

論文内容の要旨

申請者氏名 古賀 慎太郎

原がん遺伝子産物 c-Src は、Src チロシンキナーゼファミリーの一つであり、その遺伝子欠損マウスは破骨細胞の機能不全による大理石骨病を呈する。破骨細胞では他の *src* ファミリー遺伝子群の発現が見られるにもかかわらず、それらを欠損しても同様の表現型が現れないことから、c-Src には他の Src ファミリー分子と異なる固有の機能の存在が予想される。そこで、申請者は破骨細胞において c-Src と会合するたんぱく質を網羅的に解析することにより、その理解の手がかりを得ることを目指した。質量分析法による解析の結果、会合分子の一つとして ADAP(Adhesion and degranulation-promoting adaptor protein)を同定することが出来た。ADAP は血球系細胞特異的なアダプター分子として、インテグリンの活性化、細胞接着、細胞遊走などを制御することが知られている。c-Src と ADAP の会合についてはこれまで報告がなかったことから、本研究では、c-Src と ADAP の会合様式ならびに破骨細胞分化における ADAP の機能を明らかにすることを目的とした。

c-Src と ADAP の会合様式の解析：c-Src-SH2 ドメインが ADAP との会合に必要であること、c-Src の酵素活性依存的に ADAP がリン酸化されること、ADAP の Tyr⁸⁰⁷ が c-Src との主要な結合部位であることなどを見出した。同じ Src ファミリーである Fyn は Tyr⁶¹⁵ に結合することが報告されていることから、今回の結果は、ADAP が Src ファミリー間で異なる会合様式をとる可能性を示唆する。

破骨細胞における ADAP の機能解析：ADAP は仮足やラメリポディアに局在するとともに、細胞接着時において、ピトロネクチン依存的にチロシンリン酸化を受けることが分かった。その際、Tyr⁸⁰⁷ のリン酸化が上昇していた。一方、ADAP 発現抑制細胞株(siADAP 細胞)では、細胞遊走能が減少するとともに、多核の破骨細胞の形成が著しく阻害されていた。破骨細胞におけるチロシンリン酸化たんぱく質を分析したところ、インテグリンを介したシグナル伝達機構においてアクチン細胞骨格を再構成することにより細胞遊走を制御する機能をもつアダプター分子 Cas が主要たんぱく質であることが明らかとなったが、siADAP 細胞においては Cas のリン酸化が著しく減少していた。さらに、Cas と ADAP が会合しうること、そしてその会合は c-Src の発現により促進されることなどを明らかにした。

本研究から、ADAP は c-Src、Cas と複合体を形成することにより Cas のリン酸化を促進することが明らかとなった。c-Src/ADAP/Cas を介したシグナル伝達機構が単核破骨細胞の細胞遊走、多核破骨細胞の形成を促進する要因ではないかと考えている。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 古賀 慎太郎

原がん遺伝子産物 c-Src は、Src チロシンキナーゼファミリーの一つであり、非受容体チロシンキナーゼとして様々なシグナル伝達に関わることが報告されている。しかし、その遺伝子欠損マウスにおいて見られる表現型は破骨細胞の機能不全による骨大理石病であることより、破骨細胞を用いた解析は、c-Src の機能を理解するうえで重要な手がかりとなることが期待できる。そこで、申請者は破骨細胞分化における c-Src の役割を理解するために、新しく見出した c-Src 会合たんぱく質 ADAP の会合様式ならびにその機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

その結果、まず、c-SrcSH2 ドメインが ADAP との会合に必要であること、c-Src の酵素活性依存的に ADAP がリン酸化されること、ADAP の Tyr⁸⁰⁷ が c-Src との主要な結合部位であることなどを見出した。同じ Src ファミリーである Fyn は Tyr⁶¹⁵ に結合することが報告されていることから、この結果は、Src ファミリー間でみられる遺伝子特異性を説明できる可能性を示唆しており非常に興味深い。つぎに、破骨細胞分化過程における ADAP の機能解析を行った。ADAP は仮足やラメリポディアに局在するとともに、細胞接着時において、ピトロネクチン依存的にチロシンリン酸化を受けることを明らかにした。また、ADAP 発現抑制細胞株(siADAP 細胞)では、細胞遊走能や多核の破骨細胞の形成が著しく阻害されていることも見出した。さらに、破骨細胞におけるチロシンリン酸たんぱく質を解析したところ、Cas を同定することが出来た。Cas はインテグリンを介したシグナル伝達機構において、アクチン細胞骨格を再構成することで細胞遊走を制御するアダプター分である。siADAP 細胞において Cas のリン酸化が減少していたこと、Cas と ADAP が会合しうること、そしてその会合は c-Src の発現により促進されることなどを明かにした。以上の結果に基づき、c-Src/ADAP/Cas を介したシグナル伝達機構が単核破骨細胞の細胞遊走、多核破骨細胞の形成を促進する要因であることを提示している。

以上のように、本論文は原がん遺伝子 c-Src の新規会合たんぱく質として ADAP を同定するとともに、破骨細胞分化におけるその機能を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。