 発現 NIH3T3

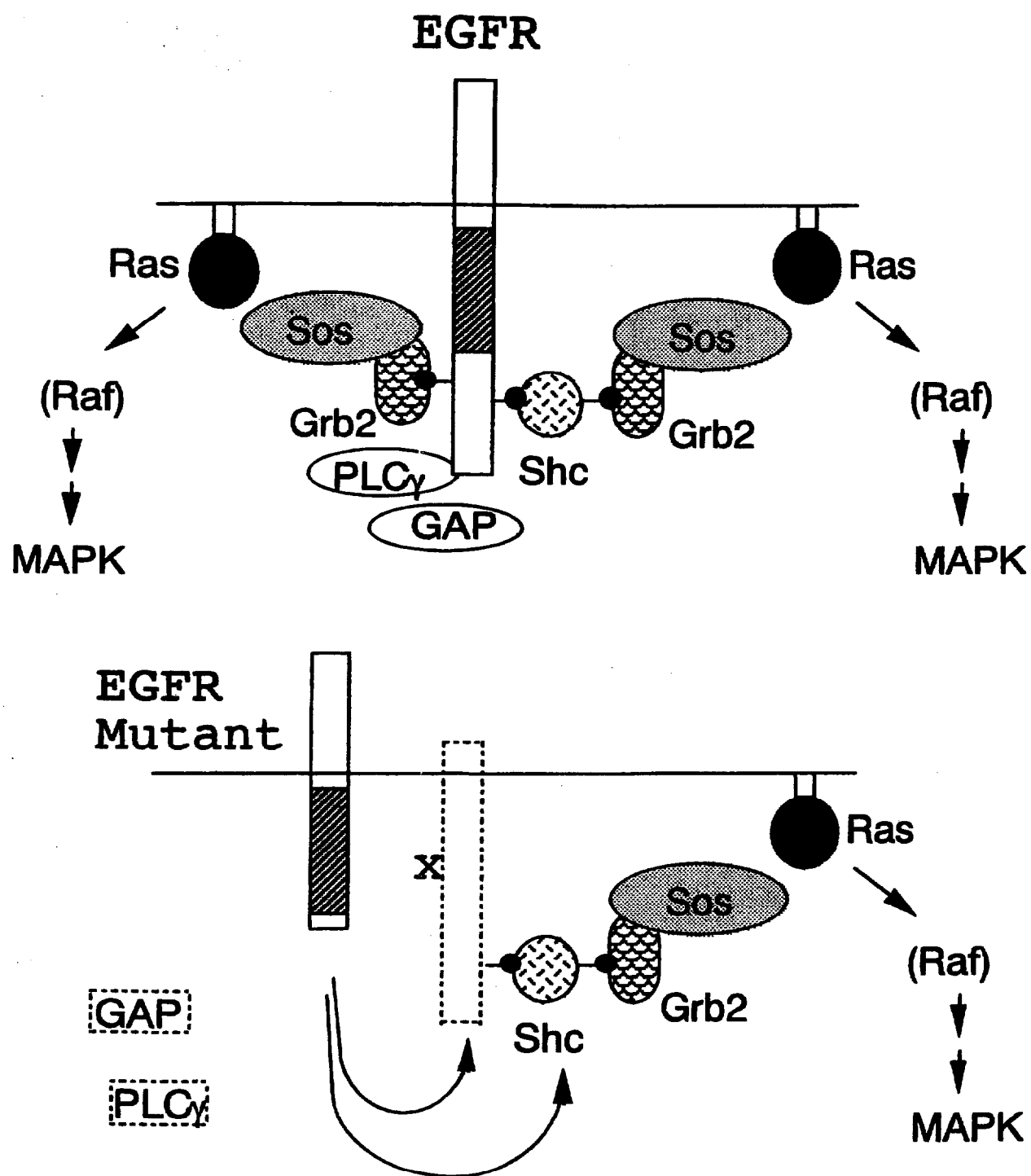


図 14 自己リン酸化部位を欠失させた EGFR からの細胞内情報伝達

細胞(mER)は、東大医科研細胞遺伝学研究部において確立した細胞株である(33)。その他はⅡ項に示したものと同様である。

2.実験方法

2-1.トランスフェクション

Ⅱ項同項目参照

2-2.ウエスタンブロット

Ⅱ項同項目参照

2-3.免疫沈降

Ⅱ項同項目参照

2-4. In-gel kinase アッセイ

mER 細胞を 6cm プレート約 80%飽和状態まで培養し、0.5%NBCS 含有 DMEM にて一晩飢餓状態とし、EGF 100ng/ml にて 5 分刺激した。細胞は、PBS にて洗浄後、lysis buffer で可溶化し、微量高速遠心機で 15000rpm、10 分間遠心し、その上清を実験に使用した。上清中のタンパク質量は、Bio-rad protein assay kit (Bio Rab) にて定量した。20mg サンプルに 1/4 量の 5x sample buffer を加え煮沸後、MAPK の基質として 0.5mg/ml の MBP(myerin basic protein)を含む SDS-PAGE にて分離した。分離後、ゲルをプロパノール溶液 (20%プロパノール/50mM Tris-Cl [pH8.0])に浸して SDS を除去する。次いで buffer A(50mM Tris-Cl [pH8.0]/5mM メルカプトエタノール)にて洗浄し、グアニジン溶液(6M guanigin.HCl/bufferA)にてゲル内のタンパク質を完全に変性させる。4℃にてゲルに renature 液(0.05%Tween 40/ bufferA)を加え一晩振盪する。室温で 30 分 bufferB(40mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 20mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 2mM DTT)で振盪後、反応液(25mM ATP, 50mCi [γ -³²P]ATP/ bufferB)で室温、60 分反応させた。反応終了後、洗浄液(5%トリクロロ酢酸/ 1%ピロリン酸ナトリウム)にて、未反応の ATP を除去した後、ゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィーによって解析した。

2-5. 増殖曲線

ER または mER 細胞を、3.5cm プレートに 2×10^4 個まき、翌日 0.5 % NBCS/DMEM 培地に交換後 EGF 1ng/ml にて刺激した。刺激後 3 日および 5 日目に培地交換を行い、EGF を添加した。最初の EGF 刺激 3 日後、5 日後、7 日後に、トリプシン処理し細胞を剥がし、集積しチュルク計数板にて細胞数を数えた。

2-6. ^3H -チミジンの取り込み

mER 細胞を、24 穴プレートに 2×10^4 個まき、0.5 %NBCS/DMEM 培地にて 2 日間培養後、EGF で刺激した。22 時間後 1mCi の ^3H -チミジンを加え、4 時間パルス標識した。標識した細胞を、0.2M NaCl, 5mM EDTA にて可溶化後氷冷した 10%トリクロロ酢酸 6ml 中にいれ 30 分静置させた。生じた沈殿を GF/C フィルター上に回収し、乾燥後バイアルにいれ、シンチレータを加えて液体シンチレーションカウンターにて回収された放射活性を測定した。

(c)実験結果

1.mER 細胞(自己リン酸化部位欠失 EGFR 発現 NIH3T3 細胞)

1-1.mER 細胞における Shc 変異体発現細胞の樹立

WT Shc、Y317F Shc、Y239/240F Shc および Y239/240/317F Shc cDNA を組み込んだハイグロマイシン耐性遺伝子を含むベクター pKU-Hyg を用いて、mER 細胞にリン酸カルシウム法にて導入した。ハイグロマイシンで細胞を選択し、耐性株について Shc の発現を調べた。

その結果 WT Shc、Y317F Shc、Y239/240F Shc を導入した細胞ではそれぞれ約 20 クローン拾い、このうち 2 から 3 クローンの高発現株を得た。これらの細胞の Shc の発現量は、ウエスタンブロットによる解析結果から判断すると内在性 Shc の 3～5 倍の発現が認められた(図 15)。これに対し Y239/240/317F Shc

導入細胞については約 50 クローン拾ったが、いずれも Shc の発現は、親株と変わりなく高発現株は得られなかった。

1-2.増殖活性

1-2-1.³H-チミジンの取り込み

得られた Shc 変異体発現細胞において、EGF 刺激による DNA 合成について検討した。

0.1%血清条件にて 48 時間培養後、EGF で刺激した。刺激後 22 時間に ³H-チミジンを添加し 4 時間ラベルした。取り込まれた放射活性を測定し結果を図 16 A に示した。

WT Shc 発現細胞では、EGF 濃度依存的な ³H-チミジンの取り込みが認められ、DNA 合成がおこなわれていることが確認された。Y239/240F Shc および Y317F Shc 発現細胞では、EGF 濃度依存的な ³H-チミジンの取り込みがほとんど認められなかった。これらの細胞において EGF 10ng/ml 刺激したときの ³H-チミジンの取り込み量を、血清刺激したときの取り込み量を 100 としたときの相対値で示すと図 16 B になる。WT Shc 発現細胞では 90%であったのに対し、Y239/240F Shc 発現細胞では 40%であり、Y317F Shc 発現細胞ではわずか 15%に過ぎなかった。

1-2-2.増殖曲線

低血清条件下における Shc 変異体発現細胞の EGF による細胞数の変化について検討した。結果を図 16 C に示した。

0.1%血清条件下において、WT Shc、Y239/240F Shc および Y317F Shc 発現細胞はいずれも細胞数の変化はほとんど認められなかった。

一方 EGF 10ng/ml 刺激を加えると、WT Shc 発現細胞は EGF 刺激に呼応した細胞数の増加を示した。しかし Y239/240F Shc と Y317F Shc 発現細胞では、細胞数の変化はほとんど認められず、EGF 依存的な増殖活性が抑制されたこと

が明らかとなった。

1-3. Shc 変異体とアダプター分子 Grb2 との結合

Shc の下流に位置し相互作用する分子として Grb2 が知られている。そこで Shc 変異体発現細胞において EGF 刺激後の細胞可溶化液を抗 Shc 抗体で免疫沈降し Grb2 が共沈してくるかについて抗 Grb2 抗体でウエスタンブロットにより解析した。その結果を図 17 D に示した。

WT Shc 発現細胞においては、EGF 刺激依存的な Shc と Grb2 との結合が認められた。また Y239/240F Shc 発現細胞においても、WT とほぼ同程度に Shc と Grb2 との結合が認められた。これに対し Y317F Shc 発現細胞においては、EGF 刺激依存的な Grb2 との結合はわずかに認められる程度で、WT や Y239/240F Shc 発現細胞に比べ顕著に減じていた。

1-4. MAPK 活性化

Shc は 317Y のリン酸化を介して Grb2 と結合し、Ras / MAPK を活性化することが知られている。そこで Shc 変異体発現細胞において MAPK 活性化について検討した。

Shc 変異体発現細胞において EGF 刺激後の細胞可溶化液を、MAPK 特異的基質として知られている myelin basic protein を含む SDS-PAGE に流した後、in-gel kinase assay を行った。その結果を図 17 A, B に示した。

WT Shc および Y239/240F Shc 発現細胞においては、EGF 刺激依存的な MAPK の活性化がほぼ同程度に認められた。これに対し Y317F Shc 発現細胞では、EGF 刺激依存的な MAPK の活性化はほとんど認められなかった。

次に Y317F Shc 発現細胞での MAPK の活性化の抑制は、MAPK のリン酸化の結果による違いかどうかについて検討した。活性化した MEK は、MAPK のセリン、スレオニンおよびチロシン残基をリン酸化し MAPK の活性化を引き起こすことが知られている。そこで Shc 変異体発現細胞において EGF 刺激

後の細胞可溶化液を、チロシンリン酸化した MAPK を特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロットで解析をした。その結果を図 17 C に示した。

Y317F Shc 発現細胞では、EGF 刺激依存的な MAPK のチロシンリン酸化はほとんど認められなかった。WT Shc および Y239/240F Shc 発現細胞においては、EGF 刺激依存的な MAPK のチロシンリン酸化がほぼ同程度に認められた。この結果は、in-gel kinase assay の結果と同様であった。

2. ER 細胞(WT EGFR 発現 NIH3T3 細胞)の増殖活性

Shc の 317Y のリン酸化は、Ras 経路の活性化をおこし、細胞の増殖に重要といわれている。そこで WT Shc および Y317F Shc 発現細胞における EGF による増殖活性について、EGF 刺激後の細胞数の変化を追うことで検討した。

その結果を図 18 に示した。

0.5%血清条件下においては、WT Shc および Y317F Shc 発現細胞はいずれも細胞数の変化はほとんど認められなかった。

一方 EGF 10ng/ml 刺激を加えると、細胞数は増加を示した。しかし WT Shc と Y317F Shc 発現細胞で、細胞数の変化における違いはほとんど認められなかった。

(d)考察

新たに見い出した Shc のリン酸化部位 239/240Y の情報伝達について検討した。Shc が特異的に働く mER 細胞に Y239/240F Shc を発現させた細胞では、EGF 依存的な DNA 合成がほとんど起こらなくなった。これは Y317F Shc を導入した細胞でも同様であった。さらに EGF 刺激による細胞数の変化を見ても、2 つの Shc 変異体はほとんど増殖活性を示さなかった。Y239/240F Shc と Y317F Shc の発現細胞では、DNA 合成、細胞数変化ともに後者のほうがより強く抑制がかかる傾向が認められた。このことは、EGF 刺激にともない Shc の 2 箇所のリン酸化部位からの情報伝達経路が発せられ、いずれも DNA 合成や細胞

増殖に必須であることを意味している。また両方のリン酸化部位変異体 (Y239/240/317F Shc) を mER 細胞に導入したが高発現細胞株が得られなかったことや得られた Y239/240F Shc、Y317F Shc を発現させた細胞におけるその発現量が ER 細胞にこれら変異体を発現させたときと比較して少ないことから Shc の 2 箇所のリン酸化部位が EGF 依存的増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。逆に Y239/240F Shc、Y317F Shc を発現させた細胞でその発現量がそれほど多くなくても DNA 合成や増殖に与える影響が大きかったことから同じことがいえると考えられた。

次に Shc の 2 箇所のリン酸化部位からどのような経路が発せられているのかについて検討した。Shc を介する情報伝達には Grb2 との結合そして Ras/MAPK 経路の活性化が知られている。Shc の新たなリン酸化部位 239/240Y を含むアミノ酸配列は YYND である。239Y のみがリン酸化され 240Y がリン酸化されない場合、これは Grb2 との結合配列に相当する。しかし Y317F Shc 発現細胞において Grb2 との結合はわずかに見られる程度であり、MAPK の活性化についてはほとんど認めなかった。2 次元リン酸化マップから 239Y と 240Y が一つずつリン酸化されることが確認されているが、そのリン酸化の程度は 240Y のほうが 239Y よりも強いことが示唆されている。このことから mER 細胞の系で Shc の 239/240Y から EGF 刺激による Ras/MAPK 活性化への寄与はほとんどなく、したがって主に Shc の 317Y のリン酸化によるものと考えられた。

後藤らは、BA/F3 細胞における IL-3 刺激における Shc の役割について検討し報告している(48)。その中で Shc の 317Y は Ras/MAPK 活性化の経路関与し、IL-3 依存的な細胞増殖に重要であり、一方 239/240Y は、Ras/MAPK 経路とは独立した *c-myc* の誘導に関与し、それが抗アポト-シスに重要であることを明らかにした。今回検討した EGF による繊維芽細胞の系においても、Shc の 2 つのリン酸化部位である 317Y と 239/240Y から発せられる情報伝達経路は独立したものであり、それぞれ細胞の増殖に重要であることが見い出され

た。EGF による細胞増殖における Shc の 239/240Y から発せられる情報伝達については、IL-3 の系と同様に *c-myc* の誘導に関与していることを確認しているが(47)、その効果は IL-3 の系ほど強いものではなかった。したがって細胞によってまだ他の経路を活性化して生物学的意義に関与している可能性が考えられた。

以上今回の実験で得られた結果をまとめると図 19 のようになる。

今後の課題は、今回得られなかった Shc の 239/240Y に結合する下流分子の探索と、新しい情報伝達経路の詳細を明らかにするがあげられる。

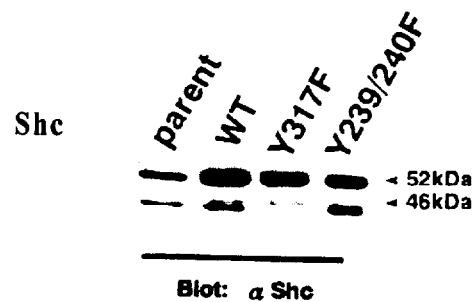


図15 mutantEGFR発現NIH3T3(mER)細胞における各Shc変異体の発現
mER細胞にWTおよびY317F、Y239/240F、Y239/240/317F Shc cDNA
をトランスフェクションし、ハイグロマイシンにより選択して得られた
高発現細胞。Y239/240/317F Shcについては高発現細胞株は得られな
かった。

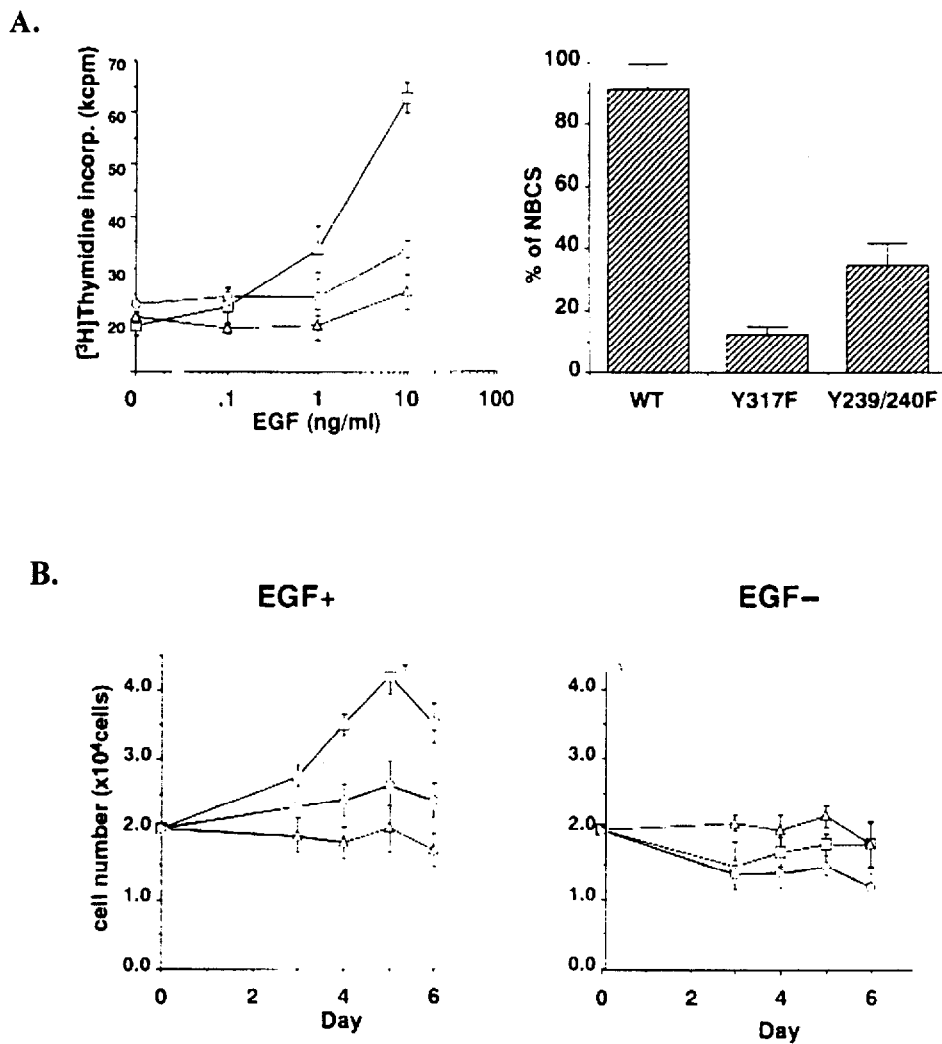


図16 Shc 317Yと239/240Yのリン酸化はどちらもEGF刺激による細胞増殖に重要である。

A. WT Shcおよび各Shc変異体を発現したmER細胞をEGFで刺激し、 ^3H -チミジンの取り込み(左)を計測した。またEGF 10ng/ml刺激したときの取り込みを血清刺激したときと比較した(右) B. WT Shcおよび各Shc変異体を発現したmER細胞をEGF 10ng/mlで刺激し、細胞数を計測した。

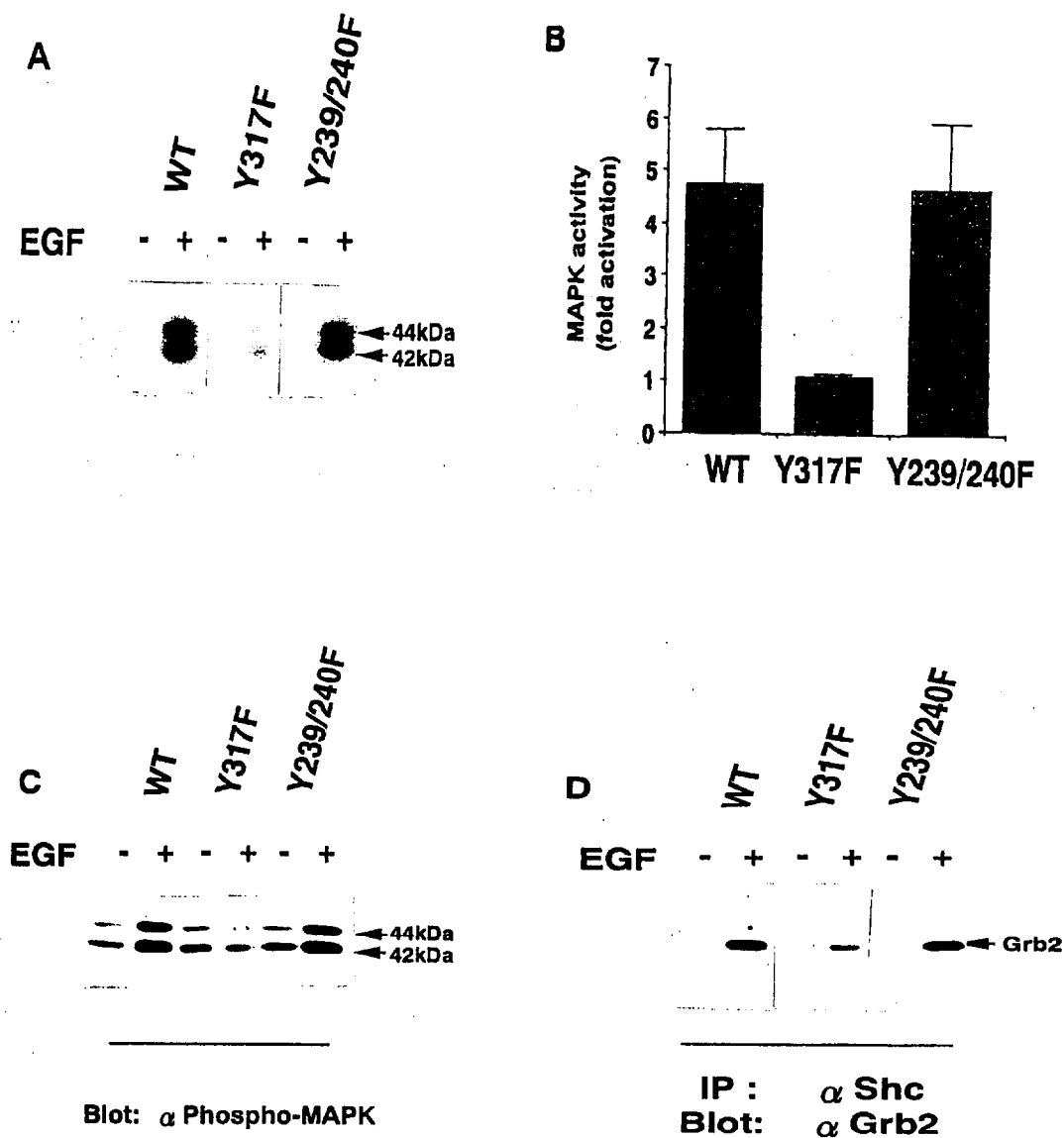


図17 Y317F Shc はEGFによるMAPK活性化を抑制する

WTおよびShc変異体発現細胞にEGFを刺激した. (A)細胞可溶化液をMBP含有のSDS-PAGEで泳動後、MAPK活性化をin-gel kinase assayにて解析した. (B) in-gel kinase assayにより測定したMAPKの活性化をEGF刺激をしないときと比較した. (C) 細胞可溶化液をSDS-PAGEで泳動後、抗リン酸化MAPK抗体でプロットした. (D) 細胞可溶化液を抗Shc抗体で免疫沈降し、SDS-PAGEで泳動後、抗Grb2抗体でプロットした.

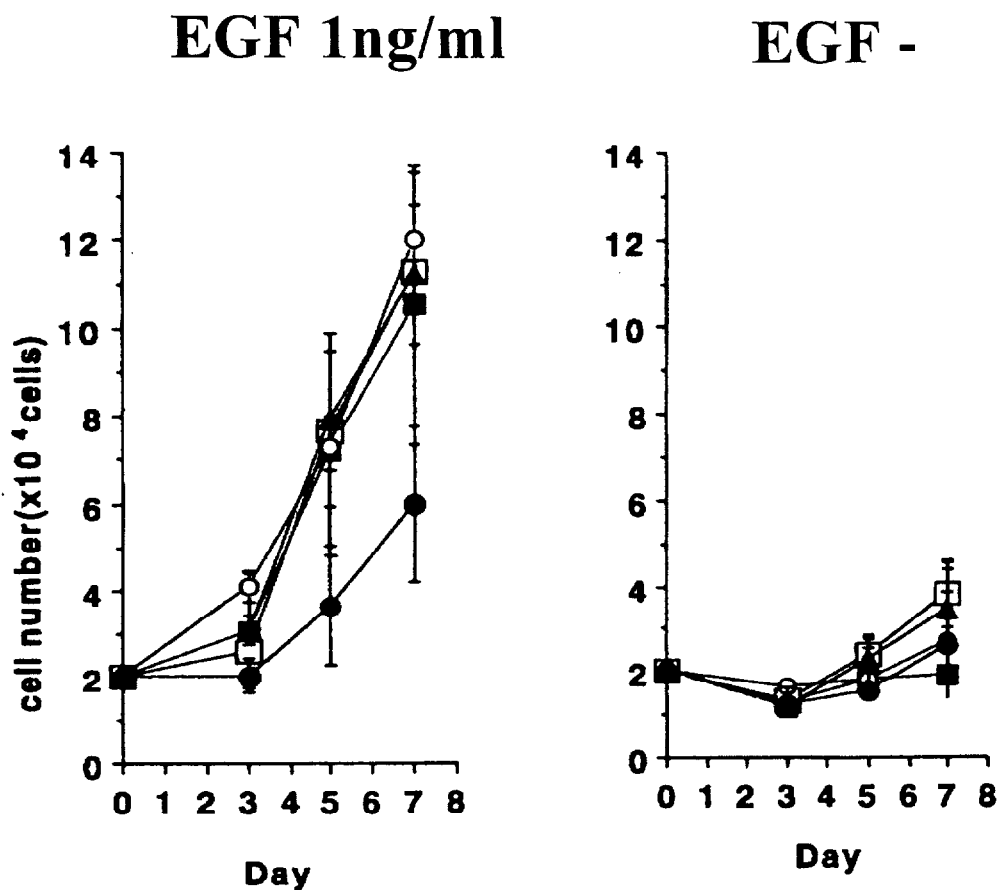


図18 Y239/240/317F ShcはEGFR発現NIH3T3(ER)細胞におけるEGF刺激による細胞増殖を抑制する
 WT Shcおよび各Shc変異体を発現したER細胞にEGF刺激し、細胞数を計測した。□, WT Shc; ▲, Y317F Shc; ○, Y239/240F Shc; ●, Y239/240/317F Shc; ■, vector control

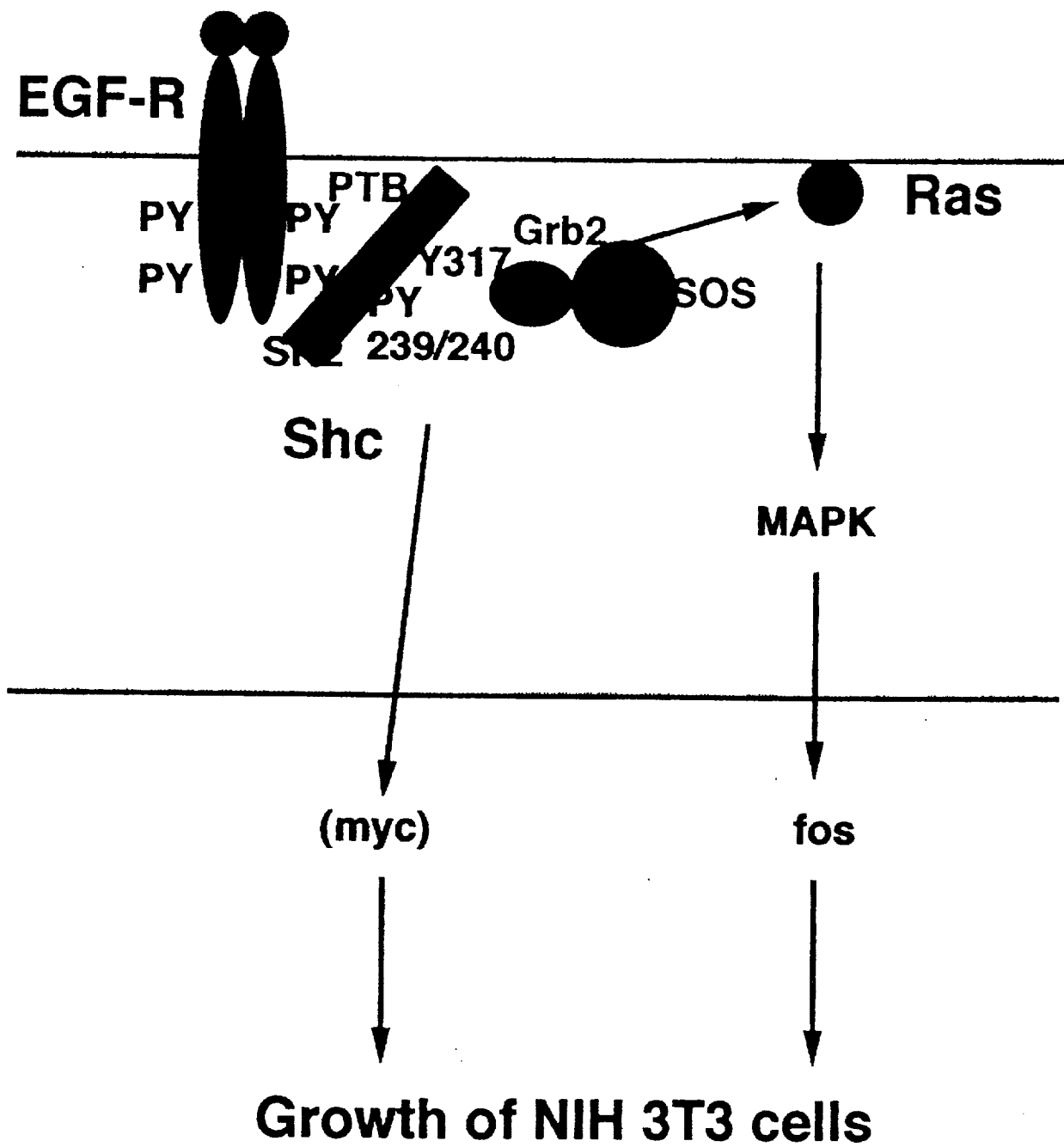


図19 EGFRからShcを介する2つの情報伝達経路

IV.まとめ

EGFR からの細胞内情報伝達について、アダプター分子 Shc に注目し検討を行ってきた。その結果、これまで知られていた Shc の 317Y に加え、新たなリン酸化部位として 239/240Y を見い出した。さらに、ここから発せられる情報伝達は 317Y を介する Ras/MAPK 活性化経路とは独立したものであり、EGF による細胞増殖に重要であることがわかった。

今回見い出した Shc の新たなリン酸化部位は、その後さまざまな系で情報伝達に関与していることが報告されてきている。van der Geer らは、Shc の 239/240Y に結合する分子として Grb2 の他、チロシンリン酸化タンパク質 pp22、pp410、pp160 があることを報告している(49)。また Thomas らは、NGFR である TrkA において、Shc の 239/240Y が神経突起の伸長に重要であると報告している(50)。その中で彼等は神経突起伸長に Ras/MAPK 経路が重要であるとして Shc の変異体を用いて検討している。TrkA は Shc の PTB ドメインでしか結合できない。NGF 刺激したとき Shc はリン酸化されるが、このとき 317Y ではなく 239/240Y でおもに Grb2 と結合し、Ras/MAPK 経路を活性化していると報告している。さらに Sato らは、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 依存的に c-Src が Shc の 239/240Y のみをリン酸化することを見い出している(51)。このようにここ 1 年で Shc の新しいリン酸化部位に関する報告が多く見られ、こうした報告の中には、今回の実験結果と異なる結果も見られる。しかし、Shc の新しいリン酸化部位 239/240Y は明らかとなったばかりであり、その情報伝達については不明な点が多い。

これまでに報告に基づいて Shc を中心にまとめると図 20 のようになる。今後 Shc の重要性が指摘されているさまざまな系において研究が進展することにより、情報伝達についてのより詳細に明らかにされるものと考えられる。

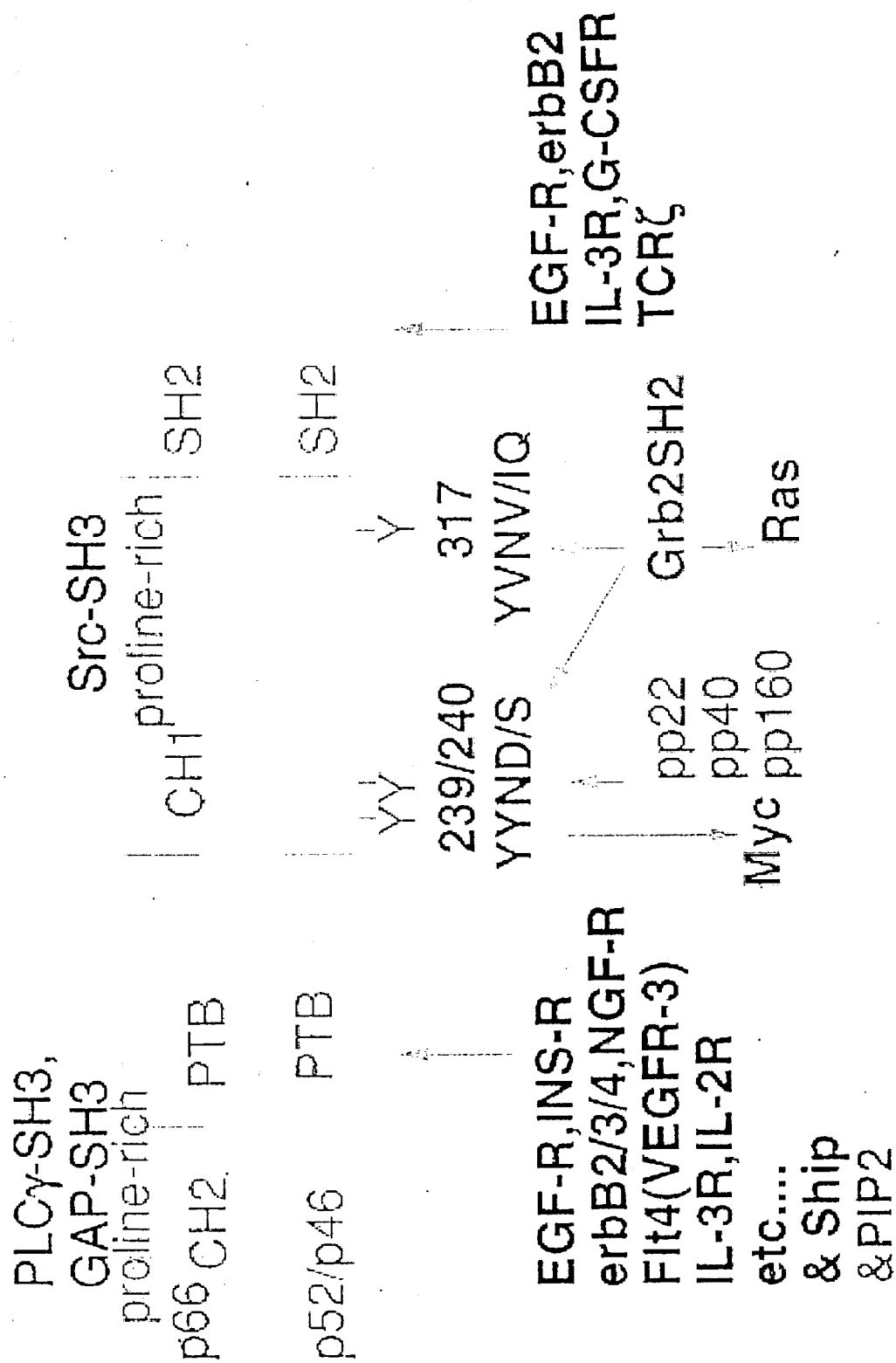


図20 Shcを介する細胞内情報伝達

第3章 A431細胞の上皮細胞増殖因子による細胞増殖抑制における細胞内情報伝達機構

I. A431細胞の上皮細胞増殖因子(EGF)による細胞増殖抑制

(a)はじめに

A431細胞は、1977年ヒト外陰部の扁平上皮癌より分離された細胞株で、上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)遺伝子の増幅が見られ、正常細胞の20~30倍の約 2×10^6 個/cellのEGFRを過剰発現している(5)。

この細胞のEGFに対する応答性に関してこれまでいくつか報告されている。A431細胞をヌードマウスの皮下に移植した時はEGFによって増殖が促進される。一方培養条件における増殖については、正常繊維芽細胞の増殖を促進するEGF濃度で抑制されることが1987年に報告された(52)。こうした特徴はその後EGFRを高発現したヒトの細胞株のうちいくつかにおいて認められることが明らかになってきた(53,54)。

この増殖抑制については、抗EGFR抗体で処理するとブロックされる(55,56)ことから、EGFRのリン酸化の亢進とそれとともなうチロシンキナーゼの活性化によって引き起こされるものと考えられている(57)。また最近A431細胞についてEGFによる細胞増殖の抑制は、Cyclin-dependent kinase(CDK) inhibitorのp21(WAF1/Cip1)によるG1 arrestがおもな要因であることが相次いで報告された(58-60)。これまでp21(WAF1/Cip1)遺伝子の誘導は、癌抑制遺伝子であるp53依存的におこることが知られている。しかしA431細胞はp53が変異していることが報告されており(61,62)、A431細胞のEGFによるp21(WAF1/Cip1)遺伝子の誘導発現がp53非依存的におこり、それが増殖抑制に関与していることが示唆されている。しかしながらEGFRからp21(WAF1/Cip1)遺伝子の発現にいたる細胞内情報伝達については、これまでほとんど明らかにされていない。

本項では、まずこれまで報告されていることを追試し、A431細胞のEGF

による増殖抑制効果および p21(WAF1/Cip1)の発現誘導について確認した。

(b)実験材料と実験方法

1.実験材料

ウエスタンブロットに用いた抗 p21(WAF1/Cip1)抗体、抗 p27(Kip1)抗体は、Transduction Laboratories 社 より購入した。

A431 細胞は、5 % ウシ胎仔血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) を使用して、37℃、CO₂ 5% 条件下継代培養した。

2.実験方法

2-1. MTS 試験

MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) は、細胞により生物還元され、細胞培養液に溶解性の formazan へ変換される。MTS の水溶性 formazan への変換は、代謝活性を持つ細胞中にみられる脱水素酵素によって行われる。490nm の吸光度として計測される formazan 産物の量は、培養液中の生細胞数と直線的な比例関係にあること、DNA 合成能をはかる ³H-チミジンの取り込み試験と同様な結果が得られていることが報告されている。

MTS 試験は、Promega 社の CellTiter 96 AQueous Solution Cell Proliferation Assay kit を用いた。96 穴プレートに、A431 細胞を 5x10³ 個/well まき、0.5 % FCS を含む DMEM 100μl に交換し 24 時間後に EGF で刺激した。刺激後 16 時間に MTS 試薬を 20μl 添加し、さらに 3 時間培養後、プレートリーダーにて 492nm における吸光度を測定した。増殖比率は EGF 刺激しないときの吸光度を基準とした相対値として計算した。

2-2. 細胞増殖試験

A431 細胞を、3.5cm プレートに 2x10⁴ 個まき、翌日 EGF にて刺激した。刺

刺激後 3 日目に培地交換を行い、EGF を添加した。最初の EGF 刺激 1 日後、3 日後、5 日後に、トリプシン処理し細胞を剥がし、集積しチュルク計数板にて細胞数を数えた。

2-3. ウエスタンブロット

A431 細胞を 6cm プレート約 60% 飽和状態まで培養し、0.5% FCS 含有 DMEM にて一晩飢餓状態とし、EGF にて刺激した。細胞は、PBS にて洗浄後、lysis buffer (50mM Hepes [pH7.4], 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 100mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 10mM Na₄P₂O₇, 1mM PMSF, 10μg/ml leupeptin and 10μg/ml aprotinin) で可溶化し、4℃ にて超音波処理をした。以下の操作は、第 2 章で記載したのと同様である。

(c) 実験結果

1. MTS 試験

A431 細胞に EGF 1, 10, 50, 100 ng/ml で刺激したときの MTS 試験による増殖比率の結果を図 21A に示した。

EGF 1ng/ml 刺激では、EGF 刺激をしないときと比較し 109% と増殖活性を示した。一方、さらに EGF 濃度を上げていくと、MTS による増殖比率は EGF 10ng/ml 刺激では 82%、50ng/ml 刺激では 80%、100ng/ml で刺激したときには 72% に低下し、濃度依存的な細胞増殖の抑制を示した(図 21A)。

2. 増殖曲線

上記の MTS 試験の結果では、A431 細胞において EGF 1ng/ml 刺激では増殖活性を、10ng/ml 以上では増殖抑制を示した。この EGF 刺激後 24 時間による増殖比率がそれ以降の細胞数の変化としてどのような曲線を示すのかについて検討した。ここでは、MTS 試験において増殖活性を示した EGF 1ng/ml 刺激と反対に強く増殖の抑制を示した 100ng/ml 刺激における、5 日目までの細胞数

の変化を計測し、グラフにした。結果を図 21B に示す。A431 細胞は、EGF 刺激をしなかったときにおいても十分な増殖を示した。EGF 1ng/ml 刺激においては、EGF 刺激をしなかったときと比較し、わずかではあるが増殖活性を示した。一方、EGF 100ng/ml 刺激についてはその増殖は強く抑制され、3 日目の細胞数は EGF 刺激しないときの約 60%、また 5 日目では約 20%であった(図 21B)。この結果については、上記 MTS 試験の結果を反映したものと考えられた。

3. A431 細胞の EGF による Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21(WAF1/Cip1)の誘導

EGF による細胞増殖抑制における細胞周期関連蛋白の関与が指摘されている。その中で特に CDK inhibitor が注目されている。

A431 細胞において、EGF による CDK inhibitor である p21(WAF1/Cip1) および p27(Kip1)の発現の変化を、増殖活性を示した EGF 1ng/ml および増殖抑制を示した EGF 100ng/ml を刺激したときでウエスタンブロットにより解析した(図 22)。

p21(WAF1/Cip1)は、EGF 刺激前においてはほとんどその発現は認められなかった。EGF 1ng/ml 刺激後においてはその発現には変化が認められず、ウエスタンレベルではほとんど検出できなかった。それに対し、EGF 100ng/ml 刺激後においては 2 時間よりその発現の誘導が見られた。さらにその発現レベルは刺激 24 時間後まで持続していることが認められた。一方、p27(Kip1)については、EGF 1 および 100ng/ml 刺激において、EGF による発現の変化は認められず、また両濃度において顕著な差は認められなかった。

(d)考察

A431 細胞は、EGF 刺激によりその濃度が低いときには増殖活性を、より高濃度の時には増殖抑制がおこることが知られている(52-55)。今回の実験結果

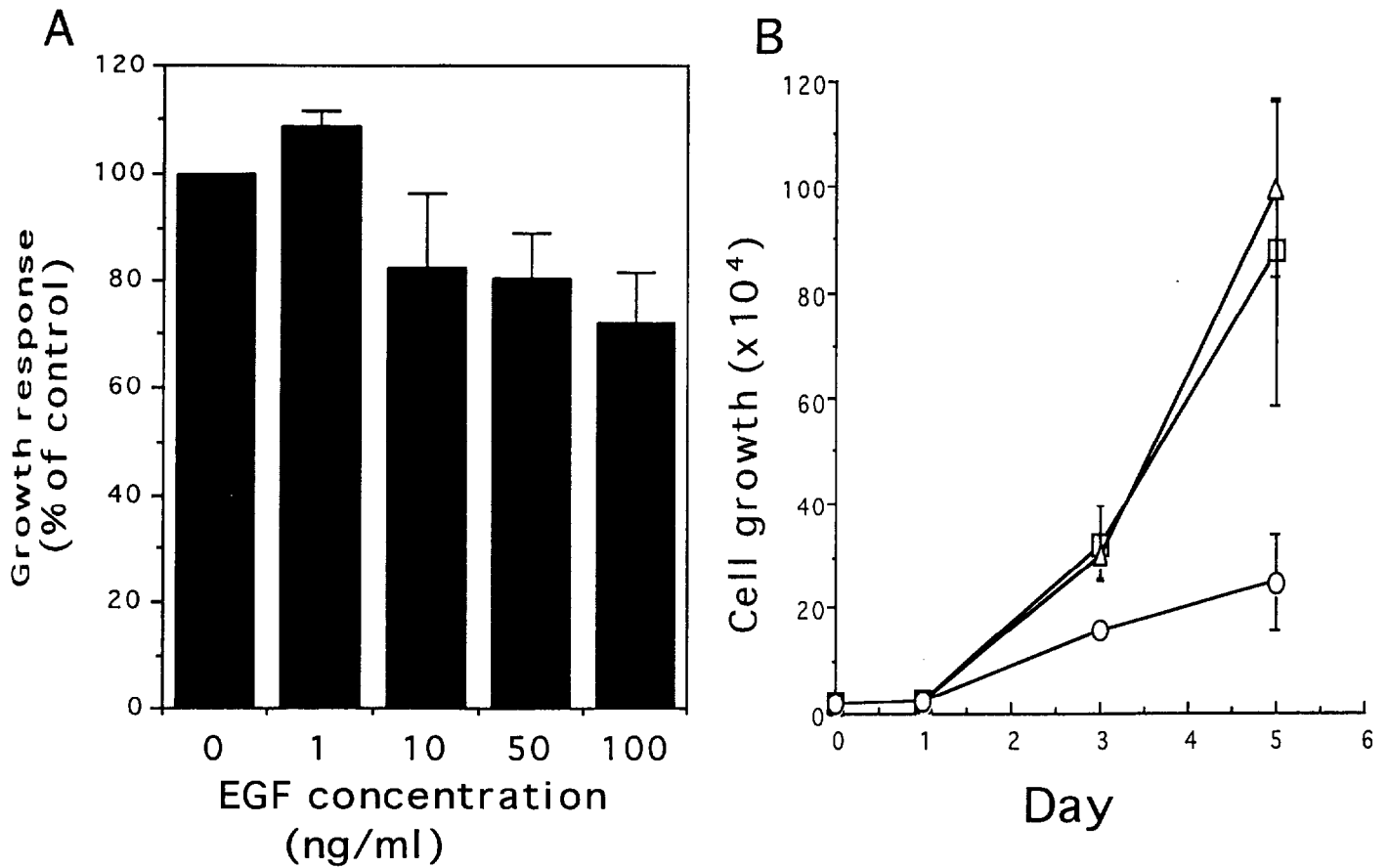


図21 A431細胞におけるEGFによる増殖抑制
 A. MTS試験によるA431細胞におけるEGF濃度依存的増殖比率. EGFを添加しない時の吸光度を100とした相対値として表わした. B. A431細胞にEGF刺激後の細胞数の変化. □、EGF minus; △、EGF 1ng/ml; ○、EGF 100ng/ml.

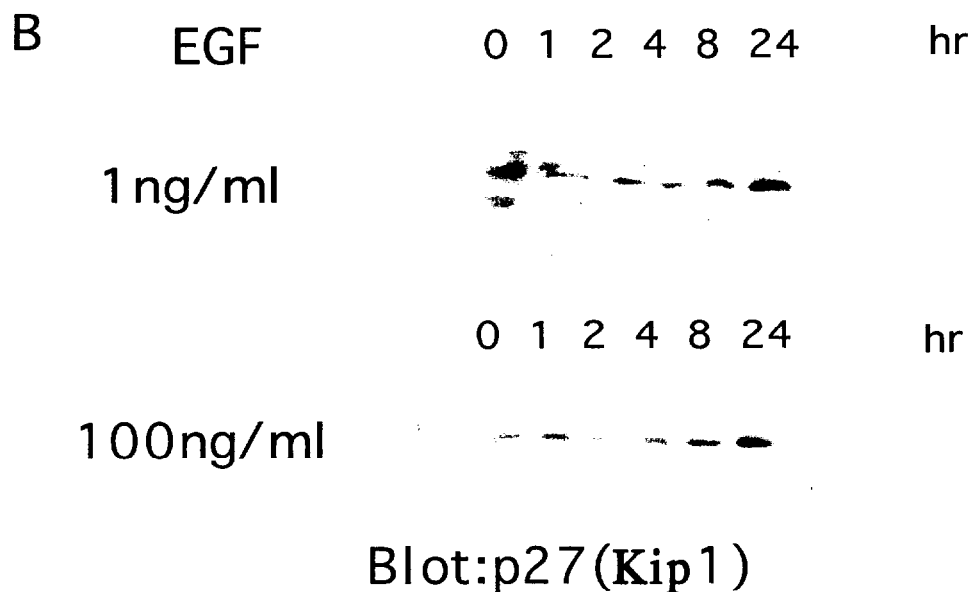
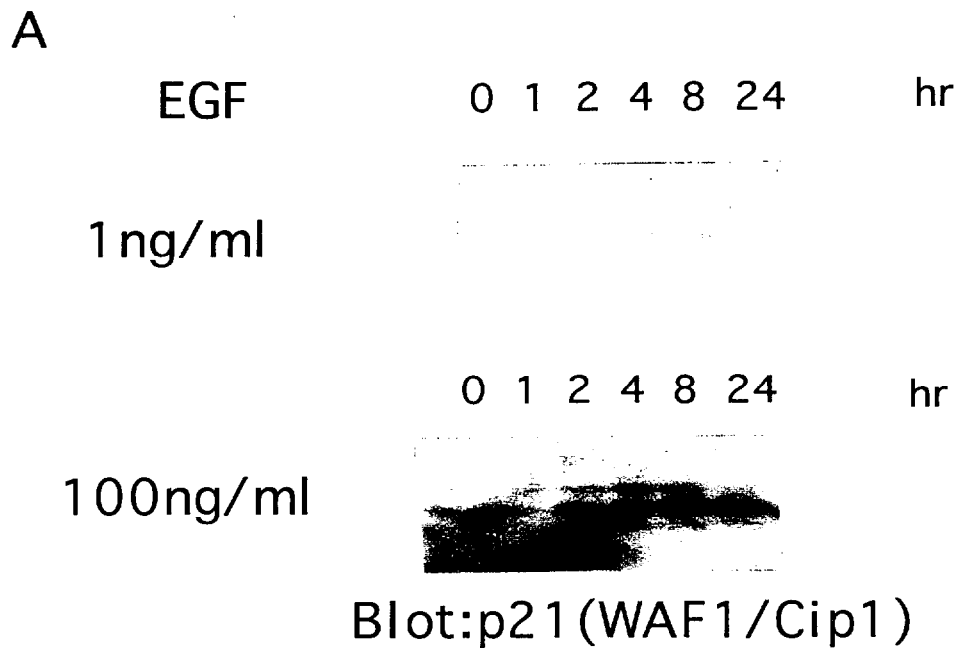


図22 A431細胞のEGFによるp21(WAF1/Cip1)およびp27(Kip1)の発現
A431細胞をEGF 1または100ng/ml刺激後の、p21(WAF1/Cip1)(A)
およびp27(Kip1)(B)の発現の時間経過.

は、これまでの報告の追試ができたことを示すものであった。すなわち、EGF 1ng/ml 刺激では、MTS 試験および細胞数の変化いずれも増殖活性を示した。一方 MTS 試験で、EGF 濃度を 10,50,100ng/ml と上げることにより増殖抑制効果が強くなる傾向を示した。さらに最も抑制効果の強かった EGF100ng/ml 刺激で細胞数の変化を追うと、その効果がより顕著に認められた。

DNA 合成能を調べる方法としては ^3H -チミジンや BrdU の取り込みによるものが知られているが、今回用いた MTS 試験はこれら 2 つの方法よりも簡便な方法として最近開発されたものである。第 2 章で用いた EGFR 発現 NIH3T3 細胞について MTS 試験を行うと EGF 依存的な増殖活性が認められ、 ^3H -チミジンの取込み試験と一致した結果を得た。今回の実験結果からこの試験が、細胞増殖試験の判定として有効な方法であることを示すものと考えられた。

この高濃度の EGF 刺激に基づく増殖抑制には、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターのひとつである p21(WAF1/Cip1) の誘導発現が重要とされている(58-60)。これまでの報告では、p21(WAF1/Cip1) の EGF 刺激後の速やかな発現は、その遺伝子の転写レベルの上昇の結果引き起こされることが明らかとなっている。さらに、そのタンパク質の持続的発現が G1 サイクリンと CDK 複合体による細胞周期進行を抑制し、結果として増殖抑制をおこすと考えられている。また最近、p21(WAF1/Cip1) のアンチセンスのオリゴヌクレオチドを導入するとこの EGF による増殖抑制効果が解除されるという報告がされた(61)。したがって A431 細胞の EGF による増殖抑制効果の情報伝達機構を解析する上で、p21(WAF1/Cip1) の発現を指標として考えた。

II. A431 細胞の EGF による増殖抑制における PI-3 kinase inhibitor および Protein kinase C inhibitor の効果

(a)はじめに

第3章 I 項において A431 細胞が EGF 刺激により p21(WAF1/Cip1)の発現が誘導され、増殖が抑制されることがわかった。しかしどのようなメカニズムでこのような現象がおこるかについてはこれまでほとんど明らかになっていない。

EGF がその受容体である EGFR と結合すると EGFR が活性化し、そこからさまざまなタンパク質が関与して種々の情報伝達経路を活性化していく。そうした情報は核内へと伝えられ、必要な遺伝子の発現へとつながる。A431 細胞においても EGF 刺激によって、さまざまな細胞内の情報伝達経路が活性化していると考えられる。このうち、どのような経路が第3章 I 項で示した A431 細胞の EGF による p21(WAF1/Cip1)の発現誘導そして増殖抑制に最も関与している可能性があるかについて検討を行うこととした。

EGFR からの細胞内情報伝達経路はこれまでに多くの研究報告から明らかになってきている。その詳細については第2章に述べた。

そこでこの複雑な細胞内情報伝達機構の中から p21(WAF1/Cip1)の発現誘導そして増殖抑制に関与する経路を明らかにするために、最近開発が著しく進んでいる情報伝達に関与する分子特異的阻害剤を用いることとした。これまでに明らかとなり重要と考えられている EGFR からの細胞内情報伝達経路のなかで、PI 3-kinase の経路および PLC- γ /Protein kinase C(PKC)の経路を遮断すべく(図 23)、PI 3-kinase 阻害剤である Wortmannin および PKC 阻害剤である GF109203X(63)(図 24)を実験に用い、増殖抑制効果ならびに p21(WAF1/Cip1)の発現誘導について検討した。

(b)実験材料と実験方法

1. 実験材料

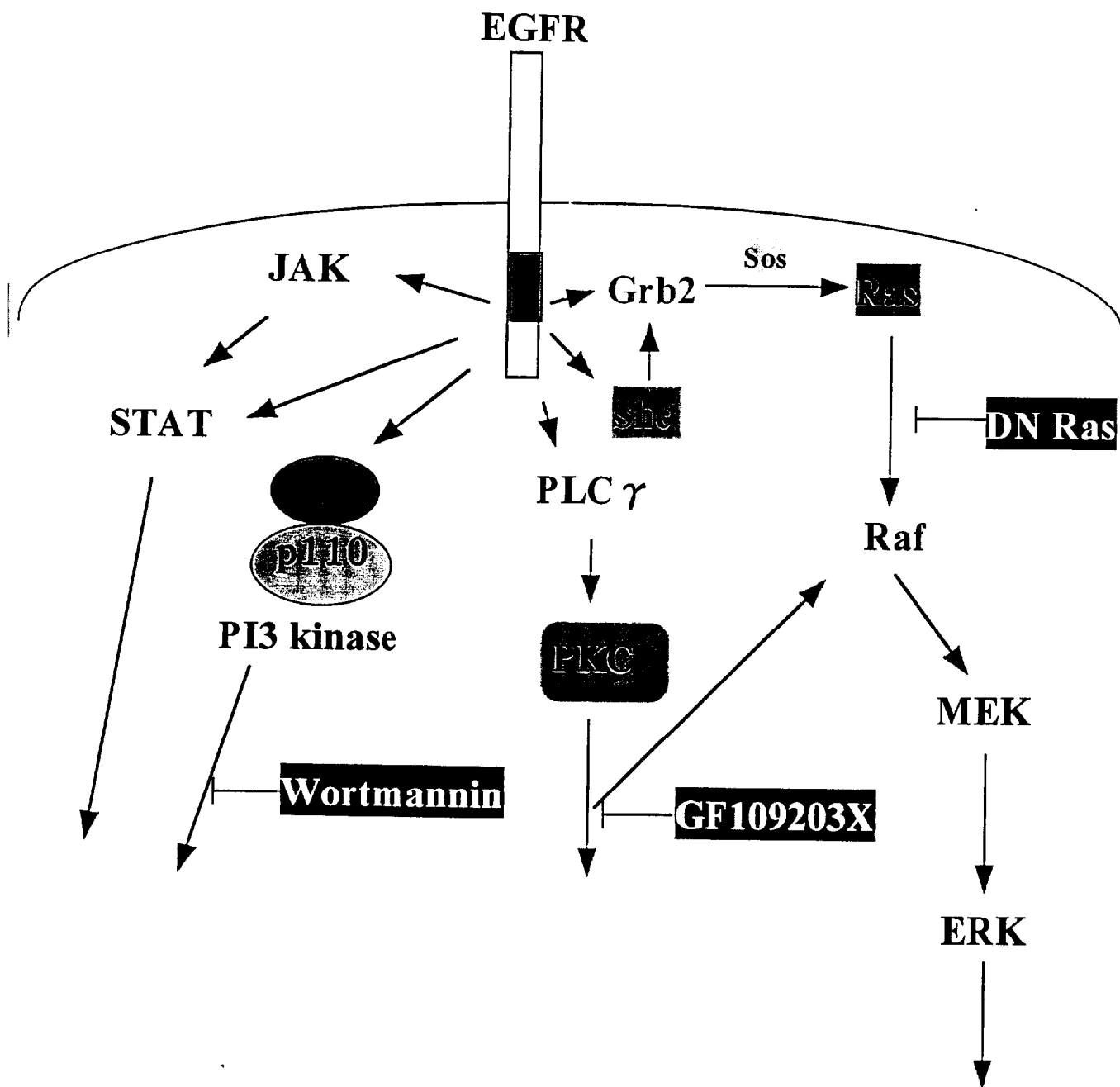
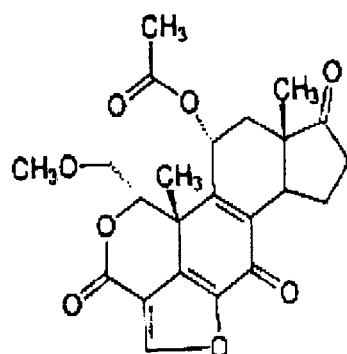
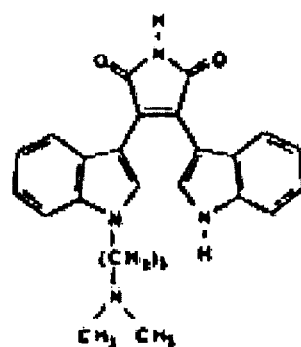


図23 EGFRからの細胞内情報伝達と阻害剤の効果



Wortmannin



GF109203X

図24 WortmanninおよびGF109206Xの化学構造

Wortmannin および GF109203X は、Sigma 社 より各々購入した。ウエスタンブロットに用いた抗リン酸化チロシン抗体(PY20)は ICN 社、抗 EGFR 抗体(6F1)は医学生物学研究所、抗 active-MAPK 抗体は Promega 社より各々購入した。また抗 MAPK 抗体、抗 p21(WAF1/Cip1)抗体は、Transduction Laboratories 社 より購入した。

2. 実験方法

2-1. 増殖活性

MTS 試験にて増殖活性を測定した。その概要については前項と同様にして行った。A431 細胞の増殖抑制を示した EGF 100ng/ml 刺激において実験を行い、薬剤処理によりその増殖抑制効果がどう変化するかについて MTS 試験により判断した。ただしここでの実験において阻害剤の処理は、EGF 刺激前 30 分とした。対照群として阻害剤の溶媒である DMSO を最終濃度 0.1%になるよう添加した実験を行った。増殖活性の比率は、DMSO 処理で EGF 刺激なしの時の吸光度を基準とした相対値として計算した。さらに得られた値において同濃度の薬剤処理における EGF 刺激ありなしの差を計算し、増殖抑制効果の指標とした。

2-2. p21(WAF1/Cip1)の発現

前項に示した方法で解析を行った。EGF の濃度は、増殖抑制を認め、p21(WAF1/Cip1)の EGF による誘導発現が顕著に認められた、100ng/ml とした。阻害剤の処理は、EGF 刺激前 30 分とした。また阻害剤の影響を考慮し、主な情報伝達分子の挙動についても検討した。対照群として阻害剤の溶媒である DMSO を最終濃度 0.1%になるよう添加した実験を行った。

(c)実験結果

1. PI 3-kinase 阻害剤 Wortmannin の効果

1-1. 増殖抑制について

EGF 100ng/ml 刺激後の増殖活性についての MTS 試験の結果を図 25A に示した。

薬剤処理を行っていることから、それが細胞に与える影響および MTS 試験の結果に及ぼす影響について考慮する必要がある。そこで EGF 刺激をせず、薬剤処理だけをしたときの増殖比率について検討した。薬剤濃度はこれまでに報告されている実験結果に基づき、その阻害効果が十分認められるとされる濃度範囲をはさんで設定した。その結果、MTS による増殖比率は、コントロールである DMSO で処理したときと比較して、ほとんど変化を認めず、また薬剤の濃度依存的な変化についても認められなかった。したがって今回実験で用いた Wortmannin の濃度範囲においては、それにより細胞に与える影響や測定への影響については、ほとんどないものと考えられた。

そこで次に EGF による増殖抑制にあたえる、Wortmannin の効果について検討した。A431 細胞の EGF による増殖抑制の比率の指標とした、EGF 刺激をしなかった場合とした場合での MTS 試験における増殖比率の差は、コントロールである DMSO 処理において約-20%であった。これに対し、Wortmannin を前処理すると、その比率の差は Wortmannin の濃度によらずほぼ-20%となり、コントロールの時の値と比較して変化が認められなかった。

1-2. p21(WAF1/Cip1)の誘導発現

Wortmannin 100nM を前処理し、EGF 100ng/ml 刺激後の p21(WAF1/Cip1)の発現の結果を図 26 に示す。

薬剤処理による EGFR や MAPK のタンパク質量やそのリン酸化については、DMSO 処理と比較して変化が認められなかった。

p21(WAF1/Cip1)の誘導発現についても、DMSO 処理との差はなかった。つまり EGF 刺激 2 時間後で発現が認められ、刺激 24 時間後まで持続していた。

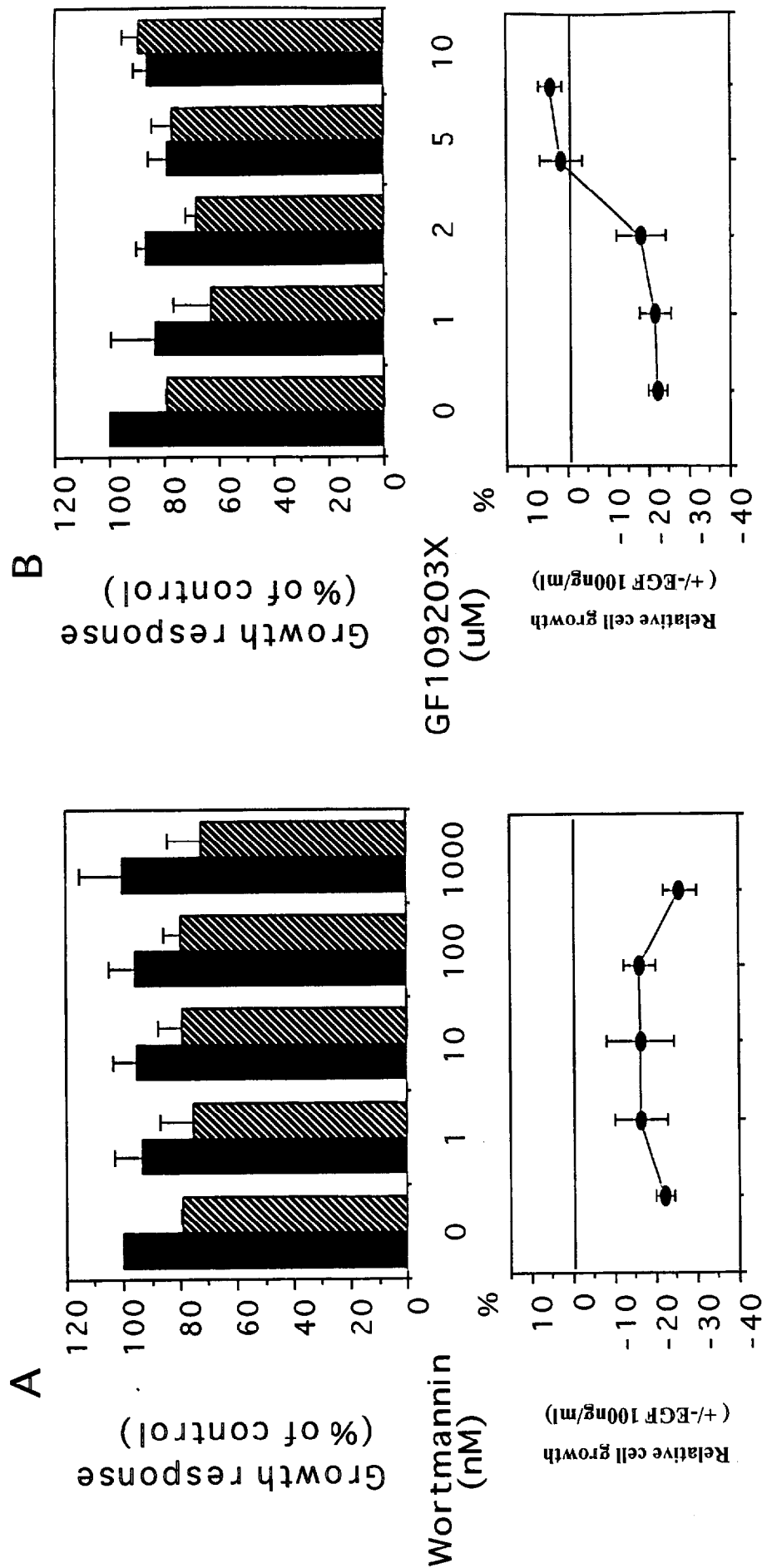


図25 EGFによる増殖抑制に対するWortmanninおよびGF109203Xの効果

A431細胞にWortmannin(A)またはGF109203X(B)を30分処理し、EGF 100ng/ml 刺激後の細胞増殖活性をMTS試験にて計測した。DMSOで処理したもの(薬剤濃度 0)をコントロールとした。■、EGF minus; ▨、EGF 100ng/ml. 下のグラフはEGF刺激なしありの時の増殖比率の差における薬剤濃度依存性.

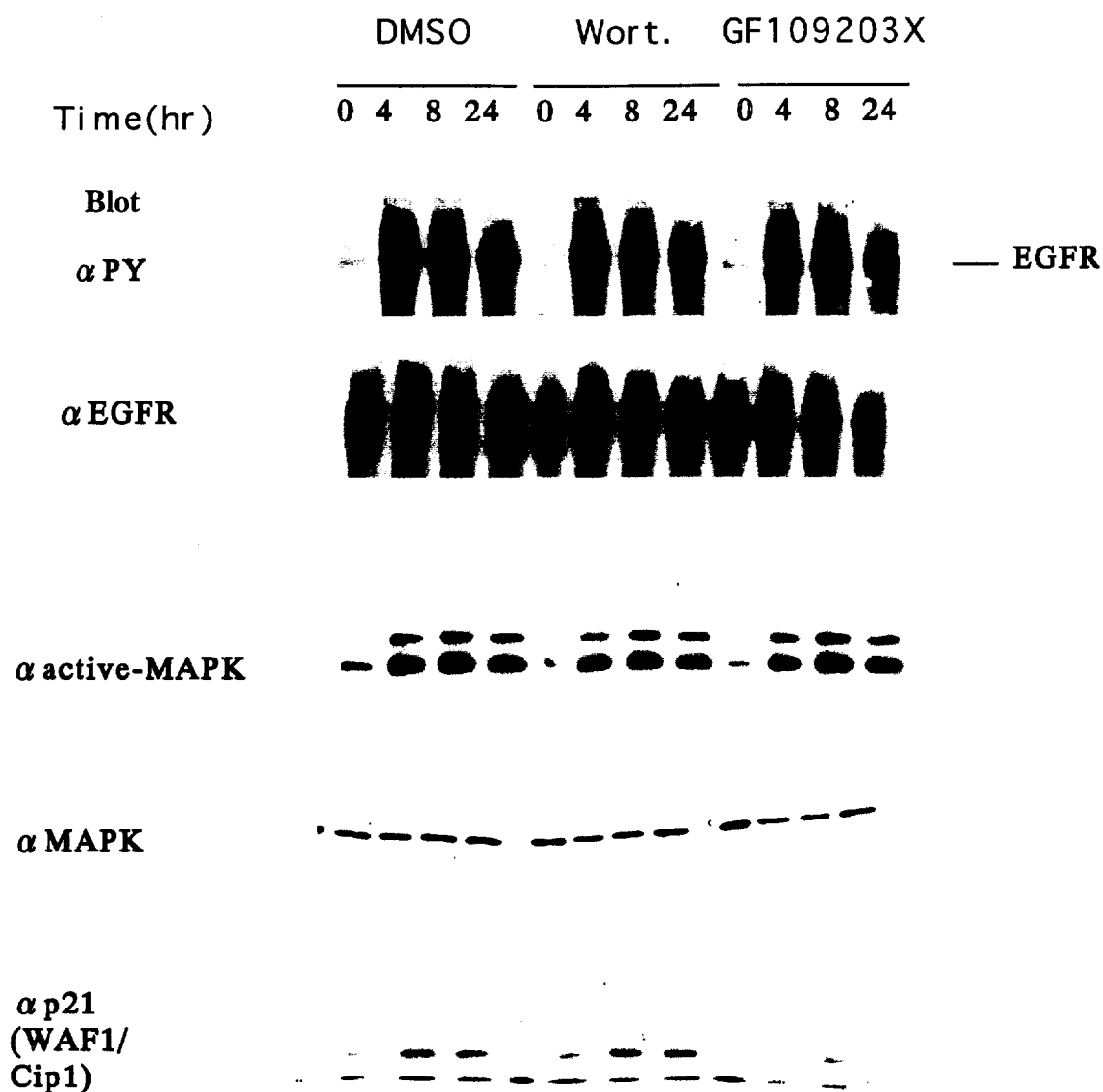


図26 GF109203XはEGFによるp21(WAF1/Cip1)の発現を抑制する
 A431細胞を薬剤で30分処理しEGF 100ng/ml刺激し、細胞可溶化液を
 各抗体でプロットした. DMSO, final 0.1%; Wortmannin(Wort.), 100nM;
 GF109203X, 5 μ M

2. PKC 阻害剤 GF109203X の効果

2-1. 増殖抑制について

EGF 100ng/ml 刺激後の増殖活性についての MTS 試験の結果を図 25B に示した。

薬剤処理に伴う細胞に与える影響および MTS 試験の結果に及ぼす影響について検討した。薬剤濃度はこれまでに報告されている実験結果に基づき、その阻害効果が十分認められるとされる濃度範囲をはさんで設定した。その結果、MTS による増殖比率は、コントロールである DMSO で処理したときと比較して薬剤処理にともないやや低下傾向を示したものの、薬剤の濃度依存的な変化については認められなかった。したがって今回実験で用いた GF109203X の濃度範囲においては、それにより細胞に与える影響や測定への影響については、大きなものではないと考えられた。

そこで EGF による増殖抑制における GF109203X の効果について検討した。EGF 刺激なしとありのときの増殖比率の差は、GF109203X 処理においてその濃度が、2 μ M までは、約-20%と DMSO 処理の時と変化が認められなかった。しかし GF109203X 5 および 10 μ M を前処理した場合は、それぞれ +1.4、+4.0%となった。これは、GF109203X 5 μ M 以上の処理により、A431 細胞の EGF による増殖抑制が解除されたことを示している。

このことは PKC が増殖抑制に関与していることを示唆するものであった。そこで今回の PKC の関与する増殖抑制機構が、p21(WAF1/Cip1)の誘導発現と関係があるかどうかについて、EGF による増殖抑制を十分解除したと考えられる薬剤濃度を処理したときの p21(WAF1/Cip1)の発現をウエスタンブロットにて解析した。

2-2. p21(WAF1/Cip1)の誘導発現について

2-1 項で増殖抑制の解除が認められた 5 μ M GF109203X を前処理し、EGF 100ng/ml 刺激後の p21(WAF1/Cip1)の発現の結果を図 26 に示した。

薬剤処理による EGFR や MAPK のタンパク質量およびそのリン酸化には、DMSO 処理の時と比較し、違いは認められなかった。

p21(WAF1/Cip1)については、GF109203X 5 μ M 処理で、EGF による誘導発現は、DMSO 処理では認められた、刺激後 2、4、24 時間いずれにおいてもほとんど認められなかった。

(c)考察

今回の結果は A431 細胞の EGF による増殖抑制または解除と p21(WAF1/Cip1)の発現またはその抑制が、相関していることを示すものであった。

A431 細胞において EGF による p21(WAF1/Cip1)の誘導発現および増殖抑制が、どのような機構で引き起こされているのかについての詳細は明らかになっていない。EGF 刺激に伴い EGFR から様々な細胞内情報伝達が引き起こされる(図 3)。一般に、こうした一連の反応は複雑でありその一部を特にとりだし議論をすすめることは難しい。そこでこうした場合よく薬剤が使われる。ここ数年でさまざまな分子についての活性を、特異的に促進あるいは抑制する薬剤が開発されてきている。さらにはその機構についても明らかにされつつある薬剤もある。そこで EGF による増殖抑制について EGFR からの主要な経路と考えられ、そこに関与する情報分子を特異的に阻害しまたその効果が広く知られている薬剤を用い検討した。

PI3-kinase 阻害剤 Wortmannin や PKC 阻害剤である GF109203X はそうした薬剤の一つであった。

A431 細胞に Wortmannin を処理しても EGF による増殖抑制に効果はなかった。NIH3T3 細胞や A431 細胞では、EGF による PI3-kinase の活性化は、PDGF 等に比較して弱いことが知られている。EGF による p21(WAF1/Cip1)の発現や増殖抑制に対してもその寄与は大きなものでないと考えられた。

一方 GF109203X で処理すると、EGF による p21(WAF1/Cip1)の発現や増殖

抑制に対しその効果を解除した。解除が認められた GF109203X の濃度は、これまで報告があったこの薬剤の PKC に対する IC_{50} 値にほぼ等しいものであった。

PKC の情報伝達については様々な細胞系において研究が行われ、その重要性が指摘されてはいるが、その詳細な機構についてはほとんど明らかにされていない。したがって今回の A431 細胞での EGF による増殖抑制における PKC の関与への示唆は PKC の情報伝達機構を考える上でよい実験系になると考えられた。

EGFR と直接結合し、活性化を受ける分子としては $PLC\gamma$ が知られている。この $PLC\gamma$ についてその阻害剤(U73122)を用いた検討も行った。しかしこの薬剤はその特異性がやや広く、また細胞に対する影響が大きかったため、その下流にあるとされる PKC をターゲットとした薬剤を選択した。

薬剤処理にはターゲット分子に対する効果以外の影響を細胞に与えることが考えられる。今回の試験においても薬剤の測定に与える影響や、細胞の形態や生化学的な側面への影響には注意した。その結果確認した範囲内においては影響はないものと考えられた。

Ⅲ. A431 細胞の EGF による増殖抑制における conventional PKC inhibitor および PKC δ inhibitor の効果

(a)はじめに

前項において、A431 細胞の EGF による p21(WAF1/Cip1)の発現および増殖抑制における PKC の関与が示唆された。

PKC はファミリーをもち、これまでに十数種類が知られている。これらは構造的、機能的に 3 タイプに分けられる。すなわち、conventional PKCs (cPKCs), novel PKCs (nPKCs), atypical PKC (aPKCs)である(図 27)。cPKCs は、diacylglycerol (DAG), Ca²⁺依存的な、nPKCs は Ca²⁺非依存、DAG 依存、また aPKCs は Ca²⁺, DAG 非依存な活性化をおこすことが知られている(64-66)。

これまでの研究から aPKCs 活性化の上流には PI 3-kinase が関与していることが報告されている。前項の結果から A431 細胞の EGF による p21(WAF1/Cip1)の発現および増殖抑制にこのタイプの PKC が関与している可能性は小さいと考えられた。一方増殖解除を示した GF109203X は、cPKCs および nPKCs の阻害剤として働くことが報告されている(63)。つまりこれらのサブタイプのいずれかが、p21(WAF1/Cip1)の発現ならびに増殖抑制における情報伝達経路に関与していることが考えられた。

PKC の情報伝達機構に関しては、その重要性は指摘されているにもかかわらず、今だ混沌とした状況にある。したがってこれらのどのタイプが A431 細胞の EGF による増殖抑制に重要な役割を担っているかについての検討は、PKC の情報伝達分子としての役割を理解する上でも重要であると考えられた。

そこで前項と同様に情報伝達分子特異的阻害剤をもちいて、関与するサブタイプを絞るための検討を行った。これまで知られている PKC のサブタイプ特異的阻害剤のうち、今回実験に用いたのは Gö6976 と Rottlerin(図 28)である。Gö6976 は、cPKCs を、また Rottlerin は nPKCs のうち PKC δ を、それぞれ特異的に阻害することが報告されている(67,68)。

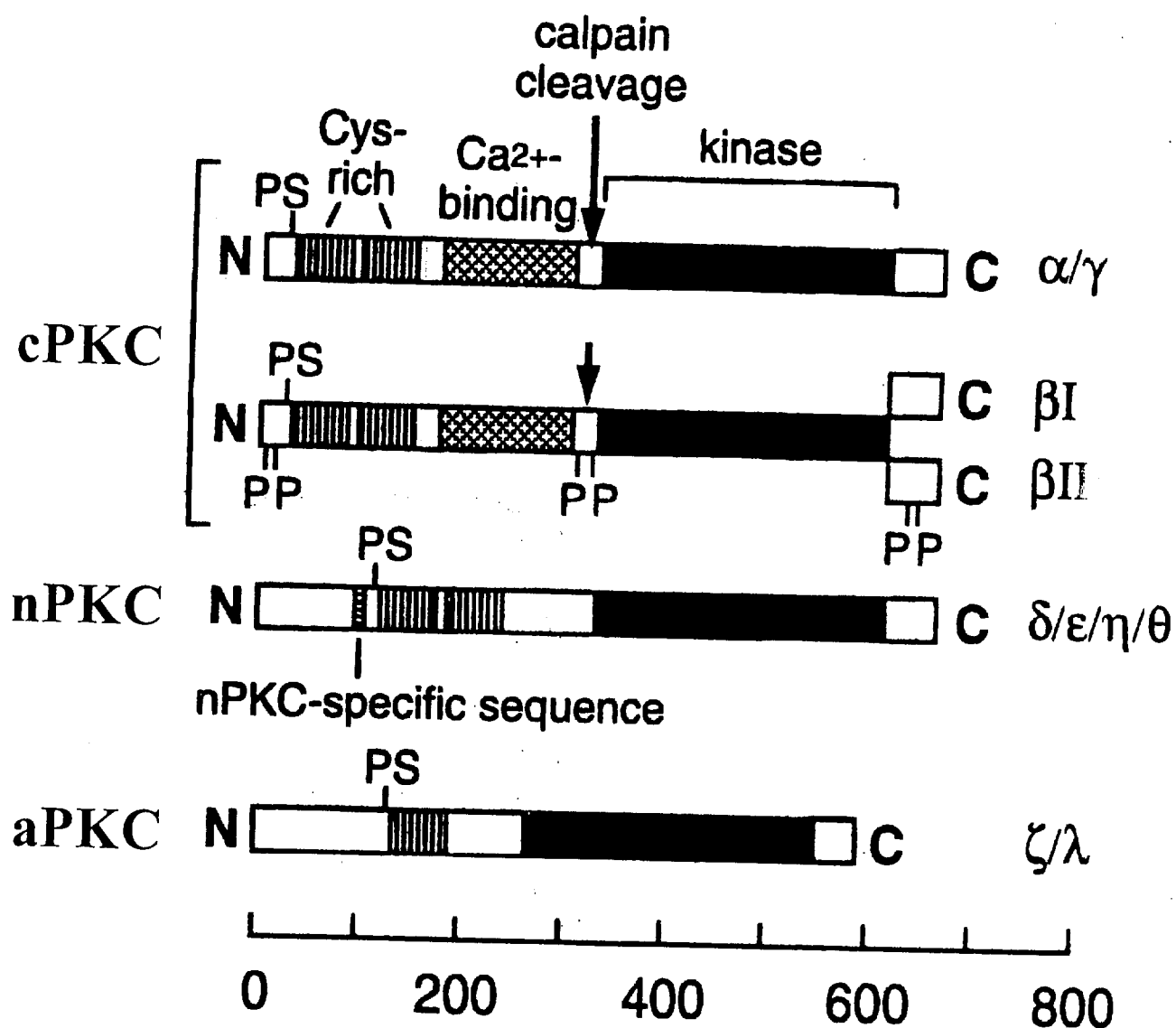
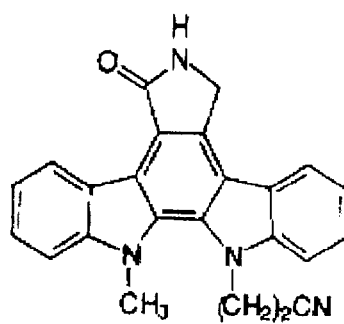
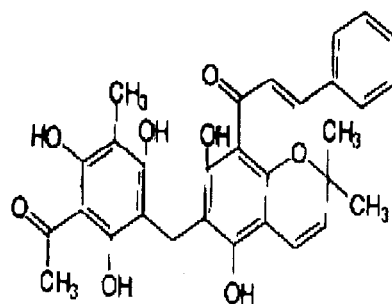


図27 Protein kinase Cのサブファミリーと構造
 cPKC、conventional PKC; nPKC、novel PKC;
 aPKC、atypical PKC; PS、偽塩基配列。



Gö6976



Rottlerin

図28 Gö6976およびRottlerinの化学構造

(b)実験材料と実験方法

1. 実験材料

Gö6976 および Rottlerin は、Carbiochem 社 より各々購入した。抗リン酸化チロシン抗体(PY20)は ICN 社、抗 EGFR 抗体(6F1)は医学生物学研究所、抗 active-MAPK 抗体は Promega 社より各々購入した。抗 PLC- γ 抗体および免疫沈降に用いた抗 Shc 抗体は、UBI より購入した。ウエスタンブロットに用いた抗 Shc 抗体、抗 MAPK 抗体および抗 p21(WAF1/Cip1)抗体は、Transduction Laboratories 社 より購入した。

2. 実験方法

Ⅱ 項と同様である。

(c)実験結果

1. cPKC 阻害剤 Gö6976 の効果

1-1. 増殖抑制について

EGF100ng/ml 刺激後の増殖活性についての MTS 試験の結果を図 29A に示した。

薬剤処理を行っていることから、それが細胞に与える影響および MTS 試験の結果に及ぼす影響について考慮する必要がある。そこで EGF 刺激をせず、薬剤処理だけをしたときの増殖比率について検討した。薬剤濃度はこれまでに報告されている実験結果に基づき、その阻害効果が十分認められるとされる濃度範囲をはさんで設定した。その結果、MTS による増殖比率は、コントロールである DMSO で処理したときと比較して、ほとんど変化を認めず、また薬剤の濃度依存的な変化についても認められなかった。したがって今回実験で用いた Gö6976 の濃度範囲においては、それにより細胞に与える影響や測定への影響については、ほとんどないものと考えられた。

そこで次に EGF による増殖抑制にあたえる、Gö6976 の効果について検討し

た。A431 細胞の EGF による増殖抑制の比率の指標とした、EGF 刺激をしなかった場合とした場合での MTS 試験における増殖比率の差は、コントロールである DMSO 処理において約-20%であった。これに対し、Gö6976 を前処理すると、その比率の差は Gö6976 の濃度によらずほぼ-20%となり、コントロールの時の値と比較して変化が認められなかった。

これは、A431 細胞における EGF による増殖抑制には、cPKCs は関与していないことを示唆するものであった。

1-2. p21(WAF1/Cip1)の誘導発現

Gö6976 50nM を前処理し、EGF 100ng/ml 刺激後の p21(WAF1/Cip1)の発現の結果を図 30 に示した。

薬剤処理による EGFR や MAPK のタンパク質量やそのリン酸化には、DMSO 処理のときと比較して違いが認められなかった。また、PLC- γ や Shc のリン酸化についても検討したが、いずれも EGF 刺激依存的なリン酸化が認められ、今回実験で用いた濃度範囲においては、細胞の薬剤による影響は小さいものと考えられた。

p21(WAF1/Cip1)については、EGF 刺激後 2 時間でその発現が確認でき、それは刺激後 24 時間まで持続していた。これは、DMSO 処理のときの経時変化と違いは認められた。

前項の結果とあわせて、増殖抑制に関与する PKC は、conventional type とは異なる PKC ファミリーであることが明らかとなった。

2. PKC δ 阻害剤 Rottlerin の効果

2-1. 増殖抑制について

EGF 100ng/ml 刺激後の増殖活性についての MTS 試験の結果を図 29B に示した。

薬剤処理に伴う細胞に与える影響および MTS 試験の結果に及ぼす影響に

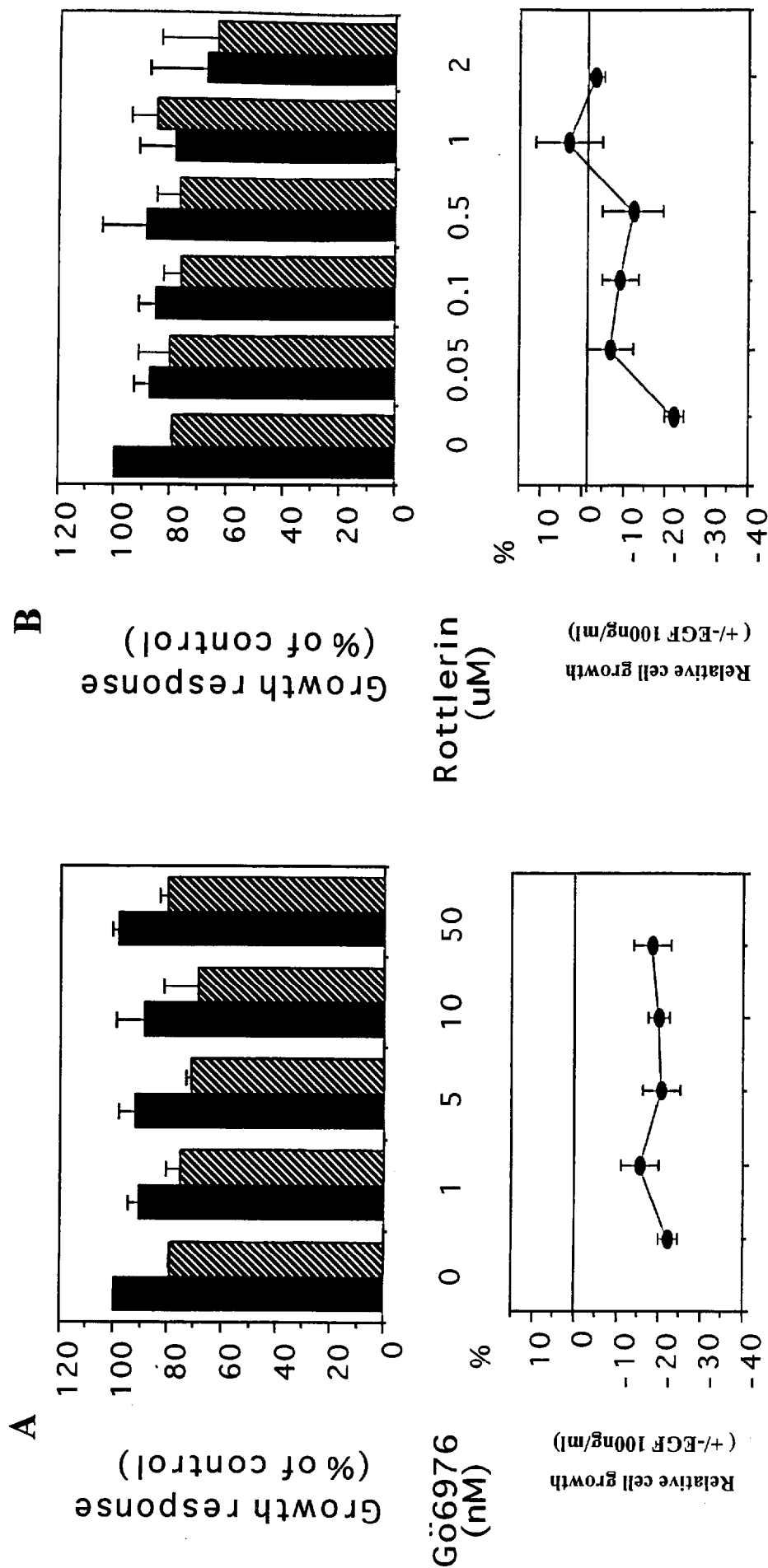


図29 EGFによる増殖抑制に対するGö6976およびRottlerinの効果

A431細胞にGö6976(A)またはRottlerin(B)を30分処理し、EGF 100ng/ml 刺激後の細胞増殖活性をMTS試験にて計測した。DMSOで処理したもの(薬剤濃度 0)をコントロールとした。■、EGF minus; ▨、EGF plus; 100ng/ml. 下のグラフはEGF刺激なしありの時の増殖比率の差における薬剤濃度依存性.

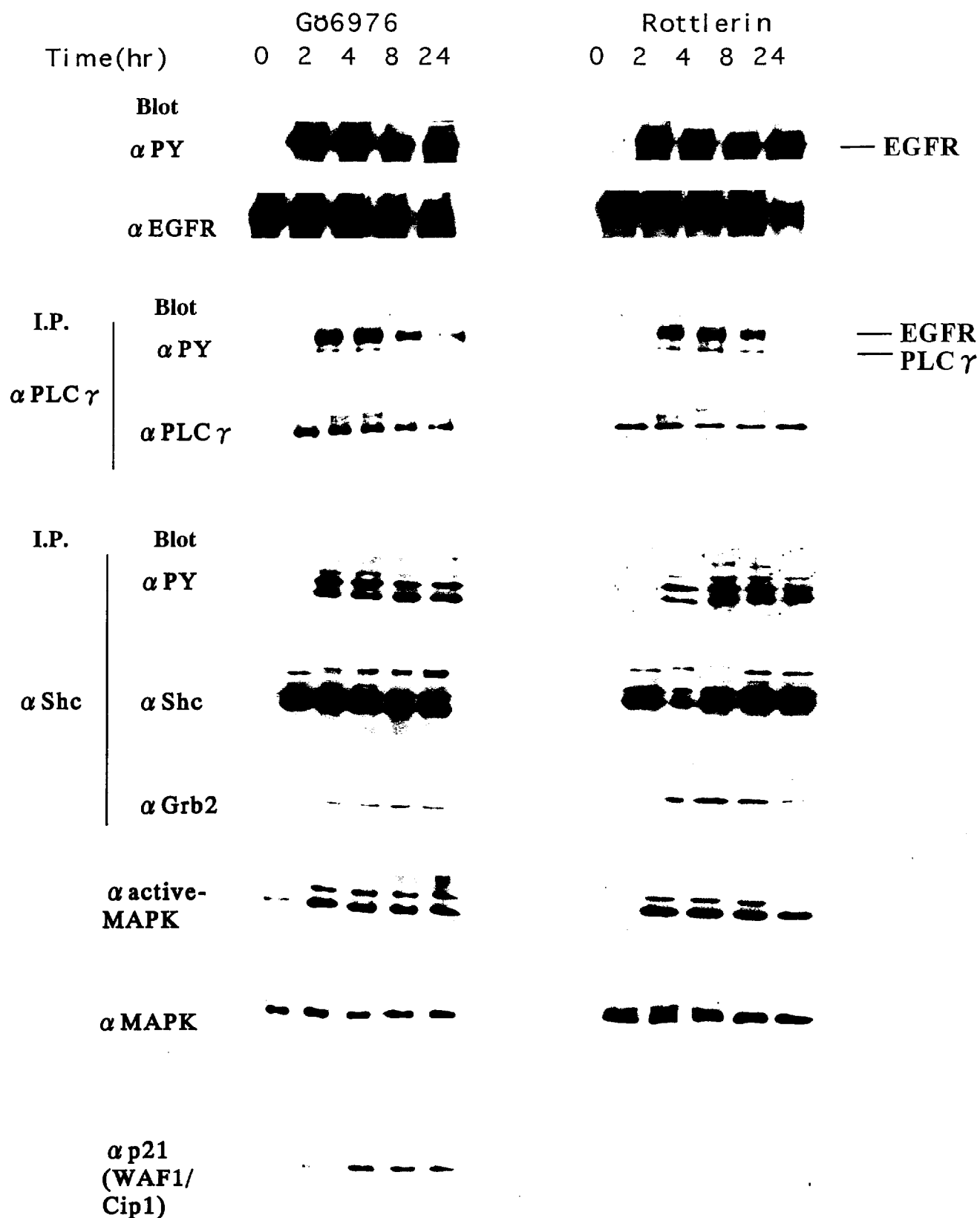


図30 RottlerinはEGFによるp21(WAF1/Cip1)の発現を抑制する
 A431細胞を薬剤で30分処理しEGF 100ng/ml刺激し、細胞可溶
 化液を各抗体でプロットした。また一部は、抗Shc抗体および
 抗PLC γ 抗体で免疫沈降し、各抗体でプロットした。

について検討した。薬剤濃度はこれまでに報告されている実験結果に基づき、その阻害効果が十分認められるとされる濃度範囲をはさんで設定した。その結果、MTS による増殖比率は、コントロールである DMSO で処理したときと比較して薬剤処理にともないやや低下傾向を示したものの、薬剤の濃度依存的な変化は、1 μ M までの濃度範囲については認められなかった。ただし Rottlerin 2 μ M 処理に関しては、細胞や測定に与える影響が大きいものと考えられた。それは細胞そのものの状態がかなり悪く、MTS における増殖比率が薬剤未処理と比較し約 65%と低く、またこれより低い濃度の薬剤を処理したときと比較しても約 15%も低くなっており、さらに測定値そのものもやや幅が広く信頼性にかけている点が上げられる。したがって今回実験で用いた Rottlerin の濃度範囲では、1 μ M までについては細胞に与える影響や測定への影響については、大きなものではないと考えられた。

そこで次に EGF による増殖抑制における Rottlerin の効果について検討した。EGF 刺激なしとありのときの増殖比率の差は、Rottlerin 処理においてその濃度が 0.05 μ M の低濃度処理より、DMSO 処理の時と比較し小さくなり、Rottlerin 1 μ M を前処理した場合は、+4.3%となった。これは、Rottlerin 処理により、A431 細胞の EGF による増殖抑制が解除されたことを示している。

そこで PKC δ の関与する増殖抑制機構が、p21(WAF1/Cip1)の誘導発現と関係があるかどうかについて検討した。EGF による増殖抑制を十分解除したと考えられた薬剤濃度を処理したときの p21(WAF1/Cip1)の発現をウエスタンブロットにて解析した。

2-2. p21(WAF1/Cip1)の誘導発現

2-1 項で増殖抑制の解除が認められた 1 μ M Rottlerin を前処理し、EGF100ng/ml 刺激後の p21(WAF1/Cip1)の発現の結果を図 30 に示した。

薬剤処理による EGFR や MAPK のタンパク質量やそのリン酸化には、DMSO 処理のときと比較して違いが認められなかった。また、PLC- γ や Shc

のリン酸化についても検討したが、いずれも EGF 刺激依存的なリン酸化が認められ、薬剤による影響はないと考えられた。

EGF による p21(WAF1/Cip1)の誘導発現は、DMSO 処理では認められた、刺激後 2、4、24 時間いずれにおいても 1 μ M Rottlerin を処理することで、ほとんど認められなくなった。

この結果、A431 細胞における EGF による細胞増殖抑制に PKC、特に PKC δ が関与していることが示唆された。

(d)考察

PKC にはこれまでに十数種類のサブファミリーが知られている。これらは細胞内でそれぞれ異なった情報伝達に関与し、また生物学的意義を有していると考えられている。

PKC の活性化の機序については、(a)で大まかに述べた。更に付け加えると nPKCs のうち ϵ , η および aPKCs は、PI3-kinase 産物により活性化される。前Ⅲ項の結果で PI3-kinase 阻害剤に対し EGF による A431 細胞の増殖抑制効果はほとんど影響しなかったことから、ここには他のサブタイプ、すなわち cPKC または PKC δ か θ が関与していると考えられた。

本項の実験の結果 EGF による A431 細胞の増殖抑制効果には、cPKC の関与は小さいと考えられ、一方 PKC δ については関与が強く示唆されることが明らかとなった。また PKC θ についてはそれを特異的に阻害する薬剤が見つけられなかったためその関与はわからない。しかし PKC δ を阻害した場合に得られた p21(WAF1/Cip1)の発現抑制ならびに細胞増殖抑制解除の効果が、GF109203X での効果にほぼ見合うと考えられることから、PKC θ の関与の可能性はそれほど大きくないのではないかと思われた。

PKC は、活性化されると膜画分に移行し(69)、PKC δ もそのことが活性化の指標となっている。実際、EGF 刺激にともない細胞質画分から膜画分への移行は認められた(未発表)。しかしこれまでのところ EGF の濃度依存的な膜移

行性や時間経過の違い等については十分なデータは得られていない。さらに PKC δ はその活性化にチロシンリン酸化が関係しているといわれている(70-72)。したがって、A431 細胞において PKC δ が EGF 刺激にともなってどのような細胞内局在を起こすのか、それとチロシンリン酸化との関係、そして p21(WAF1/Cip1)発現誘導への経路にどのような形で関与しているかについては今後の課題といえる。

IV. A431 細胞の EGF による増殖抑制におけるドミナントネガティブ Ras の効果

(a)はじめに

これまでに A431 細胞の EGF による p21(WAF1/Cip1)の発現および増殖抑制に PKC が関与していることが示唆された。

PKC の細胞内情報伝達については、その下流で相互作用する分子がようやくわかりかけてきたところであり、それらがどのような役割があるのかについての詳細についてはほとんど明らかになっていない。こうした中、PKC が関与する唯一明らかにされている情報伝達経路は、活性化した PKC が Raf を直接活性化し、そこを介して MAPK(mitogen-activated protein kinase)を活性化する経路である。

EGFR からの MAPK 活性化の経路は、主なものとして Ras を介した経路がある。そこで、A431 細胞の EGF による増殖抑制に MAPK 経路がどの程度関与しているかどうか、また PKC からの経路と Ras からの経路からの MAPK 活性化の役割に差があるのかどうかについて検討した。

Ras 経路からの情報伝達をとめるために、ドミナントネガティブ(DN)の Ras を発現させることとした(図 23)。Ras の DN については、17 番目のアミノ酸をセリン残基からアスパラギン残基に置換させた 17N-Ras が良く知られている(73)。また発現には、ほぼ 100%の細胞に外来遺伝子を組み込むことが出来るアデノウイルスベクターをもちいることとした。

そこで A431 細胞に DN-Ras を組み込んだアデノウイルスベクターを感染させ、EGF による p21(WAF1/Cip1)の発現の誘導を見た。

(b)実験材料と実験方法

1. 実験材料

ドミナントネガティブ Ki-Ras を発現させるアデノウイルスベクターは、山口大学教授岡芳知博士ならびに東京大学片桐秀樹博士より供与していただいた(74)。

2. 実験方法

2-1.DN-Ras の発現

A431 細胞を 6cm プレート約 60%飽和状態まで培養し、DN-Ras を含む培養液にて、100 m.o.i.で室温 1 時間感染させた。感染後 48 時間に、0.5%FCS 含有 DMEM にて一晩飢餓状態とし、EGF にて刺激した。細胞は、PBS にて洗浄後、lysis buffer で可溶化し、4℃にて超音波処理をした。微量高速遠心機で 15000rpm、10 分間遠心し、その上清を実験に使用した。上清中のタンパク質量は、Bio-rad protein assay kit (Bio Rad 社) にて定量した。10 または 20 μ g サンプルに 1/4 量の 5x sample buffer を加え煮沸後、SDS-PAGE にて分離し、ウエスタンブロット法にて解析した。対照群として β -galactosidase (LacZ) 発現するアデノウイルスベクターを感染させた実験を行った。

2-2.ウエスタンブロット

第 3 章 I 項同項目参照

(c)実験結果

A431 細胞に DN-Ras を発現するアデノウイルスベクターを感染させ、EGF 100ng/ml で刺激した。

感染後の Ras の発現は、コントロールとした LacZ を発現するアデノウイルスベクターを感染させた時と比較し、タンパク質レベルで 10 倍以上であり、EGF 刺激後もその発現の変化は認められなかった(図 31)。このとき EGF 刺激後の MAPK のリン酸化は、LacZ 感染細胞においては十分認められたのに対し、DN-Ras 感染細胞においては、EGF 刺激 2 時間後にわずかに認められたものの、それ以後はほとんど認められなかった(図 31)。

p21(WAF1/Cip1)については、LacZ、DN-Ras いずれの感染細胞も、EGF 刺激後 2 時間でその発現が認められ、刺激後 24 時間まで持続していることが確認された(図 31)。

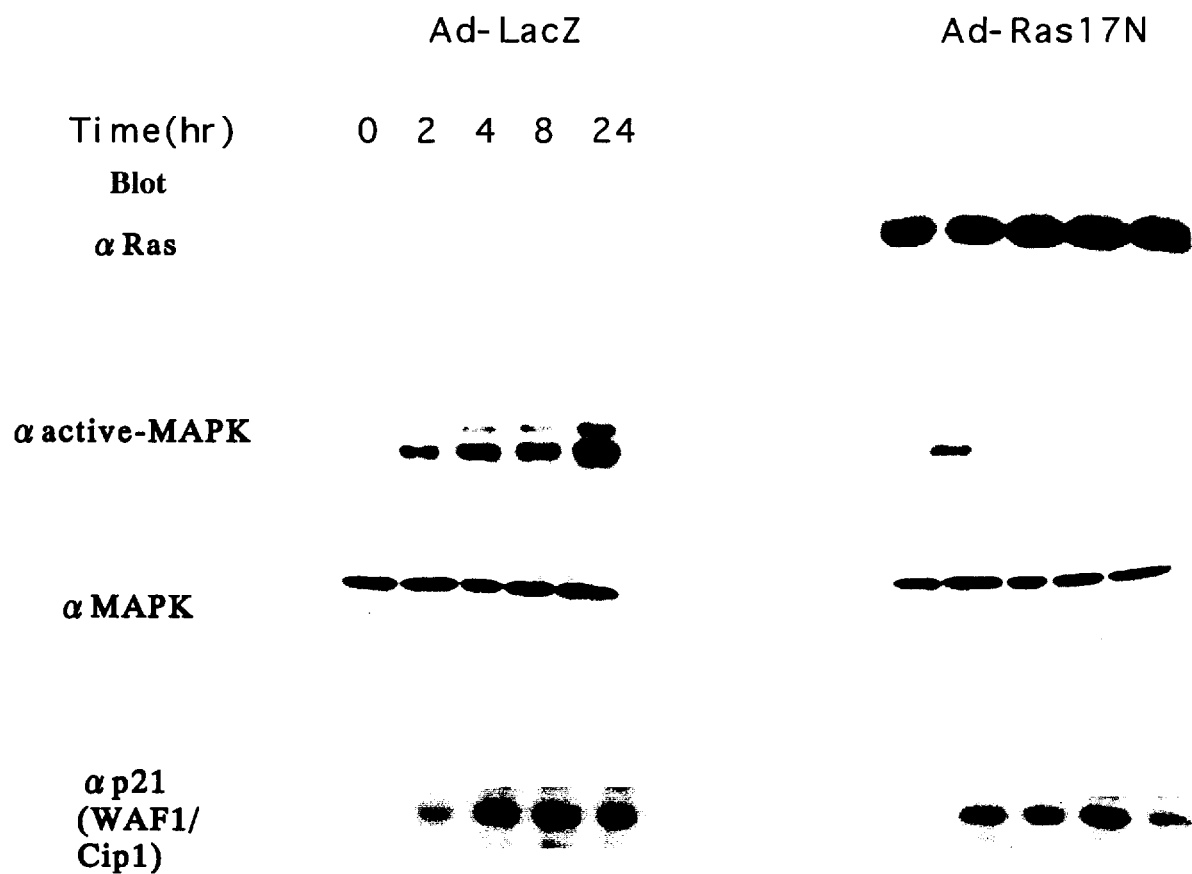


図31 DN-Rasの発現によって、p21(WAF1/Cip1)の発現は抑制されない
 A431細胞にDN-Ras発現アデノウイルスを感染させ、EGF刺激後の
 p21(WAF1/Cip1)の発現をウエスタンブロットにて解析した。
 コントロールとしてLacZ発現アデノウイルスを感染させた細胞を用いた。

(d)考察

PKC が Raf-1 を介して MAPK を活性化しているという報告が最近相次いで出されている(74-79)。PKC は、ホルボールエステルなどの刺激により活性化し、Raf-1 を活性化するという報告がある(74)。このとき Raf-1 のチロシンリン酸化は起こらずいくつかのセリン、スレオニン残基がリン酸化される。また Kolch らは PKC α が無細胞系で Raf-1 の 499 番目のセリン残基がリン酸化し活性化していると報告している(75)。また PKC δ が非 Ras 依存的に Raf-1 の活性化を促進しているという報告がある(76)。このように PKC を介した Raf-1 の活性化はセリン残基のリン酸化によって制御されていると考えられている。

一方 MAPK の活性化には、Ras を介した経路がある。Ras は Raf を介して MAPK を活性化している。このときの Raf-1 の活性化は Src など細胞膜に存在する分子によって活性化を受けると考えられている(80,81)。このとき Raf-1 は 340/341Y がリン酸化を受けていることが報告されている。また最近 Ras 依存的に Raf-1 を活性化している活性化因子が細胞質に存在している可能性が報告されている(82,83)。

Raf-1 の活性化の機構についてはまだ良くわかっていないが、Ras からと PKC からではその活性化機構が違うことも考えられる。それが MAPK の活性化にどの程度関与しているかは全くわからない。

さらに p21(WAF1/Cip1)の発現誘導に MAPK 経路の関与が報告され(84-86)、また A431 細胞では EGF による増殖活性と増殖抑制の時で MAPK の時間経過が異なることが報告されている(87)。

このことを確認するため DN-Ras を発現させて実験を行った。その結果、A431 細胞では EGF 刺激による MAPK の活性化は、Ras を介した経路が主要であり PKC からの寄与はそれほど大きくないことが示唆された。一方 p21(WAF1/Cip1)の発現は、DN-Ras の発現による影響ほとんどはなかった。

したがってこの結果は PKC δ を介した p21(WAF1/Cip1)の誘導発現が、MAPK 経路とは独立した経路で起こることを強く示唆するものであった。

V. まとめ

本章では A431 細胞における EGF による増殖抑制機構について検討した。

その結果これまで不明であった EGFR から p21(WAF1/Cip1)に至る細胞内情報伝達に PKC、とくに PKC δ が関与していることを明らかにした。しかし今回の実験では PKC がどのような経路を有し p21(WAF1/Cip1)の発現を誘導しているかについては、MAPK とは独立した経路が関与していること以外は不明であった。

本実験では、薬剤を用いた検討を中心とした。薬剤は細胞に対してさまざまな影響があると考えられる。今回の検討ではおおよそその影響はないと思われたが、目に見えないところでの影響については判断のしようがない。したがって今後情報伝達分子の相互作用などの詳細を見ていくには、薬剤を用いての系はできるだけ避けたほうがよい。そこで薬剤を用いない系で分子レベルでの解析を行い、今回得られた結果をより確実なものにしなければならないと思われる。

A431 細胞の p21(WAF1/Cip1)の発現、増殖抑制機構に STAT1 の関与が報告されている(88-91)。p21(WAF1/Cip1)遺伝子のプロモーター領域に STAT-responce element が存在していることがわかっており、その転写活性化に関与しているといわれている。一方 PKC はその STAT の活性化を制御しているという報告がある(70)。また最近 c-Abl によって活性化された PKC δ が核へ移行するという報告があった(72)。

このように PKC δ に関する情報伝達や p21(WAF1/Cip1)の発現に関しては、いまだ不確定な要素が多い。こうした報告や今回の実験結果から考えられる A431 細胞の p21(WAF1/Cip1)の発現、増殖抑制機構をまとめると図 32 のようになる。PKC δ が STAT と直接または間接的に関与しているのか、とすればそれは細胞質かそれとも核で起こっているのか。またはそれぞれが独立した経路として p21(WAF1/Cip1)の発現に関与し、そのバランスが重要なのか。この点については今後の課題である。さらに MAPK 経路についても、その持続的活性化が

p21(WAF1/Cip1)の発現の持続性に関与していることも考えられる。したがって、これまで明らかにされてきた情報伝達経路に新たな経路の存在が加わるとともに、それぞれの経路が細胞内においてどのようなバランスを保ち、生物学的特性を引き出しているかは今後の大きな問題であり、興味あることだと思われる。

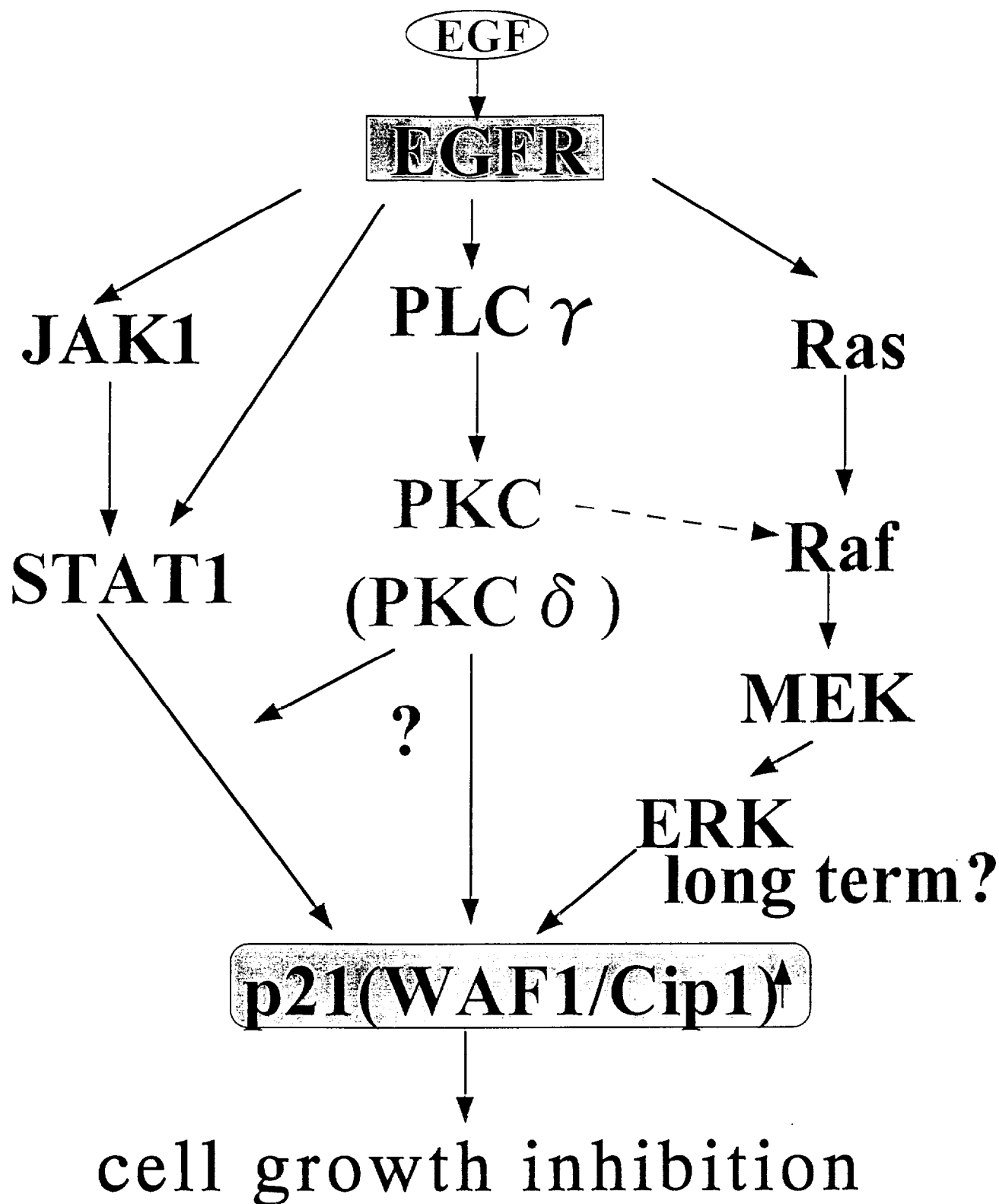


図32 A431細胞のEGFによる細胞増殖抑制における細胞内情報伝達

第4章 総括

EGFR からの細胞内情報伝達機構の解明は、他のさまざまな情報伝達系と共通性が多く認められる。こうした特性から多くの情報伝達分子が同定され、そうした分子の役割が明らかとなってきた。しかし一方で、共通の分子を持ちながら、細胞は各々組織や個体中で特異的な生理機能を発揮している。この理解のためには、各々の情報伝達分子の相互作用を理解した上で、細胞内の情報伝達が複雑なネットワークの形成について、ひとつひとつ説き明かしていくことが必要になってくる。

わたしは、そうした複雑な細胞内の情報伝達ネットワークを理解することを念頭におき、本研究を行った。

第2章では、Shc の新たなリン酸化部位を明らかにするとともに、そこからあらたな情報伝達が発していることを示した。Shc は EGFR からの情報伝達だけではなくさまざまな刺激に対し重要な役割を持っている。Shc を介するシグナルが、一見複雑にみえるネットワークの中継点として働いていることが考えられ、今回見い出した新たな情報伝達経路がどのようなタンパク質と相互作用し、生理機能と結びついてくるかについての理解への一助になるものと考えられる。

第3章では、EGF による細胞増殖抑制の機構について検討した。その結果、PKC が関与する経路が重要であることが示唆された。PKC に関する情報伝達については、いまだ混沌とした状況である。こうした中、PKC の MAPK 非依存的経路がある可能性を示した。またこれまでの報告とあわせて考えると、いまだはっきりしていない EGF 刺激による STAT シグナルとの相互作用の可能性についても考えられ、情報伝達分子の新たな相互作用とそれにとともなう、生理機能の理解へつながるものと考えられた。

以上2つの視点から EGFR の細胞内情報伝達機構を解析してきた。これらの解析から新たな情報伝達経路を見い出した。今回の情報伝達経路は、同じ EGFR からの情報伝達でありながら生物学的意義が異なる各々の細胞系において、独立したものとして得られた。これらがどのような関係を持っているか、またそ

の関係がどのような生物学的意義へと繋がっているのかについてはまだ不明である。

今回見い出した情報伝達経路については EGFR 以外のさまざまな系で利用されている可能性がある。こうした解析の進展とともに、情報伝達経路の全容が明らかとなり、生物学的意味づけがともなっていくことになるであろう。そして一見複雑に見える情報伝達ネットワークが整理され、それを基盤として、さまざまな疾患における原因の解明や副作用の少ない薬剤の開発へと繋がるものと思われる。

参考文献

1. Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212.
2. Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**, 383-391.
3. Koch, C. A., Anderson, D, Moran, M. F., Ellis, C. and Pawson T. (1991) SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668-74.
4. Pawson, T and Schlessinger J. (1993) SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol.* **3**, 434-442.
5. Ullrich, A., Coussens, L. Hayflick, J. S., Dull, T. J., Dray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D. and Seeburg, P. H. (1984) Human epidermal growth factor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature (London)* **309**, 418-424.
6. Yamamoto, T., Nisida, T., Miyajima, N., Kawai, S., Ooi, T. and Toyoshima, K. (1983) The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell* **35**, 71-78.
7. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrase, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Waterfield, M. D. (1984) Close similarity of epidermal growth factor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature (London)* **307**, 521-527.
8. Yamazaki, F., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S. and Shibuya, M. (1988) Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor (c-erbB) in human brain tumors. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1816-1820.
9. Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N. and Shibuya, M. (1990) A deletion mutation

- within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* **81** 773-779.
10. Downward, J., Parke, P. and Waterfield, M. D. (1984) *Nature* (London) Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. **311**, 483-485.
 11. Margolis, B. L., Lax, I., Kris, R., Dombalagian, M., Honegger, A. M., Howk, R., Givol, D., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1989) All autophosphorylation sites of epidermal growth factor receptor and HER/neu are located in their carboxy-terminal tails. *J. Biol. Chem.* **264**, 10667-10671.
 12. Walton, G. M., Chen, W. S., Rosenfeld, M.G. and Gill, G. N. (1990) Analysis of deletions of the carboxy terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates. *J. Biol. Chem.* **265**, 1750-1754.
 13. Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, T., Pawson, T. and Pelicci, P. G. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**, 93-104.
 14. O'Bryan, J.P., Songyang, Z., Cantley, L., Der, C. J. and Pawson, T. (1996) A mammalian adaptor protein with conserved Src homology 2 and phosphotyrosine-binding domains is related to Shc and is specifically expressed in the brain. *Proc. Natl. Acad. USA* **93**, 2729-2743.
 15. Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y., Ayusawa, D., Oishi, M. and Mori, N. (1996) N-Shc : a neural-specific adaptor molecule that mediates signaling from neutrophin / Trk to Ras / MAPK pathway. *Oncogene* **13**, 1111-1121
 16. Lai, K. M., Olivier, J. P., Gish, G. D., Henkemeyer, H., McGlade, J. and Pawson, T. (1995) A *Drosophila* Shc gene product is implicated in signaling by the DER receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4810-4818.
 17. Kavanaugh, W. M. and Williams, L., T. (1994) An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* **266**, 1862-1865.

18. Bazter, A. G., Blaikie, P., Nelson, K., Schlessinger, J. and Margolis, B. (1995) The phosphotyrosine interaction domain of Shc binds an LXNPXY motif on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7248-7256.
19. Gotoh, N., Muroya, K., Hattori, S., Nakamura, S., Chida, K. and Shibuya, M. (1995) The SH2 domain of Shc suppresses EGF-induced mitogenesis in a dominant negative manner. *Oncogene* **11**, 2525-2533.
20. Batzer, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y. and Schlessinger, J. (1994) Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5192-5201.
21. Buday, L. and Downward, J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21^{ras} through the formation of a complex with receptor, Grb2 adaptor protein, and SOS nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611-620.
22. Chardin, P., Camonis, J., Gale, W. L., Aelst, L. V., Schlessinger, J., Wigler, M. H. and Bar-Sagi, D. (1993) Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* **260**, 1338-1343.
23. Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1992) The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **7**, 431-442.
24. Matsuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A. and Takenawa, T. (1992) Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9015-9016.
25. Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. and Bowtell, D. (1993) The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSOS. *Nature (London)* **363**, 83-85.
26. Salcini, A. E., McGlade, J., Pelicci, G., Nicoletti, I., Pawson, T. and Pelicci, P. G. (1994) Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc protein. *Oncogene* **9**, 2827-2836.

27. Greenberg, M. E. and Ziff, E. B. (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature (London)* **311**, 433-437.
28. Hill, C. S. and Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals : mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199-211.
29. Marais, R., Wynne, J. and Treisman, R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**, 381-393.
30. Marshall, C. J. (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 82-89.
31. Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. and Curran, T. (1984) Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature (London)* **312**, 716-720.
32. Rollins, B. J. and Stiles, C.D. (1989) Serum inducible genes. *Adv. Cancer Res.* **53**, 1-32.
33. Gotoh, N., Tojo, A., Muroya, K., Hashimoto, S., Hattori, S., Nakamura, S., Takenawa, T., Yazaki, Y. and Shibuya, M. (1994) Epidermal growth factor-receptor mutant lacking the autophosphorylation sites induces phosphorylation of Shc protein and Shc-Grb2/Ash association and retains mitogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 167-171.
34. Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E. H., Saffran, D. C. and Witte, O. N. (1995) Alternative signals to RAS for haematopoietic transformation by BCR-ABL oncogene. *Cell* **82**, 981-988.
35. Basu, T., Warne, P. H. and Downward, J. (1994) Role of Shc in the activation of RAS in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Oncogene* **9**, 3483-3491.
36. Pawson, T. (1995) Protein modules and signaling networks. *Nature (London)* **373**, 573-580.
37. Pronk, G. J., Vries-Smith, A. M. M., Buday, L., Downward, J., Maassen, J. A.,

- Medema, R. H. and Bos, J. L. (1994) Involvement of Shc in insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21^{ras}. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1575-1581.
38. Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P. G., Schlessinger, J. and Pawson, T. (1992) Association of the Shc and Grb2/sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature (London)* **360**, 689-692.
 39. Feig, L. A. and Cooper, G. M. (1988) Inhibition of NIH3T3 cell proliferation by a mutant *ras* protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3235-3243.
 40. Mulcahy, L. S., Smith, M. R. and Stacey, D. W. (1985) Requirement of *ras* proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH3T3 cells. *Nature (London)* **313**, 241-243.
 41. Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Akiyama, T., Yamamoto, T. and Kajiro, Y. (1990) Accumulation of p21^{ras}-GTP in response to stimulation with epidermal growth factor oncogene products with tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7926-7929.
 42. Szeberénge, H. C. J. and Cooper, G. M. (1990) Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5314-5323.
 43. Chen, Y.-H., Grall, D., Salcini, A. E., Pelicci, P. G., Pouyssegur, J. and Van Obberghen-Schilling, E. (1996) Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J.* **15**, 1037-1044.
 44. Wary, K. K., Mainjero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E. and Giancotti, F. G. (1996) The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycles progression. *Cell* **87**, 733-743.
 45. Lanfranccone, L., Pelicci, G., Brizzi, M. F., Arouica, M. G., Casciari, C., Giuli, S.,

- Pegoraro, L., Pawson, T. and Pelicci, P.G. (1995) Overexpression of Shc protein potentiates the proliferative response to the granulocyte-macrophage colony stimulating and recruitment of Grb2/Sos and Grb2/p140 complexes to the β receptor subunit. *Oncogene* **10**, 907-917.
46. Pelicci, G., Giordano, G., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardell, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pelicci, P. G. and Comoglio, P. M. (1995) The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the *Shc* adaptor protein. *Oncogene* **10**, 1631-1638.
 47. Gotoh, N., Toyoda, M. and Shibuya, M. (1997) Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1824-1831.
 48. Gotoh, N., Tojo, A. and Shibuya, M. (1996) A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residue 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *EMBO J.* **15**, 6167-6204.
 49. van der Geer, P., Wiley, S., Gish, G. D. and Pawson, T. (1996) The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Current Biol.* **6**, 1435-1444.
 50. Thomas, D. and Bradshaw, R. A. (1997) Differential utilization of ShcA tyrosine residues and functional domains in the transduction of Epidermal growth factor-induced mitogen-activated protein kinase activation in 239T cells and Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 22293-22299.
 51. Sato, K., Gotoh, N., Otsuki, T., Kakumoto, M., Aoto, M., Tokmakov, A. A., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1997) Tyrosine residues 239 and 240 of Shc are phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent phosphorylation sites by c-Src. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 399-404.
 52. Gill, G. N. and Lazar, C. S. (1981) Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells. *Nature (London)* **293**, 305-

- 307.
53. Barnes, D. W. (1982) Epidermal growth factor inhibites growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. *J. Cell Biol.* **93**, 1-4.
 54. Filmus, J., Pollak, M. N., Cailleau, R. and Boick, R. N. (1985) MDA468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 898-905.
 55. Ennis, B. W., Valverius, E. M., Lippman, M. E., Bellot, F., Kris, R., Schlessinger, J., Masui, H., Goldenberg, A., Mendelsohn, J. and Dickson, R. B. (1989) Anti-epidermal growth factor receptor antibodies inhibit the autocrine-stimulated growth of MDA-468 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1830-1838.
 56. Fan, Z., Masui, H., Altas, I. and Mendelsohn, J. (1993) Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **53**, 4322-4328.
 57. Gulli, L.F., Palmer, K. C., Chen, Y. Q., and Reddy, K. B. (1996) Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ.* **7**, 173-178.
 58. Fan, Z., Lu, Y., Wu, X., DeBlasio, A., Koff, A. and Mendelsohn, J. (1995) Prolonged induction of p21^{Cip1/WAF1}/CDK2/PCNA complex by epidermal growth factor receptor activation mediates ligand-induced A431 cell growth inhibition. *J. Cell Biol.* **131**, 235-242.
 59. Jakus, J. and Yeudall, W. A. (1996) Growth inhibitory concentrations of EGF induce p21(WAF1/Cip1) and alter cell cycle control in squamous carcinoma cells. *Oncogene* **12**, 2369-2376.
 60. Ohtsubo, M., Gamou, S., and Shimizu, N. (1998) Antisense oligonucleotide of *WAF1* gene prevents EGF-induced cell-cycle arrest in A431 cells. *Oncogene* **16**, 797-802.

61. Kwok, T. T., Mok, C. H. and Menton-Brennan, L. (1994) Up-regulation of a mutant form of p53 by doxorubicin in human squamous carcinoma cells. *Cancer Res.* **54**, 2834-2836.
62. Michieli, P., Chedid, M. Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, M. E. and Givol, D. (1994) Induction of WAF1 / CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* **54**, 3391-3395 .
63. Toullec, D., Pianerri, P., Coste, H., Bellevenue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D. and Kirilovsky, J. (1991) The bisindolylmaleimide GF109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 15771-15781.
64. Nisizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.
65. Hug, H. and Sarre, T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: Divergence in signal transduction? *Biochem J.* **291**, 329-343.
66. Dekker, L. V. and Parker, P. J (1994) Protein kinase C-a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 73-77
67. Martiny-Baron, G., Kazanietz, M. G., Mischak, H., Blumberg, P. M., Kochs, G., Hug, H., Harmé, D. and Schächtele, C. (1993) Selective inhibitor of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö6976. *J. Biol. Chem.* **268**, 9194-9197.
68. Gschwendt, M., Müller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G. and Marks, F. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 93-98.
69. Ha, K.S. and Exton, J. K. (1993) Differential translocation of protein kinase C isozymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **268**, 10534-10539.
70. Saharinen, P., Ekman, N., Sarvas, K., Parker, P., Alitalo, K., and Silvennoinen, O. (1997) The Bmx tyrosine kinase induces activation of the Stat signaling pathway, which is specifically inhibited by protein kinase C delta. *Blood* **90**, 4341-4353.

71. Zezula, J., Sexl, V., Hutter, C., Karel, A., Schütz, W. and Freissmuth, M. (1997) The cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{cip1} mediates the growth inhibitory effect of phorbol esters in human venous endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 29967-29974.
72. Yuan, Z.M., Utsugisawa, T., Ishiko, T., Nakada, S., Huang, Y., Kharbanda, S., Weichselbaum, R. and Kufe, D. (1998) Activation of protein kinase C δ by c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Oncogene* **16**, 1643-1648.
73. Feig, F. A. and Cooper, G. M., (1988) Inhibition of NIH3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3235-3243.
74. Katagiri, H., Asano, T., Inukai, K., Ogihara, T., Ishihara, H., Shibazaki, Y., Murata, T., Terasaki, J., Kikuchi, M., Yazaki, Y. and Oka, Y. (1998) Roles of PI3-kinase and Ras on insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol.* **272**, E326-331.
75. Carrol, M.P. and May, W. S. (1994) Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cell. *J. Biol. Chem.* **269**, 1249-1256
76. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmé, D. and Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature (London)* **364**, 249-252.
77. Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K. and Ohno, S. (1996) Protein kinase C δ activates the MEK-ERK pathway in manner independent of Ras and dependent Raf. *J. Biol. Chem.* **271**, 23512-23519.
78. Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U. and Cooper, G. M. (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 732-741.
79. Schönwasser, D. C., Maris, R. M., Marshall, C. J. and Parker, P. J. (1998)

- Activation of the mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 790-798.
80. Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M. and Hancock, J. F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* **264**, 1463-1467.
 81. Leever, S. J., Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature (London)* **369**, 411-414.
 82. Stokoe, D. and McCormick, F. (1997) Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J.* **16**, 2384-2396.
 83. Mizutani, S., Koide, H. and Kajiro, Y. (1998) Isolation of a new protein factor required for activation of Raf-1 by Ha-Ras. *Oncogene* **16**, 2781-2786.
 84. Liu, Y., Martindale, J. L., Gorospe, M. and Holbrook, N. J. (1996) Regulation of p21^{WAF1/CIP1} expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* **56**, 31-35.
 85. Pumigilil, K. M., and Decker, S. J. (1997) Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 448-452.
 86. Fesposito, F., Cuccovillo, F., Vanoni, M., Cimino, F., Anderson, C. W., Appella, E. and Russo, T. (1997) Redox-mediated regulation of p21^{waf1/cip1} expression involves a post-transcriptional mechanism and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur. J. Biochem.* **245**, 730-737.
 87. Chajry, N., Martin, P. M., Pages, G., Cochet, C., Afdel, K. and Berthois, Y. (1994) Relationship between the MAP kinase activity and the dual effect of EGF on A431 cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 984-990.
 88. Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C. S., You, Z. H., Iwamoto, Y. and Fu, X. Y. (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor

- p21^{WAF1/CIP1} mediated by STAT1. *Science* **272**, 719-722.
89. Chin, Y. E., Kitagawa, M., Kuida, K., Flavell, R. A. and Fu, X. Y. (1997) Activation of STAT1 signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5328-5337.
90. Iwamoto, Y., Chin Y. E., Peng, X. and Fu, X. Y. (1998) Identification of membrane-associated inhibitoes(s) of epidermal growth factor-induced signal transducer and activator of transcription activation. *J. Biol. Chem.* **273** 18198-18204.
91. Bromberg, J. F., Fan, Z., Brown, C., Mendelsohn, J. and Darnell, J. E. Jr. (1998) Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth. Differ.* **9**, 505-512.

略語一覧

EGF : epidermal growth factor ; 上皮細胞増殖因子
EGFR : epidermal growth factor receptor ; 上皮細胞増殖因子受容体
TGF- α : transforming growth factor- α
HB-EGF : heparin-binding EGF-like growth factor
HGF : hepatocyte growth factor
G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
SH2, SH3 : Src homology 2/3
PTB/PI : phosphotyrosine binding/phosphotyrosine interaction
CH1, CH2 : collagen homology 1/2
Shc : Src homology and collagen
Grb2 : growth factor receptor bound protein 2
Sos : son of sevenless
MAPK : mitogen-activated protein kinase
PI3-kinase : phosphatidylinositol 3-kinase
DG : diacylglycerol
PLC- γ : phospholipase C- γ
PKC : protein kinase C
aPKC : atypical protein kinase C
nPKC : novel protein kinase C
cPKC : conventional protein kinase C
CDK : cyclin dependent kinase
STAT : signal transducer and activator of transcription
DMEM : Dulbecco's modified Eagle Medium
NBCS : newborn calf serum ; ウシ新生仔血清
FCS : fetal calf serum ; ウシ胎仔血清
PBS : phosphate-buffered saline
BSA : bovine serum albumin
PCR : polymerase chain reaction
SDS : sodium dodecyl sulfate
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
GST : glutathione S-transferase
MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
DMSO : dimethyl sulfoxide
DN-Ras : dominant negative Ras
LacZ : β -galactosidase

謝 辞

本研究の機会を与えていただきました東京工業大学半田宏教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、直接御指導いただきました東京大学医科学研究所細胞遺伝学研究部渋谷正史教授ならびに後藤典子博士に深甚なる謝意を表します。

また本研究にもちいた材料を提供していただきました山口大学岡芳知教授ならびに東京大学片桐秀樹博士に厚くお礼申し上げます。

さらには本研究を行う上で、有形無形のご支援をいただきました東京大学医科学研究所細胞遺伝学研究部ならびに東京工業大学半田研究室の皆様にお礼申し上げます。