

## 論文内容の要旨

### 博士論文題目 Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase during cell migration and cytokinesis

(細胞運動、細胞質分裂におけるRho-キナーゼによるMBSリン酸化の解析)

申請者氏名 河野 洋治

低分子量GTP結合蛋白質Rhoは、細胞増殖因子などの細胞外シグナルの下流で細胞運動、細胞質分裂、平滑筋収縮などの細胞高次機能を制御することが知られている。申請者の所属する研究室ではこれまでに、Rhoの作用機構を明らかにするためにRhoの標的蛋白質の同定を試み、Rho-キナーゼとミオシンホスファターゼのサブユニットのひとつであるmyosin-binding subunit (MBS)を同定している。また*in vitro*の実験から、Rho-キナーゼが基質蛋白質であるmyosin light chain (MLC)やERMをリン酸化すると共に、ミオシンホスファターゼのMBSをリン酸化することにより不活性化してMLCやERMのリン酸化レベルを上昇させることが明らかにしている。このことは、MBSのRho-キナーゼによるリン酸化がRho-キナーゼの基質のリン酸化状態を正に制御する上できわめて重要な役割を担う可能性を示唆する。しかしながら、実際の細胞内においてこのような制御機構が働くかどうかは不明であった。そこで申請者は、運動細胞と分裂細胞におけるMBSのRho-キナーゼによるリン酸化を可視化してモニタリングを行い、以下の結果を得た。

1) Rho-キナーゼのMBSにおける主要なリン酸化部位のひとつが854番目のセリンであることを同定し、854番目のセリンがリン酸化されたMBSを特異的に認識する抗リン酸化MBS抗体(S854)を作製した。

2) この抗体を用いて、hepatocyte growth factor (HGF)や12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 刺激により細胞運動が引き起こされた細胞内で、実際にMBSの854番目のセリンがRhoの下流でRho-キナーゼを介してリン酸化されることを証明した。さらに興味深いことに、リン酸化MBSが運動細胞のleading edgeや後部領域に極性をもって濃縮していることを明らかにした。リン酸化MBSの局在は基質蛋白質であるMLCのリン酸化の局在と一致していた。

3) さらに申請者は、細胞質分裂時の細胞においてもMBSがRho-キナーゼによりリン酸化されることを証明した。リン酸化MBS及びRho-キナーゼの基質蛋白質であるMLCやERMのリン酸化は分裂溝付近に局限していた。

以上の結果から、実際の細胞内においてもMBSがRho-キナーゼによってリン酸化を受けて、Rho-キナーゼの基質群のリン酸化状態を正に制御することが示唆された。このことから、MBSの854番目のセリンのリン酸化がRho-キナーゼの活性化を示す指標となりうると考えられた。さらに、運動細胞や分裂細胞において空間的に制御されたMBSのリン酸化は、Rho-キナーゼ基質蛋白質の局所におけるリン酸化レベルを上昇させ、細胞運動や細胞質分裂を遂行する上で重要な役割を担うものと考えられた。

## 論文審査結果の要旨

博士論文題目 Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase during cell migration and cytokinesis  
(細胞運動、細胞質分裂におけるRho-キナーゼによるMBSリン酸化の解析)

申請者氏名 河野 洋治

低分子量GTP結合蛋白質Rhoは、細胞増殖因子などの細胞外シグナルの下流で細胞運動、ストレスファイバー形成、細胞質分裂などの細胞高次機能を制御することが知られている。本研究で申請者は、Rhoの標的蛋白質であるRho-キナーゼ及びミオシンホスファターゼのサブユニットのひとつであるMBSに焦点をあて、Rhoによる細胞高次機能の制御機構の解明を試みている。これまでに申請者らは、*in vitro*の実験からRho-キナーゼが基質蛋白質を直接リン酸化すると共に、これらの脱リン酸化酵素であるミオシンホスファターゼのMBSをリン酸化することにより不活性化して、基質蛋白質のリン酸化レベルを上昇させることを明らかにしている。しかしながら、実際の細胞内においてこのような制御機構が働くかどうかは不明であった。申請者は本研究において、世界に先駆けて*in vivo*でのRho-キナーゼによるMBSリン酸化をモニタリングするシステムを確立した。このモニタリングシステムを用いて、Rho-キナーゼが運動細胞のleading edge及び後部領域、ストレスファイバー上、細胞質分裂時の分裂溝付近などの限局された部位でMBSをリン酸化することを明らかにした。以上の結果から、実際の細胞内においてもMBSがRho-キナーゼによりリン酸化を受けて、Rho-キナーゼの基質群のリン酸化状態を正に制御することが示唆された。運動細胞や分裂細胞における空間的に制御されたMBSのリン酸化は、Rho-キナーゼ基質蛋白質の局所におけるリン酸化レベルを上昇させ、細胞運動や細胞質分裂を遂行する上で重要な役割を担うものと考えられた。

これまでの細胞内シグナル伝達の解析は、主にホモジナイズした細胞を用いた細胞内の空間的解像度を持たない解析法で進められてきた。このような既存の方法では、様々な細胞外シグナルに応答して、細胞極性、細胞骨格及び細胞接着装置をダイナミックに変化させ増殖、分化する細胞の細胞内シグナル伝達を追跡することは不可能である。申請者の用いたモニタリングシステムは、*in vivo*でのRho-キナーゼによるMBSリン酸化を時間的な側面からだけでなく、空間的な解像度をもって可視化することができる解析法である。この点が本研究の特色のひとつであり、独創的な点である。本研究は、Rhoによる細胞高次機能の制御機構の一端を明らかにしたものと考えられる。したがって、本論文は博士（バイオサイエンス）の学位論文として十分に価値あるものと認める。