

審査の結果の要旨

氏名 峯岸 ゆり子

本研究は神経系組織において発現している **FRS2 β** の分子機能を明らかにするため、特異抗体の作成と LC-MS/MS を用いた結合分子の同定より内在性 **FRS2 β** の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. **FRS2 β** 機能解析のため、バキュロウイルス系を用いたモノクローナル抗体の作成を行い、各種神経系細胞の分化マーカー抗体と合わせ、定量的 RT-PCR、免疫組織・細胞化学を行い、内在性 **FRS2 β** が成体マウスおよび胎仔マウスの神経組織に顕著に発現していることを明らかにした。また、LysoTracker 試薬と免疫細胞化学による検討から、初代培養神経細胞内で **FRS2 β** がリソソーム周囲に局在することが明らかとなり、**FRS2 β** が神経組織、特に分化した神経系の細胞においてリソソームと関連した機能を持ちうることを示された。
2. FLAG タグを付加した **FRS2 β** と **FRS2 α** をそれぞれ HEK293T 細胞内で一過性に過剰発現させ、LC-MS/MS を用いて結合分子の同定を行い、**FRS2 β** の新規結合分子である CIN85/CD2AP ファミリーを同定した。また、**FRS2 β** 内に 2 箇所の CIN85/CD2AP の結合モチーフを同定し、この結合モチーフの変異体 **FRS2 β** のプラスミドベクターを 3 種作成し、免疫沈降とウェスタンブロットを行い、**FRS2 β** が PxPxxR モチーフを介して CIN85/CD2AP と結合することを明らかにした。また同時に **FRS2 β** の強制発現により、ErbB2、CIN85、CD2AP のタンパク量が減少することを見出した。
3. **FRS2 β** の強制発現により ErbB2 のタンパク量が減少することに関し、CIN85、CD2AP、CBL について SiRNA 法によるノックダウンの実験を行ったところ、CIN85 と CD2AP の両分子を同時に、もしくは CBL を単独でノックダウンすると ErbB2 タンパク量が減少しなくなることを明らかにした。また抗 **FRS2 β** 抗体による免疫沈降サンプルに、CIN85 のほか、ErbB2、CBL も含まれていることをウェスタンブロットにより明らかとした。以上のことから **FRS2 β** が CIN85、CBL、ErbB2 と複合体を形成することで ErbB2 のタンパク量の減少に寄与していることが示された。
4. **FRS2 β** 発現により ErbB2 のタンパク量が減少することに関し、プロテアソームもしくはリソソーム系細胞内分解阻害剤を用いたウェスタンブロットによる検討から、**FRS2 β** は

5. **FRS2 β** もしくは変異体 **RwA** をレンチウイルスで導入した **T98G** 細胞を用い、軟寒天培養を行い、**FRS2 β** により半分程度抑制される足場非依存性の増殖が、**RwA**では一部解除されることを明らかとした。このことから、**FRS2 β** が持つ細胞増殖抑制作用の少なくとも一部には、**CIN85/CD2AP** 複合体形成と関連した **ErbB2** タンパク量の減少が関与していることが示唆された。
6. 胎生 14 日目胎仔マウス終脳半球から神経幹・前駆細胞と、神経細胞をそれぞれ培養し、培養 4 日後に各分子のタンパク量について検討を行った結果、神経幹・前駆細胞では **ErbB2** タンパク量が多く、**FRS2 β** および **CIN85** タンパク量は少ないことが明らかとなった。一方、神経細胞では **FRS2 β** 、**CIN85** のタンパク量が多く、**ErbB2** タンパク量が減少していた。神経細胞培養 4 日目には、タンパク量と同様に **ErbB2** の mRNA 量が幹細胞培養と比較して低下し、**CIN85** および **FRS2 β** の mRNA 量は神経細胞で顕著に上昇した。胎生 14 日目胎仔マウスからの神経細胞初代培養において、それぞれ培養 2 日後、4 日後、6 日後における **FRS2 β** タンパク量について確認したところ、**FRS2 β** は培養 2 日後から発現し、培養 4 日目には発現が最大となることを確認した。以上のことから、神経細胞の分化とともに発現する **FRS2 β** が同一細胞内で共に発現する **ErbB2** のタンパク量を減少しうる可能性を考慮し、初代培養神経細胞で内在性 **FRS2 β** を SiRNA 法でノックダウンし、2 日後に各分子の発現について確認を行った。その結果、**FRS2 β** ノックダウンにより、**CIN85**、**ErbB2** のタンパク量がコントロールと比較して増加することが明らかとなった。また、同条件下での **ErbB2** および **CIN85** の mRNA 量は、コントロールと比較して有意な差が認められなかった。以上のことから、**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。

以上、本論文は **FRS2 β** 特異抗体の作製、内在性 **FRS2 β** の細胞内局在と LC-MS/MS による結合分子の同定により **FRS2 β** の機能解析を行い、**FRS2 β** が **CIN85/CD2AP-CBL** と複合体を

形成し、**ErbB2** タンパクをリソソーム系で分解することで、**ErbB** シグナルを抑制的に制御することを明らかにした。また **FRS2 β** の **ErbB2** の抑制制御は、生理的には神経発生期の分化途中にある細胞で機能し、神経細胞の成熟に寄与している可能性が示唆された。本研究はこれまで未知であった、内在性 **FRS2 β** の機能解明に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。