

論文内容の要旨

申請者氏名 永井 裕介

ヘテロ三量体 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) は α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットから構成されており、 α サブユニット ($G\alpha$) に結合したグアニンヌクレオチド (GDP と GTP) によりその活性が制御されている。これまでに G 蛋白質のグアニンヌクレオチドサイクルは生体内の分子スイッチのモデルケースとして多くの研究がなされてきた。しかしながら、G 蛋白質の翻訳後の発現量の調節機構およびその細胞応答への関与については不明な点が多く残されていた。

Ric-8B は線虫 RIC-8 の哺乳類におけるホモログである。哺乳類には 2 つの Ric-8、Ric-8A と Ric-8B が存在する。線虫 RIC-8 及び Ric-8A が $G\alpha$ に対するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) として機能する事から、Ric-8B も GEF として機能すると考えられていた。しかしながら、Ric-8B の GEF 活性を解析した報告はこれまでになく、Ric-8B の機能は不明であった。申請者は G 蛋白質シグナル調節機構のさらなる解明を目指して機能未知分子である Ric-8B に注目して研究を行なった。

線虫 RIC-8 及び Ric-8A と同様に Ric-8B は $G\alpha$ に対する GEF として機能する事が考えられたため、Ric-8B の $G\alpha$ に対する GEF 活性を *in vitro* において検討した。その結果、予想と反して Ric-8B の GEF 活性は認められなかった。次に Ric-8B の細胞内における機能を shRNA を用いた発現抑制により検討した。G 蛋白質の 1 つである G_s の α サブユニット ($G\alpha_s$) はアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP 産生を促す。NIH3T3 細胞において Ric-8B をノックダウンすると β -アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノール刺激による cAMP 産生が減弱した。興味深い事に Ric-8B をノックダウンした細胞では $G\alpha_s$ のタンパク質量が特異的に減少していた。一方、Ric-8B を過剰発現させた細胞では $G\alpha_s$ 蛋白質量は増加したが、 $G\alpha_s$ の mRNA 量は変動していなかった。これらのことは Ric-8B が $G\alpha_s$ タンパク質量、そして G_s シグナルを正に制御する分子であることを示している。次に申請者は $G\alpha_s$ が細胞内でユビキチン化され、プロテアソームにより分解される事を見出した。Ric-8B の過剰発現により $G\alpha_s$ のユビキチン化が抑制されたことから、Ric-8B は $G\alpha_s$ のユビキチン化を抑制することによって $G\alpha_s$ 蛋白質を安定化することが明らかになった。 $G\alpha_s$ と結合しない Ric-8B のスプライシングバリエントを用いた解析と、 $G\alpha_s$ と $G\alpha_i$ を組み換えたキメラ蛋白質を用いた解析から、Ric-8B による $G\alpha_s$ のユビキチン化の抑制には Ric-8B と $G\alpha_s$ の結合が重要であることが明らかになった。さらに、申請者は $G\alpha_s$ が細胞膜でユビキチン化されることを示し、Ric-8B の膜局在が $G\alpha_s$ のユビキチン化の抑制に重要であることを示唆した。以上の結果は、G 蛋白質の翻訳後の安定性の制御機構を初めて示し、これまでに知られていた G 蛋白質のグアニンヌクレオチドに依存した質的な活性調節機構とは全く異なる G 蛋白質の量的制御機構の重要性を提唱している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 永井 裕介

G 蛋白質を介するシグナル伝達は、神経系、心臓血管系や免疫系などを含む様々な組織や細胞の機能に関与している。このシグナル伝達経路の制御において中心的役割を担うのが、G 蛋白質共役型受容体から細胞内エフェクター蛋白質に情報を伝達する G 蛋白質である。G 蛋白質の活性は G 蛋白質の α サブユニット($G\alpha$)に結合した GDP/GTP により制御されており、G 蛋白質は細胞内の分子スイッチのモデルケースとしてよく知られている。しかしながら、G 蛋白質の翻訳後の安定性や発現量の調節機構についてはほとんど知見が得られていなかった。申請者は機能未知の G 蛋白質結合分子である Ric-8B に注目して研究を行ない、これまでに知られていた G 蛋白質のグアニンヌクレオチドに依存した活性制御機構とは全く異なる新しい G 蛋白質シグナル調節機構を明らかにした。

Ric-8B はこれまでに $G\alpha$ に対する GEF 活性を持つことが推測されてきたが、実際にその GEF 活性を検証した報告はなかった。申請者は Ric-8B の $G\alpha$ に対する GEF 活性を *in vitro* において検討し、これまでの予想と反して Ric-8B が *in vitro* において GEF 活性を示さないことを示唆した。一方、Ric-8B をノックダウンした細胞において細胞外刺激による cAMP 産生の減少が観察された。これに加えて、Ric-8B をノックダウンした細胞では $G\alpha_s$ の発現量が特異的に減少したことから、Ric-8B が $G\alpha_s$ 蛋白質量を特異的に正に調節することにより G_s シグナルを制御する分子である事が明らかになった。これまでに、G 蛋白質の翻訳後の安定性の制御についてはほとんど知見が得られていなかったが、本研究において申請者は $G\alpha_s$ がユビキチン-プロテアソーム系によって分解される事を明らかにした。さらに Ric-8B が $G\alpha_s$ と結合することによって $G\alpha_s$ のユビキチン化を抑制し、 $G\alpha_s$ を安定化する事を明らかにした。一方、Ric-8B の嗅覚系への関与が示唆されていたが、その分子基盤は不明であった。申請者は Ric-8B が $G\alpha_s$ のみではなく、 $G\alpha_s$ ファミリーに属する嗅覚系特異的 G 蛋白質である $G\alpha_{olf}$ に対してもユビキチン化抑制作用を示すことを明らかにし、Ric-8B が $G\alpha_{olf}$ を安定化することにより嗅覚応答を制御する可能性を示唆した。以上の本論文により明らかにされた G 蛋白質の量的制御機構は、従来の G 蛋白質活性調節機構であるグアニンヌクレオチドに依存した質的制御機構とは全く異なる新しい G 蛋白質シグナル調節機構を提唱するものである。

以上のように、本論文は G 蛋白質の量的制御という新たな G 蛋白質シグナル調節機構を提唱するもので、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。