

【論文の内容の要旨】

論文題目：神経系に発現するアダプター分子 FRS2 β の新規結合分子同定と機能解析

指導教員 後藤 典子 特任准教授

東京大学大学院 医学系研究科 (平成19年4月入学)

医学博士課程 病因・病理学専攻

氏名 峯岸 ゆり子

受容体型チロシンキナーゼである FGF 受容体の基質タンパクで、アダプター分子である FRS2 ファミリーには FRS2 α と FRS2 β が存在する。FRS2 α が FGF シグナル伝達の中心的役割を担っている一方で、FRS2 β に特異的なシグナル伝達、独自の生理学的機序に関してはいまだ多くが未解明である。

これまでに我々は、FRS2 β が神経細胞内において小胞状に発現し、一部がリソソームと共局在すること (*FEBS Lett.*, 583: 807-814, 2009)、また FRS2 β は EGF 受容体ファミリーと結合性を持ち、EGF シグナルに対して抑制的な作用を持つこと (*Oncogene*, 29: 3087-3099, 2010) などについて報告している。

本研究では FRS2 β のさらなる機能解析のため、FRS2 β に特異的な結合分子を LC-MS/MS Proteomics 解析により同定し、新規に得られた結合候補分子の中から E3 ユビキチンリガーゼである CBL と結合性を持ち、細胞内輸送に関与することで知られている CIN85/CD2AP ファミリー分子に着目し、FRS2 β との相互作用と、EGF シグナル抑制効果との関連について検討を行った。

CIN85/CD2AP との結合モチーフ検索の結果、FRS2 β 内には 2 箇所 of 結合モチーフ “Px(P/A)xxR” 配列が確認され、モチーフ内で結合核となる最後尾のアルギニン (R) をアラニン (A) 置換した変異型 FRS2 β (R251A、R392A、R251/392A) を用いた免疫沈降とウェスタンブロットの結果から、FRS2 β は CIN85/CD2AP と PxPxxR モチーフを介して結合していることを明らかとした。また FRS2 β を細胞内で強制発現させると、CIN85、CD2AP ならびに EGF 受容体ファミリーの 1 つである ErbB2 のタンパク量が減少することを見出した。免疫沈降とウェスタンブロットの結果から、一連の実験において FRS2 β -CIN85/CD2AP 複合体には ErbB2 の他、CBL も含まれていることを確認した。そこで、FRS2 β 発現による ErbB2 タンパク量の減少が CIN85、CD2AP または CBL と関連したものであるか、SiRNA 法により CIN85 と CD2AP、もしくは CBL をノックダウンした条件で検討を行った。その結果、CIN85 と CD2AP の両分子、もしくは CBL のノックダウンにより、FRS2 β 発現による ErbB2 タンパク量の減少が起こらなくなることが明らかとなった。またこのタンパク量の減少が細胞内分解に起因するものであるかについて、細胞内分解阻害剤を用いて検討を行ったところ、リソソーム系細胞内分解阻害剤処理により、FRS2 β を発現させても CIN85、CD2AP ならびに ErbB2 タンパク量の減少が起こらなくなることが明らかとなった。また FRS2 β と同様に正常神経組

織において発現している CIN85 をレンチウイルス系により細胞内で発現させると、細胞内で小胞状の共局在を呈し、またその共局在した小胞の一部がさらにリソソームと共局在することを確認した。以上の結果から、FRS2 β は CIN85/CD2AP-CBL と複合体を形成し、リソソームでの細胞内分解を介して ErbB2 タンパクを減少させることでシグナルの抑制的制御に寄与していることが示唆された。また内在性に ErbB2、CIN85、FRS2 β を同時に発現する細胞として胎生 14 日目胎仔マウス終脳からの初代培養神経細胞を用い、SiRNA 法により FRS2 β をノックダウンしたところ、CIN85 のタンパク量の増加と、培養経過日数とともに減少するはずの ErbB2 のタンパク量がコントロールと比較して維持されることが確認された。以上より、FRS2 β は正常神経では神経幹・前駆細胞から未分化な神経細胞へと分化する途中段階にある細胞で発現し、ErbB2 タンパク量を減少させることで、シグナルを抑制的に制御している可能性が示唆された。さらに野生型 FRS2 β を導入したヒト神経膠芽種細胞株 T98G 細胞では、無刺激および EGF 刺激によって誘導される軟寒天内での直径 100 μ m 以上のコロニー形成が抑制され、一方、CIN85 と非結合性の変異型 FRS2 β (RwA) を導入した細胞株ではこの抑制効果の一部が解除されることが確認された。以上より、従来報告して来た FRS2 β の持つ EGF シグナル抑制機能の一部に、ErbB2 タンパク量の減少によるシグナルの抑制的制御が含まれることが考えられた。

本研究より FRS2 β -CIN85/CD2AP-CBL 複合体はリソソームでの ErbB2 タンパクの分解を促進することで ErbB シグナルを抑制的に制御することが明らかとなった。また FRS2 β が ErbB2 のタンパク量を減少させる機能は、生理的には神経発生と関連し、神経細胞の分化成熟に支持的に寄与している可能性が示唆された。

FRS2 β が CIN85/CD2AP ファミリーと複合体を形成して ErbB2 のタンパク量を減少させるその作用機序の解明は、将来的には癌に対する創薬の可能性や種々の神経・精神疾患における新規知見にもつながる可能性を秘めた、意義のあるものであると考えられる。