

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 劉 輝

Src 型チロシンキナーゼファミリーのうち、Fyn は神経系で高く発現しており、多様なシグナル伝達系に関与し、脳発達および脳機能の両方に重要な役割を果たすことが示唆されている。本研究は Fyn が神経系のシグナル伝達に関与するメカニズムをさらに解明するため、Fyn の結合分子 TCGAP を同定し、その機能解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. Fyn の神経系の結合分子を探索するため、ヒト Fyn の全長をベイトとし、ヒト胎児脳の cDNA ライブラリーを用いて、yeast two-hybrid 法を行った。8.6×10<sup>6</sup> 個独立クローンのスクリーニングを行った結果、80 個の候補クローンが得られた。本研究では得られた候補分子の中で、RhoGAP ドメインを持つ蛋白質 TCGAP に着目して解析を行った。
2. HEK293T 細胞再構成系において、TCGAP と Fyn を一過性に発現させ、免疫共沈実験を行った結果、TCGAP は Fyn と結合した。その結合に必要な領域は Fyn の SH3 ドメイン領域であることが強く示唆された。また、再構成系により TCGAP は Fyn によってチロシンリン酸化された。4 週齢の野生型マウスと Fyn 欠損マウスから脳可溶化液を調製し、抗 TCGAP 抗体で免疫沈降を行った結果、マウス脳の内在性 TCGAP は Fyn によってチロシンリン酸化されることが示唆された。
3. TCGAP が細胞内で Rho ファミリーの GTPase に対して GAP 活性を持っているかを検討するため、Rho エフェクタープルダウンアッセイを行った。その結果、TCGAP は Cdc42 に対して選択的な RhoGAP 活性を示

した。さらに活性化型 Fyn と TCGAP を共発現させたところ、TCGAP の RhoGAP 活性は Fyn によるリン酸化で抑制されることが示された。

4. 各器官における TCGAP の発現パターンを検討するため、*in situ hybridization* 法を行った。胎生期と生後のマウスでの発現を調べた結果、*TCGAP* mRNA は神経系に特異的な強い発現を示した。
5. 培養神経細胞を用いて、TCGAP の神経細胞内の局在を観察した結果、未成熟神経細胞では TCGAP は細胞質にも神経突起にも存在していた。一方、成熟神経細胞では TCGAP は細胞質、軸索および樹状突起に存在したが、特にスパインへの局在が鮮明に観察された。これに対応してマウス脳から調製した PSD 画分を用いて行ったウェスタンブロットより、TCGAP が PSD に濃縮されていることが示された。
6. レトロウイルスベクターを用いて、PC12 細胞に野生型 TCGAP を過剰発現させた結果、NGF による神経突起伸長が抑えられた。一方、TCGAP の GAP 活性欠失変異体 R350I の過剰発現は NGF による神経突起伸長を促進した。また、NGF 刺激により、PC12 細胞の内在性 TCGAP のチロシンリン酸化レベルが上昇した。この TCGAP のチロシンリン酸化は Src ファミリーの阻害剤 PP2 によって抑制された。これらの結果から、NGF 刺激に伴い、Src ファミリーにより TCGAP がチロシンリン酸化され、その GAP 活性が抑制されることが、Cdc42 の活性上昇および神経突起の伸長に寄与すると考えられた。

以上、本論文は TCGAP が Fyn の新規基質であり、神経系における Src-Rho ファミリーシグナル伝達系の新たな構成分子であることを示した。本研究は神経系でのアクチン骨格制御に重要な Src 型キナーゼから Rho ファミリー GTPases に至るメカニズム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。