

## 論文の内容の要旨

論文題目 エンドセリン1による MAP キナーゼ活性化における G タンパク質の選択性

氏名 荒井健

### 【はじめに】

心肥大は心不全などの危険因子となるため、その形成機構の解明は臨床の面からも注目されている。エンドセリン1 (endothelin-1; ET-1) は血管内皮細胞などから産生される物質で、主要な心肥大形成因子として知られている。ET-1 は細胞膜上にある受容体を通じて細胞内へと情報を伝達するが、詳細な情報伝達機構は明らかとなっていない。これは、ET-1 受容体と共役することが示唆される G タンパク質 ( $G_i$ 、 $G_q$ 、 $G_{12}$  の 3 つのファミリー) のうち、 $G_q$  および  $G_{12}$  ファミリーの特異的阻害剤が存在しないことによる。特に、 $G_{12}$  タンパク質および  $G_{13}$  タンパク質から成る  $G_{12}$  ファミリーの役割はほとんど不明である。本研究では、アデノウイルス・ベクターを用いて G タンパク質の機能を阻害するペプチドを培養ラット心筋細胞に導入し、ET-1 による G タンパク質を介した情報伝達機構の解明を試みた。

### 【実験内容】

#### 1. ET-1 による JNK、ERK 活性化における $G_{12}$ ファミリーの役割

JNK および ERK は MAP キナーゼに属する Ser/Thr キナーゼであり、ET-1 は受容体を介してこれらのキナーゼを活性化する。そこで、はじめに ET-1 による JNK、ERK の活性化に  $G_{12}/G_{13}$  タンパク質が関与しているかを検討した。前述のように、 $G_{12}/G_{13}$  タンパク質を選択的に阻害する薬物は存在しない。そこで、ET-1 受容体とこれら G タンパク質の共役を阻害するために、各々の G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットのカルボキシル末端領域 ( $G_{\alpha_{12}\text{-ct}}$  および  $G_{\alpha_{13}\text{-ct}}$ ) を過剰発現させ、 $G_{12}/G_{13}$  タンパク質を介する情報伝達を抑制した。図1に示すように、ET-1 処置により JNK および ERK の活性は顕著に上昇する。この JNK 活性化は  $G_{\alpha_{12}\text{-ct}}$  および  $G_{\alpha_{13}\text{-ct}}$  の過剰発現により抑制されたが、ERK の活性化は抑制されなかった。そのため、ET-1 による JNK 活性化は  $G_{12}/G_{13}$  タンパク質を介するが、ERK 活性化は別の G タンパク質を介して行われることが示された。

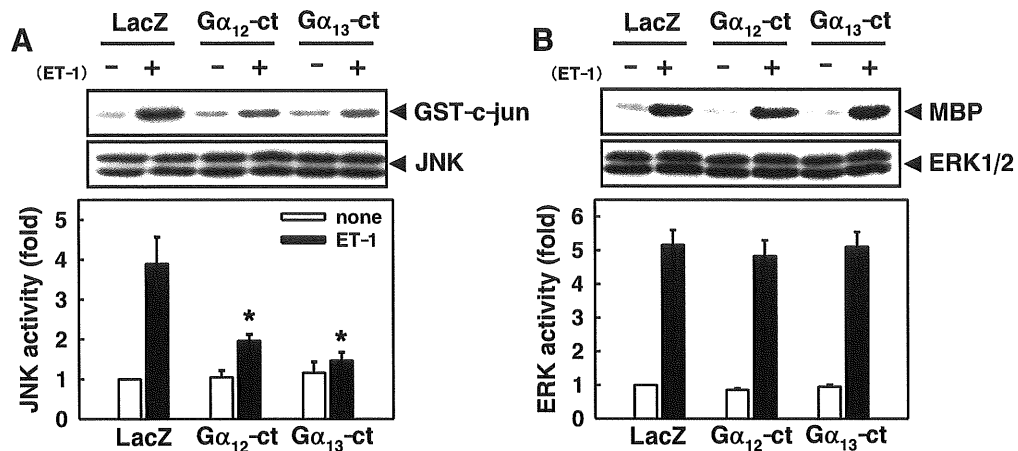


図1. ET-1によるJNK、ERK活性化におけるGα<sub>12</sub>-ct、Gα<sub>13</sub>-ctの効果  
 生後0-1日齢のSDラットから得た培養心室筋細胞を使用した。LacZ、Gα<sub>12</sub>-ct、Gα<sub>13</sub>-ctをコードするアデノウイルス・ベクターを培養1日目の細胞に100 MOIで感染させ、48時間後に10 nM ET-1で20分間(A)、または1 nM ET-1で10分間(B)刺激した。JNK活性(A)は、JNK1抗体で免疫沈降した後、GST-c-junを基質として測定した。ERK活性(B)はERK2抗体で免疫沈降した後、MBPを基質として測定した。データは平均±標準誤差(N=3、\*p<0.05)で表した。

Gタンパク質は、受容体刺激によりαサブユニットとβγサブユニットに解離し、それぞれが情報伝達系(キナーゼ類)に対して働きかける。そこで、次にG<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>タンパク質のどちらのサブユニットがJNK活性化へと働きかけるかを検討した。Gα<sub>12</sub>/Gα<sub>13</sub>の関与は、これらタンパク質と特異的に相互作用しその機能を阻害するp115RhoGEFのRGSドメイン(p115-RGS)の過剰発現により検討した。Gβγの関与は、GRK2(G-protein coupled receptor kinase2)のカルボキシル末端(GRK2-ct)の過剰発現によりGβγの機能を阻害することで検討した。図2に示すように、ET-1によるJNK活性化はp115-RGSの発現により抑制されたが、GRK2-ctの発現では変化が観察されなかった。したがって、ET-1はG<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>タンパク質のαサブユニットを介してJNKを活性化することが明らかとなった。

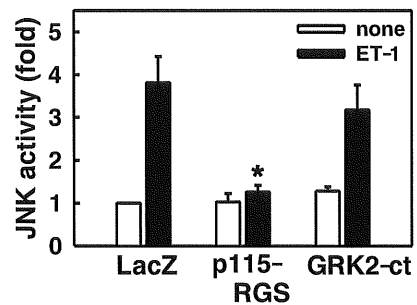


図2. ET-1によるJNK活性におけるp115-RGS、GRK2-ctの効果  
 生後0-1日齢のSDラットから得た培養心室筋細胞を使用した。LacZ、p115-RGS、GRK2-ctをコードするアデノウイルス・ベクターを培養1日目の細胞に100 MOIで感染させ、48時間後に10 nM ET-1で20分間刺激した。JNK活性はJNK1抗体で免疫沈降後、GST-c-junを基質として測定した。データは平均±標準誤差(N=3、\*p<0.05)で表した。

## 2. ET-1によるJNK、ERK活性化におけるG<sub>q</sub>、G<sub>i</sub>タンパク質の役割

G<sub>q</sub>タンパク質およびG<sub>i</sub>タンパク質もET-1受容体と共役しており、ET-1による種々の細胞応答はこれらのGタンパク質を介することが知られている。しかし、ET-1におけるJNKまたはERKの活性化に対するG<sub>q</sub>タンパク質またはG<sub>i</sub>タンパク質の関与は完全には解明されていない。そこで、Gα<sub>q</sub>-ct(受容体とG<sub>q</sub>タンパク質の共役を阻害)および百日咳毒素PTX(G<sub>i</sub>タンパク質を不活性化)を用いてこれら2種のGタンパク質の機能を検討した。ET-1によるJNK活性化はGα<sub>q</sub>-ctの過

剰発現により抑制されたが PTX の前処置では変化が見られなかった。一方、ERK の活性化は  $G_{\alpha_q}$ -ct の過剰発現では影響を受けなかったが PTX の前処置で顕著に抑制された。このため、ET-1 による JNK 活性化は  $G_{12}/G_{13}$  タンパク質だけでなく  $G_q$  タンパク質も介して行われること、また ERK の活性化は主に  $G_i$  タンパク質を介することが明らかとなった。さらに、 $G_{\alpha_q}$  の機能を選択的に阻害する GRK2 の RGSドメイン (GRK2-RGS) を用いた検討から、 $G_{12}/G_{13}$  タンパク質と同様に、 $G_q$  タンパク質もその  $\alpha$  サブユニットを通じて JNK 活性化へといたる情報伝達を行うことが確認された。また、ERK の活性化は GRK2-ct の過剰発現により抑制されたことから、 $G_i$  タンパク質から分離した  $\beta\gamma$  サブユニットが ET-1 による ERK 活性化に関与することも明らかとなった。

### 3. JNK および ERK の活性化にいたる経路の検討

$G_{12}/G_{13}$  タンパク質は Rho 経路を制御することが知られている。また、Rho の活性化に  $G_{\alpha_q}$  が関与することも報告されている。そこで、ET-1 による JNK 活性化に Rho が関与しているかを検討した。Rho を不活性化する C3 toxin を過剰発現させた培養心筋細胞では、ET-1 による JNK 活性化が抑えられていた。一方、ERK の活性化は C3 toxin を過剰発現させても変化が見られなかった。したがって、Rho は  $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$  または  $G_{\alpha_q}$  の下流に位置し、JNK の活性化に関与しているものの ERK の活性化には関与していないと考えられる。また、ET-1 による ERK の活性化は、ERK の上流に位置する MEK (MAPK/ERK kinase) の選択的阻害剤 U0126 および PD98059 により濃度依存的に抑制された。そのため、ET-1 による ERK 活性化は MEK を介して行われることが明らかとなった。

### 4. ET-1 による心肥大形成における $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$ タンパク質の関与

ET-1 は主要な心肥大形成因子であり、これまでに  $G_q$  タンパク質および  $G_i$  タンパク質を介して心肥大応答を引き起こすことが報告されている。しかし、 $G_{12}/G_{13}$  タンパク質が心肥大応答に及ぼす影響はほとんど検討されていない。心肥大形成時には、心筋細胞はタンパク質の合成を行って量的に肥大するだけでなく、アクチンなどの収縮系を構成するタンパク質の再構築なども行う。そこで、最後に p115-RGS および C3 toxin の過剰発現により、ET-1 による心肥大応答における  $G_{12}/G_{13}$  タンパク質および Rho の役割を検討した。図3に示すように、p115-RGS および C3 toxin

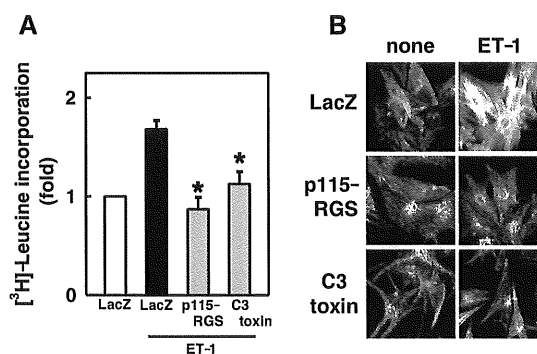
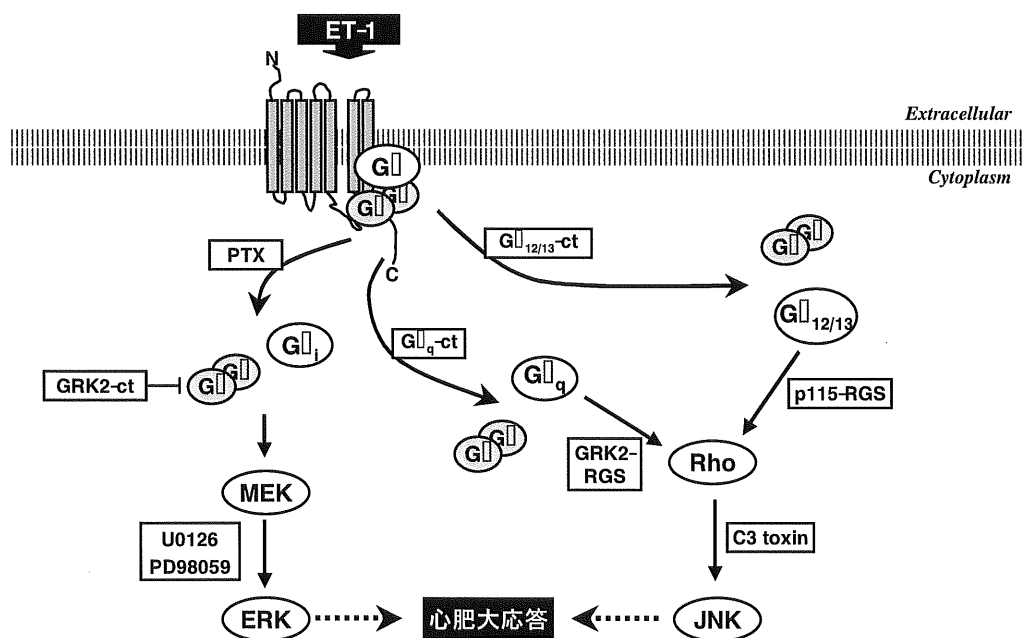


図3. ET-1による心肥大応答に対するp115-RGS、C3 toxinの効果。生後0-1日齢のSDラットから得た培養心室筋細胞を使用した。LacZ、p115-RGS、C3 toxinをコードしたアデノウイルス・ベクターを培養1日目の細胞に100 MOIで感染させ、48時間後に実験に用いた。(A)100 nM ET-1で24時間刺激した後、タンパク質合成量を測定した。データは平均±標準誤差(N=3、\*p<0.05)で表した。(B)100 nM ET-1で48時間刺激した後、アクチン繊維を観察した。

の過剰発現により、心肥大の指標であるタンパク質合成量上昇とアクチンの再構成がともに抑制された。したがって、ET-1による心肥大形成において、新たに  $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$  タンパク質を経由した Rho/JNK の経路が存在することが明らかとなった。

【まとめ】

本研究から、i) ET-1 による JNK、ERK 活性化は G タンパク質の種類に依存すること、ii)  $G_{12}/G_{13}$  タンパク質の $\alpha$ サブユニットは Rho/JNK 経路を介し心肥大応答を誘導していること、が明らかとなった。これらの知見は、これまで治療薬の対象として未開拓であった  $G_{12}/G_{13}$  タンパク質が心肥大の新規創薬ターゲットとして有用であることを示すばかりでなく、細胞内情報伝達のより詳細な機構を解明する手助けとなるものである。(参考文献: Arai et al., Mol. Pharmacol. in press )



\* 四角で囲まれた物質は、該当する経路を抑制