

Title	Identification of Csk binding proteins as scaffolds for Src/Csk regulatory circuit
Author(s)	齊藤, 一伸
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1771
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	さいとうかずのぶ 齊藤 一 伸
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 21775 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Identification of Csk binding proteins as scaffolds for Src/Csk regulatory circuit (Src チロシンキナーゼの活性調節の足場となる Csk 結合蛋白質の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 雅人 (副査) 教授 高尾 敏文 教授 三木 裕明

論 文 内 容 の 要 旨

Src family tyrosine kinases (SFK) は細胞膜直下に局在し、種々の受容体からのシグナルを細胞内チロシンリン酸化に変換する分子スイッチとして機能する。正常細胞では、SFK は Csk によりリン酸化された不活性型として存在することで、細胞の恒常性が維持されている。Csk は膜局在シグナルを持たないため、膜に存在する SFK に効率よく作用するためには膜近傍に存在するアダプター蛋白質が必要となる。本研究では、Csk を SFK の機能の場にリクルートするアダプター分子を網羅的に探索し、Csk を介する SFK 制御機構の全貌を明らかにすることを目的とした解析を行った。Csk 欠損マウス胎児由来線維芽細胞 (Csk^{-/-} MEF) を用いることにより、SFK が活性化して Csk がアダプター分子と結合しうる状況を固定化した実験系を確立し、新規 Csk 結合蛋白質の同定及び機能解析を行った。

まず初めに Csk SH2 ドメインの GST 融合蛋白質を用いた Pull-down 法による結合分子の同定を試みて、増殖シグナルの制御に関わるアダプター分子 Dok-1 を同定した。Dok-1 は EGF 刺激に応答し SFK の活性依存的にリン酸化され、Csk と結合することを確認した。次に、COS7 発現系における Src と Dok-1 の強制発現実験より、Src が Dok-1 と直接結合することにより活性化することが示唆された。そこで、Dok-1 と結合した Src のリン酸化状態を調べた結果、Csk が結合できない Y450F 変異体と結合した Src では Tyr 527 のリン酸化レベル (不活性型の指標) が低下していることが明らかとなった。以上のことから、活性化した Src は Dok-1 と結合してリン酸化し、その場に Csk をリクルートさせることによって効率よく活性抑制を受けることが明らかとなった。

次に、より網羅的に Csk 結合蛋白質を探索するために TAP 法を用いた解析を行った。特にヒトのがんと密接に関連する、c-Src の制御に関わる分子を同定するために、Csk^{-/-} MEF に c-Src を発現させ形質転換し、さらに TAP タグを付加したキナーゼ活性の無い Csk 変異体を安定発現する細胞株を樹立した。この細胞から TAP 精製した Csk 複合体を SDS-PAGE 解析したところ、形質転換に伴ってリン酸化が変化する蛋白質 ZO-1/2 が同定された。ZO-2 について、その内在性のリン酸化状態を確認したところ、c-Src による形質転換依存的にリン酸化が上昇することが確認された。また、HEK293T 細胞を用いた強制発現実験から ZO-2 がリン酸化依存的に Csk と結合すること、さらに Csk の SH2 ドメインと ZO-2 のリン酸化チロシンが結合することが確認された。以上の結果から、SFK が関与することが知られていた細胞間相互作用においても、接着帯に局在する ZO 蛋白質を足場にした SFK/Csk の活性制御系が重要な役割を担うことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、Src family tyrosine kinases (SFK) の活性制御因子 Csk の機能調節に関わるアダプター分子の同定及び機能解析を行った。SFK が活性化し多くのアダプター分子がリン酸化された状態にある Csk 欠損細胞を用いて、まず、Csk SH2 ドメインに結合する分子として増殖シグナルの制御に関わるアダプター分子 Dok-1 を同定した。EGF 刺激により Dok-1 が SFK の活性依存的にリン酸化されて Csk と結合することを確認し、活性化した Src が Dok-1 と結合してリン酸化し、そこに Csk がリクルートされることによって効率よく Src が活性抑制を受けることを明らかにした。次いで、より網羅的に Csk 結合蛋白質を探索するために TAP 法を用いた解析を行い、接着帯蛋白質 ZO-1/2 を新たな Csk 結合分子として同定した。ZO-2 は c-Src による形質転換依存的にリン酸化が上昇し Csk と特異的に結合することが確認され、接着帯においてもアダプター分子を足場にした SFK/Csk の活性制御系が重要な役割を担うことが示唆された。以上の成果は、SFK の機能調節機構の新たなメカニズムを提出するものであり、よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。