

京都大学	博士（生命科学）	氏名	佐藤 崇之
論文題目	受容体型チロシンキナーゼシグナル伝達経路の制御因子Sproutyの作用機構の解析		
(論文内容の要旨)			
Sproutyは受容体型チロシンキナーゼシグナル伝達経路の制御因子として働き、分化や発生、免疫など様々な系で機能していることが知られている。SproutyにはSprouty1、Sprouty2、Sprouty3およびSprouty4という4つのアイソフォームがある。N末側にあるチロシン残基ならびにその周辺配列と、C末側にあるシステインに富んだ領域がアイソフォームに共通して存在しており、種を超えて保存されている。保存されているチロシン残基はSrcファミリーキナーゼによってリン酸化される。リン酸化されたSproutyがGrb2やCblなどと結合することで制御因子として働くと考えられている。また、アイソフォームの中で、Sprouty1とSprouty2は相同性が高いことから重複性があり相補的に働くと考えられている。しかしながら、Sproutyの作用機構についてはいまだ不明な点が多い。 本研究でまず、Sprouty2のターゲットとしてCrkLを新たに同定した。CrkLはN末側からSH2ドメイン1つとSH3ドメイン2つから成るアダプタータンパク質で、様々なシグナル伝達経路で働くとされている。FGF受容体での刺激により、Sprouty2とCrkLは結合することがわかった。その結合にはSprouty2のチロシンリン酸化が必要であることも明らかにした。FGF刺激によるSprouty2のチロシンリン酸化とSprouty2とCrkLの結合には相関があることも見出した。さらに内在性のSprouty2とCrkLのFGF刺激による結合も示した。一方この結合において必要なCrkLのドメインを調べた結果、CrkLのSH2ドメインとN末側SH3ドメインの両方が必要であることがわかった。Sprouty2とCrkLの結合がCrkLの下流に与える影響を調べた結果、FGF刺激によるRap1の活性化がSprouty2により抑制されることが観察された。また、EGF刺激においてもSprouty2とCrkLは結合し、EGF刺激によってSprouty2とCrkLが細胞膜において共局在することがわかった。これらの結果より、Sprouty2はCrkLと結合することでCrkL-Rap1経路を負に制御する因子として働くことを明らかにした。 次に、Sprouty1とSprouty2では細胞内での局在が異なり、その違いがFGF刺激によるチロシンリン酸化の程度と時期の違いにつながることを明らかにした。細胞染色によりSprouty1はほぼ細胞質一様に存在し、Sprouty2は微小管に局在することを示した。微小管局在とSprouty2の刺激依存的なチロシンリン酸化との関係を調べた結果、薬剤により微小管の重合状態を変化させるとSprouty2のチロシンリン酸化の程度が変化することを見出した。また、Sprouty2のC末側の配列がSprouty2の微小管局在に重要な役割を果たすことを見出した。 以上の結果は、Sprouty2の新たな標的分子と機能を明らかにするとともに、Sprouty1とSprouty2の機能差異の分子的基盤を示すことにより、Sproutyの作用機序と活性化機構についての分子的理解を深めるものである。			

(論文審査の結果の要旨)

Sproutyは受容体型チロシンキナーゼシグナル伝達経路の制御因子として働き、分化や発生、免疫など様々な系で機能していることが報告されている。申請者は、**FGF**刺激依存的に、**Sprouty2**と**CrkL**は結合すること明らかにした。その結合には**Sprouty2**の55番目のチロシン残基のリン酸化が必要であることを見出した。**FGF**刺激による**Sprouty2**のチロシンリン酸化の程度と時間と**FGF**刺激依存的な**Sprouty2**と**CrkL**の結合の間には相関があることを示した。そして、内在性の**Sprouty2**と**CrkL**の**FGF**刺激依存的な結合を明らかにした。またこの**FGF**刺激依存的な**Sprouty2**と**CrkL**の結合には、**CrkL**のSH2ドメインとN末側SH3ドメインの両方が必要かつ十分であることを明らかにした。申請者はこの**Sprouty**と**CrkL**の**FGF**刺激依存的な結合に、**Sprouty2**のチロシンリン酸化と**CrkL**のSH2ドメインが必要であるということが、**Sprouty**が**Grb2**との結合を介して**Ras/ERK**経路を負に制御している機構に似ていると考え、**FGF**シグナル伝達経路において**CrkL**の下流であると知られている**Rap1**の活性化状態を調べた。**Sprouty2**の存在により、**FGF**刺激による**Rap1**の活性化が抑制されたことを明らかにした。**EGF**刺激においても**Sprouty2**と**CrkL**は結合し、**EGF**刺激によって**Sprouty2**と**CrkL**が細胞膜において共局在することを見出した。これらの結果より、申請者は**Sprouty2**が**CrkL**と結合することで**CrkL-Rap1**経路を負に制御する因子として働くことを明らかにした。次に、申請者は、**Sprouty1**と**Sprouty2**の**FGF**刺激によるチロシンリン酸化の程度と時間に違いがあることに着目し、その違いが細胞内での局在の違いによるものではないかと考えた。細胞染色により**Sprouty1**はほぼ細胞質一様に存在し、**Sprouty2**は微小管と共局在すること示した。**Sprouty2**の**FGF**刺激依存的なチロシンリン酸化と**Sprouty2**の微小管局在との関係を調べた結果、微小管重合阻害剤ノコダゾールで前処理をするとチロシンリン酸化された**Sprouty2**の量が増加し、微小管安定化剤タキソールで前処理をするとチロシンリン酸化された**Sprouty2**の量が減少することを見出した。このことより申請者は、**Sprouty2**の微小管局在が**FGF**刺激依存的な**Sprouty2**のチロシンリン酸化を負に制御することを明らかにした。また、**Sprouty2**のC末側の領域が**Sprouty2**の微小管局在に重要な役割を果たすことを示した。以上の結果から、申請者は、**Sprouty2**の新たな標的分子と機能を明らかにするとともに、**Sprouty1**と**Sprouty2**の機能差異の分子的基盤を示した。このことは、**Sprouty**の作用機序と活性化機構についての分子的理解をより深めるものである。

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22年1月28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。

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。

要旨公開可能日： 年 月 日