Thesis

細胞間接着によるGab-1のチロシンリン酸化

埼玉医科大学総合医療センター第一内科学教室
（指導：吉田　行雄教授）
篠原　将彦

Gab-1はHGF/SF受容体であるc-Metや，EGFレセプター等の受容体型チロシンキナーゼによってチロシンリン酸化を受けるマルチプルドッキングタンパク質である．今回我々は，E-カドヘリンによる細胞間接着機構を解析するため，Gab-1のチロシンリン酸化について検討した．細胞間接着はGab-1のチロシンリン酸化を増加させ，その破綻はGab-1のチロシンリン酸化を減少させた．抗E-カドヘリン抗体は細胞間接着依存性のGab-1のチロシンリン酸化を減少させ，E-カドヘリンの発現はGab-1のチロシンリン酸化を増加させた．選択的なSrcファミリーキナーゼの阻害剤は細胞間接着依存性のGab-1のチロシンリン酸化を減少させ，この酵素の活性を阻害するC-terminal Srcキナーゼのドミナントネガティブ変異体の強制発現はGab-1のチロシンリン酸化を増加させた．細胞間接着の破綻はGab-1のチロシンリン酸化を減少させ，同時に細胞間接着に反応するMAPキナーゼやAkt活性を減少させた．これらの結果からE-カドヘリン依存性の細胞間接着は，SrcファミリーキナーゼによってGab-1のチロシンリン酸化を増加させ，Ras/MAPキナーゼとPI3キナーゼ/Aktカスケードの活性を調節していることが示された[57]．

緒　言

細胞間接着部位に存在するタンパク質には細胞の接着や移動を司る様々な重要な機能がある[1-5]．上皮細胞の細胞間接着部位には密着結合（tight junction，タイトジャンクション），接着結合（adherens junction，アドヘレンスジャンクション），接着班（desmosome，デスモソーム）からなる特別な膜構造があり，中でもアドヘレンスジャンクションにはCa^{2+}依存性の細胞間接着分子であるカドヘリンが存在し[2,5,6]，細胞間接着において中心的な役割を果たしている（Fig. 1）．カドヘリンはCa^{2+}依存性に同じ細胞膜上にある2つのカドヘリン分子が横に結合することでシス二量体を形成し，シス二量体が別の細胞膜のシス二量体とトランス結合することで細胞同士が接着する[7-11]．カドヘリンの細胞内領域のC末端はβ-カテニンと結合し，β-カテニンはさらにα-カテニンと結合する（Fig. 1）．α-カテニンは直接F-アクチンに結合するが[12]，そのN末端側で他のF-アクチン結合タンパク質であるビンキュリン，α-アクチニンとC末端側でタイトジャンクションを構成する膜裏打ちタンパク質のZO-1と結合し[17]，これらを介してさらにF-アクチンと結合する経路も存在する．カドヘリンとアクチン骨格への連結は，カドヘリンを基軸とした細胞間接着をより強固にしている[2,5,6,18]．

一方，カドヘリン-カテニン系は細胞間接着だけではなく，シグナル伝達機構においても重要な役割を果たしている．β-カテニンは形態形成や癌との関係で注目されているWntシグナル伝達経路において重要な役割を演じていることが示された[19]．カドヘリン-カテニン系は細胞間接着部位に存在するタンパク質のチロシンリン酸化部位に結合することが示唆されている．実際，α-，β-，γ-カテニンとp120カテニン全てが上皮型のカドヘリン（E-カドヘリン）の細胞内領域と直接的または間接的に結合し，癌遺伝子である*v-src*導入により形質転換した細胞[20-22]や，上皮細胞増殖因子（epidermal growth factor; EGF）や肝細胞増殖因子／細胞分散因子（hepatocyte growth factor/scatter factor; HGF/SF）に応答し[23]，チロシンリン酸化されることが知られている．カドヘリン-カテニン系は，EGF受容体やEGF受容体に類似する*c-erb-B-2*癌遺伝子産物と複合体を作ることが示されており[24,25]，受容体型チロシンホスファターゼであるLAR-PTP（protein

医学博士　甲第860号　平成15年3月28日（埼玉医科大学）

tyrosine phosphatase)，PTP μ，PTP1B 様ホスファターゼ，チロシンリン酸化タンパク質のホスファターゼである SHP-2（Src homology 2-containing protain tyrosine phosphatase-2）もまたカドヘリン-カテニン系と連結することが示されている[26-28]．カテニンと p120 カテニンのチロシンリン酸化の増加は細胞の形質転換や増殖因子刺激による分裂での細胞間接着活性の減少と関連している[29, 30]．しかし，カドヘリン結合タンパク質のチロシンリン酸化が細胞間接着の調節にどのように関係しているかはまだ明らかではない．

Gab-1（Grb2 associated binder-1）は HGF/SF，EGF，インスリン，インスリン様増殖因子のような様々な増殖因子に反応し，Grb2（Growth factor receptor bound protein 2）や SHP-2 及び PI3 キナーゼ（phosphatidyl inositol 3 kinase; PI3K）の p85 サブユニットと結合し，チロシンリン酸化を受けるドッキングタンパク質である（Fig. 1）[31, 32]．Gab-1 はその N 末端領域に細胞膜と結合する PH（pleckstrin homology）領域を含み，ホスホイノシトール酸との結合を可能にする[33, 34]．さらに Gab-1 は HGF 受容体である c-Met と結合するドメインを含んでおり，c-Met の細胞質側のホスホチロシン含有モチーフを介してタンパク質-タンパク質結合すると考えられている（Fig. 1）[32]．Gab-1 はイヌ腎上皮細胞由来 MDCK 細胞の細胞間接着部位に局在していることが最近証明された[35]．Gab-1 や PI3 キナーゼの PH 領域活性は Gab-1 の膜における局在が重要な役割を果たす[35]．我々は MDCK 細胞の細胞間接着部位において E-カドヘリンと c-Met は共に局在することを最近証明した[36, 37]．さらに HGF/SF や化学発癌剤の一種であるホルボールエステル（tetradecanoil phorbol acetate; TPA）は細胞間接着を破壊し，E- カドヘリンと c-Met のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ，細胞表面より消失する．このように Gab-1 とカドヘリン-カテニン系は互いに関連している可能性がある．

本研究において我々は，細胞間接着が Gab-1 のチロシンリン酸化を刺激し，この作用は E-カドヘリンと Src ファミリーキナーゼを介して発揮される可能性を示した（Fig. 1）．このように，細胞間接着は増殖因子と同様に Gab-1 のシグナル伝達の下流の活性を調節していることが示唆された．

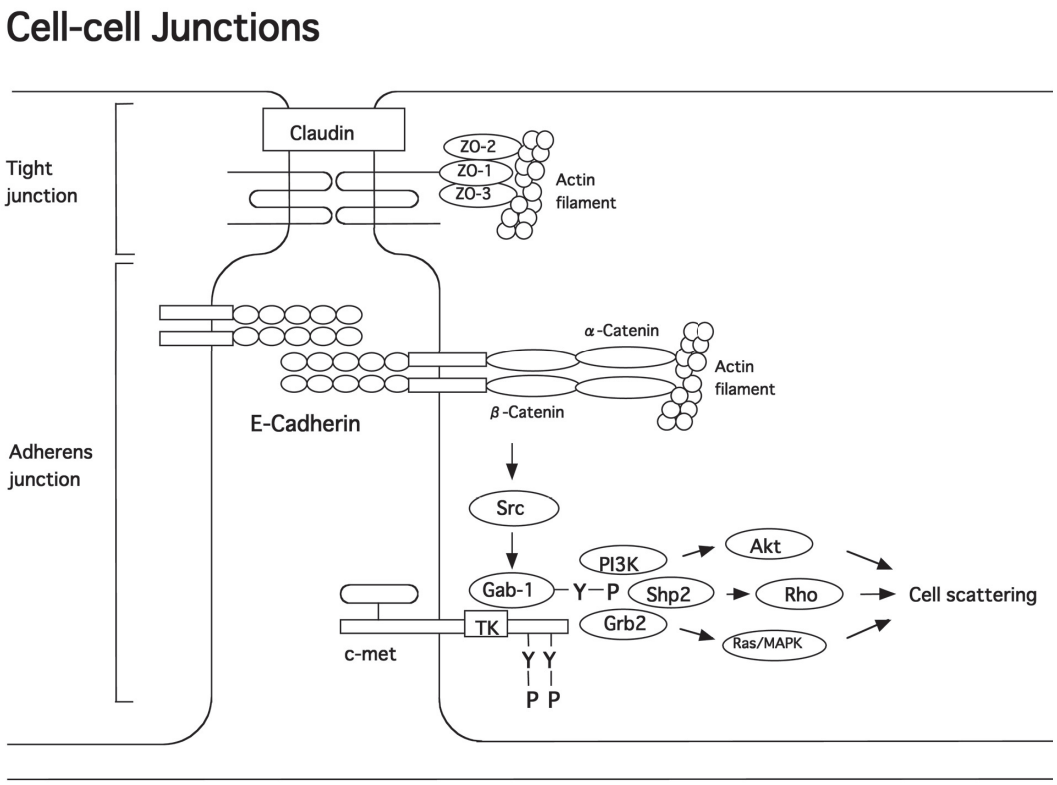

Fig. 1. Schematic illustration of the cell-cell adhesion site. In polarized epitherial cells, the cell-cell junction shows a specialized membrane stracture comprising tight junctions, adherens junctions, and desmosomes (show tight junction and adherens junction). At adherens junctions, cadherin, a Ca^{2+}-dependent homophilic cell adhesion molecule, plays a fundamental role in cell-cell adhesion. The cadherin-catenin system may play an important role in the signal transduction system. For details, see text. Gab-1, Grb2 associated binder-1; Grb2, Growth factor receptor bound protein 2; MAPK; mitogen-activated protein kinase; PI3K, phosphatidyl inositol 3 kinase; SHP-2, Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-2; TK, tyrosine kinase.

実験材料および方法

抗体

ヒトリコンビナント HGF/SF は中村敏一教授（大阪大学大学院医学系研究科腫瘍生化学教室）より供与された．抗 Gab-1 ウサギポリクローナル抗体は，平野俊夫教授（大阪大学大学院医学系研究科腫瘍病理学教室）より供与され，また，Upstate Biotechnology（Lake Placid, NY, USA）より購入した．抗 FLAG マウス モノクローナル抗体（M2）は，Eastman Kodak（Rochester, NY, USA）より，ペルオキシダーゼ標識抗チロシンリン酸化モノクローナル抗体（PY20）は，Santa Cruz Biotechnology（Santa Cruz, CA, USA）より購入した．抗チロシンリン酸化 MAP キナーゼウサギポリクローナル抗体，抗 MAP キナーゼウサギポリクローナル抗体，抗セリンリン酸化 Akt ウサギポリクローナル抗体，抗 Akt ウサギポリクローナル抗体は，New England BioLabs（Beverly, MA, USA）より購入した．

細胞培養及び遺伝子導入法

イヌ腎上皮細胞由来 MDCK 細胞は, Dr. W. Birchmeier（Max-Delbruck Center for MolecularMedicine, Berlin, Germany）より，マウス乳腺腫瘍 MTD-1A 細胞，マウス表皮角化細胞 308R は，竹市雅俊教授（京都大学大学院生命科学研究科多細胞体構築学教室）より供与された．MDCK 細胞，マウス乳腺腫瘍 MTD-1A 細胞，マウス表皮角化細胞 308R は，10％非動化ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地（Life Technologies, Inc., Lockville, MD, USA）に，100 units/ml ペニシリン，100 μg/ml ストレプトマイシンを添加し，37℃，10% CO_2 環境下で培養した．マウス線維芽細胞由来 L, CL, EL 細胞は 月田承一郎教授（京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学教室）および，永淵昭良教授（熊本大学発生医学研究センター）より供与された．これらの細胞は 10％非動化ウシ胎児血清添加ダルベッコ改変イーグル培地で培養した．一過性遺伝子導入実験は，平野俊夫教授（大阪大学大学院医学系研究科腫瘍病理学教室）より供与された FLAG 標識 Gab-1 ヒト cDNA を用いて行なった[38]．L, CL, EL 細胞を 10 cm 径組織培養ディッシュに 1×10^5 個播種し，24 時間培養後，FLAG- 結合 Gab-1 cDNA 挿入をした．pCMV ベクター（Stratagene, La Jolla, CA, USA）1 μg をリポフェクタミン・プラス試薬（Life Technologies, Inc.）を用いてリポフェクション法にて遺伝子導入を行なった．リコンビナントアデノウイルス，Ax1CATcsk-ΔK は，岡田雅人教授（大阪大学蛋白質研究所）より供与された．MDCK 細胞にアデノウイルスベクターを感染させ，高い導入効率が得られた[39]．遺伝子導入実験は大阪大学組換え DNA 実験安全管理規程に基づいた．

免疫沈降反応とイムノブロッティング

10 cm 径組織培養ディッシュで培養した全ての細胞は，スクレーパーにて剥離し，回収後，液体窒素にて凍結した．これを氷上にて 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml aprotinin, 1 mM sodium vanadate を含む冷溶解緩衝液（20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 140 mM NaCl, 2.6 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 % Nonidet P-40, 10 % glycerol）1 ml で溶解した．全細胞溶解液は 4 ℃, 10,000×*g*, 15 分間遠心後，上清を免疫沈降反応とイムノブロットに供した．上清は抗 Gab-1 ポリクローナル抗体を結合させたプロテイン G セファロースビーズ（2 μg of Ab/20 μl of beads）（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) と 4℃下にて 4 時間反応させ免疫沈降した．免疫沈降したビーズは WG 緩衝液 (50 mM Hepes-NaOH [pH 7.6], 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100）1 ml で 2 回洗浄することにより未結合物を除去し，SDS サンプル緩衝液に溶解後，SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した．ニトロセルロース膜に転写後，各々の抗体を用いてイムノブロットし，ECL 化学発光キット（Amersham Pharmacia Biotech）にて検出した．

試験管内における GST-Gab-1 のリン酸化

Gab-1 の COOH 末端 (421-694 アミノ酸）を含む GST 融合タンパク質は，グルタチオンセファロースビーズ（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて発現と精製を行なった．GST 融合タンパク質（0.1 μg）を，グルタチオンセファロースビーズに結合させ，キナーゼアッセイ緩衝液（50 mM Hepes-NaOH [pH 7.6], 3 mM $MnCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol）で 2 回洗い，10 mM ATP 存在下と非存在下で，キナーゼアッセイ緩衝液 50 ml に 精製した Src キナーゼ（Upstate Biotechnology）を 24℃，30 分間反応させた．この反応物を 4℃ , 10,000×*g*, 5 分間で遠心した．上清に SDS サンプルバッファーを加え，10 分間煮沸し，SDS-PAGE で解析した．GST 融合タンパク質のチロシンリン酸化量は，ペルオキシダーゼ標識抗チロシンリン酸化モノクローナル抗体 PY20 を用いてイムノブロッティングにて解析した．

結　果

細胞間接着による Gab-1 のチロシンリン酸化

MDCK 細胞を 2 mMCa^{2+}を含んだ無血清培地で 24 時間以上培養し，細胞の溶解液を抗 Gab-1 ポリクローナル抗体を用いて免疫沈降した．さらに抗チロシンリン酸化モノクローナル抗体 PY20 を用いてブロットしたところ，Gab-1 のチロシンリン酸化が認められた（Fig. 2A）．細胞培地の Ca^{2+}濃度を 2 mM から 2 μM へ低下させた所（Ca^{2+}スイッチ），MDCK 細胞間の接着は徐々に緩み始め，Ca^{2+}スイッチから 4 時

間後，単層培養のMDCK細胞は完全に解離し単細胞になった[36, 37, 未発表]．Gab-1のチロシンリン酸化は時間経過とともに減少し，Ca^{2+}スイッチを行なってから4時間後にはほとんど認められなくなった（Fig. 2A）．

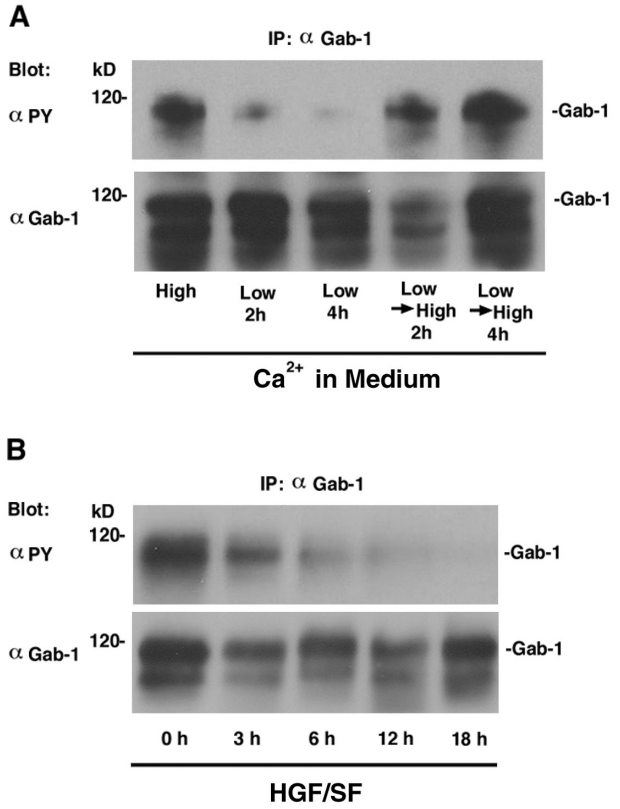

Fig. 2. Cell-cell adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Gab-1 in MDCK cells. A, MDCK cells were treated as indicated in the figure. The whole cell lysates were then subjected to immunoprecipitation (*IP*) with the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*α Gab-1*), and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*α PY*) (*upper panel*). The same blot was reprobed with the anti- Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*) to ensure that similar amounts of endogenous Gab-1 were present in each lane. *High*, MDCK cells were deprived of serum for 12 h in medium containing 2 mM Ca^{2+}. *Low*, MDCK cells were deprived of serum in the medium containing 2 mM Ca^{2+} for 12 h and subsequently cultured in medium containing 2 μM Ca^{2+} for the indicated time. *Low* → *High*, cells pretreated with 2 μM Ca^{2+} for 4 h were cultured further in the medium containing 2 mM Ca^{2+} for the indicated time. B, serum-deprived MDCK cells were incubated in the presence or absence of 10 ng/ml HGF/SF for 0-18 h. The whole cell lysates were then subjected to immunoprecipitation with the anti- Gab-1 polyclonal Ab, and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with either the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*upper panel*) or the anti- Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*). The results shown are representative of three independent experiments.

MDCK細胞を4時間，2 μMCa^{2+}で培養後，培地のCa^{2+}濃度を2 mMに上昇させた所，Gab-1のチロシンリン酸化に伴い（Fig. 2A），分離していた細胞はしだいに細胞間接着を形成した（Fig. 2A）[未発表]．

敷石状の単層コロニーを形成しているMDCK細胞をHGF/SFで刺激すると，細胞は伸展し，周囲に分散した[40, 41]．HGF/SFによる細胞の分離は2 mMCa^{2+}濃度の培地でもGab-1のチロシンリン酸化を同様に減少させた（Fig. 2B）．MDCK細胞と同様に，Gab-1のチロシンリン酸化は2 mMCa^{2+}を含んだ無血清培地でマウス乳腺腫瘍細胞MTD-1Aとマウス表皮角化細胞308Rで共に認められた（Fig. 3）．さらに，Gab-1のチロシンリン酸化の低下は，低Ca^{2+}濃度下で，細胞間接着の破綻を起こしたこれらの細胞株においても認められた．（Fig. 3）．308R細胞をHGF/SFで刺激すると同様に細胞は分散し，Gab-1のチロシンリン酸化は減少した[未発表]．これらの結果から可逆的な細胞間接着はGab-1のチロシンリン酸化を引き起こすと考えられた．

細胞間接着によるGab-1のチロシンリン酸化におけるE-カドヘリンの関与

E-カドヘリンによる細胞間接着活性を阻害する抗E-カドヘリンモノクローナル抗体存在下で，MDCK細胞の培地のCa^{2+}濃度を2 μMから2 mMへ上昇させたところ，細胞間接着は回復せず，Gab-1のチロシンリン酸化は喪失した（Fig. 4A）．そこで，E-カドヘリン発現の有無によるGab-1のチロシンリン酸化を検討した．2 mMCa^{2+}濃度の培地で，E-カドヘリンが発現していないL細胞と，L細胞にタイトジャンクションストランド構造の重要な膜蛋白であるクローディンを強制発現させたCL細胞[42]では，最小限のGab-1のチロシンリン酸化しか発現していなかった．一方，L細胞にヒトE-カドヘリンが発現したEL細胞[43]では，Gab-1のチロシンリン酸化がより高度に発現していた（Fig. 4B）．MDCK細胞を2 μMCa^{2+}で2時間前処理し，更にTPAを添加し培養すると，E-カドヘリンやβ-カテニンではないZO-1の集積によるタイトジャンクション構造が得られる[44]．そこで，同様にMDCK細胞を2 μMCa^{2+}の低濃度で培養し，TPAを加えた所，Gab-1のチロシンリン酸化は再び増加しなかった（Fig. 4C）．これらの結果から細胞間接着によるGab-1のチロシンリン酸化はE-カドヘリンを介していると考えられる．

細胞間接着によるGab-1のチロシンリン酸化におけるSrcファミリーキナーゼの関与

次に，細胞間接着によるGab-1のチロシンリン酸化の機構を詳細に検討するため，Srcファミリーキナーゼの選択的な阻害剤である，4-amino-5-

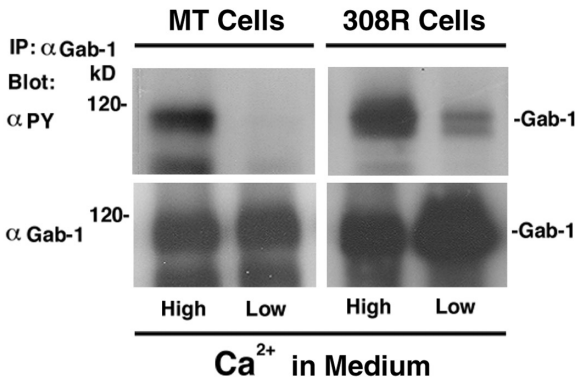

Fig. 3. Cell-cell adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Gab-1 in MTD-1A cells or 308R cells. MTD-1A (*MT*) cells or 308R cells were treated as indicated in the figure. The whole cell lysates were then subjected to immunoprecipitation (*IP*) with the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*α Gab-1*), and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with either the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*α PY, upper panels*) or the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*lower panels*). High, cells were deprived of serum for 12 h in the medium containing 2 mM Ca^{2+}. *Low*, cells were deprived of serum in the medium containing 2 mM Ca^{2+} for 12 h and subsequently cultured in the medium containing 2 μM Ca^{2+} for 4 h. The results shown are representative of three independent experiments.

(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-D]pyrimidine の効果を調べた[45]．4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-D]pyrimidine は 2 mMCa^{2+}培地で Gab-1 のチロシンリン酸化を著明に減少させる (Fig. 5A)．そこで MDCK 細胞で Csk (C-terminal Src kinase) のキナーゼを不活化したドミナントネガティブに働く変異体 (Csk-ΔK)[39] を強制発現させ，Gab-1 のチロシンリン酸化への効果を調べた．Csk は Src 様のチロシンキナーゼで，C 末端のチロシン残基のリン酸化を触媒することにより，Src ファミリーキナーゼ活性を阻害する[46, 47]．MDCK 細胞での Csk-ΔK の発現にはリコンビナントアデノウイルスベクターを使用した[39]．MDCK 細胞に Ax1CAT-lacZ，または，Ax1CAT-csk-ΔK を感染させた (Fig. 5B)．2 mMCa^{2+}培地でコントロールの細胞に Csk-ΔK を発現させた所，Gab-1 のチロシンリン酸化は著明に増加した (Fig. 5B)．5 個のチロシン残基 (Tyr-447，Tyr-472，Tyr-589, Tyr-627, Tyr-659) を含む Gab-1 の C 末端の GST 融合タンパク質は Src キナーゼによりチロシンリン酸化された[未発表]．これらの結果から，細胞間接着による Gab-1 のチロシンリン酸化に Src ファミリーキナーゼの関与が推測される．

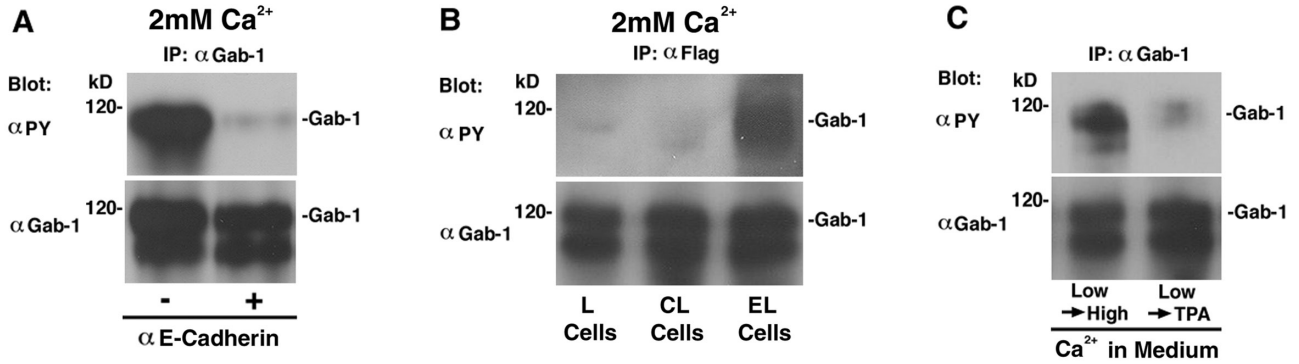

Fig. 4. E-Cadherin-dependent tyrosine phosphorylation of Gab-1. A, serum-deprived MDCK cells were cultured in the medium containing 2 μM Ca^{2+} for 4 h and then cultured further in the medium containing 2 mM Ca^{2+} for 2 h in the presence or absence of the anti-Ecadherin mAb Arc-1 (*α E-Cadherin*). The whole cell lysates were then subjected to immunoprecipitation (*IP*) with the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*α Gab-1*), and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with either the horseradish peroxidase-conjugated anti- phosphotyrosine mAb PY20 (*α PY, upper panel*) or the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*). B, L, CL, and EL cells were transfected with pCMVFLAG-Gab-1. At 48 h after transfection, these cells were serum deprived in the medium containing 2 mM Ca^{2+}, and the whole cell lysates prepared from the cells were subjected to immunoprecipitation with anti-FLAG mAb (*α FLAG*). The resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with either the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*upper panel*) or the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*). C, MDCK cells were treated as indicated in the figure. The whole cell lysates were then subjected to immunoprecipitation with the anti-Gab-1 polyclonal Ab, and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with either the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*upper panel*) or the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*). *Low → High*, MDCK cells were deprived of serum in the medium containing 2 mM Ca^{2+} for 12 h and subsequently cultured in the medium containing 2 μM Ca^{2+} for 4 h. The cells were cultured further in the medium containing 2 mM Ca^{2+} for 2 h. *Low → TPA*, cells pretreated with 2 μM Ca^{2+} for 4 h were cultured further in the medium containing 2 μM Ca^{2+} and 100 nM TPA for 2 h. The results shown are representative of three independent experiments.

細胞間接着による Gab-1 の下流へのシグナルに及ぼす影響

培地の Ca^{2+}濃度を下げることにより，Gab-1 のチロシンリン酸化は著明に減少した（Fig. 6A）．細胞溶解液を抗チロシンリン酸化 MAP キナーゼポリクローナル抗体によってイムノブロットし，MAP キナーゼ活性を調べた．刺激が加わっていない MDCK 細胞を 2 mMCa^{2+}培地で培養したところ，MAP キナーゼ活性を認めた（Fig. 6B）．対照的に，2 mMCa^{2+}培地と比較して，低 Ca^{2+}濃度の培地においては MAP キナーゼ活性は低下した（Fig. 6B）．チロシンリン酸化された Gab-1 は PI3 キナーゼと結合し[48, 49]，PI3 キナーゼの下流の Akt/PKB キナーゼを続いて活性化することが報告されている[50]．このため，低 Ca^{2+}濃度の培地で培養した細胞の溶解液を，抗セリンリン酸化 Akt ポリクローナル抗体でイムノブロットし，Akt 活性を調べた．その結果，何も刺激の加わっていない MDCK 細胞を 2 mMCa^{2+}培地で培養した場合，Akt 活性が認められたのに対し，低 Ca^{2+}濃度の培地で培養した場合，Akt 活性は著明に低下した（Fig. 6C）．以上の事から，Gab-1 のチロシンリン酸化を通した MAP キナーゼと Akt 活性は，細胞間接着と関係していると考えられる．

考　察

本研究では，上皮細胞の培養系を用いて，細胞間接着による可逆的な Gab-1 のチロシンリン酸化を示した．Gab-1 のチロシンリン酸化はカドヘリン非発現細胞と比較してカドヘリン発現細胞で著明に増加しており，MDCK 細胞においては，抗 E-カドヘリンモノクローナル抗体は Gab-1 のチロシンリン酸化を著明に低下させた．したがって，細胞間接着は E-カドヘリン依存性に Gab-1 のチロシンリン酸化を引き起こしていると考えられる．β-カテニン，γ-カテニン，p120 カテニン等のタンパク質は全てアドヘレンスジャンクションに局在しており，チロシンリン酸化されることが報告されている[20-22]．しかし，これらのチロシンリン酸化の機序は全て明らかになっているわけではない．このため, Gab-1 は，アドヘレンスジャンクションに局在し，細胞間接着によってチロシンリン酸化されるタンパク質の新しいメンバーと考えられる．

次に細胞間接着が Gab-1 のチロシンリン酸化を刺激する機序を調べた．4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-D]pyrimidine は Src ファミリーキナーゼの選択的阻害剤であり，Gab-1 のチロシンリン酸化を減少させるが，Csk のドミナントネガティブ変異体の発現は Gab-1 のチロシンリン酸化を増加させた．これらの結果から，Src ファミリーキナーゼは，細胞間接着による Gab-1 のチロシンリン酸化の少なくとも一部を担っていると考えられる．実際, Src ファミリーキナーゼはアドヘレンスジャンクションに認められ[51]，β-カテニン，γ-カテニン，p120 カテニン等のアドヘレンスジャンクションタンパク質のチロシンリン酸化は，マウス表皮角化細胞で細胞間接着に反応して増加することが報告されている[30]．対照的に，非受

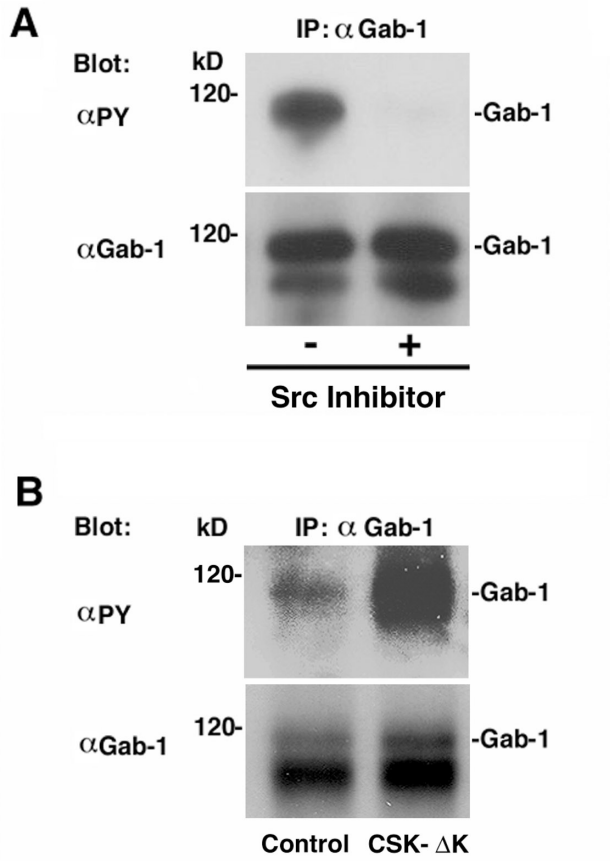

Fig. 5. Effect of an inhibitor for Src family kinases or expression of a dominant-negative mutant of Csk on the tyrosine phosphorylation of Gab-1. A, serum-deprived MDCK cells were cultured at 2μM Ca^{2+} for 4 h with or without 1μM 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3, 4-D]pyrimidine (*Src Inhibitor*), a compound reported to act as a relatively selective inhibitor of Src family kinases, for 30 min, and then cultured further at 2 mM Ca^{2+} for 2 h. The whole cell lysates were then subjected to immunoprecipitation (*IP*) with the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*α Gab-1*), and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with either the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*α PY, upper panel*) or the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*). B, MDCK cells were infected with either Ax1CAT-lacZ (*Control*) or Ax1CAT-csk-ΔK (*CSK-ΔK*) at 100 multiplicity of infection. At 48 h after the transfection, the infected MDCK cells in the meduim containing 2 mM Ca^{2+} were subjected to immunoprecipitation with the anti-Gab-1 polyclonal Ab, and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with either the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*upper panel*) or the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*). The results shown are representative of three independent experiments.

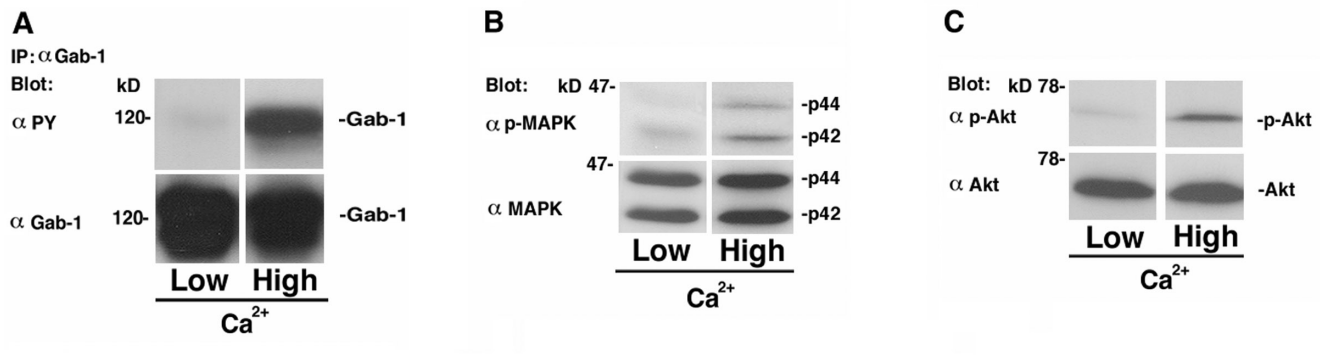

Fig. 6. Effects of cell-cell adhesion on the downstream signaling of Gab-1. A, serum-deprived MDCK cells were treated as indicated in the figure. The whole cell lysates were then subjected to immunoprecipitation (*IP*) with the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*α Gab-1*), and the resulting immunoprecipitates were subjected to immunoblotting with the horseradish peroxidase-conjugated anti-phosphotyrosine mAb PY20 (*α PY, upper panel*) or the anti-Gab-1 polyclonal Ab (*lower panel*). High, MDCK cells were deprived of serum for 12 h in the medium containing 2 mM Ca^{2+}. Low, MDCK cells were deprived of serum in the medium containing 2 mM Ca^{2+} for 12 h and subsequently cultured in the medium containing 2 μM Ca^{2+} for 4 h. B, the whole cell lysates were subjected to immunoblotting with either the anti-tyrosine-phosphorylated-MAP kinase polyclonal Ab (*α p-MAPK, upper panel*) or the anti-MAP kinase polyclonal Ab (*α MAPK, lower panel*). C, the whole cell lysates were also subjected to immunoblotting with either the antiserine-phosphorylated-Akt polyclonal Ab (*α p-Akt, upper panel*) or the anti-Akt polyclonal Ab (*α Akt, lower panel*). The results shown are representative of three independent experiments.

容体型チロシンキナーゼで，Src ファミリーに属する fyn を欠損させた表皮角化細胞では，これらのアドヘレンスジャンクションタンパク質のチロシンリン酸化は著明に減少しており，チロシンキナーゼ阻害剤と同じように細胞間接着の構造的，機能的異常が認められる．このため，Src ファミリーキナーゼは細胞間接着によるアドヘレンスジャンクションタンパク質のチロシンリン酸化の調節に関わっていると考えられる．

本研究では，細胞間接着による Gab-1 のチロシンリン酸化と，細胞間接着による MAP キナーゼと Akt 活性は相関していることを示した．E-カドヘリン依存性の細胞間接着構造による Akt の活性化は MDCK 細胞で報告されている[52]．また，E-カドヘリンによる細胞間接着は様々な細胞で生存を延長することが報告されている[53, 54]．更に，Ras/MAP キナーゼと PI3 キナーゼ /Akt カスケードが細胞の生存に関係していることも示唆されている[55]．我々の知見は，E-カドヘリンによる細胞間接着は Gab-1 のチロシンリン酸化を刺激し，Ras/MAP キナーゼと PI3 キナーゼ /Akt カスケードを活性化する興味深いことを示しており，この機序が細胞間接着による細胞の生存に関わっている可能性が考えられる．

しかし，E-カドヘリン依存性の細胞間接着が Src ファミリーキナーゼによる Gab-1 のチロシンリン酸化をどのように引き起こすのかは未だ明らかにされていない．E-カドヘリンによる細胞間接着は Src ファミリーキナーゼを活性化することができる．E-カドヘリン依存性の細胞間接着は Gab-1 が局在している場所にこのキナーゼを集合させる．事実，細胞外マトリックスのインテグリンの結合が，Src キナーゼによって裏打ちタンパク質群のチロシンリン酸化を誘導する．これは，細胞外マトリックスへ結合したインテグリンが，接着班関連チロシンキナーゼである FAK（focal adhesion kinase）と結合することにより，インテグリンを基軸として裏打ちタンパク質が集積し接着班を形成するためにおこると報告されている[56]．今後，E-カドヘリンによる細胞間接着が Gab-1 のチロシンリン酸化を導く分子機構を明らかにする必要がある．

謝　辞

本稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました埼玉医科大学総合医療センター第一内科学教室吉田行雄教授に深謝いたします．また，実験の実施に際し御協力いただいた大阪大学大学院医学系研究科生態制御医学生化学・分子生物学教室高井義美教授，中西宏之助教授並びに，本研究を直接御指導いただきました群馬大学生体調節研究所附属生理活性物質センター的崎尚教授に心より感謝いたします．最後に，埼玉医科大学総合医療センター第一内科学教室の教室員の皆様，実験助手伴場裕巳博士に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development 1988; 102: 639-55.

2) Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991; 251: 1451-5.
3) Luna EJ, Hitt AL. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. Science 1992; 258: 955-64.
4) Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Winkler J, et al. The molecular architecture of focal adhesions. Annu Rev Cell Dev Biol 1995; 11: 379-416.
5) Gumbiner B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 1996; 84: 345-57.
6) Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. Curr Opin Cell Biol 1995; 7: 619-27.
7) Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Hendrickson WA, et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. Nature 1995; 374: 327-37.
8) Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. Nature 1996; 380: 360-4.
9) Tomschy A, Fauser C, Landwehr R, Engel J. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. EMBO J 1996; 15: 3507-14.
10) Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. Neuron 1998; 20: 1153-63.
11) Pertz O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A, Engel J. A new crystal structure, Ca^{2+} dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. EMBO J 1999; 18: 1738-47.
12) Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS. α1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 1995; 92: 8813-7.
13) Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ. Interaction of α-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via α-catenin. J Cell Biol 1995; 130: 67-77.
14) Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudson KA, Johnson KR, Wheelock MJ. Characterization of the interactions of α-catenin with α-actinin and β-catenin/plakoglobin. J Cell Sci 1997; 110: 1013-22.
15) Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Takeichi M, et al. α-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. J Cell Biol 1998; 142: 847-57.
16) Imamura Y, Itoh M, Maeno M, Tsukita S, Nagafuchi A. Functional domains of α-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. J Cell Biol 1999; 144: 1311-22.
17) Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to α-catenin and actin filaments. J Cell Biol 1997; 138: 181-92.
18) Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. J Cell Biol 2000; 148: 399-403.
19) Polakis P. Wnt signaling and cancer. Genes Dev 2000; 14: 1837-51.
20) Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. J Cell Biol 1992; 118: 703-14.
21) Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, van Roy F, Birchmeier W, et al. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive *v-Src* gene. J Cell Biol 1993; 120: 757-66.
22) Hamaguchi M, Matsuyoshi N, Ohnishi Y, Gotoh B, Takeichi M, Nagai Y. p60*v-Src* causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. EMBO J 1993; 12: 307-14.
23) Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Ito F, et al. Tyrosine phosphorylation of β-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. Cell Adhes Commun 1994; 1: 295-305.
24) Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. β-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. J Cell Biol 1994; 127: 1375-80.
25) Ochiai A, Akimoto S, Kanai Y, Shibata T, Oyama T, Hirohashi S. *c-erbB-2* gene product associates with catenins in human cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 1994; 205: 73-8.
26) Brady-Kalnay SM, Rimm DL, Tonks NK. Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo. J Cell Biol 1995; 130: 977-86.
27) Balsamo J, Leung T, Ernst H, Zanin MK, Hoffman S, Lilien J. Regulated binding of PTP1B-

like phosphatase to N-cadherin: control of cadherin-mediated adhesion by dephosphorylation of β-catenin. J Cell Biol 1996; 134: 801-13.
28) Kypta RM, Su H, Reichardt LF. Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. J Cell Biol 1996; 134: 1519-29.
29) Lampugnani MG, Corada M, Andriopoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. J Cell Sci 1997; 110: 2065-77.
30) Calautti E, Cabodi S, Stein PL, Hatzfeld M, Kedersha N, Paolo Dotto G. Tyrosine phosphorylation and Src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. J Cell Biol 1998; 141: 1449-65.
31) Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. Nature 1996; 379: 560-4.
32) Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. Nature 1996; 384: 173-6.
33) Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. Trends Biochem Sci 1993; 18: 343-8.
34) Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. Biochem J 2000; 15: 1-18.
35) Maroun CR, Holgado-Madruga M, Royal I, Naujokas MA, Fournier TM, Park M, et al. The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. Mol Cell Biol 1999; 19: 1784-99.
36) Kartenbeck J, Schmelz M, Franke WW, Geiger B. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca^{2+} ion medium. J Cell Biol 1991; 113: 881-92.
37) Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Takai Y, et al. Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells-regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. Oncogene 1999; 18: 6776-84.
38) Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Hirano T. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. Mol Cell Biol 1998; 18: 4109-17.
39) Takayama Y, Tanaka S, Nagai K, Okada M. Adenovirus-mediated overexpression of C-terminal Src kinase (Csk) in type I astrocytes interferes with cell spreading and attachment to fibronectin. Correlation with tyrosine phosphorylations of paxillin and FAK. J Biol Chem 1999; 274: 2291-7.
40) Imamura H, Takaishi K, Nakano K, Kodama A, Oishi H, Takai Y. Rho and Rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesions in MDCK cells. Mol Biol Cell 1998; 9: 2561-75.
41) Kodama A, Matozaki T, Fukuhara A, Kikyo M, Ichihashi M, Takai Y. Involvement of an SHP-2-Rho small G protein pathway in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell scattering. Mol Biol Cell 2000; 11: 2565-75.
42) Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol 1998; 143:391-401.
43) Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. Nature 1987; 329: 341-3.
44) Balda MS, Gonzalez-Mariscal L, Matter K, Cereijido M, Anderson JM. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. J Cell Biol 1993; 123: 293-302.
45) Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. EMBO J 1997; 16: 7032-44.
46) Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. Nature 1991; 351: 69-72.
47) Okada M, Nada S, Yamanashi Y, Yamamoto T, Nakagawa H. CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of Src family kinases. J Biol Chem 1991; 266: 24249-52.
48) Royal L, Park M. Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 1995; 270: 27780-7.
49) Khwaja A, Lehmann K, Marte M, Downward J. Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and

tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. J Biol Chem 1998; 273: 18793-801.
50) Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. Trends Biochem Sci 1997; 22: 355-8.
51) Tsukita S, Oishi K, Akiyama T, Yamanashi Y, Yamamoto T, Tsukita S. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. J Cell Biol 1991; 113: 867-79.
52) Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. J Biol Chem 1999; 274: 19347-51.
53) Kantak SS, Kramer RH. E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. J Biol Chem 1998; 273: 16953-61.
54) Miller JR, Moon RT. Signal transduction through β-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. Genes Dev 1996; 10: 2527-39.
55) Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 1999; 13: 2905-27.
56) Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. Nature 1994; 372: 786-91.
57) Shinohara M, Kodama A, Matozaki T, Fukuhara A, Tachibana K, Nakanishi H, et al. Roles of cell-cell adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Gab-1. J Biol Chem 2001; 276: 18941-6.

© 2003 The Medical Society of Saitama Medical School