



Title	A FRET-based probe for epidermal growth factor receptor bound non-covalently to a pair of synthetic amphipathic helixes
Author(s)	伊藤, 玲奈
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47535
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 **い 伊 とう 藤 れい 玲 な 奈**

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 0 9 4 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 **A FRET-based probe for epidermal growth factor receptor bound non-covalently to a pair of synthetic amphipathic helices**
(両親媒性ヘリックスを利用した上皮増殖因子受容体の FRET モニター分子の開発)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 高倉 伸幸

(副査)
教 授 目加田英輔 教 授 岡田 雅人

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) は、細胞の増殖、分化、運動に関与する代表的な細胞膜受容体型チロシンキナーゼである。細胞膜上で上皮細胞増殖因子 (EGF) と結合した EGFR は二量体を形成し、自己リン酸化反応により活性化される。この活性化型 EGFR は、多様なシグナル伝達分子を介して下流へと情報を伝達する一方、エンドサイトーシスによって、速やかに細胞内小胞へと取り込まれ、やがては後期エンドソームにて分解されることが生化学的実験により分かっている。しかし、活性化型 EGFR が細胞膜上から細胞内部へと輸送される過程において、EGFR の活性がどのように変化していくのか、その時空間的な活性制御はほとんど不明である。そこで、EGFR の活性化状態を生細胞でリアルタイムにイメージングするために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたプローブを開発した。

〔 方法ならびに成績 〕

1. EGFR の活性をモニターする分子の作製

当研究室で報告したチロシンリン酸化モニター分子 Picchu を材料として、EGFR の活性化と局在変化とをモニターする FRET プローブを作製した。Picchu プローブは、アダプター分子 CrkII を、緑色蛍光蛋白質の黄色変異体 (YFP) とシアン色変異体 (CFP) とで挟んだ構造をしている。CrkII が EGFR を始めとするチロシンキナーゼによってリン酸化を受けるとプローブの構造が変化し、それに伴い FRET 効率が增加する。この Picchu プローブを EGFR 活性化モニターへと改変するために、ヘテロダイマーを形成する二つの coiled-coil ペプチド ZIPA2 と ZIPB1 を利用した。まず、ZIPA2 を EGFR の C 末端に、ZIPB1 を Picchu の N 末端に融合させたものを作製し、それぞれを EGFR-Z および Picchu-Z と命名した。この両者を細胞内に発現させると、本来は細胞質にしか局在しない Picchu が、ZIP ペプチドを介して EGFR に結合するために、細胞膜および小胞体に局在するようになった。すなわち、この Picchu-Z と EGFR-Z とを共発現する系を用いて、ごく近傍における EGFR のチロシンキナーゼ活性を FRET 効率としてモニターすることができるようになった。

2. Picchu-Z の局在と EGF 刺激応答によるリン酸化状態の評価

Picchu-Z が、ZIPA2 依存性に EGFR に結合し、EGFR と挙動をとともにすることを免疫染色、ウェスタンブロット、褪色後蛍光回復法にて確認した。さらに、Picchu-Z が EGF 刺激により EGF 受容体とほぼ同一のタイムコースでチロシンリン酸化を受けることを確認した。

3. EGF 刺激時の Picchu-Z を用いた EGFR の活性変化の解析

EGFR-Z と Picchu-Z とを共発現する細胞を EGF で刺激し、FRET イメージングを行った。EGF 刺激後、FRET 効率は形質膜上で速やかに上昇し、EGFR がエンドソームに取り込まれた後も FRET 効率は上昇したまま維持され、やがてエンドソームが核周縁域に到達すると、そこではじめて FRET 効率の低下が観察された。この結果は、形質膜上で活性化した EGFR は核周縁で不活化されるまで活性を保ち、形質膜のみならずエンドソーム上でもシグナルを発し続けることを示している。

4. EGFR の活性化と不活性化による Picchu-Z の FRET 効率の変化

上記の実験において、高い FRET 効率がエンドソーム上で遷延するのは、脱リン酸化反応がプローブ上では速やかに起きていないためである可能性も考えられる。そこで、EGFR 活性を AG1478 にて阻害してみたところ、EGF 刺激によって上昇した FRET 効率は、AG1478 の投与によって速やかに定常状態に戻った。このことは、持続する高い FRET 効率は持続する高い EGFR のチロシンキナーゼ活性によるものであることを示している。

[総 括]

本研究では、ヘテロダイマーを形成する coiled-coil ペプチドを使うことで、既存の FRET プローブを目的とする蛋白の活性状態を測定するプローブに改変できることを示した。その一例として、EGFR の活性を測定するプローブの作製し、EGF 刺激後の EGFR の活性変化をモニターした。その結果、EGFR のチロシンキナーゼ活性は EGF と結合した形質膜上のみならず、エンドソーム上でも高い活性を維持し、核周縁部の後期エンドソームに到達してはじめて不活化されることが示された。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞増殖因子受容体（EGF 受容体）は、細胞増殖を制御する最も代表的な受容体型チロシンキナーゼであり、その異常は癌化を引き起こす。申請者は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の原理に基づくチロシンキナーゼの活性化モニターを、ヘテロ二量体を形成する ZIP ペプチドを介して EGF 受容体に非共有結合的に結合させ、EGF 受容体の活性状態を測定する系を開発した。さらに、このプローブを用いて EGF 受容体の活性変化を生細胞内でビデオ画像化することに成功した。EGF により刺激された細胞において、EGF 受容体は、形質膜上のみならず細胞内に取り込まれた後のエンドソーム上でも高い活性を維持し、核周縁部のエンドソームに到達してはじめて不活化されることを見出した。以上の結果は、ZIP ペプチドが FRET プローブの応用範囲を拡大することを示すとともに、EGF 受容体の活性制御機構の解明に大きく貢献するものであり、学位に値するものと認める。