

論文の内容の要旨

論文題目 cyclic AMP 依存的 RhoA リン酸化の検討

氏名 三谷康二

序文

低分子量 G タンパク質は、GTP-form で活性化、GDP-form で不活性化することで、細胞内の情報伝達のスイッチのオン/オフを担っている。その 1 種の RhoA は、アクチンフィラメントの合成を介した細胞骨格の構築や、細胞増殖、平滑筋細胞の収縮などに関与しており、心血管障害・悪性腫瘍など多くの疾患に関与している。

RhoA は翻訳された後に、C 末端に近い 190 位の Cys にゲラニルゲラニル基修飾を受ける (prenylation)。RhoA が、翻訳後修飾を受けた後に正常に機能するためには、GDP-form の RhoA の GDP を GTP に交換して活性化させる RhoGEF、GTP-form の RhoA の GTP の加水分解を促進して不活性化させる RhoGAP、GDP-form の RhoA と複合体を形成して細胞質で安定化させるなどの多面的な作用を持つ RhoGDI の 3 種のタンパク質が関与する。

RhoA を活性化する刺激として、 $G_{q/11}$ や $G_{12/13}$ のヘテロ三量体 G タンパク質を介するものなどが知られている。一方 *Clostridium botulinum* の C3 toxin などの毒素は、RhoA の活性化を阻害する。線維芽細胞などは、RhoA の阻害でアクチンフィラメントの生成が障害されると、細胞形態の極性が失われて丸く小さく変化してしまう。ヘテロ三量体 G タンパク質の G_s に代表される cyclic AMP (cAMP) を増加させる刺激でも同様の形態変化が生じることから、cAMP は RhoA を抑制すると考えられていた。その機序については、無細胞系の実験で cAMP が protein kinase A (PKA) を介して RhoA の 188 位の Ser をリン酸化することが発見され、これを根拠に細胞における cAMP 増加刺激での RhoA の抑制は、PKA が細胞膜に存在する活性型の GTP-form の RhoA を選択的にリン酸化し、するとそのリン酸化を受けた

RhoA は RhoGDI と複合体を形成しやすくなって細胞質へ回収され、活性が低下することによる、という説が提唱された。

しかし細胞で RhoA のリン酸化を検出した報告は少なく、検出できないと結論したものさえあった。さらにリン酸化を受けない変異を導入した RhoA を過剰発現させても、RhoA をリン酸化する刺激により RhoA の抑制が観察されるという、前述の説とは矛盾した現象も報告された。私の研究室も過去にこの矛盾を確認して研究を進め、cAMP-PKA 系による RhoA の抑制は、RhoA 自体のリン酸化ではなく、RhoGDI α のリン酸化が機序であると証明した (Oishi A, et al. J Biol Chem. 2012; 287: 38705-14.)。

ただしこの研究結果は、「細胞内で RhoA がリン酸化されない」と同時に証明したわけではないため、細胞内での RhoA のリン酸化の可能性について詳細な検討を行った。すると RhoA を過剰発現させた時に cAMP-PKA 系の刺激によるリン酸化が検出された。そのリン酸化を受けた RhoA は、内在性 RhoA では検出困難な prenylation を受けていない RhoA (unprenylated-RhoA) であった。この結果を踏まえて、細胞における cAMP 依存的な RhoA のリン酸化についてさらに詳細に、またその生物学的意義についても検討、考察を行った。

結果

COS-7 細胞に野生型の GFP-RhoA (GFP-RhoA WT) をアデノウイルスを用いて過剰発現させると、そのリン酸化が検出された。しかし内在性 RhoA には認められなかった。GFP-RhoA の試料の濃度を希釈して内在性 RhoA のものより低くしても前者のリン酸化は検出できたため、後者のリン酸化が検出できない理由は、量が少ないからではなくリン酸化を受けにくい性質があるためと推定した。

その性質の候補の 1 つとして、リン酸化を受ける 188 位の Ser と prenylation を受ける 190 位の Cys の近接性に着目し、prenylation が PKA の作用と関連する可能性を検討した。GFP-RhoA C190A (prenylation を受けない変異) を COS-7 細胞に過剰発現させると、PKA によるリン酸化は GFP-RhoA WT よりも増加した。さらに prenylation の抑制効果が示唆されているスタチンの 1 種のピタバスタチン (Pita) を投与したところ、PKA による GFP-RhoA のリン酸化は同様に増加し、さらに内在性 RhoA のリン酸化も検出できるようになった。この 2 つの結果は、unprenylated-RhoA が prenylated-RhoA よりも PKA によるリン酸化を受けやすいことを示唆した。

次に RhoA を prenylated-form と unprenylated-form とで分離するために、Triton X-114 を用いて COS-7 細胞の破碎物を、疎水性タンパク質である prenylated-RhoA を含む界面活性剤相と、親水性タンパク質である unprenylated-RhoA を含む水相に分離した。過剰発現させた GFP-RhoA WT は、両相にほぼ同量で分布していたが、PKA によるリン酸化は水相の unprenylated-form でのみ検出された。一方内在性 RhoA は、prenylated-form のみが存在していた。さらに Pita を投与すると、GFP-RhoA WT は prenylated-

form が減少して unprenylated-form が増加して優位となった。内在性 RhoA も prenylated-form のみであったのが、Pita によりむしろ unprenylated-form が多くなった。この結果は、Pita が prenylation を抑制することを示すものともなった。PKA によるリン酸化は、Pita によって、GFP-RhoA WT では unprenylated-form が増えたことに伴い増加し、内在性 RhoA でも unprenylated-form が生じたことに合わせて検出できるようになった。以上より RhoA は、その unprenylated-form が選択的にリン酸化されると結論した。

さらに unprenylated-form、prenylated-form それぞれの GFP-RhoA WT において、PKA によってリン酸化される RhoA の割合の推定を行った。そのためにリン酸化タンパク質吸着カラムを使って、全てがリン酸化されていると想定できる GFP-RhoA WT を精製し、GFP-RhoA の総量、リン酸化された GFP-RhoA の量を比較することによりその割合を算出した。その結果は unprenylated-form では、PKA でリン酸化されるものの割合は約 5%であった。一方 prenylated-RhoA では、0.2%のリン酸化を検出できる感度でも検出できなかった。

prenylation の有無の他に、活性型 (GTP-form) と不活性型 (GDP-form) の違いが PKA による RhoA のリン酸化に影響するかについても検討を行った。GFP-RhoA WT を COS-7 細胞に過剰発現させ、RhoA を活性化するアンジオテンシン II (A II) を投与し、PKA による unprenylated-form の GFP-RhoA のリン酸化を調べたところ、A II 投与による変化は見られなかった。また RhoA を活性化させる別の手段として、恒常活性型変異である GFP-RhoA G14V を過剰発現させての検討も行ったが、PKA による unprenylated-RhoA のリン酸化は GFP-RhoA WT と同等であった。これらの結果より、unprenylated-RhoA においては、GTP-form と GDP-form の違いは、PKA によるリン酸化に影響しないと考えた。

考察

以上の実験結果より、cAMP は PKA の活性化を介して unprenylated-form の RhoA を選択的にリン酸化することを今回明らかにした。

PKA による RhoA のリン酸化を直接阻害しているものが何かという問いには、prenylation 反応で RhoA に付加されるガラニルガラニル基そのものであるという答が想起される。一方でガラニルガラニル基に加えて、RhoA と複合体を形成する RhoGDI も PKA の作用を妨げることができるという可能性も考えられる。なぜなら両者の結合にはガラニルガラニル基が関与しており、RhoA の 188 位の Ser はその近傍に存在するため、両者が複合体を形成すると 188 位の Ser は RhoGDI で覆われてしまって、やはり PKA がそこへ作用できない、とも想像できるからである。今回私は RhoGDI が PKA の作用を阻害するのかが解明できておらず、さらなる検討が必要である。また、GTP-form と GDP-form の違いは PKA による RhoA のリン酸化に影響しないと示したが、エフェクターとの結合など、他にも検討すべき対象がある。

unprenylated-RhoA には、RhoA の古典的な作用とは異なった独自の作用がある可能性が、近年複数報告されている。そうならば、PKA による unprenylated-RhoA のリン酸化は、その作用を修飾する可能性がある。今回私はそのような生物学的意義までは特定できなかったが、さらに研究を行いたい。

一方で、unprenylated-RhoA のリン酸化が持つ意義の解明とは独立した視点で、リン酸化された RhoA の検出を、prenylation の抑制を表す代替指標として臨床に応用することを立案した。今回の実験でも用いたスタチンは、LDL コレステロール低下作用による心血管イベント抑制効果が臨床的に確立しているが、それとは独立した効果、例えば悪性腫瘍の進展抑制の効果も持つ可能性が議論されており、pleiotropic effect と呼ばれている。この pleiotropic effect を説明する機序として、低分子量 G タンパク質の prenylation の抑制が有力な候補に挙げられている。末梢白血球に存在するリン酸化を受けた RhoA がスタチンの服用により増加することが検出されれば、それはスタチンによる prenylation の抑制が起こっていること、そして pleiotropic effect の効果が期待できることを表すのではないかと、想定している。現在スタチンの pleiotropic effect の指標となるような臨床検査はなく、このリン酸化 RhoA の測定はその指標になる可能性があるかと期待している。

ヘテロ三量体 G タンパク質の G_{q11} や $G_{12/13}$ を活性化する刺激は、RhoGEF を介して RhoA を活性化し、一方 G_s を刺激するものは、cAMP-PKA 系を活性化して RhoGDI α をリン酸化し、RhoA を抑制する。異なる種類のヘテロ三量体 G タンパク質が、RhoA を交点として活性化と抑制の 2 つの方向でクロストークを形成していることは興味深い。cAMP-PKA 系が unprenylated-RhoA を選択的にリン酸化するという発見は、このクロストークの概念に新たな要素を加えたこととなった。このクロストーク機構のさらなる詳細を明らかにしていくことも、今後の目標としたい。