

審査の結果の要旨

氏名 田邊 思帆里

生体内の細胞は、様々な薬物受容体刺激を細胞膜上の受容体で受容し、細胞内でシグナルを伝達させることにより生理応答を引き起こすことが知られている。従ってその周辺分子の機能解析を行うことは非常に重要であると考えられている。三量体 G タンパク質共役型 7 回膜貫通型受容体刺激、細胞増殖刺激は細胞内でそれぞれ特異的な Dbl ファミリー-GEF(Guanine nucleotide exchange factor)を活性化するものである。活性化された GEF は RhoGTPase 等の低分子量 G タンパク質を GDP 結合型から GTP 結合型へ変換することによって活性化し、細胞骨格構築や DNA 合成、神経突起調節に代表される細胞応答を惹起する。本論文においては、特に 7 回膜貫通型薬物受容体刺激から三量体 G タンパク質を介して伝達されるシグナル伝達経路に着目し、その分子機能解析を行っている。GEF として同定されている合計約 100 種の分子の内、RGS (regulator of G protein signaling)ドメインを有する分子は、ヒトにおいては p115RhoGEF, LARG, PDZ-RhoGEF の 3 種が同定されているのみであり、本論文においては、その 3 種の分子を RGS-RhoGEF ファミリーと総称している。これまで PDZ-RhoGEF は細胞を用いた解析においてその G α 12/13 タンパク質による活性化が示唆されてきたが、*in vitro* における直接的な活性化は観察されていなかった。そこで本論文においては、PDZ-RhoGEF をはじめとする、RGS-RhoGEF ファミリーの G12/13 による活性制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的として解析を行っている。

本論文において、RGS-RhoGEF の活性測定には、*in vitro* の再構成系を用いている。Sf9 昆虫細胞を用いてタンパク質を精製しアッセイに使用している。従来の Rho 精製方法においては、得られるタンパク質が 2L の Sf9 培養液から約 100 μ g と低収量であった。そこで本論文においてはこの問題点を改善するため、アミノ末端にタグを付加した Rho のバキュロウィルスを作製し、精製することを試みている。この方法により 1L の Sf9 culture から 5mg という高収量の Rho を得ることが可能となっている。

まず第一節においては、RhoGEF の活性化を Rho に対する GTP γ S 結合により定量する方法を新規に開発している。従来の、Rho からの GDP 解離を定量する方法においては、Rho に [3 H]-GDP をロードするステップが必要であったが、これを、GTP γ S 結合を直接定量することで、アッセイをより簡便で容易なものに改良している。加えて、本アッセイ法を用いることにより得られるシグナルの感度が上昇している。本論文においては、新規 GTP γ S 結合アッセイ法を用いて G α 13 タンパク質が精製 p115RhoGEF 及び LARG を活性化することが明らかとなっている。

一方で、PDZ-RhoGEF に関しては同様の *in vitro* 再構成系を用いた限りでは活性化が見られていない。そこで、続いて第二節においては、PDZ-RhoGEF の活性化に対して昆虫細胞内では誘導されない何らかの細胞内修飾が必要である可能性を想定し、RhoGEF をヒト HEK293 細胞に発現させた後、免疫沈降してその活性を測定することを試みている。免疫沈降した PDZ-RhoGEF を用いて RhoGEF アッセイを行った結果より、 $G\alpha_{13}$ により PDZ-RhoGEF が活性化されることが初めて明らかとなっている。これらの知見から、 $G\alpha_{13}$ による PDZ-RhoGEF の活性化にとっては何らかの細胞内修飾又は細胞内因子の必要性が考えられている。

第三節においては、細胞内修飾の一つの可能性として、G12/13 経路に対する Src の関与を調べることにし、まずこれらの RGS-RhoGEF のチロシンリン酸化を検討している。HEK293 細胞を用いた実験結果より、PDZ-RhoGEF と LARG が Src 依存的にチロシンリン酸化され、p115RhoGEF は同じ条件下でチロシンリン酸化されないことが見出されている。また、 $G\alpha_{12/13}$ による RhoGEF 活性化の詳細な機構を明らかにするため、Rho の活性を測定している。本論文における検討結果より、 $G\alpha_{13}$ と PDZ-RhoGEF を共発現させることによって上昇した活性は、Src によって抑制されることが明らかとなっている。

以上のように、本論文において、新規 $GTP\gamma S$ 結合アッセイにより、 $G\alpha_{13}$ が、精製及び免疫沈降した p115RhoGEF、LARG を活性化することが明らかとなっている。また、免疫沈降した PDZ-RhoGEF が $G\alpha_{13}$ により活性化されることが新たに明らかとなっている。さらに、PDZ-RhoGEF が Src tyrosine kinase によりリン酸化されることを見出し、その活性がリン酸化によって制御されている可能性を見出している。以上本論文は、各々の RGS-RhoGEF が細胞内で特異的な制御を受けており、G12/13 経路が RhoGEF のリン酸化によりさらに制御されている可能性を示すものである。本論文により提示された結果は、今後各分子を特異的にターゲットとした創薬・治療を目指す上で非常に重要な概念となり、生命薬学の分野に多大な貢献をもたらすものと期待でき、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。