

審査の結果の要旨

氏名 姚 皇治

本研究は細胞の遊走・浸潤において重要な役割を果たすドッキング蛋白 Cas-L のチロシンリン酸化制御機構を明らかにするため、ヒト肺癌細胞株 A549 に Cas-L および非受容体型チロシンフォスファターゼ SHP-2 をトランスフェクションする系にて、細胞遊走および Cas-L のチロシンリン酸化をアッセイしたものであり、下記の結果を得た。

1. A549 に Cas-L と SHP-2 を過剰発現して行った免疫細胞染色では接着斑における両者の共局在が示され、同部位における両者の相互作用が示唆された。
2. A549 に Cas-L と SHP-2 の野生型およびその不活性変異体である SHP-2 CS をトランスフェクションし、fibronectin (FN) をコートした transwell を用いて migration assay を行ったところ、Cas-L のトランスフェクションによって細胞遊走は亢進するが、SHP-2 の野生型を同時に過剰発現させたものにおいては Cas-L による細胞遊走の亢進が抑制された。この結果から、SHP-2 は Cas-L 依存性の細胞遊走を、その酵素活性によって負に制御していることが示唆された。
3. A549 に野生型の SHP-2 と不活性型の SHP-2 CS を Cas-L と共にトランスフェクションし、FN で刺激した後に lysate から Cas-L を免疫沈降してチロシンリン酸化を評価したところ、野生型の SHP-2 をトランスフェクションしたものでは不活性型の SHP-2 CS をトランスフェクションしたものよりもチロシンリン酸化が低下しており、SHP-2 は細胞内で Cas-L のリン酸化を抑制することが示された。また、抗 Cas-L 抗体による免疫沈降物を SHP-2 の GST 融合蛋白とインキュベーションした場合もチロシンリン酸化の低下を認め、またその効果は vanadate の添加により消失した。これらの結果から、SHP-2 はその酵素活性依存的に Cas-L のチロシンリン酸化を抑制していることが示された。
4. 293T 細胞に Cas-L, SHP-2 およびその substrate trapping mutant を Fyn の kinase negative mutant, constitutively active mutant と共にトランスフェクションして行った免疫沈降実験では、Cas-L と SHP-2 の trapping mutant が細胞内で複合体を形成することが示され、またその結合はチロシンリン酸化によって著明に増強した。この結果から、SHP-2 は細胞内において Cas-L とチロシンリン酸化依存性に複合体を形成し、そのリン酸化レベルを制御していることが示唆された。

以上、本論文はヒト肺癌細胞 A549 において、SHP-2 が Cas-L と複合体を形成し、そのチロシンリン酸化レベルを制御することで Cas-L 依存性の生物学的プロセスを制御することを示した。研究の進め方は論理的で、データの質も高く信頼性の高い研究成果である。本研究の成果は、SHP-2 による生物現象の制御の新しいメカニズムを提唱し、今後、腫瘍や炎症といった病態における Cas-L-SHP-2 相互作用の役割をあきらかにしていく事で臨床的な応用も期待できる研究結果であると考えられる。の点から、本論文は学位の授与に値するものと考えられる。