

審査の結果の要旨

氏名 宮崎 浩二

本研究は平滑筋における低分子量G-蛋白質Rhoの機能を明らかにするため、その蛋白質の細胞内局在変化を、緑色蛍光蛋白質GFPを用いることにより培養平滑筋細胞において *in vivo* で経時的に観察し、下記の結果を得た。

1. 低分子量G-蛋白質Rhoの機能がGFP標識の影響を受けないことが、生化学的にGTPase活性によって、また細胞生物学的には、その活性型、非活性型の変異体を持ちいて、それぞれのストレスファイバー誘導能およびミオシンリン酸化の変化によって示された。

2. 分化型平滑筋培養細胞系を確立し、その細胞におけるGFP標識RhoAの野生型、変異型の細胞内局在を生きたままの状態を観察した。野生型発現細胞では、一部細胞膜に局在が認められるが、大部分は細胞質に局在し、活性型RhoA発現体では、はっきりと細胞膜に局在したが、依然、多くのシグナルは細胞内に認められ、網状パターンを示し、細胞内膜器官への局在を示唆した。また、不活性型RhoA発現体では、完全に細胞質にほぼ均一に分布しており、対照実験としてGFPのみを発現させた細胞と類似していた。以上より、アゴニスト刺激による野生型RhoAの細胞内局在が細胞質から、細胞膜へ移動することが示唆された。

3. アゴニスト刺激による野生型RhoAの局在変化を、生きた細胞の3次元デジタル画像を経時的に記録して、可視化した。アゴニスト刺激後、次第にGFP標識RhoAの細胞膜におけるシグナル強度が増加し、10分以内に最大値に到達することが示された。ここで、細胞質内のシグナル強度には有意な差は認められなかった。これは比較的発現量の低い細胞においても認められ、RhoAの移動先が飽和したことによる影響とは考えにくい。つまり、刺激により全てのRho蛋白質が膜へ移動するわけではないことが示唆される。

4. 次にRhoの局在とミオシンのリン酸化との関連を検討した。分化型平滑筋培養細胞をアゴニスト刺激後、経時的に固定し、抗リン酸化ミオシン特異的抗体と抗汎ミオシン軽鎖抗体を持ちいて二重染色することにより、各細胞で抗リン酸化ミオシン特異的抗体と抗汎ミオシン軽鎖抗体の各々のシグナル強度の比をもとめ、野生型、変異型RhoA発

現細胞間で比較した。対照として、GFPのみ発現させた細胞をもちいた。対照細胞では、アゴニスト刺激により、ミオシンリン酸化レベルは1分以内に急増し、ピークに達したあと、比較的速やかに減少し、刺激前のレベルまで戻った。しかし、野生型RhoA過剰発現体および活性型RhoA発現体はピークに達した後のミオシンリン酸化レベルの消退が遅れ、アゴニスト洗浄後もしばらく保持された。

この反応は、不活性型発現体には認められなかった。また、活性型発現体をRho依存性キナーゼの特異的阻害剤Y-27632で前処置後に同様の実験を行った結果、活性型変異体のミオシンリン酸化の保持作用はほぼ完全に消失した。即ち、RhoおよびRho依存性キナーゼ系の活性化はアゴニスト刺激によるミオシンリン酸化を増加させたが、これは数秒以内の早い時期 (phasic) ではなく、比較的遅い時期 (tonic) のミオシンリン酸化の保持に寄与していることが示唆された。この遅い時期のミオシンのリン酸化の保持はGFP標識RhoAが細胞膜に移動する時期とほぼ一致またはやや遅れており、RhoAの細胞膜への移動がRhoAの活性化を反映することが、これらのミオシンリン酸化の推移の検討から予想された。

5. 従来、平滑筋収縮の緊張期 (tonic phase) の収縮は、刺激後の細胞内への持続的なカルシウム流入による細胞内カルシウムのわずかな上昇によっておきると考えられてきたが、Rhoの強制発現によって細胞内カルシウム変化に影響があるか否かを細胞内カルシウムセンサーとしてFura-2AMを負荷して検討した結果、この平滑筋細胞の系において野生型と変異型Rhoの強制発現によって細胞内カルシウムに差を認めなかった。この結果から、RhoおよびRho依存性キナーゼ系が平滑筋収縮の緊張期における収縮の一旦を担っていることが示唆された。

以上、本論文は分化型平滑筋細胞において、蛍光標識蛋白質の細胞内遺伝子導入法を用いて、その標的蛋白質であるRhoの細胞内局在変化の可視化に成功し、アゴニスト刺激によるミオシンリン酸化の上昇とのかかわりを経時的に解析した。本研究は蛍光標識蛋白質による新しい手法を用いて、平滑筋収縮における低分子量G-蛋白質Rhoの機能を理解する上で重要と考え、学位の授与に値すると考えられる。