

Title	Spatio-temporal imaging of activation and regulation of the Src family tyrosine kinase in living cells
Author(s)	松岡, 秀忠
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/45121">http://hdl.handle.net/11094/45121</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	松岡秀忠
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第18417号
学位授与年月日	平成16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	Spatio-temporal imaging of activation and regulation of the Src family tyrosine kinase in living cells (生細胞内における Src family tyrosine kinase 活性制御の時空間的イメージング)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 雅人 (副査) 教授 関口 清俊 教授 平岡 泰

#### 論文内容の要旨

Src family tyrosine kinase (SFK) は、様々な細胞外情報を細胞内へ蛋白質チロシンリン酸化として情報を伝える分子スイッチとして機能し、細胞の分化、増殖、接着、運動などきわめて多様な細胞応答のシグナル伝達系の制御に重要な役割を担うことが知られている。SFKは、C末端の制御チロシン残基のリン酸化状態によって、その活性が厳密に制御されている。さらに近年、そのC末端チロシン残基を特異的にリン酸化しSFKの活性を負に制御するCsk (c-terminal Src kinase)、及びCskと結合するSFK基質である膜蛋白質Cbp (Csk binding protein)の同定により、現在、これら2分子を介したSFKの活性制御機構の存在が推定されている。しかしながら、実際の生きた細胞内でこのようなSFKの制御機構が本当に存在し、機能しているのか、またSFKがいつどこで活性化し、様々な細胞応答を制御しているのかについては明らかとなっていない。

本研究では、生細胞内でのSFKを介した様々な事象をリアルタイムに観察することにより、実際の生きた細胞内でのSFKの作用機序および制御機構の解明を目的としている。近年、蛍光特性の異なる様々な改変型GFPの作製、さらにその改変型GFPを用いたFRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 技術の応用により、様々な生体分子の動態を生細胞内でリアルタイムに可視化することが可能となっている。私は、このGFP-based FRET技術を利用することにより、生細胞内でのCbp/Cskを介したSFK活性制御機構を解析し、さらにSFK活性化モニター分子として、1分子内にCbp、Csk、CFP、YFPを融合した1分子FRETプローブ: Chimeraを作製し、SFKの活性化状態を時空間的に解析した。

FRETによるCbp/Csk間相互作用の解析により、実際の生きた細胞内でCbpがSFKによってリン酸化を受けると、Cskを細胞膜へとリクルートしてSFKの制御が行われるという、SFKの活性制御機構が存在し、機能していることを明らかとした。さらに、1分子FRETプローブを作製することにより、生細胞内でのSFK活性化状態のイメージングを可能とし、EGF刺激に伴うSFKの活性化がラッフリング膜で一過性に起こっていることを明らかにすることができた。さらに、2分子間FRETの解析からCbp/Csk間の相互作用もラッフリング膜で一過性であったことから、ラッフリング膜がEGF刺激により誘導されるSFKシグナリングの場であることが示唆された。また、SFK活性化モニター分子: Chimeraが、細胞運動におけるSFK活性化状態のモニターも可能であることを示し、さらに様々な

細胞応答における SFK 活性化状態のモニタリングに有用な tool となると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、癌遺伝子産物 v-Src の正常型プロトタイプとして同定された Src family tyrosine kinase (SFK) の生きた細胞内での作用機序およびその活性制御機構を解明することを目的として行われた。これまでの主に生化学的な研究によって、SFK の機能が非受容体型チロシンキナーゼ Csk (C-terminal Src kinase) および Csk と結合する膜蛋白質 Cbp (Csk binding protein) によって制御されることが示唆されていた。しかしながら、実際の生きた細胞内でこのような SFK の制御機構が存在し機能しているのか、また、SFK がいつどこで活性化し、様々な細胞応答を制御しているのかについての明確な証拠は得られていなかった。そこで本研究では、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 技術を導入することによって、Csk および Cbp の生きた細胞内での挙動をリアルタイムモニターすることを試みた。その結果、Cbp が SFK によってリン酸化を受けると Csk が細胞膜へリクルートされて、SFK の制御が行われるという SFK の活性制御機構が存在し機能していることを示すことに初めて成功した。また、FRET 技術を利用した SFK 活性化モニター分子の開発により、生細胞内での SFK の活性化状態をリアルタイムに解析することに成功し、ラフリング膜が EGF 刺激により誘導される SFK シグナリングの場であることを明らかにした。さらに、今回作製した SFK 活性化モニター分子が、細胞運動における SFK の活性化状態の解析にも利用可能なことが示され、その他の SFK が関与する様々な細胞応答における SFK 活性化状態の解析に有用な tool になることが示唆された。以上の研究成果は、チロシンキナーゼの介在する細胞内情報伝達機構を理解する上できわめて重要な情報を提供することから、博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。