

氏名	くさ か べ もり おう 日下部 杜 央
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2534 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科生物学専攻
学位論文題目	アフリカツメガエル FRS2 の同定とその初期発生における機能解析

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 竹市 雅俊 教授 宮田 隆

論 文 内 容 の 要 旨

FRS2 は、FGF の刺激によりチロシンリン酸化をうけるドッキング分子として哺乳類培養細胞において同定された。リン酸化をうけた FRS2 は、アダプター分子 Grb2 やチロシンホスファターゼ Shp2 と結合し、最終的に Ras/MAPK カスケードを経て核にシグナルを伝達すると推定されていた。これまで FRS2 に関する研究は、哺乳類培養細胞を用いたものに限られていた。また哺乳類以外の種では、FRS2 は同定されておらず、進化的に保存されたシグナル分子であるかどうかも知られていなかった。くわえて初期発生過程における機能についても解析されていなかった。本論文ではドッキングタンパク FRS2 のアフリカツメガエル相同遺伝子を単離し、FRS2 の初期発生における機能について解析した。また FGF のシグナル伝達における FRS2、FGF 受容体、Src ファミリーキナーゼ Lalo の相互作用について検討した。

まず、卵母細胞遺伝子ライブラリーからアフリカツメガエルの FRS2 (xFRS2) を単離した。xFRS2 は、ヒト FRS2 とアミノ酸レベルで 81% の相同性を示した。次に、xFRS2 を初期胚の動物極側に異所的に発現させアニマルキャップアッセイをおこなうと、中胚葉のマーカである、Xbra や Xcad3 が誘導された。またリン酸化をうける 6 個のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した xFRS2 (xFRS2-6F) を同じく初期胚の動物極側に発現させても、Xbra や Xcad3 は誘導されなかった。このことより、xFRS2 のチロシンリン酸化がその機能に必須であることが明らかとなった。さらに、xFRS2-6F は、FGF による Xbra や Xcad3 の誘導を阻害したことから、ドミナントネガティブ型として機能することがわかった。xFRS2-6F をアフリカツメガエル初期胚の赤道領域に発現させると、中胚葉のパターン形成が著しく阻害され、体軸が短く、背側に屈曲した表現型が観察された。これらのことから、xFRS2 が初期発生段階において発現してチロシンリン酸化をうけ、FGF の下流で中胚葉のパターン形成に必須な役割を果たすことが明らかとなった。

さらに、xFRS2 は、FGF 受容体だけでなく、Src ファミリーに属するチロシンキナーゼ Lalo によってチロシンリン酸化をうけることがわかった。また、FGF 受容体および Lalo による xFRS2 のリン酸化は相互依存的であることがわかった。次に、Lalo による中胚葉のマーカの誘導は、xFRS2-6F により阻害された。このことより、xFRS2 は、Lalo の下流で機能することが明らかとなった。

さらに、アフリカツメガエル初期胚および培養細胞を用いた免疫沈降実験より、xFRS2 の PTB ドメインと Lalo のユニークドメイン、xFRS2 の PTB ドメインと FGF 受容体の juxtamembrane ドメイン、Lalo の SH2 ドメイン付近と FGF 受容体の juxtamembrane ドメインが、それぞれ特異的に結合することが解明された。すなわち、xFRS2、Lalo、FGF 受容体の三者がシグナル複合体を形成することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

FRS2 は、FGF による細胞内シグナル伝達において、アダプタータンパク質 Grb2 と FGF 受容体の間を中継すると考えられていた。しかし、これまで FRS2 に関しては哺乳類培養細胞を用いた生化学的解析が進んでいたが、発生過程などに

における実際の生理的機能は不明であった。また今まで哺乳類以外の種では、FRS2は同定されておらず、進化的に保存されたシグナル分子であるかどうか知られていなかった。申請者はまず、卵母細胞遺伝子ライブラリーからアフリカツメガエルのFRS2相同遺伝子、xFRS2を単離した。これは、哺乳類以外ではじめて同定されたFRS2ホモログである。

次に申請者は、xFRS2がアフリカツメガエル初期発生段階において発現してチロシンリン酸化をうけ、FGFの下流で中胚葉のパターン形成に必須な役割を果たすことを明らかとした。このことはFRS2の初期発生における機能がはじめて記述された例として、価値が高い。

さらに申請者は、xFRS2が、FGF受容体だけでなく、Srcファミリーに属するチロシンキナーゼLalooによってチロシンリン酸化をうけることを示した。また、FGF受容体およびLalooによるxFRS2のリン酸化は相互依存的事であることを示した。次に中胚葉のマーカの誘導を指標として、LalooとxFRS2の上下関係について検討し、xFRS2は、Lalooの下流で機能することが明らかとされた。Lalooは、FGFによる中胚葉形成に必要であり、すくなくともRasの上流ではたらくことが以前報告されていたが、FGFシグナルにおいてLalooがどのような機構で活性化し、どのような分子をターゲットとするかについては、解明されていなかった。申請者の研究は、Lalooの具体的な作用機構についての初めての知見であり、価値が高い。

そして申請者は、アフリカツメガエル初期胚および培養細胞を用いた免疫沈降実験より、xFRS2、Laloo、FGF受容体の三者が、それぞれ特定の領域を介して結合し、シグナル複合体を形成することをはじめて明らかとした。すなわち、FRS2、FGF受容体、SrcファミリーキナーゼLaloo、の三者により形成される複合体において、FGF受容体とLalooが、協調してFRS2のチロシンリン酸化をひきおこし、下流のRasやMAPKにシグナルを伝えることが示された。この発見は、FGFによるシグナル伝達の制御機能に、新たな局面を示したものである。

以上本申請論文は、アフリカツメガエルFRS2の同定とその初期発生における機能解析をおこなったものであり、博士(理学)の学位論文として十分に価値あるものとして認められる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について試問した結果、合格と認めた。