

[別紙2]

審査の結果の要旨

張田 豊

本研究は蛋白尿の発生機序に重要な役割を担っていると考えられる腎糸球体上皮細胞スリット膜の構造、機能を明らかにするため、スリット膜の主な構成成分である nephrin と Neph1 のリン酸化、およびそれによる結合蛋白質の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1、既報の nephrin と同様に Src ファミリーチロシンキナーゼの Fyn が Neph1 に結合し、Neph1 をリン酸化する事を *in vitro* および HEK293T 細胞における発現系で明らかにした。
- 2、nephrin および Neph1 の細胞内領域において Fyn によりリン酸化をうけるチロシン残基の同定を *in vitro* でリン酸化した蛋白質をプロテアーゼ処理し、質量分析計により質量の変化を検出する事で行った。その結果、nephrin はその細胞内領域のすべてのチロシン残基および Neph1 は Y604, Y637, Y638, Y654, Y657 の 5 つのチロシン残基がリン酸化されうる事が判明した。Neph1 についてはこれらのチロシンのフェニルアラニン変異体と fyn を HEK293T 細胞を共発現させてリン酸化レベルを比べる事により細胞内でもこれらのチロシン残基がリン酸化されている事が明らかになった。
- 3、nephrin と Neph1 のチロシンリン酸化依存的な結合蛋白質を同定するために、pull-down アッセイを行った。リン酸化 nephrin には既報の Nck 以外に PLC $\gamma$ 、アダプター蛋白質 CrkI, Crk II, Crk-L, PI3kinasep85 が、またリン酸化 Neph1 にはチロシンキナーゼの Csk、アダプター蛋白質の Grb2 が結合する事が判明した。
- 4、Neph1 と Csk の SH2 ドメインの直接の結合は pull-down アッセイにより確かめられた。また Neph1 と Csk の fyn 依存的な結合が免疫沈降法により細胞内でも確認された。
- 5、Neph1 と Grb2 の結合は Neph1 の Y637, Y638 のチロシンリン酸化に依

存しており、これらのフェニルアラニン変異体では結合が認められなかつた。また、リン酸化 Neph1 は fyn による ERK の活性化に対して抑制作用を有し、さらに下流の AP-1 の転写活性に対しても抑制的に作用する事が明らかになった。これらの抑制作用は Grb2 との結合部位のチロシンリシン酸化に依存していたため、Neph1-Grb2 のリン酸化依存的な結合が下流の MAP キナーゼに対して抑制的に作用すると考えられた。

6、nephrin はリン酸化に伴い PLC $\gamma$  と細胞内で結合する事が免疫沈降法により明らかになった。PLC $\gamma$  の組織染色により腎糸球体、特に糸球体上皮細胞に PLC $\gamma$  が高発現している事が判明した。

以上、本論文はスリット膜複合体において Fyn によるチロシンリン酸化により多くの蛋白質間相互作用が制御されている事、また nephrin および Neph1 と種々のアダプター蛋白との結合によりその下流で様々なシグナル伝達系に影響を及ぼしている事が明らかになった。本研究はスリット膜の構造、機能の解明、ひいては蛋白尿の発症機序の解明において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。