

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 荻田 佳孝

ヒトの細胞には150種以上からなる低分子量Gタンパク質スーパーファミリーが存在し、諸種のシグナル伝達経路において分子スイッチとして機能している。このファミリーに属する多くの低分子量Gタンパク質は、GDPを結合した不活性型で待機しており、シグナル経路の上流に位置するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の作用によって、GDPを解離してGTPを結合した活性型に転換し、下流の標的分子の機能を調節する。結合したGTPは、その後Gタンパク質に内在するGTPアーゼによって加水分解され、GDPを結合した不活性型へと復帰するが、この反応はGTPアーゼ活性化タンパク質(GAP)の作用によって促進される。しかしながら、定常状態でGTP結合型(活性型)を好むようなアтипカルな性状を有する低分子量Gタンパク質が同定され、さらに、ヒトの腫瘍でRAS以外の例として、新たに低分子量Gタンパク質RAC1遺伝子の体細胞変異が報告された。

「GTP結合優位型低分子量Gタンパク質の動態・活性制御に関する研究」と題する本論文では、Rasサブファミリーに属し、GTP結合型を好むアтипカルな性状をもつDi-Ras2のユニークな細胞内動態・活性制御機構を解明し、さらに、悪性黒色腫患者で最近見出されたRhoサブファミリーに属するRAC1の変異が、Gタンパク質を恒常的にGTP結合型(活性型)にする機構を見出している。

1. アтипカル低分子量Gタンパク質Di-Ras2の動態と活性制御機構の解明

Rasサブファミリーに属するDi-Ras (Distinct subgroup of the Ras family: Di-Ras1とDi-Ras2)は、Rasタンパク質に共通する構造上の特徴をもつが、その生化学的性状は他のRasタンパク質とは異なり、脳組織で特異的に発現する。Di-Rasに内在するGTPアーゼの活性は低く、GDPに比べてGTPへの結合親和性が高いため、培養細胞に過剰発現させたDi-Rasは主にGTP結合型で存在し、GDP結合型となる他の多くの低分子量Gタンパク質とは異なる。さらに、Di-Ras2タンパク質は細胞膜だけでなく細胞質にも存在し、細胞質のDi-Ras2はSmgGDSとの複合体として精製される。このようにユニークな特徴を有するDi-Rasの動態と活性制御機構について、さらに解析を進め、1) SmgGDSをDi-Ras2に作用させると、Di-Ras2とSmgGDSが安定な複合体を形成し、Di-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性が低下すること。2) 培養細胞への過剰発現実験系でも、SmgGDSは

Di-Ras2のグアニンヌクレオチド結合量を低下させること。さらに、3) パルスチェイス実験により、Di-Ras2は生合成の直後にSmgGDSと複合体を形成すること、4) Di-Ras2とSmgGDSの複合体は、Di-Ras2の安定性に寄与すること。また、5) この複合体形成はDi-Ras2のプレニル化に依存すること、を見出した。

2. ヒト腫瘍組織で新たに見出されたRac1変異体の活性化機構の解明

ヒトの腫瘍でこれまでに見出されてきた低分子量Gタンパク質の変異として最も有名な例は、K-RAS遺伝子のコドンG12V等にみられるミスセンス変異である。このRas/G12V変異体ではGAPが結合できず、Rasに内在するGTPアーゼ活性が不全となってGTP結合型Ras（活性型）が蓄積し、細胞が異常増殖する。その後、悪性黒色腫患者の腫瘍部位やヒト癌由来細胞株から、Rhoサブファミリーに属するRAC1遺伝子の体細胞変異が新たに複数同定された。これらのRac1変異体におけるアミノ酸の置換部位は、これまでRas変異体で報告された置換部位とは異なっていた。そこで、細胞増殖の促進と新たなRac1変異体との関連について、大腸菌にて発現・精製した組み換えタンパク質を用いて生化学的解析を詳細に進め、1) 細胞増殖の促進作用が顕著なRac1変異体であるP29S, N92I及びC157Yは、野生型Rac1とは異なり、いずれもGTP結合型（活性型）を好む生化学的性状を有すること。さらに、2) この性状は、Rac1に内在するGTPアーゼ活性の低下ではなく、GDP解離（とその後のGTP結合）の促進に基づくこと、を見出した。

1. Di-Ras2に関する研究では、GTP結合型を好むDi-Ras2が、生合成後速やかにSmgGDSと複合体を形成することで、GTP/GDP結合親和性が低下した状態、すなわち不活性型の状態で安定に待機するという、新しい調節機構を提唱している。この研究成果から、GDP-GTP交換反応とGTPアーゼ反応という従来型のスイッチ機構とは異なる、別種の制御機構で調節される低分子量Gタンパク質の存在、すなわち、Gタンパク質の活性制御機構が多様であることが提示されている。また、2. Rac1変異体に関する研究では、ヒト腫瘍組織から見出された体細胞変異体は、GDP-GTP交換反応が自発的に進行してGTP結合型（活性型）が優位になり、細胞増殖が促進されることを解明している。このRac1変異体は、先に見出されたGTPアーゼ活性欠失-Ras型とは異なる活性化機構をもつ初めての例であり、亢進したGDP解離を抑制することがRac1変異体を標的とする癌治療に結びつく可能性を示唆している。以上を要するに、本論文の研究成果は、博士（薬科学）の学位として十分な価値があるものと認められる。