

審査の結果の要旨

氏名 大石篤郎

本研究はcAMPに反応し細胞が形を小さく変える現象 (cell rounding) の分子機構を、主にcardiac fibroblastで示したものであり、下記の結果を得ている。

1. 活性型RhoA(G14V ; constitutively active mutant)をbaseに、PKAによるリン酸化サイトとされているSerin 188をAlaninに置換したリン酸化resistant mutant (G14V/S188A) 発現細胞において、十分なRhoGDI α が発現していれば、cAMPによってcell roundingが生じるというRhoA S188のリン酸化だけでは説明できない現象を観察した。
2. Endogenous RhoGDI α をsiRNAでknock down することでcAMPによるcell roundingが抑制されることを示した。
3. 2. で示したsiRNAでendogenous RhoGDI α をknock downした状態で、siRNAに干渉されないRhoGDI α -WTまたはS174A mutantを発現させcAMPを作用させると、リン酸化を受けうるRhoGDI α -WTではcell roundingが回復したが、リン酸化されないRhoGDI α -S174Aではcell roundingは回復しなかった。このことよりcell roundingにはRhoGDI α のS174のリン酸化が重要な役割を示していることが示唆された。
4. 免疫沈降したRhoGDI α をRhoGDI α -S174のリン酸化抗体でwestern blottingしたところ、Endogenous RhoGDI α -S174のintact cellでのリン酸化をcardiac fibroblastで確認した。
5. COS7細胞において、活性型RhoAの免疫沈降時に共沈されるRhoGDI α を評価することで、cAMPによる活性型RhoAとRhoGDI α の親和性の上昇を規定するのが、RhoAのリン酸化よりもむしろRhoGDI α のリン酸化であることを示した。

以上、本論文は cAMP に反応し細胞が形を小さく変える (cell rounding) 現象について、リン酸化された RhoGDI α S174 が cell rounding の責任分子であることを明らかにした。本研究は cAMP による RhoA の抑制は、これまで RhoA-S188 がリン酸化されることが主たる分子機構と考えられていたが、cAMP の上昇に伴って RhoGDI α -S174 がリン酸化されることが RhoA の抑制の主たる分子機構であるという事象を明らかにしたという点で、学位の授与に値するものと考えられる。