

氏名(本籍)	みず こと えい いち 水 越 栄 一 (神奈川県)
学位の種類	博 士 (学 術)
学位記番号	博 甲 第 2557 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Identification and Analysis of an Intracellular FGF-1 Interacting Protein (細胞内で増殖因子 FGF-1 と相互作用する蛋白質の同定と解析)
主 査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副 査	筑波大学教授 工学博士 松 村 正 利
副 査	筑波大学教授 農学博士 祥 雲 弘 文
副 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠

論 文 の 内 容 の 要 旨

高等動物細胞は複雑なシグナル伝達ネットワークを有する。ポリペプチド増殖因子は、細胞間における増殖分化制御のシグナル分子として、重要な役割を果たし、細胞増殖、分化、細胞死への制御のみならず、個体レベルでは神経形成、肢芽形成、血管新生、障害肝の再生、成体の高次機能制御を行っている増殖因子ファミリーに、FGF (fibroblast growth factors) があり、これらには4種類のチロシンキナーゼ型の受容体が存在して細胞内にシグナルを伝達する。

一方FGFファミリーの一員であるFGF-1はこれらの受容体を介した活性発現に加え、それ自身が細胞内で活性を発現する機構が示唆されている。すなわち、FGF-1の一次構造中に分泌シグナルを持たず細胞内に留まること、筋芽細胞で内在的に発現され筋管への分化を促進すること、一方、核移行シグナルを持ち細胞外から添加された際には細胞内に取り込まれDNA合成前のG1後期に核移行すること、核移行が活性発現に重要であることなどが知られている。これらの知見より、細胞外FGF-1による細胞膜受容体を介したシグナル伝達に加え、細胞内でのFGF-1による活性発現機構が存在することが予想された。

本研究では、FGF-1の細胞内機構の解明を目的として、細胞内のFGF-1が相互作用する蛋白質を同定しその解析を行った。

FGF-1の細胞内作用が示唆されているラット筋芽細胞を出発材料とし、FGF-1フィニティービーズを用いて結合蛋白質を分離する手法により、分子量75kDa, 56kDa, 50kDa, 38kDa, 36kDaの5種の蛋白質を得た。ペプチドフラグメントのアミノ酸配列の決定により、75kDa蛋白質が、老化誘導や癌化機能を調節する蛋白質であり構造的側面においては熱ショック蛋白質ファミリー hsp70の一員である、mortalinであることを明らかにした。さらに、FGF-1とmortalinが相互作用することを、免疫沈降法による共沈降の確認、免疫染色による共局在の確認、酵母2ハイブリッド法による相互作用の確認、精製した蛋白質同士の直接結合の確認、により証明した。

前述のように、細胞外から添加したFGF-1は細胞内に取り込まれ細胞質に移行し、その後、細胞周期上のG1後期に核移行することが知られているので、細胞休止状態のBALB/c3T3細胞をFGF-1で増殖の刺激を試みた。細胞周期の進行はDNA合成やcydinD1の発現により確認し、また、細胞分画後イムノブロット解析により、細胞内に取り込まれたFGF-1が細胞質への移行、細胞周期G1後期にFGF-1の核移行を確認した。このような条件下で細胞内に取り込まれたFGF-1とmortalinの相互作用が起きる可能性を免疫沈降-イムノブロット法により解析した。そ

の結果、取り込まれたFGF-1とmortalinの結合がG1後期からS期にかけて強く起こることを観察した。また、免疫染色-共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析によりこの相互作用は核膜近傍で起こっていることが示唆された。さらにFGF-1とmortalinの相互作用の制御要因について検討したところ、両者の結合が強化すると同時期に細胞内mortalinのチロシンリン酸化が強く起こることを見出した。チロシンホスファターゼ阻害剤で細胞を処理するとmortalinとFGF-1の結合が増強されることを観察した。さらに、In vitro系を用い、mortalinとFGF-1の相互作用を解析したところ、チロシンホスファターゼ処理を施したmortalinは、FGF-1との結合能が減少することを見出した。これらのことから、mortalin上のチロシンリン酸化によりFGF-1との相互作用が制御されていることが示された。

休止期の細胞をFGF-1刺激し細胞周期を進行させる際、初期及びG1後期の相性に起こる細胞タンパク質のチロシンリン酸化が、細胞増殖の制御に極めて重要と考えられている。この第2相目のチロシンリン酸化亢進期にmortalinのチロシンリン酸化が亢進すること、それによりmortalinとFGF-1との相互作用が亢進することを見出したことから、この相互作用がFGF-1の後期シグナル伝達と関した現象であることが明らかになった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ポリペプチド性増殖因子の一つであるFGF-1はこれらの受容体を介した活性発現に加え、それ自身が細胞内で活性を示す経路が、様々な実験事実により示唆されている。すなわち、FGF-1の一次構造中に分泌シグナルを持たず、産生細胞内にとどまり、筋芽細胞の分化を促進すること、また核移行シグナルを有し、細胞外から添加された際には細胞内に取り込まれ、DNA合成期直前にG1後期に核移行し、細胞増殖促進活性と密接な関連があることが知られている。本研究は、FGF-1のもつユニークな細胞内での活性発現機構を明らかにするためにFGF-1標的蛋白質の同定を目的として行ったものである。

FGF-1標的蛋白質はFGFアフィニティービーズを用いて分離し、分子量75kDa, 56kDa, 50kDa, 38kDa, 36kDaの蛋白質を得た。そのうち分子量75kDaの蛋白質は老化誘導蛋白質で、熱ショック蛋白質ファミリーの一員であるmortalinであることを明らかにし、FGF-1とmortalinの分子間相互作用を各種方法を確認した。まず細胞抽出物からの共免疫沈降、免疫染色による細胞内での共局在確認、酵母2ハイブリッド法によるin vivoにおける相互作用を明らかにした。次に、in vitro binding assayで両者が直接結合することを確認した。

一方、細胞外から加えたFGF-1は細胞内に取り込まれ、細胞周期上G1期に核に移行することが知られているが、この系で細胞内に取り込まれたFGF-1とmortalinが相互作用の検討を行ったところ、細胞外に加えたFGF-1により誘導された細胞周期に依存して、G1後期に細胞内FGF-1とmortalinの結合と核膜近傍での共局在が増強されることを見出した。さらに、この相互作用の変化に関連する蛋白修飾について検討したところ、FGF-1とmortalinの相互作用の増強と同時期にmortalinのチロシンリン酸化が確認され、さらにホスファターゼ阻害剤やin vitroでのチロシンホスファターゼを用いての解析からmortalinのチロシンリン酸化と両者の相互作用が相関することが示された。これらの結果はmortalinとFGF-1の結合が細胞の増殖シグナルの一貫となっていることを示唆するものであり、本研究の成果は、今後増殖因子のシグナル伝達に関する研究に寄与するところが大きいものと思われる。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。