

Title	Role of Src family tyrosine kinases in the Epidermal Growth Factor signaling
Author(s)	笠井, 篤子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46494
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	かき い あつ 子 笠 井 篤 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 20030 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	Role of Src family tyrosine kinases in the Epidermal Growth Factor signaling (EGF シグナリングにおける Src family tyrosine kinases の役割解析)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 雅人 (副査) 教授 永井 克也 教授 吉川 和明

論 文 内 容 の 要 旨

細胞の増殖・分化・接着など多様な細胞応答のシグナル伝達において、Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) がチロシンリン酸化の制御を担う分子スイッチとして機能することが知られている。また、SFK の多くがラフトに濃縮されていることから、SFK はラフトを起点とした細胞内シグナル伝達系で重要な役割を担うと考えられている。そこで PC12 細胞を用いて EGF シグナリングと SFK との関連性をラフトに焦点を置いて解析した。

ウエスタンブロッティングによる解析から EGF 刺激により、EGF レセプター (EGFR) のラフトへの集積と活性化、ラフト内の SFK、特に Src および Yes の活性化が観察された。そこで EGF 刺激前に SFK の活性阻害剤で処理したところ、PC12 細胞の分化が観察された。また、Csk を発現させた場合でも、同様の結果が得られた。次にラフトの働きを抑える薬剤 Nystatin 存在下で EGF 刺激したところ、分化が観察された。PC12 細胞は NGF 刺激では Erk1/2 が持続的に活性化することで分化が誘導されるのに対して、EGF 刺激では Erk1/2 が一過性に活性化するため増殖が誘導されると考えられている。そこで Erk1/2 の活性時間を調べたところ、持続的な活性化が観察された。上流分子 MEK の阻害剤で処理したところ、SFK の活性を抑えた条件下での EGF 刺激による細胞分化は抑制された。したがって SFK の活性を抑制することで EGF のシグナルが持続し細胞の分化が誘導されたと考えられる。

また Csk 欠損線維芽細胞においても、シグナルの持続が観察され EGFR の分解抑制が観察された。Csk を過剰発現させても同様の結果が得られた。よって EGF シグナリングにおいて SFK の活性が EGF シグナルのダウンレギュレートに関与することが示唆された。そこで、SFK の活性化が EGF シグナリングのダウンレギュレーションのどこに関与しているか解析するため、Texas-red を付加した EGF の動きを time-lapse 顕微鏡で観察した。その結果、PP2 処理した細胞での EGFR のクラスタリング形成の遅れが観察された。したがって、SFK はエンドサイトーシスの初期反応となるレセプターのクラスタリングを促進することで、シグナルを調節していると考えられる。

このようなメカニズムに関与する SFK の基質を探索するため、ラフト内において SFK の活性依存的に EGF 刺激に応じてリン酸化されるタンパク質を解析した。その結果、MGC72560 (p18) という機能未知のタンパク質が同定された。p18 は N 末端にミリスチン酸あるいはパルミチン酸が付加しラフトに局在すると考えられる。また、いくつかのチロシン残基が存在し、脊椎動物において構造がよく保存されており、無脊椎動物においても存在することが明

らかとなった。p18 を発現させたところ、EGF 刺激依存的にリン酸化が上昇し、c-Src との共発現でもリン酸化された。また、リン酸化された p18 はラフトに存在し、EGF 刺激によりラフトへ移行することが推測された。また、p18 は細胞膜、小胞膜およびゴルジ膜に局在することがわかった。COS1 細胞において p18 の動きを time-lapse 顕微鏡で観察したところ、小胞上で動くことがわかった。PC12 細胞で p18 の動きを観察したところ、EGF 刺激前は細胞膜上に存在した p18 が刺激後中へ取り込まれた。この動きは EGF-TR の動きと非常によく似たものであった。以上より、SFK は EGF 刺激依存的に p18 をリン酸化し、レセプターのクラスターリングといった膜の動きを調節していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

笠井氏は、EGF (上皮増殖因子) による細胞増殖シグナル伝達経路における非受容体型チロシンキナーゼ Src family tyrosine kinase (SFK) の役割を明らかにするために、細胞膜マイクロドメイン lipid rafts に焦点をあてた解析を行った。まず、PC12 細胞を EGF 刺激することにより EGF 受容体が lipid rafts へ集積し、SFK (Src と Yes) が活性化されることを観察した。また、SFK 阻害剤 (PP2、SU6656) の添加や、SFK の negative regulator Csk の発現により、EGF 刺激により増殖はむしろ抑制され神経細胞様への分化が促進されることを見出した。さらに SFK 活性の阻害によって、EGF 受容体の下流に位置する Erk1/2 の活性化が持続すること、EGF 受容体の分解が抑制されることを見出した。これらの結果より、SFK が EGF シグナルの down-regulation に関与することが示唆された。次に EGF 受容体の挙動を生細胞で観察し、SFK の活性抑制によって EGF 受容体の膜上での集積が抑制されることを見出した。さらにこの現象を分子レベルで解明するために、lipid rafts に存在する SFK の基質分子の検索を行い、新たな分子 (p18) の同定に成功した。p18 は SFK に依存して EGF 刺激によってリン酸化が亢進すること、EGF 刺激によって lipid rafts に集積すること、EGF 受容体と同様に細胞膜及び細胞内 vesicle に局在することなどから、p18 が受容体分子の細胞内 trafficking の制御に係わる SFK 基質として機能することが示唆された。以上の成果は、SFK の機能に関する新たな局面を開く独創的なものであり、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。