

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏 名：吉田 典弘

本論文は G タンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) によるチュープリンのリン酸化について、下記の新しい事実を明らかにした。

1. ブタ脳から精製したチュープリンを GRK2 でリン酸化後、陰イオン交換カラム、逆相カラムクロマトグラフィーを用いてリン酸化ペプチドを単離した。GRK2 によるチュープリンの主要なリン酸化部位は  $\beta$ -チューブリン C 末部分の  $^{409}\text{Thr}$  と  $^{420}\text{Ser}$  であると結論した。
2. グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) と  $\beta_I$ -チューブリン (GST- $\beta_I$ -チューブリン)、 $\beta_{III}$ -チューブリン (GST- $\beta_{III}$ -チューブリン)、およびそれぞれのチューブリン変異体との融合蛋白質を大腸菌で発現させ、GRK2 によるリン酸化を検討した。GST- $\beta_I$ -チューブリン、GST- $\beta_{III}$ -チューブリンとも GRK2 によってリン酸化された。 $\beta_I$ -チューブリンの変異体 T409A, S420A は GRK2 によるリン酸化量が減少し、さらに 2 重変異体 T409A/S420A はほとんどリン酸化されなかった。また  $\beta_{III}$ -チューブリンの 2 重変異体 T409A/S420A は GRK2 によるリン酸化量が野生型と比較して約 30 % に減少し、3 重変異体 T409A/S420A/S444A はほとんどリン酸化されなかった。以上の結果から、GRK2 によるチュープリンのリン酸化部位が  $^{409}\text{Thr}$ ,  $^{420}\text{Ser}$  および  $\beta_{III}$ -チューブリンでの  $^{444}\text{Ser}$  の 3 ヶ所に限定されることが明らかになった。チューブリンの 3 次元構造の結果と照らし合わせると、リン酸化部位が微小管の

外側に位置していた。この領域はキネシンや MAPs (Microtubule Associated Proteins) との結合に関わることから、GRK2 によるチューブリンのリン酸化が MAPs 等との相互作用に影響を与える可能性が示唆される。

3. GRK2 でリン酸化したチューブリンをグリセロールもしくはタクソール存在下で重合させ遠心分離を行うと、リン酸化されたチューブリンは沈殿画分に回収された。また脳から精製したチューブリンをタンパク質脱リン酸化酵素 (PP2A) で処理し、チューブリンの微小管形成を濁度測定法により測定した。その結果、GRK2 によるチューブリンのリン酸化依存的に微小管形成の増加が見られた。GRK2 によるチューブリンのリン酸化が、微小管形成を促進することが明らかになった。
4. GRK2 がアゴニスト結合受容体のみをリン酸化するのは、受容体中の塩基性部分が GRK2 に作用して活性化するためと考えられている。チューブリン中にもこのような塩基性の活性化部分が存在する可能性が考えられるため、塩基性アミノ酸をほとんど含まない  $\beta_1$ -チューブリンの C 末端部分 (393-455) と GST との融合タンパク質 (GST- $\beta_1$ -チューブリン C) を調製した。GST- $\beta_1$ -チューブリン C は GST- $\beta_1$ -チューブリンと同程度にリン酸化された。非受容体型基質に存在する酸性アミノ酸部分が GRK2 の活性化に関与している可能性が考えられる。この結果は、アゴニスト結合型 G タンパク質共役受容体とは異なった機構で、チューブリンがリン酸化されていることを示唆している。
5. GRK2 によってリン酸化されたチューブリンは、プロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) によって脱リン酸化された。脳から精製したチューブリンを

PP2A で脱リン酸化処理すると、GRK2 によるチュブリンのリン酸化量が約 2 倍に増加した。この結果は、チュブリンの <sup>409</sup>Thr, <sup>420</sup>Ser, <sup>444</sup>Ser のいずれかが脳内でリン酸化されていることを示唆する。

6. GRK2 を HEK293 tsA201 細胞に過剰発現させて共焦点顕微鏡で観察したところ、GRK2 は微小管上に存在し、抗 GRK2 抗体で免疫沈降を行うと  $\beta$ -チュブリンも共沈した。また、野生型 GRK2 を過剰発現すると、内在性チュブリンのリン酸化が増加した。以上の結果は、培養細胞において GRK2 が  $\beta$ -チュブリンと結合し、GRK2 がチュブリンのリン酸化に関与していることを示唆している。生体内でも GRK2 がチュブリンのリン酸化に関与している可能性が考えられる。

以上、本論文は G タンパク質共役受容体キナーゼ (GRK2) によるチュブリンリン酸化の生理的意義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。