

## 論文内容の要旨

申請者名 宮本 幸

Cell migration is a crucial event not only during development, but also for homeostasis such as wound repair and immune responses. To regulate the balance between the factors that positively and negatively regulate migration is critical for the proper development and the maintenance of homeostasis. Despite increasing evidence of the positive regulation by the G protein-coupled receptors (GPCRs), missing is the link between the negative receptors and their intracellular signaling mechanisms.

First, I show that the adaptor protein, Nck1, but not Grb2 or CrkII, mediates the inhibition of cell migration induced by the endothelin-1 (ET-1) and endothelin type A (ETA) receptor. The small interference RNA and dominant negative mutants of Nck1 attenuated the ET-1-induced inhibition. Although overexpression of wild-type Nck1 was detected in the cytosol and did not affect cell migration, expression of the myristoylation signal sequence-conjugated Nck1 was in the membrane and induced activation of Cdc42 and c-Jun N-terminal kinase (JNK), inhibiting cell migration. Taken together, these results indicate that the ET-1/ETA receptor transduces the signal of inhibition of cell migration through Cdc42-dependent JNK activation by using Nck1.

Next, I show that KIAA0793, containing substantial sequence homology with the catalytic Dbl homology (DH) domain of the faciogenital dysplasia gene product (FGD1), is a specific GEF for Cdc42. I, therefore, tentatively named it FRG (FGD1-related Cdc42-GEF). Src kinase directly phosphorylated and activated FRG, as Vav family GEFs. Additionally, FRG was involved in the signaling pathway from the ETA receptor to JNK, resulting in the inhibition of cell migration. Together, these results demonstrate that FRG is a member of Cdc42-GEF and plays a key role in the signaling pathway downstream of GPCRs.

It is noteworthy to examine whether FRG is a binding partner with the SH3 domain of Nck1 in the ET-1/ETA receptor-signaling pathway. A challenge for the future will aid into defining the roles of Nck1 in regulating the potential for crosstalks among the various signaling pathways, involving FRG in the control of cell migration. Such studies should promote our understanding of the GPCR-regulated mechanism of the early process of development as well as oncogenesis.

## 論文審査結果の要旨

申請者名 宮本 幸

細胞遊走は種々の器官の初期発生過程に重要であるのみならず、がん、動脈硬化、免疫疾患など様々な病態形成においても非常に重要な役割を果たすことが知られている。細胞遊走は、細胞遊走促進因子と反発因子の両者のバランスによって制御されている。現在、細胞遊走促進因子の作用機構に関しての知見が集積しているが、反発因子の作用機構はほとんど明らかにされていない。申請者は、近年 G タンパク質共役受容体に結合して細胞遊走を負に制御することが明らかとなったエンドセリンに着目して、その作用機構の解析を行った。

申請者はまず初めに、エンドセリン A (ETA) 受容体が、Src ファミリーチロシンキナーゼから Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質 Cdc42 を介して、Jun キナーゼ (JNK) を活性化すること、さらに DNA ウイルスでトランスフォームされた上皮細胞の遊走が受容体刺激依存的に抑制され、それが JNK 経路を介することを見出した。次に、本経路を介した細胞遊走の抑制にアダプタータンパク質 Nck が介在することを Nck の優性抑制型変異体、活性型変異体、および siRNA を用いて明らかにした。さらに、Src が Nck の上流に存在し、Cdc42 と JNK を活性化して、細胞遊走の抑制を引き起こしていることが判明した。以上のことからアダプタータンパク質 Nck1 が ETA 受容体の下流で働き、細胞遊走抑制に関与することが初めて明らかとなった。

次に、申請者は ETA 受容体が、新規 Rho ファミリーグアニンヌクレオチド交換因子 (Rho ファミリー GEF) KIAA0793 を介し、JNK 依存的に細胞遊走抑制作用を引き起こすことを見出した。まず、ETA 受容体による細胞遊走抑制に KIAA0793 が関与するかを検討するため、KIAA0793 の触媒部位欠損変異体を細胞に強制発現させたところ、受容体刺激による JNK の活性化および細胞遊走がほぼ完全に抑制された。また、FRG は ETA 受容体刺激依存的に細胞内でチロシンリン酸化されるのみならず、*in vitro* でも Src によりチロシンリン酸化され、そのチロシンリン酸化に伴って KIAA0793 の Cdc42 に対する GEF 活性が特異的に活性化されることを見出した。申請者は、KIAA0793 が別の Cdc42 特異的 GEF である FGD1 とファミリーを形成していることを考慮して、KIAA0793 を FRG (FGD1-related Cdc42-GEF) と命名した。以上のことから、ETA 受容体は、Src→Nck1/FRG→Cdc42→JNK 経路を介して、細胞遊走抑制作用を引き起こすことが明らかとなった。

以上のように、本論文は近年重要視されている G タンパク質共役受容体によるがん細胞の遊走・転移阻害機構、個体発生過程における細胞遊走の仕組みに、新たな知見を提供するもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。