

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名： 郭 非凡

本研究は、ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)のM₁サブタイプとExtracellular signal-Regulated Kinases (ERK)1/2を結び付ける新しい細胞内伝達経路を明らかにするため、PC12D細胞を用いた実験より、M₁mAChRの刺激によるERK1/2の活性化は、グアニンヌクレオチド交換因子であるCalDAG-GEFI、低分子量GTP結合タンパク質であるRap1とセリントレオニンキナーゼであるB-Rafからなる複合体を介して起こることを初めて明らかにすることができた。下記の結果を得ている。

1. PC12D細胞をカルバコールで処理するとERK1/2が速やかに活性化されることをanti-phospho ERK1/2抗体を用いてウェスタンブロット法で確認した。ERK1/2の活性化は、mAChRの拮抗薬であるアトロピン(atropine)、またはMEKの阻害剤であるPD098059とU0126の前処理により抑制された。これらの結果から、カルバコールによるERK1/2の活性化はmAChRとMEKを介して起こることを確認することができた。
2. Site-directed mutagenesis法を用いて、dn Ras、またはdn Rap1を選択的に発現させることができるPC12D-37-19細胞を作製した。PC12D-37-19細胞を用いた実験より、カルバコール刺激によるERK1/2の活性化は主にRap1依存性の細胞内シグナル伝達経路を介して起こることが明らかになった。一方、NGF刺激によるERK1/2の活性化は、主にRas依存性の経路を介して起こった。GTP-Rasと選択的に結合するGST-Raf-RBDと、GTP-Rap1と選択的に結合するGST-RalGDS-RBDを用いた実験より、カルバコールはRap1を比較的強く活性化することと、NGFはRasを比較的強く活性化することが分かった。なお、GST-Raf-RBDとGST-RalGDS-RBDを用いることにより、dnRasは主に

Rasの活性化を抑制することと、dnRap1は主にRap1の活性化を抑制することを確かめることもできた。

3. NGF受容体キナーゼの阻害剤であるK252aと上皮増殖因子(EGF)受容体キナーゼの阻害剤であるAG1478を用いた実験より、カルバコール刺激によるRap1の活性化は、NGFやEGF受容体キナーゼに非依存的事であることを確認した。また、Ca²⁺をキレートするEGTAとC-キナーゼの阻害剤であるGF10920 3Xの前処理によりカルバコール刺激によるRap1の活性化は、主にCa²⁺の流入に依存することが分かった。

4. RT-PCR法とDNAシークエンシング法を用いて、PC12D-37-19細胞では、CalDAG-GEFIのmRNAが発現していることを確認した。次にCalDAG-GEFIのC末端を認識する抗体を用いて、PC12D-37-19細胞でのCalDAG-GEFIタンパク質の発現も確かめた。

5. CalDAG-GEFIがカルバコールの刺激に対して応答するかどうかを調べるため、免疫沈降実験を行った。その結果、細胞をカルバコールで処理すると、CalDAG-GEFI、Rap1とB-Rafを含む複合体が形成されることが分かった。MEKを基質とするキナーゼアッセイを行うことにより、その複合体に入っているB-Rafが活性型であることも確認することができた。

6. カルバコールによるB-Rafの活性化には、CalDAG-GEFIが必要であるかどうかを調べるため、PC12D-37-19細胞にCalDAG-GEFIのアンチセンスRNAを発現させ、HA抗原のタグが付いているB-Rafの活性化への効果を検討した。その結果、カルバコールによるB-Rafの活性化は、アンチセンスRNAの発現により部分的に抑制されることが判明した。同様な実験により、カルバコール刺激による複合体の形成も、CalDAG-GEFIのアンチセンスRNAの発現により部分的に抑制された。これらの実験結果から、CalDAG-GEFIは、カルバコール刺激によるERK1/2の活性化に機能することが明らかになった。

以上、本論文はPC12D細胞において、M₁mAChRによるERK1/2の活性化は、CalDAG-GEFI/Rap1/B-Rafからなる複合体を介して起こることが、初めて明らかになった。この事実より内在性のCalDAG-GEFIの機能についての新た

な知見を得ることができた。この結果より、B-Rafを発現する細胞や体内組織では、他のGタンパク質共役型受容体もこの複合体を介してERK1/2を活性化することが予想される。本研究はGタンパク質共役型受容体を介するERK1/2の活性化機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。