

審査の結果の要旨

氏名 久保健一郎

本研究は哺乳類中枢神経系の層構造の形成に必須であるリーリンシグナルの伝達メカニズムを明らかにするため、リーリン分子の多量体形成とその下流に存在する Dab1 のチロシンリン酸化のメカニズムについて解析し、下記の結果を得ている。

- 1) Reelin 同士のホモフィリックな結合を、異なったエピトープタグをつけた Reelin 分子の免疫共沈降によって生化学的に証明した。
- 2) Reelin 分子は何分子が互いに会合するのかを検討した。Reelin は単量体でも分子量 400k の大きな蛋白質であることから、Reelin 分子を電気泳動する際にアガロース PAGE 法を用いることにより、会合体の分子量を調べた。無血清条件下で培地中に分泌された Reelin は、還元剤の非存在下では、2 量体に当たる分子量にシフトした。これは架橋剤を用いても同様で、3 量体以上の多量体は検出されなかった。脳のサンプルを用いても同様の結果が得られ、生体内でも S-S 結合による 2 量体を基本構造として存在すると考えられた。
- 3) 機能阻害抗体によって認識される Reelin の N 末部分を欠損させると、2 量体にとどまらずに 3、4 量体も形成した。一方で Dab1 のチロシンリン酸化誘導能も低下する事から、N 末は規則正しい 2 量体形成と、効率的な Dab1 のチロシンリン酸化の両方に重要な役割を持つ可能性がある。
- 4) 変異体の作成により Reelin は C 末でリポ蛋白受容体と結合する事が明らかになった。
- 5) Reelin によって誘導される Dab1 のチロシンリン酸化が Src ファミリーチロシンキナーゼによるものであるか否かを検証するために、Src ファミリーの阻害剤である PP2、及び対照として PP3 で処理して、リーリンによる Dab1 のチロシンリン酸化誘導に与える影響を調べた。PP2 で処理した際にのみ、リーリンによる Dab1 のチロシンリン酸化誘導が特異的に阻害された事から、培養細胞において Dab1 が Src ファミリーチロシンキナーゼによってリン酸化されることが強く示唆された。
- 6) *reeler* の皮質細胞を初代培養して、Reelin を添加すると、最初は可溶性画分に存在していた Dab1 が、Reelin 処理により Src ファミリーのチロシンキナーゼが濃縮されているラフト画分に移行することを発見した。このとき、Dab1 蛋白質あたりのチロシンリ

ン酸化は、ラフト画分において高度に亢進していた。

7) ラフトを破壊した後では、Reelin による Dab1 のリン酸化は著しく減少した。このことから、ラフトが、Reelin の Dab1 へのシグナル伝達に非常に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

8) さらに、Dab1 のラフトへの移行が、その後のチロシンリン酸化にとって十分条件でありうるかを検討した。細胞内分子をラフトに強制的に局在化させるシグナル (CAAX) を、Dab1 の C 末に付けた。CAAX シグナルを付けた Dab1 は、Reelin 非存在下でも高度にチロシンリン酸化されるのが観察された。Reelin シグナル伝達に必須とされる Dab1 上のチロシンをフェニルアラニンに置換し、Reelin 依存的なチロシンリン酸化を受けなくなるように変異させた 5F-Dab1 に、CAAX シグナルをつけて同様の実験を行ったところ、チロシンリン酸化は見られなかった。この結果は、Reelin 非存在下で強制的にラフトへ局在させた Dab1 で見られた高度のチロシンリン酸化は、Reelin シグナル伝達に必須のチロシンで起こったことを意味する。

以上、本論文は、Reelin 会合体 (2 量体) の受容体への結合は、Dab1 のラフトへの移行を引き起こし、その結果として、ラフトに存在するチロシンキナーゼによってチロシンリン酸化を受けて下流へとシグナルを伝達することを明らかにした。従来報告されていた Reelin の受容体は、いずれも細胞内にチロシンキナーゼ活性をもっていないため、Reelin が如何に Dab1 をチロシンリン酸化するかが最重要な疑問であった。皮質層構造という高度に秩序付けられた形態形成を可能にする Reelin-Dab1 シグナル伝達経路の全容の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。