

## (論文内容の要旨)

周期的な変動を示す生命現象として概日リズムや冬眠、体節形成があげられ、それぞれ周期的な振動を示す分子時計によって制御される。また培養細胞系において周期的な挙動をしめす遺伝子群として **Hes1**、**p53**、**IκBα**などが知られている。本研究において、申請者は、血清飢餓状態の培養細胞を細胞増殖因子 **bFGF** で刺激したところ、血清刺激同様、**Hes1** 遺伝子の転写量が2時間周期の振動を示すことを明らかにした。**FGF** 刺激による **Hes1** の発現振動の誘導及び維持には **ERK** 経路と **PI3K** 経路の両方の活性化が必要であった。さらに **FGF** 刺激によって **ERK** が2時間周期で活性化することを見出した。**ERK** の活性振動が **Hes1** の周期的変動に先だって起ること、**ERK** の活性化が **Hes1** の転写を制御することから **ERK** の振動が **Hes1** の周期的発現に影響を与える可能性が示唆される。一方、**PI3K** 経路に対する阻害剤によって **Hes1** の周期的な発現は阻害されるが、**ERK** の周期的活性化は阻害されなかった。このことから **ERK** の周期的活性化は **Hes1** の発現振動に依存しない現象であると示唆された。さらに **ERK** 経路の周期的活性化制御機構について解析を進めた。**FGF** 刺激した細胞において、**ERK** 経路の上流因子 **Ras** の活性化状態を測定したところ、**ERK** の活性と同様に、**Ras** の活性が周期的に変動する事を見出した。**Ras/ERK** 経路の活性振動は他の細胞増殖因子である **EGF** 刺激によっても観察された。**ERK** の活性化を阻害すると **FGF** 刺激による **Ras** の活性は高い状態で保たれ、活性振動が阻害された。活性振動を生み出す機構としてネガティブフィードバック機構が考えられた。そこで **Ras** より上流に位置する **ERK** によるネガティブフィードバック機構によって制御される候補分子として **Sos** に注目した。**ERK** によって **Sos** がリン酸化され **Grb2** から解離することによって **Ras** が不活性化されることが報告されているが、**FGF** 刺激後、**Sos** の **ERK** 依存的なリン酸化が観察され、引き続いて **Ras** は不活性化した。**Sos** が脱リン酸化すると再び **Ras** は活性化し、その後 **Sos** のリン酸化が起こった。一方、**Sos** のリン酸化不能型変異体は **Ras** の周期的な活性化を阻害した。以上の結果より **ERK** 依存的に **Sos** が機能抑制的にリン酸化されるネガティブフィードバックループ機構によって **Ras/ERK** 経路の周期的活性化が引き起こされると考えられる。最後に **Ras/ERK** 経路の活性振動が **Hes1** の発現振動に影響を及ぼす可能性を示した。本研究において **Ras/ERK** 経路が分子時計として働きうることを見出した。

(論文審査の結果の要旨)

周期性をもつ生命現象として概日リズム、体節形成や培養細胞における様々な遺伝子変動が報告されている。

申請者は、細胞増殖因子 FGF 刺激が、血清刺激同様に転写抑制因子 Hes1 の発現変動を制御することを見出した。次に MEK の阻害剤である U0126 や PI3K の阻害剤である LY294002 を用いた実験から FGF 刺激による Hes1 の発現振動の誘導と維持に MEK/ERK 経路と PI3K 経路の両方の活性化が必要であることを示した。さらに FGF 刺激をおこなった細胞において ERK が周期的に活性化することを新たに見出した。FGF 刺激による ERK の周期的な活性化は Hes1 発現振動に依存しないことを見出した。さらに FGF 刺激によって誘導される周期的な ERK の活性化は、上流の低分子 G タンパク質 Ras の活性振動にまでさかのぼることも明らかにした。FGF 受容体の阻害剤である SU5402 を用いた実験から Ras/ERK 経路の周期的な活性化の維持には FGF 受容体の持続的な活性化が必要であることを明らかにした。さらに他の細胞増殖因子である EGF 刺激における Ras/ERK 経路の活性変動を調べた。EGF 刺激においても Ras/ERK 経路は周期的に活性化することから、申請者は、FGF 刺激と EGF 刺激に共通する分子機構によって Ras/ERK 経路の活性振動が制御されると考え、両者に共通する ERK のネガティブフィードバックループによる制御を受ける因子である Sos に注目し解析を進めた。Sos は Ras の活性因子であり、刺激依存的にアダプター因子 Grb2 と共に細胞膜近傍へ移行する。活性型 ERK によって Sos のセリン残基がリン酸化されると Grb2 から解離し、Ras の不活性化が起こると報告されていた。そこで、申請者は ERK や Ras の活性化に加えて、Sos のリン酸化状態の変化を観察した。FGF で刺激したコントロールの細胞において活性型 Ras や活性型 ERK 同様、リン酸化 Sos も ERK 依存的に振動することを明らかにした。Sos のリン酸化・脱リン酸化は、Ras の不活性化・活性化に相関を示した。さらに ERK による Sos のリン酸化が Ras の活性化の抑制に十分であることを示した。最後に、申請者は、リン酸化不能型 Sos を作成し、Ras 活性振動への影響を調べた。Ras は、野生型 Sos と共に発現した際には活性振動を示すが、リン酸化不能型 Sos との共発現において活性は高く維持され活性振動を示さないことを明らかにした。以上の結果から、申請者は FGF 刺激によって Hes1 の発現振動と Ras/ERK 経路の活性振動が誘導されるという新しい現象を見出した。また Ras/ERK の活性振動には ERK による Sos へのネガティブフィードバックループが必要であることも示した。

以上のように、本論文で述べられた成果は非常に重要であり、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに平成 20 年 4 月 16 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。