

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	亀崎 青沙
論文題目	増殖因子ニューレグリン1の切断を可視化する蛍光バイオセンサーの開発とその応用		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>増殖因子ニューレグリン1 : Neuregulin 1 (NRG1)は、ErbB受容体の主要なリガンドのひとつであり、主に傍分泌もしくは接触分泌の様式で多様な細胞間相互作用を媒介することにより、神経系を代表とする様々な臓器の発生や再生において重要な役割を果たす。NRG1には、スプライシングバリエーションによって生じるアイソフォームが多数存在するが、そのほとんどは膜貫通型のタンパク質として合成され、ADAMファミリーやBACE1を主とする種々の切断酵素により切断を受ける。この切断のプロセスが、NRG1の機能制御において重要であると考えられ、その切断酵素や切断制御機構に関して主に培養細胞を用いて研究がおこなわれてきた。</p> <p>しかしながら、個体におけるNRG1の切断制御機構に関しては、未解明なところが多い。また、NRG1の切断に関する解析は主に生化学的手法に頼って行われてきたため、生きた細胞内においてNRG1の切断やその細胞内分布を評価することは困難であった。申請者は、これらの問題点を踏まえ、本研究において、NRG1の切断を生きた細胞や個体内で定量化および可視化することのできる蛍光バイオセンサー (Neuregulin 1 Cleavage Indicating SenSOR, N-CISSOR)を開発した。</p> <p>まず、NRG1の細胞外領域をmCherry、細胞内領域をGFPで標識したN-CISSORを作製し、HEK293T細胞を用いた評価により、N-CISSORの細胞表面上での分布、Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)刺激により誘導される切断動態および受容体であるErbB3をリン酸化させる生理活性の点において、N-CISSORがNRG1をよく模倣することを確認した。そして、HEK293T細胞にN-CISSORを発現させタイムラプスイメージングにより経時的に蛍光強度を測定したところ、N-CISSORのmCherry/GFP蛍光強度比はPMA刺激により時間とともに低下した。このPMA依存的なmCherry/GFP蛍光強度比の低下は、メタロプロテアーゼ活性の抑制およびNRG1の切断部位の除去によりともに阻害されたことから、N-CISSORはNRG1の切断をmCherry/GFP蛍光強度比の低下により評価できることが示された。さらに、mCherry/GFP蛍光強度比のRatio imageを取得することでNRG1の切断を可視化すると、PMA依存的なNRG1の切断は細胞内において局在性をもつことがわかった。そこで、個体中でのNRG1の切断を評価するため、N-CISSORをゼブラフィッシュ胚で神経細胞特異的に発現させたところ、NRG1は運動神経細胞において細胞体よりも軸索で優先的に切断されること、そして、その切断はメタロプロテアーゼあるいはBACEにより制御されていることを見出した。</p> <p>以上のように本研究において申請者は、N-CISSORの開発により、従来の生化学的手法では困難であった生きた細胞内での膜型NRG1の切断評価を試み、細胞内で時間経過に伴いNRG1が切断される様子を定量化および可視化することに成功した。また、N-CISSORが神経細胞の軸索で優先的に切断されていたことは、NRG1が細胞内で局在性をもって切断制御されていることを<i>in vivo</i>で示した重要な知見であり、N-CISSORを個体で用いることの有用性を示すものである。今後、このバイオセンサーが、NRG1の切断制御機構やその意義の解明に寄与することが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、膜型増殖因子ニューレグリン1 (NRG1) の切断を定量化・可視化することのできる蛍光バイオセンサーを開発するとともに、それを用いて動物の個体内におけるNRG1の切断に関して新たな知見をもたらしたものである。これまで、種々のプロテアーゼによる可溶性NRG1の産生やその制御は主に生化学的手法により解析されてきたものの、生きた細胞や個体内において膜型NRG1の切断の現場を捉える手段がなかったことから、膜型NRG1が細胞内においていつどこで切断を受けているかは不明であった。そのため、NRG1を介した細胞間シグナルの時空間的制御におけるその切断の位置づけを検証することができなかった。

本論文ではそのような問題点を解決するため、生きた培養細胞やゼブラフィッシュ胚の個体内でNRG1の切断を定量化・可視化することのできる蛍光バイオセンサー、N-CISSORを開発した。開発されたN-CISSORは、これまで報告されてきたNRG1やその切断の性質をよく考慮した上で、NRG1の全長の配列を含みその細胞外ドメインおよび細胞内ドメインに各々mCherryとGFPを標識した蛍光プローブである。申請者は、培養細胞を用いて、細胞表面への分布、PMAにより誘導される切断の効率やプロテアーゼ阻害剤に対する感受性、ErbB3のリン酸化などにおいて、N-CISSORがNRG1を模倣することを丹念に確認した。その上で、そのライブイメージングを行い、mCherry/GFP蛍光強度比のRatio imagingの取得によって、NRG1の切断の細胞内分布を生きた細胞で観察することに成功した。このことから、N-CISSORは今後のNRG1切断に関する研究において非常に有効なツールになることが期待される。

さらに本論文では、このRatio imagingによって、PMA刺激したHEK293T細胞では細胞突起において、ゼブラフィッシュ胚内の神経細胞では軸索においてNRG1が優先的に切断されることを示唆する結果を得ている。NRG1が細胞内で局在性を持って切断されることは、本手法を用いることで初めて示すことができた知見であり、NRG1切断の性質や意義に関して非常に重要かつ新たな側面をもたらすものであると考えられる。

以上より、本論文から、申請者が高度で幅広い学識を持って本研究に取り組み、NRG1の切断に関して新たな解析手法の開発を行い、重要な発見をもたらしたことが認められた。以上の評価に基づき、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。また、平成28年8月8日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日