

審査の結果の要旨

氏名 荒井 健

心臓は血行力学的負荷を受けると、心筋細胞を肥大させて心拍出量を正常に保持しようとする。すなわち、心肥大は分裂能力を失った心筋細胞に備わる代償機構（適応現象）と考えられる。しかし、一方で心肥大は心不全などの疾病を発症させる危険因子にもなりうる。したがって、心肥大形成機構を解明することは臨床的にも極めて重要な課題である。心肥大形成は、液性因子や機械的負荷が心筋膜上にある受容体を介して、細胞内へ情報を伝達することで開始される。液性因子であるエンドセリン1（endothelin-1; ET-1）は主要な心肥大形成因子でありながら、いまだに詳細な情報伝達機構が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} タンパク質の特異的阻害剤が存在しないことによる。本研究で荒井は、培養ラット心筋細胞を用いて、ET-1 刺激による心肥大形成における G タンパク質の役割および情報伝達経路に関する検討を行った。

特異的阻害剤が存在しない G_{12}/G_{13} タンパク質および G_q タンパク質の生理機能を検討するためには、各 G タンパク質と選択的に作用（阻害）するペプチド類を細胞内に導入する必要がある。本研究では、はじめに G タンパク質の α サブユニットのカルボキシル末端（ $G\alpha$ -ct）を培養心筋細胞に導入する手法を用いている。この領域は受容体と G タンパク質との共役に重要であるため、 $G\alpha$ -ct の過剰発現は G タンパク質より生じる情報伝達を抑制する。 $G\alpha_{12}$ -ct/ $G\alpha_{13}$ -ct の過剰発現または $G\alpha_q$ -ct の過剰発現は ET-1 刺激による JNK 活性化を抑制した。一方で ET-1 刺激による ERK 活性化に

は影響を与えなかった。したがって、ET-1 は G_{12}/G_{13} タンパク質または G_q タンパク質を介して JNK を活性化させることが明らかとなった。また、ET-1 刺激による ERK 活性化は百日咳毒素 PTX により抑制されたため、ET-1 は G_i タンパク質を介して ERK を活性化させることが示唆された。

G タンパク質は、受容体刺激により α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットに解離し、それぞれが情報伝達系に対して働きかける。本研究では、これらサブユニットの役割についても検討を行っている。 G_{12}/G_{13} の α サブユニットの関与は、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、 G_q の α サブユニットは $G\alpha_q$ の機能を選択的に阻害する GRK2 (G-protein coupled receptor kinase2) の RGS ドメイン (GRK2-RGS) を過剰発現させることで、また $G\beta\gamma$ サブユニットの関与は GRK2 のカルボキシル末端 (GRK2-ct) の過剰発現により $G\beta\gamma$ の機能を阻害することでそれぞれ検討した。

p115-RGS または GRK2-RGS の過剰発現はともに ET-1 刺激による JNK 活性化を抑制したが、ERK 活性化には変化が見られなかった。一方、GRK2-ct の過剰発現は JNK 活性に影響を与えなかったが、ERK 活性は顕著に抑制した。したがって ET-1 は、 G_{12}/G_{13} タンパク質または G_q タンパク質の α サブユニットを介して JNK を活性化し、 G_i の $\beta\gamma$ サブユニットを介して ERK を活性化することが明らかとなった。

心肥大形成時には、心筋細胞はタンパク質の合成を行い量的な肥大を生じるだけでなく、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。培養心筋細胞に p115-RGS または C3 toxin を過剰発現させて、 $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ タンパク質や Rho を抑制すると ET-1 刺激によるタンパク質合成量上昇とアクチンの再構成が抑制された。したがって、ET-1 による心肥大形成において、新たに G_{12}/G_{13} タンパク質の $G\alpha$ サブユニットを経由した Rho/JNK の経路が存在することが明らかとなった。

以上、本研究は培養心筋細胞を用いて ET-1 刺激による心肥大形成に至る細胞内情報伝達系を検討し、(1) G_{12}/G_{13} および G_q の $G\alpha$ サブユニットが ET-1 刺激による JNK 活性化に関わること、(2) ET-1 刺激による ERK 活性化には G_i の $G\beta\gamma$ サブユニットを介すること、および (3) これら JNK、ERK の両経路が ET-1 刺激により誘導される心肥大応答に重要であること、を明らかにしたものである。これらの知見は、複雑な細胞内情報伝達機構を詳細に理解するための手助けとなるばかりでなく、これまで治療薬開発の対象として未開拓であった G_{12}/G_{13} タンパク質が心疾患の新規創薬ターゲットとして有用であることを示したものであり、本研究分野の進展への貢献度は大きく、博士（薬学）の授与に値すると判定した。