

論文審査の結果の要旨

氏名 河合 康俊

本論文は以下の3章より成る。

第1章は序論であり、本研究の背景、動機と目的が述べられている。タンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）によるタンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達の過程において中心的な役割を担っている。近年、生細胞内でのキナーゼ活性を非破壊的に分析する蛍光プローブが開発され、この手法によっていくつかのキナーゼについて細胞内動態に関する新たな知見が得られている。一方、細胞の増殖・分化などの重要な生体機能の制御に関与しているキナーゼ extracellular signal-regulated kinase (ERK) については、古くから盛んに研究が行われているにもかかわらず、細胞内のどこで、いつ活性化しているかを知るための分析手法が確立しておらず、細胞内動態に関する十分な知見が得られていない。本研究では、生細胞内において ERK がどこで、いつ活性化して基質タンパク質をリン酸化するかを検出するための新規蛍光プローブの開発を行い、それを用いて、細胞外刺激の下で起こる ERK を介した細胞内シグナル伝達のメカニズムについての新たな知見を獲得することを目的とする旨が述べられている。

第2章は、ERK 活性を検出する蛍光プローブの開発について述べている。蛍光プローブは、2色の蛍光タンパク質 (CFP, YFP)、基質ドメインである EGFR タンパク質の ERK リン酸化部位 T669 ペプチド、リン酸化認識ドメインである Rad53 タンパク質の FHA2 ドメイン、ERK 結合ドメインである RSK1 タンパク質の D ドメインから構成されるキメラタンパク質である。活性を持った ERK によって基質ドメインがリン酸化されると、リン酸化認識ドメインと相互作用することにより分子構造が変化して CFP-YFP 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率に変化が生じ、その結果 CFP と YFP の蛍光強度比が変化して ERK の活性を検出することが可能となる。ERK 結合ドメインは ERK に対して選択的に結合する性質を持っており、プローブの基質ドメインが ERK によって選択的かつ効率的にリン酸化されるように ERK をプローブに繋ぎ止める役割をする。これらの分子設計に基づき、蛍光プローブをコードする cDNA を遺伝子工学的に作製している。蛍光プローブを発現させた細胞を上皮増殖因子 (EGF) で刺激することによって蛍光プローブの基質ドメインがリン酸化されることをウエスタンブロッティング法によって示している。蛍光顕微鏡を用いて細胞内における蛍光プローブの蛍光強度比 (CFP/YFP) の測定を行い、EGF 刺激によって蛍光強

度比の増加、すなわち FRET 効率の減少が観察され、刺激後 15 分で応答がプラトーに達することを示している。また、蛍光プローブの基質ドメインのリン酸化部位をスレオニン残基からアラニン残基に置換したプローブ変異体では蛍光強度比の変化が観察されなかったという結果から、蛍光プローブの応答が基質ドメインのリン酸化に起因するものであることを示している。キナーゼ阻害剤を用いた薬理学的手法によって 3 種類のキナーゼ ERK、p38 MAPK、JNK に対する蛍光プローブの選択性の評価を行い、蛍光プローブのリン酸化が ERK によって選択的に引き起こされており、p38 MAPK や JNK によるものではないことを示している。ERK 結合ドメインを欠損したプローブ変異体は ERK 結合ドメインを有するプローブと比較して EGF 刺激に対する蛍光強度比の変化量が約 50%であったという結果から、蛍光プローブに組み込んだ ERK 結合ドメインが蛍光プローブの分析感度の向上に寄与していることを示している。核内移行シグナルおよび核外移行シグナルを連結した蛍光プローブを作製して核および細胞質における ERK 活性の可視化検出を行い、その結果、細胞質ではプローブの応答が一過的であり、核ではプローブの応答が持続的であるという顕著な違いがあることを示している。このような違いが見られる原因を明らかにするために、「細胞質には ERK を不活性化する何らかの因子が存在し、その因子は ERK の活性ドメイン内にあるホスホスレオニンとホスホチロシンを脱リン酸化して ERK を不活性化する働きを持つホスファターゼである」という仮説を立て、ホスファターゼによるチロシン脱リン酸化の阻害剤であるオルトバナジン酸ナトリウムで細胞を前処理した後に EGF 刺激を行い、蛍光プローブの応答を観察している。細胞質ではチロシン脱リン酸化を阻害することによってプローブの応答が持続的になり、核ではプローブの応答に変化が見られなかったという結果から、EGF 刺激によって活性化された ERK は、細胞質ではホスファターゼによる脱リン酸化を受けて不活性化されることを示している。

第 3 章は総合的結論である。

以上のように、本研究では、タンパク質リン酸化酵素 ERK の活性を検出するための蛍光プローブを開発した。さらに、この蛍光プローブを用いて、EGF 刺激時において核と細胞質との間で ERK 活性の持続時間に顕著な差が見られることを発見し、細胞質における ERK の活性化が一過的である原因は細胞質に存在するホスファターゼが ERK を不活性化するためであることを明らかにした。これらの研究は理学の発展に大きく寄与する成果であり、博士（理学）取得を目的とする研究として充分であると審査員一同が認めた。なお、本論文は各章の研究が複数の研究者との共同研究であるが、論文提出者が主体となって行ったものであり、論文提出者の寄与は充分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。