

論文審査の結果の要旨

氏名 田崎 真哉

序論では、EGFR の変異が引き起こすシグナル伝達異常に関する生化学的な解析の現状とその問題点について論じている。その現状を踏まえ、質量分析計を用いた包括的なリン酸化プロテオミクス技術の有用性を述べている。さらに、シグナル伝達異常のシステムレベルの理解に向けたフレームワークとして EGFR 計算機モデルを用いる事の意義およびその現状を論じている。また、EGFR 変異のモデル系として自己リン酸化部位変異に着目した経緯およびその有用性ととも、本論文の目的と意義を述べている。

2章の前半部分では EGFR 変異体シグナル伝達に関するリン酸化プロテオミクス解析について述べられている。EGFR シグナル伝達は主にタンパク質のチロシンリン酸化修飾を介して伝達されることから、筆者はチロシンリン酸化タンパク質の動態に着目し包括的な定量を行った。実験の材料として野生型 EGFR(WT)および 992 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した EGFR 変異体(Y992F)を安定発現した NIH3T3 細胞を用い、EGF 刺激存的な細胞内のチロシンリン酸化関連タンパク質量の時系列変化を安定同位体標識法(SILAC)により計測した。その結果、383 種類のペプチドを同定し、147 種のタンパク質に帰属した。これらのうち 41 種の EGF 依存的なチロシンリン酸化シグナルタンパク質を抽出し、株間での定量に成功した。

2章の後半部分ではリン酸化プロテオームデータを基にした生物情報学的なネットワーク解析について述べられている。まず、筆者は 41 種の EGF 依存的チロシンリン酸化タンパク質に関するパスウェイ解析を行った。タンパク質間の相互作用情報を用いて活性化チロシンリン酸化ネットワークを構築した。構築したパスウェイネットワークに株間での各タンパク質のリン酸化量の差、リン酸化量の時系列変動パターンの変化の差をマッピングすることで、WT 細胞と Y992F 細胞で制御が異なるパスウェイを解析した。その結果、Y992F 細胞においてリン酸化レベルの亢進を示す分子が多く見られた一方、EGFR のリン酸化レベルは低下を示した。時系列パターンは一部のタンパク質群、EGFR の分解に関するタンパク質および Erk1 において変化を示した。これらの結果は EGFR 自己リン酸化部位 Y992 はチロシンリン酸化シグナル伝達の活性化レベルと活性化パターンの制御に関わる可能性を示している。

続いて筆者は変異が引き起こす動的なシグナル伝達メカニズムの変化を詳細に調べることを目的として、EGFR シグナル伝達の計算機モデルを構築した。本計算機モデルは 100 以上のパラメーターを含む非常に複雑なモデルであり、パラメーターの推定が困難である。そこで、筆者はスーパーコンピューターを用いた超並列計算により、6000 万回以

上のシミュレーションを実行し、質量分析計によって計測された時系列情報を再現するモデルの推定に成功した。推定されたパラメーターは **EGFR** と **Plcg1** 間の結合親和性の低下、**EGFR** と **RasGAP** 間の結合親和性の低下、および **EGFR** インターナリゼーションの亢進といった **Y992F** 変異が引き起こす既知のシグナル伝達異常を再現するものであり、パラメーター推定の妥当性を支持するものであった。

筆者は構築した計算機モデルを用いて、細胞株間のチロシンリン酸化シグナルの差異を引き起こすメカニズムを推定するために局所の変数影響解析を提案した。すなわち **Y992F** モデルのパラメーターの値を **WT** モデルのそれに置き換えた時に生じるシミュレーション挙動の変化の度合いをパラメーター毎に計算した。その結果、**WT** モデルと **Y992F** モデル間シグナル伝達挙動の差異は未刺激状態のタンパク質の発現量の変化、タンパク質のリン酸化速度の亢進、**EGFR** と **Grb2** の解離定数の亢進、**EGFR** のユビキチン化速度の亢進によって主に規定されることが推定された。推定されたタンパク質発現量の違いは生物実験により検証され、さらに数値実験により細胞間のタンパク質発現量の効果を定量的に解析した。また、**EGFR** のユビキチン化速度の亢進を生物実験により傍証的に示し、**Y992F** 細胞における **EGFR** 分解の促進を見出した。加えて、タンパク質のリン酸化速度の亢進の必要性を数値実験により示し、過去の知見と合わせることで **Y992F** 細胞シグナル挙動には他のチロシンキナーゼとのクロストークが関わることを示唆した。

以上、本論文は定量プロテオミクスと計算機ネットワークモデリングの統合的フレームワークについて論じられており、**EGFR** 自己リン酸化部位変異の影響を動的ネットワークレベルで推定したものである。これらの結果は、変異シグナル伝達のシステムの理解および制御理論の進展に寄与することが期待できる。

なお、本論文は論文提出者が主体となって遂行および解析した研究であり、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（生命科学）の学位を授与できると認める。