

論文審査の結果の要旨

氏名 尾崎 裕一

ERK (extracellular signal-regulated kinase)経路を初めとするいくつかのシグナル伝達経路は多彩な生命現象を制御することが知られている。例えば PC12 細胞においては同じ ERK 経路が一過性または持続性に活性化されることでそれぞれ細胞の増殖と分化という異なる細胞運命を制御する。このように情報を特定のシグナル伝達経路の時間波形にエンコードすることによって同じ分子ネットワークを用いて異なる作用を制御する点がシグナル伝達機構の本質的な特徴のひとつである。しかし、細胞外刺激の情報をシグナル伝達経路の時間波形へエンコードする仕組みは未だ不明である。本論文では PC12 細胞を用いた細胞内シグナル伝達の観測と数理モデルによる解析を用いて、刺激の異なる情報がどのように ERK の活性化の時間波形へエンコードされるかを解析している。

本論文は3章からなる。第1章は研究の背景と目的について述べた後、本研究の中心をなす *in silico* モデルの構築法について述べている。シグナル伝達ネットワークの *in vivo* のダイナミクスは、分子の発現レベルなどのクリティカルなパラメータの違いのために細胞株の間で異なるので、*in silico* ダイナミクスは単一細胞株の *in vivo* のダイナミクスで補正されるべきである。また ERK 経路にはいくつかの上流または下流の分子によって協調的に制御されるいくつかのクロストークポイントとなる分子があり、ダイナミクスが ERK 経路全体のダイナミクスを決定するので、増殖因子の濃度依存的なこれらのクロストークポイントの活性化ダイナミクスを測定するのは重要である。これらの点が既存の研究にはない新しい特徴である。

第2章はまず *in silico* と *in vivo* ダイナミクスのフィードバックによるモデルの構築を行っている。*In silico* モデルの構築にあたって、これまでの多数の文献に基づいて ERK 経路のブロックダイアグラムを構築した。既報の実験観測といくつかの仮定に基づいて *in silico* モデルのパラメータを決定した。次いで PC12 細胞の単一細胞株における *in vivo* のダイナミクスの計測に基づいてさらにパラメータを制限した。この過程において適宜ブロックダイアグラムを修正した。この結果、増殖因子から ERK にいたる *in vivo* の計測結果に対して高い再現性を持つ *in silico* モデルを構築した。

次に *in silico* モデルを用い、時間とともに徐々に増加する刺激に対する ERK 経路のダイナミクスの予測を行い、結果を *in vivo* で検証した。これらの結果、一過性の ERK 活性化が増殖因子の最終的な濃度ではなく増殖因子の急速な増加速度に依存するのに対し、持続性の ERK 活性化は NGF の増加速度あるいは減少速度に関わらず、NGF の最終的な濃度に依存することを示した。

さらに、*in silico* モデルを用いた阻害実験と定常状態の解析から、増殖因子の増加速度に依存する速い SOS と、遅い RasGAP 活性化が一過性の Ras 活性化を制御し、増殖因子の濃度に依存する C3G 活性化と刺激非依存的で一定の Rap1GAP 活性が持続性の Rap1 活性

化を制御することを示した。そしてこの結論から予測される定常状態における ERK の刺激に対する反応次数の違いを *in vivo* の計測により実証し、一過性と持続性の ERK 活性化の本質的なメカニズムはこの Ras と Rap1 の不活性化機構の違いであることを明らかにした。

第 3 章は EGF と NGF による ERK 活性化の違いはアダプタータンパク質より上流の異なるダイナミクスのためであることを論じている。最も大きな違いの 1 つはリン酸化したレセプターに対する FRS2 の異なる親和性から来ている。また、速度に依存する一過性の ERK 活性化の生理的意義として、拡散によって伝播する EGF ファミリーの空間的な勾配が、細胞の空間的な位置に依存して一過性と持続性の ERK 活性化の異なるダイナミクスを使い分けている可能性について議論している。

本論文では増殖因子の増加速度と最終的な濃度がそれぞれ Ras 経路と Rap1 経路によって明確に捕捉され、一過性の Ras 活性化と持続性の Rap1 活性化を通して一過性と持続性の ERK 活性化に変換されることを示した。さらにこの Ras 経路と Rap1 経路の特性の違いは、それぞれ刺激依存的な RasGAP 活性化と刺激非依存的な Rap1GAP という異なる不活性化機構によって説明されると結論した。

なお、本論文の第 1 章から 3 章は、笹川覚氏 藤田一広氏、黒田真也氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（ 科学 ）の学位を授与できると認める。