

審査の結果の要旨

氏名 三谷 康二

本研究は、低分子量 G タンパク質を代表するものの 1 つで、様々な生理学的作用を持ち、多岐にわたる病態生理にも関与している RhoA を扱ったものである。その中で、細胞において cyclic AMP-Protein kinase A 系 (cAMP-PKA 系) による RhoA のリン酸化が、どのように規定されているかの解明に取り組み、下記の結果を得ている。

1. 無細胞系の実験では PKA によってリン酸化されることが証明されていた RhoA だが、細胞でもリン酸化されるのかどうかについて意見が分かれていた。そのような中で、GFP タグのついた RhoA (GFP-RhoA) を一過性に過剰発現させた COS-7 細胞を用いて、cAMP 増加刺激による GFP-RhoA のリン酸化を検出し、細胞でも RhoA はリン酸化を受けることを示した。
2. 細胞に内在する RhoA のリン酸化が検出できないのは、その量が少ないからではなく、リン酸化を受けにくい何らかの性質があるためであることが推論された。そして RhoA の翻訳後修飾であるゲラニルゲラニル基修飾 (prenylation) に注目し、RhoA の遺伝子を変異させて、またスタチンを投与して prenylation を抑制することで、cAMP-PKA 系による RhoA のリン酸化が増加することが見出された。この結果より、prenylation を受けていない RhoA (unprenylated-RhoA) は、prenylation を受けた prenylated-RhoA よりリン酸化されやすい性質を持つようになることが推定された。
3. unprenylated-RhoA と、prenylated-RhoA を分離する phase separation assay の手法を用い、unprenylated-RhoA が選択的にリン酸化されることが証明された。そして内在性の RhoA は、生理的状态ではそのほぼ全てがリン酸化を受けない prenylated-RhoA の形で存在していることが判明し、過去に複数の研究グループが「細胞では RhoA のリン酸化が検出できない」との結論に至った理由も明らかとなった。
4. リン酸化タンパク質吸着カラムを利用して、100%がリン酸化されているとみなせる GFP-RhoA の試料を精製し、それをコントロールとして用いることで、cAMP-PKA 系によりリン酸化を受ける GFP-RhoA の割合を算出した。unprenylated-RhoA ではその 5%がリン酸化を受けると求められたのに対し、prenylated-RhoA では 0.2% よりもはるかに少ないという結果で、prenylation の有無による RhoA のリン酸化の選択性が定量的にも証明された。

5. RhoA が活性型の GTP-form で存在しているか、不活性型の GDP-form で存在しているかは、cAMP-PKA 系による RhoA のリン酸化に影響を及ぼさないことが示された。

以上、本論文は COS-7 細胞を用いた実験により、RhoA はその prenylation を受けない形で存在するものが、cAMP-PKA 系により選択的にリン酸化されることを明らかにした。これまで注目度の低かった unprenylated-RhoA が細胞で果たし得る作用について、新たな可能性を提起した。また cAMP-PKA 系を刺激するヘテロ三量体 G タンパク質の G_s による RhoA の制御機構にも新たな一面が加わることとなった。そしてヒト白血球のリン酸化 RhoA を測定して、それをスタチンの pleiotropic effect を予測するサロゲートマーカーとして利用するという、臨床医学への応用の道も開いた。以上の業績は、学位を授与するに値するものと考えられる。