

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 吉澤 亮

細胞が外界からの刺激に対してどのように細胞応答を決定するのかを理解することは、細胞生物学において長期にわたって考えられてきた重要な問題である。しかしながら細胞内におけるシグナル伝達ネットワークは非常に複雑で多様なタンパク質が影響しており、またシグナル伝達の時空間的な応答などのネットワークの動的な情報が十分でなかったため、細胞応答決定メカニズムの本質的な理解にはいたってなかった。特に同様のネットワークを用いて異なる応答を示すことが可能な RTK-RAS-MAPK システムについては長年盛んに研究が行われてきたが、いまだにネットワークの完全な理解には至っていない。このような観点から、申請者は RTK-RAS-MAPK シグナル伝達を一細胞、一分子レベルで可視化し、シグナル伝達の時空間的な応答を解析することで細胞応答決定のメカニズムを明らかにすることを目的としている。アダプタータンパク質である p52SHC と GRB2 は刺激後の細胞内において、活性化した RTK に結合することでシグナルの伝達場である細胞膜へと移行する。これらのタンパク質は RAS/MAPK 経路に対して、どちらも主に下流信号の増幅といった類似の役割を持つと考えられてきた。しかしながら p52SHC、GRB2 が RAS/MAPK 経路の時空間的な応答に与える影響、さらには細胞決定のための役割については議論されてこなかった。そこで本研究では p52SHC と GRB2 の細胞膜移行と、下流の ERK の核内移行を同時に経時計測する系を確立した。ヒト乳がん細胞株である MCF7 細胞を分化因子の Heregulin (HRG) で刺激すると、p52SHC と GRB2 は固有のシグナル伝達ダイナミクスを示すことを発見している。このダイナミクスの違いは下流の RAS/MAPK システムの時間的調節に対して p52SHC、GRB2 の固有の役割の可能性を示した。

本論文は 6 つの章から構成されている。第 1 章では本論文の全体的な緒言として RTK-RAS-MAPK シグナル伝達の概要、アダプタータンパク質 p52SHC の役割について説明し、これらを明らかにしてきた研究手法の問題点について明記し、研究目的を明確にしている。第 2 章、第 3 章はそれぞれ序論、結果、考察から構成されている。

第 2 章ではまず、蛍光標識した p52SHC、GRB2 を MCF7 細胞内に発現し、全反射照明蛍光顕微鏡を用いて細胞膜上付近にのみ存在するこれら分子の蛍光観察に成功したことを示している。細胞を HRG 刺激後、p52SHC、GRB2 の細胞膜上分子数の増加を確認し、これらの時間変化が異なることを見出している。次に変異体、ノックダウン等を使用し、これらのダイナミクスの関係性について検討している。その結果、p52SHC は GRB2 の細胞移行の制御に対して、以下の様に二つの役割を果たしていることを示している。シグナルの初期段階では、細胞膜上において GRB2 の膜局在の増強に寄与する。一方でシグナルの後期段階では、細胞質中において GRB2 と複合体を形成することで膜から隔離させることを示唆している。またこれら 2 つの反応には p52SHC のチロシンリン酸化が必要であることを示している。p52SHC による GRB2 の膜局在制御は下流シグナルの RAS の応答量と持続時間の両方に影響を与えていることを示唆している。刺激後初期段階では RAS 活性化の振幅増加に関与し、刺激後後期では RAS の一過的な活性化に関与することを示している。これらの研究は全反射蛍光顕微鏡、共焦点蛍光顕微鏡、蛍光相互相関分光法といった様々な機器と観察法を適切に駆使し、細胞膜、細胞質の両方のシグナル伝達場における反応をとらえてい

る。それにより、RAS の活性化制御機構に新しい知見を与える重要な研究であり高く評価できる。

続いて第 3 章では、細胞分化シグナル中における p52SHC と GRB2 の固有の役割について調べている。まず正常細胞では、p52SHC と下流の ERK は同様な持続応答性を示すことを見出した。さらに EGFR シグナルの摂動実験から、p52SHC と ERK のダイナミクスに同様な変化をもたらした。またこのとき GRB2 のダイナミクスには顕著な変化は与えないことを確認している。これらの結果は p52SHC が ERK 活性化の時間的調節において重要な役割を果たすことを示唆している。さらにこれらの反応ダイナミクスの変化が細胞応答決定に与える影響についても検討している。細胞増殖、細胞分化の定量実験から、EGFR シグナルの増強は HRG 刺激による細胞応答を細胞分化から細胞増殖の方へと移行することが示されている。これらの結果は p52SHC、ERK の反応ダイナミクスの変化は細胞応答決定に影響を与える可能性を示唆している。続いて p52SHC による ERK の制御がいかに行われているのかを調査している。キナーゼ阻害剤、ノックダウンを使用した実験から、SHC による ERK 活性化の持続時間の制御は、GRB2-RAF シグナル非依存的に PI3K-MEK シグナルを介して調節されることを示している。この経路が RAS/MAPK シグナルの持続時間の調節に関わることはこれまでに知られておらず、本研究のシグナル伝達の時空間的解析によってはじめて明らかになった。以上のことから、p52SHC-GRB2 シグナルは、刺激後初期段階においては RAS/MAPK 経路のシグナル応答の振幅に関与し、後期段階では、SHC が GRB2-RAF 非依存的に ERK の活性化の持続時間に影響を与えると結論づけている。このように本研究は、これまで冗長的であると考えられてきた p52SHC と GRB2 の固有の時空間的な役割を示し、さらにそれらが RAS/MAPK シグナルの活性化時間の調節、さらには細胞応答決定に与える影響について新しい知見を与える重要な結果であり高く評価できる。

第 4 章の結論では本論文の結言として一連の成果について総括し、本研究の成果を整理している。またこれらのダイナミクス計測を用いた研究の将来展望についても述べている。特に同一細胞内における複数のシグナル伝達タンパク質を同時計測し数理解析を行う研究は、複数のシグナル経路の寄与やシグナルバイアスについて明らかにすることが可能になると期待される。以上のように、本研究は生細胞内において RTK-RAS-MAPK 経路のアダプタータンパク質である p52SHC、GRB2 のシグナル伝達ダイナミクスを計測し、それぞれの時空間的な役割について初めて示したものである。また本研究の成果は、同一のネットワークを用いて異なる細胞応答を決定するメカニズムについて新たな情報が得られており、細胞生物学研究の理解をさらに進めるのに大きく寄与することが期待される。さらに本手法による細胞応答決定メカニズムの解明は、将来的には創薬、医療分野など広く貢献することが期待されるものであり、その点も高く評価できる。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。