

論文審査の結果の要旨

氏名 一杉 太郎

本論文は以下の4章より成る。

第1章は序論であり、本研究の背景、動機と目的が簡潔に述べられている。細胞内情報伝達において非常に重要な蛋白質リン酸化酵素の一つである Src の活性化を細胞が生きたまま非破壊で検出できる蛍光プローブ分子 TM-Srcus を用いて、ヒト乳癌細胞由来の細胞である MCF-7 細胞内における Src の活性化の時空間分析を行うことを目的とすることが述べられている。さらに、Src の活性化の時空間分析の結果、MCF-7 細胞内の Src は生体膜上に浮かぶラフトと呼ばれるナノドメイン内で起きることが明らかになった。しかしながら、このラフトでの Src の活性化が細胞の機能にとってどれくらい重要なのかまだ分かっていない。そこで、Src の活性化をラフトでのみ阻害するプローブ分子 lipid raft-targeted Src inhibitory fusion protein (以下 LRT-SIFP) を開発し、それを発現させた MCF-7 細胞の機能解析を行うことも目的とすることが述べられている。

第2章は、TM-Srcus の発現した MCF7 細胞を通常の蛍光顕微鏡で観察し、Src の活性化の時空間分析を行った結果が述べられている。細胞膜と細胞内膜のそれぞれの領域内で Src の活性化を測定した結果、細胞膜では女性ホルモン E2 添加直後から Src の活性化が細胞膜上から始まり、徐々に細胞内膜に伝播されていく様子が示されている。この活性化の伝播のメカニズムを解明するため細胞をエンドサイトーシスの阻害剤 DynK44A により前処理すると、細胞内膜での蛍光強度比の減少が見られなくなる様子が示されている。一方、同じステロイドホルモンである男性ホルモン DHT 刺激ではこのような現象は見られず、細胞膜だけで蛍光強度比が変化している。また western blotting 法による実験から E2 刺激の場合、Src はエストロゲン受容体(ER)及び皮成長因子受容体 (EGFR) と結合し活性化されるのに対して、DHT 刺激の場合にはアンドロゲン受容体(AR)は EGFR と結合せずに Src を直接活性化することが示されている。EGFR はエンドサイトーシスにより細胞内膜へと運搬されることが知られており、以上のことから E2 により活性化した Src は EGFR とともにエンドサイトーシスにより細胞膜から細胞内膜へと運搬されていると結論付けている。一方、アンドロゲン刺激による Src の活性化の場合は EGFR と関係しないため活性化された Src がそのまま細胞膜にとどまっ

ていると結論付けている。

第3章では、全反射型蛍光顕微鏡を細胞の観察に用いることで、E2によるSrcの活性化が細胞膜上に浮かぶラフトと呼ばれるナノドメイン内で起きることを示し、その生理的な意義を検証した結果が述べられている。Srcの活性化をラフトでのみ阻害するプローブ分子LRT-SIFPを新たに開発し、LRT-SIFPを発現しているMCF-7細胞の細胞接着について調べている。その結果、LRT-SIFPは細胞接着を顕著に減少させることを示している。対照的に、阻害ペプチドを持たないLRT-SIFP Delは細胞接着を損なわない。LRT-SIFPに比べその阻害効果が1/60に低減されているLRT-SIFP Y6AもMCF-7細胞の細胞接着を抑制しない。さらに、LRT-SIFPがMCF-7細胞の細胞周期に影響を与えるかどうか検討している。LRT-SIFPをトランスフェクトしたMCF-7細胞のDNAをヨウ化プロビジウム(PI)で染色し、フローサイトメトリーにより測定している。LRT-SIFP Delに比べLRT-SIFPは、G₁期にある細胞に対するG₂/M期にある細胞の割合を減少させたが、LRT-SIFP Y6Aはこの割合を減少させないことを示している。以上の結果から、ラフトでのSrcの活性化がMCF-7細胞の細胞接着及び細胞周期にとって非常に重要であると結論付けている。第4章は総合的結論である。

以上のように、本研究では、蛍光プローブ分子TM-Srcusを用いることにより、Srcの活性化の場所が男女性ホルモン刺激によって異なることが初めて明らかにしている。またE2刺激によりSrcの活性化が生体膜上に浮かぶラフトで起きることを初めて見出している。この発見をもとに、新たに開発したラフト特異的なSrcの活性化阻害プローブ分子LRT-SIFPにより、このラフトにおけるSrcの活性化はMCF-7細胞の細胞接着及び細胞周期にとって非常に重要であることを示している。これらの細胞機能は癌の転移や増殖にとって重要なプロセスであることから、本研究によりラフトにおけるSrcの活性化が癌の転移や増殖に深く関わっていることが強く示唆されている。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。