論文内容の要旨

博士論文題目 Regulation of cytoskeleton by small GTPase Rho and its targets.

(低分子量GTP結合蛋白質Rhoおよびその標的蛋白質による細胞骨格系の制御機構)

氏名 天野 睦紀

(論文内容の要旨)

(1, 200字程度)

低分子量GTP結合蛋白質Rhoは、lysophosphatidic acid(LPA)などの外界シグナルによって活性化され、アクトミオシン系を介して多様な細胞現象を制御していることが知られている。しかし、Rhoの標的蛋白質は長らく不明であり、Rhoがどのような機構で細胞骨格系を制御しているのかは明らかでなかった。私はRhoの作用機構を明らかにする目的で、affinity chromatographyにより牛大脳膜画分よりRhoの標的蛋白質の同定を試みた。その結果、既知のserine/threonine protein kinaseであるprotein kinase N (PKN)、myosin phosphataseのmyosin-binding subunit (MBS)、及び新規serine/threonine protein kinaseであるRho-kinaseの3種の蛋白質を同定した。これらの蛋白質はいずれも、活性型Rhoに特異的に結合し、かつ活性型RhoはPKN及びRho-kinaseのキナーゼ活性を亢進した。更に、in vitroでRho-kinaseがmyosin light chain (MLC) を直接リン酸化すること、またMBSをリン酸化することによりmyosin phosphatase活性を抑制することを示し、Rho-kinaseとMBSがMLCのリン酸化レベルを制御することを明らかにした。平滑筋収縮や非筋細胞のアクトミオシン系の再構築においてMLCのリン酸化が重要な役割を果たしていることが知られている。私はRho-kinaseがRhoの下流でMLCのリン酸化レベルを制御することで細胞骨格系を制御しているのではないかと考えた。そこで、活性型Rhoを導入した細胞でMBS及びMLCのリン酸化レベルを調べたところ、活性型Rhoを発現している細胞ではMBS及びMLCのいずれについても、リン酸化レベルが有意に上昇していることを確認した。更に、実際にRho-kinaseのin vivoにおける生理機能を解析するために、様々なRho-kinaseのmutantを作製し、細胞骨格系に及ぼす影響を調べた。Rho-kinaseはそのキナーゼドメイン(CAT)のみを発現させるとconstitutively activeとなった。CATは線維芽細胞においてストレスファイバー及び接着斑の形成を促進した。一方、Rho-kinaseのRho結合領域(RB)、pleckstrin-homologyドメイン(PH)、及びATP結合部位に変異を導入し不活化したキナーゼドメイン(CAT-KD)はいずれもLPAによるストレスファイバー・接着斑の形成を阻害した。以上のことより、Rho-kinaseはRhoの下流で、MBSやMLCを含む基質群をリン酸化することにより、細胞骨格系を制御していると考えられる。

(論文審査結果の要旨)

(A4 1枚 1, 200字程度)

本論文は、低分子量GTP結合蛋白質Rhoの標的蛋白質を世界に先駆けて同定すると共に、これら標的蛋白質の作用機序及び生理機能を明らかにしたものである。本論文の主要な成果は以下に要約される。

(1) 低分子量GTP結合蛋白質Rhoの標的蛋白質として、protein kinase N (PKN)、Rho-associated kinase (Rho-kinase)、及びmyosin phosphataseのmyosin-binding subunit (MBS)の3種の蛋白質を同定した。

(2) *in vitro*において、Rho-kinaseがmyosin light chain (MLC)を直接リン酸化すること、また、Rho-kinaseがMBSをリン酸化することでmyosin phosphatase活性を抑制すること、を示し、Rho-kinaseとMBSがRhoの下流で2つのpathwayを介してMLCのリン酸化レベルを制御している可能性を示した。

(3) *in vivo*においても、活性型RhoがMBS及びMLCのリン酸化レベルを上昇させることを示した。

(4) さらに、Rho-kinaseの変異体を細胞に導入することにより、Rho-kinaseがRhoの下流でストレスファイバーや接着斑の形成を制御していることを示した。

以上のように、本論文は、低分子量GTP結合蛋白質Rhoの標的蛋白質を同定し、Rhoの作用機構を分子レベルで明らかにしたものである。さらに、Rho-Rho-kinase経路は血管攣縮や本態性高血圧にも関与していることが示唆されている。本論文の成果は細胞生物学上きわめて重要であるのみならず、上記の疾病の病因の理解や診断法や治療法の開発など医学研究に応用される可能性が強く、本研究の社会的意義は極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は、博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認める。