

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 橋戸 政哉

本研究は、細胞骨格と細胞外基質を連結する機能的複合体「接着焦点」の細胞間相互作用における生物学的機能を明らかにするため、表面反射照明及び全反射蛍光照明顕微鏡の有効的活用により、Ca²⁺依存性チロシンキナーゼ PYK2 の細胞内局在変化の制御機構とその生物学役割の解明を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇に伴い、PYK2 が細胞質から接着焦点へと移行し、接着焦点の崩壊を介して細胞辺縁部の中心部への撤退を誘導することを明らかにした。PYK2 の Ca²⁺依存的な接着焦点への移行に必要な PYK2 内ドメインとして、その C 末端側の領域を同定した。
2. 細胞の接着焦点及び辺縁部と、接着焦点に局在する PYK2 を表面反射照明及び全反射蛍光照明顕微鏡を用いて、長時間連続的に観察した。その結果、PYK2-GFP を発現する細胞において、PYK2 は細胞の葉状仮足の先端部に局在し、細胞の運動性は非常に高かった。また、これらの細胞は安定した細胞間接着を形成できないことも明らかになった。一方、GFP あるいは PYK2 の C 末端側を欠失した PYK2 変異体 (PYK2ΔC) を発現する細胞は、運動性が低く、隣接細胞との間に安定した細胞間接触を維持した。これらは PYK2 の接着焦点への移行が細胞間相互作用に影響を与える可能性を示唆している。
3. PYK2 の細胞間相互作用に与える影響を調べるため、これらの細胞の細胞間距離を統計的に調べた。細胞間距離の平均値は細胞密度依存性を示した。PYK2 発現細胞は GFP あるいは PYK2ΔC 発現細胞に比して、細胞間距離が有為に高いことが分かった。これらより、PYK2 の接着焦点への移行は細胞間反発を促進することが示唆された。

4. **PYK2** の接着焦点への移行を引き起こすシグナルとして Ca^{2+} シグナルが考えられる。
そこで、細胞間接触境界付近における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を調べた。その結果、細胞間接触境界付近において、自発的に発生する Ca^{2+} シグナルを見出すことができた。これを「 Ca^{2+} ライトニング」と名付けた。 Ca^{2+} ライトニングは細胞間接触境界付近でランダムに発生し、細胞内の局所で生じていることが分かった。また、これは細胞外カドミウム ($20 \mu\text{M}$) で完全に抑制され、細胞間接触境界付近から離れた細胞の中心部では全く観測されなかった。他の細胞と全く接触していない孤立した細胞の辺縁部においては Ca^{2+} ライトニングはほとんど観測されなかった。この結果は、細胞は隣接細胞との接触を感知し、細胞外からの Ca^{2+} 流入を必要とする、自発的にかつ時間的空間的に発生する Ca^{2+} ライトニングを引き起こすことを示している。
5. Ca^{2+} ライトニングと **PYK2** の接着焦点を介した細胞間反発の関係を明確化するための実験を行った。細胞間反発性を示している **PYK2** 発現細胞の Ca^{2+} ライトニングを細胞外カドミウムにて抑制したところ、**PYK2** 発現細胞は細胞外基質との接着面積を広げ、隣接細胞との間に明確な細胞間接着を形成した。この細胞間接着境界には N-カドヘリンが局在した。この結果は Ca^{2+} ライトニングが **PYK2** の接着焦点を介した細胞間反発の上流因子として機能していることを示唆する。

以上、本論文は、接着焦点に対して働く Ca^{2+} 依存性チロシンキナーゼ **PYK2** の機能解析から、細胞間相互作用における、 Ca^{2+} シグナルと接着焦点の全く新しい機能を見出すことができた。本研究はこれまで、未知に等しかった、接着焦点の細胞間接着における機能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。