

審査の結果の要旨

氏名 千田 淑恵

本研究は、病原細菌が宿主細胞内に注入する EPIYA モチーフ保有エフェクタータンパク質によって機能攪乱の標的とされた、哺乳動物の EPIYA モチーフ保有タンパク質による新規シグナル経路を解明するために、組換えタンパク質やヒト胃上皮細胞を用いて EPIYA モチーフ保有タンパク質の 1 つである Pragmin の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 大腸菌タンパク質発現系によりチロシンリン酸化組換え Pragmin タンパク質と組換え Csk を作製し、*in vitro* 結合試験を行った結果、Pragmin と Csk はチロシンリン酸化された EPIYA モチーフを介して直接的に結合することが示された。
2. ヒト胃上皮腺癌由来 AGS 細胞における Pragmin と Csk の共発現は Pragmin のチロシンリン酸化量を増加させることが示された。Src、Yes、Fyn トリプルノックアウトマウス胎児の線維芽細胞 (MEF) 由来 SYF 細胞における Csk の発現抑制実験および組換え Pragmin と組換え Csk を用いた *in vitro* キナーゼ試験により Pragmin は Csk の新規基質であることが示された。
3. Pragmin の部分欠損変異体およびチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した各種点変異体を作製し、Csk とともに AGS 細胞に共発現させ Pragmin のチロシンリン酸化量変化の解析を行った結果、Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位は EPIYA モチーフを含む 3 個のチロシン残基であることが示された。
4. チロシンリン酸化組換え Pragmin タンパク質および組換え Csk タンパク質を基質 GST-Src-tail と混合して *in vitro* キナーゼ試験を行い、基質のチロシンリン酸化量を解析した結果、Pragmin はチロシンリン酸化された EPIYA モチーフ依存的に Csk を活性化することが示された。
5. AGS 細胞を用いて内在性 Pragmin と内在性 Csk の蛍光免疫染色を行った結果、Pragmin と Csk は細胞接着斑に共局在することが示された。
6. ヒト胃上皮腺癌由来 MKN7 細胞に Pragmin と Csk を発現させ、細胞形態および細胞運動を観察した結果、Pragmin と Csk の共発現は細胞形態の著しい伸長ならびに細胞の運動能亢進を誘導することが示唆された。

以上、本論文は Pragmin のチロシンリン酸化 EPIYA モチーフによる Csk の新たな活性制御機構と、Pragmin による Csk の活性制御の細胞形態形成と細胞運動能への関与を明らかにした。本研究は、EPIYA タンパク質による未知のシグナルネットワークの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。