

主論文の要旨

**Girdin is phosphorylated on tyrosine 1798
when associated with structures required for migration**

Girdinの1798チロシンは
遊走に必要な構造に関連してリン酸化される

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：椰野 正人 教授)

大森 健治

【緒言】

Girdin(ccdc88a/GIV)は 2005 年に初めて同定されたタンパクで細胞遊走に先立つアクチン再構成に関与すると想定されている。Girdin 欠損マウスは幅広の吻側移動経路(RMS)、嗅球低形成という神経細胞遊走障害の表現型をもち Girdin の細胞遊走への関与を示唆している。Girdin はリン酸化により機能修飾されるという報告もあり 1416 番目のセリン(S1416)が最初の研究対象となった。ただ Girdin 欠損マウスは栄養障害を呈し離乳前の死亡する重度障害を負うのに対して 1416 番目のセリンをアラニンと置換した mutant マウスは通常に生存し解剖学的変化もないことから S1416 リン酸化が Girdin 全機能を担うとはいえない。我々は Girdin リン酸化の研究対象に 1386 番目のセリン(S1386)、1764 番目(Y1764)および 1798 番目のチロシン(Y1798)を追加し、各部位かつリン酸化状態特異的な抗体を作製し細胞遊走での Girdin リン酸化の役割を研究した。

【結果】

1) 抗体作製

過去に発表したS1416に加えGirdinのC末端に存在するS1386、Y1764、Y1798を質量分析などから選択し新規に抗体を作成した。S1386、S1416、Y1798周囲のアミノ酸配列は生物種間で保存されていたがY1764周囲には種差が見られた(Fig.1A)。抗血清の力価と特異度をドットプロットで評価し全ての抗血清検体が部位かつリン酸化状態特異的にペプチドを認識した(Fig.1B)。

2) 抗体特性評価

特異性検証のためHEK293FT細胞にEGF受容体(EGFR)発現ベクターとV5タグ付き野生型または変異Girdinの発現ベクターを導入し、EGF刺激しV5抗体で免疫沈降したのち4種の抗リン酸化抗体で免疫ブロッキングした(Fig.2A)。抗体は設計通り部位かつリン酸化状態特異的であった。時間経過分析で4ヶ所のリン酸化はEGF刺激後30秒で増加し5分前後で最高レベルに達した (Fig.2B)。

3) 培養細胞でのリン酸化Girdinの局在

リン酸化Girdinの細胞内局在探索のためEGFR発現ベクターを導入しEGFで刺激したHEK293FT細胞を蛍光免疫染色した。刺激前EGFRは細胞膜上に検出されGirdin Y1798リン酸化抗体(以下pY1798抗体)では細胞質内に弱いシグナルを認めたのみであった(Fig.3A)のに対し、EGF後はシグナル頻度と強度は増加し内在化EGFRと共在化した(Fig.3A)。遊走関連構造染色のためpY1798抗体でNIH3T3細胞を染色した。細胞質内 (Fig.3B)に加え膜状仮足にシグナルが存在した(Fig.3C-1)。pY1798はストレスファイバー上(Figs.3C-2, 4)、糸状仮足の先端(Figs.3B, 3C-3, 4)にも検出された。pY1798はパキシリンとも高率に共染され接着斑への局在が確認された(Fig.3D)。

4) マウス脳の免疫染色

マウスの脳組織を pY1798 抗体で免疫染色し生体でのリン酸化を調べた。海馬歯状回、RMS、嗅球の Girdin 発現部位で 14 日齢の野生型マウスでは強く染色されたが(Fig.4A 上)、Girdin ノックアウトマウス(以下 KO マウス)では染色されず(Fig.4A 下)、pY1798 抗体の信頼性が生体でも実証された。神経細胞内での pY1798 シグナル局在検証のため RMS 培養細胞を pY1798 抗体とダブルコルチン(DCX)抗体で免疫染色し共焦点顕微鏡で観察した結果、DCX 陽性培養細胞での pY1798 の小胞状シグナルは細胞体の他、先端突起先端に認め Z スタック解析で pY1798 陽性小胞は細胞膜下に存在した(Fig.4B)。Src インヒビター PP2 を加えると神経芽細胞の遊走は障害され pY1798 シグナルは消失し(Fig.4B)、RMS 神経細胞で Src による Y1798 のリン酸化が示唆された。

【考察】

真核細胞でアクチンは結合タンパクと作用し細胞形態を変化させ遊走を可能にする。Girdin はアクチン結合タンパクで、KO マウスの脳は幅広 RMS や嗅球低形成など細胞遊走障害を示す。Girdin がリン酸化を通じ遊走を調整すると想定し Girdin の 4 部位に対し部位かつリン酸化状態特異的抗体を作製した。HEK293FT の実験で 4 ヶ所のリン酸化が EGF 依存性だと示した。細胞内小胞での Girdin の存在は膜への親和性を思わせ、HEK293FT 細胞では Y1764 および Y1798 のリン酸化は内在化した EGFR 近傍で起き、活性化され内在化した EGFR が直接 Girdin をリン酸化していると示唆した。pY1798 抗体は NIH3T3 細胞で膜状仮足、糸状仮足、ストレスファイバー、および接着斑を染色した。これは Girdin の Y1764 と Y1798 のリン酸化が EGFR か Src によりアクチン再構成を経て遊走を活性化すると報告と符合する。ただ NIH3T3 細胞に内因性 EGFR は無く別のキナーゼが Y1798 をリン酸化していると思えた。接着斑でのシグナルは細胞外マトリックスからの内向きインテグリンシグナルを経由して接着斑複合体のキナーゼによる Girdin リン酸化の存在を示唆している。生体での pY1798 分布は嗅球、RMS、海馬歯状回の遊走神経細胞分布と一致し KO マウスはまさにこの部位に異常を呈する。KO マウスの pY1798 シグナル欠如は、野生型の Girdin リン酸化の存在を生理的条件下で実証した。RMS 培養細胞では細胞体と先端突起の先端に pY1798 シグナルを認めた。Src 阻害剤の PP2 処理で神経細胞遊走と Y1798 リン酸化が阻害され、細胞遊走と Girdin リン酸化の関係性が考えられた。KO マウスの幅広 RMS と嗅球低形成は神経細胞遊走障害を示す一方、歯状回の顆粒細胞は過遊走を呈す乖離がある。LacZ 染色の Girdin プロモーター活性検出とリン酸化 Girdin の検出を用いて歯状回 2 層の Girdin シグナル分離に成功した。早生および晩生の顆粒細胞が見られる 10 日齢で pY1798 は歯状回顆粒層最内部で、Girdin プロモーター活性は最外部で観察された。LacZ 染色陽性細胞とダブルコルチン陽性細胞は顆粒層で相互に排他的で、海馬歯状回顆粒層最内部の pY1798 シグナルは LacZ 陽性細胞の苔状繊維の一部由来するように見えた(Supplementary fig.2)。過去に報告したように歯状回顆粒細胞分散は側頭葉てんかん(MTLE)と関連し、実際 MTLE 様の表現型は Girdin 変異マウスで観察される。顆粒細胞の過剰遊走は細胞自律的というよりはてんかんによる局所環境変化による可能性が高い。

【結語】

Girdin の 4 つの部位かつリン酸化状態特異的抗体を作製し検証した。抗体は Girdin の複数部位での同時性リン酸化状態の変化を認識し、特に pY1798 シグナルの遊走関連構造を認識した。この観察により Girdin pY1798 とアクチン再構成を介した細胞遊走の関係が示唆された。Girdin のリン酸化の生理的重要性の解明にはさらなる生体での解析が必要である。