

申請者はすでにMBS結合蛋白質として細胞膜裏打ち蛋白質であるadducinを見出し、adducinがRho-キナーゼの基質であること、Rho-キナーゼによってリン酸化されたadducinはそのアクチンフィラメント結合活性が上昇することを見出している。また、adducinのリン酸化レベルがRho-キナーゼとMBSを介した二つの経路により制御されていることを明らかにしている。

本論文ではRho-キナーゼによるadducinのリン酸化の細胞内における生理機能を明らかにする目的で、1) adducinのRho-キナーゼによるリン酸化部位の同定、2) リン酸化状態を特異的に認識する抗リン酸化抗体の作成、3) 抗リン酸化抗体を用いたリン酸化adducinの細胞内局在の検討、4) リン酸化部位を変異させたadducin変異体の細胞内導入による解析をおこない、以下のような結果を得た。

(1) *in vitro*でRho-キナーゼがadducinのThr-445とThr-480をリン酸化することを明らかにした。

(2) adducinのThr-445のリン酸化状態を特異的に認識する抗リン酸化adducin抗体を作成した。この抗体は*in vitro*でRho-キナーゼによってリン酸化されたadducinのみを認識し、非リン酸化型のadducinやprotein kinase Cによってリン酸化されたadducinを認識しなかった。抗リン酸化adducin抗体を用いて、COS細胞に発現させたadducinのThr-445のリン酸化レベルがRhoとRho-キナーゼ依存性に上昇することを明らかにした。

(3) MDCK細胞のような上皮細胞においてhepatocyte growth factor (HGF)やホルボールエステル(TPA)はRhoの活性化を介して細胞膜の波打ち現象である細胞膜ラッフリングを誘導し、その結果、細胞運動を引き起こすことが知られている。Thr-445がリン酸化されたadducinの細胞内局在を抗リン酸化adducin抗体を用いて検討したところ、adducinがHGFやTPAによって誘導された細胞膜ラッフリング領域や運動（遊走）細胞のleading領域で特異的にリン酸化されていることを見出した。

(4) 細胞膜ラッフリングの形成にRhoの下流でRho-キナーゼが関与しているかを検討した。MDCK細胞にドミナントネガティブ型のRho-キナーゼをマイクロインジェクションするとRhoの機能を阻害するC3と同様に、HGFやTPAによる細胞膜ラッフリングが阻害された。さらに、Rho-キナーゼによるリン酸化部位をAlaおよびAspに置換したadducinの変異体を作成し、マイクロインジェクションした。Ala変異体はRho-キナーゼによってリン酸化を受けずドミナントネガティブ型adducinになりうると考えられる。また、Asp変異体は細胞内でRho-キナーゼによるadducinのリン酸化状態を模倣すると考えられる。Ala変異体はHGFやTPAによる細胞膜ラッフリングを阻害した。一方、Asp変異体はドミナントネガティブ型のRho-キナーゼによる細胞膜ラッフリングの阻害効果を抑制した。したがって、adducinのRho-キナーゼによるリン酸化は細胞膜ラッフリングの形成に必要であることが明らかになった。さらに細胞運動をモニターするアッセイ系としてWound healing assayを用いて、ドミナントネガティブ型のRho-キナーゼだけでなくadducinのAla変異体が細胞運動を阻害することを見出した。

以上の結果から、adducinはRho-キナーゼの生理的な基質であり、Rhoの下流におけるRho-キナーゼによるadducinのリン酸化が細胞膜ラッフリングや細胞運動に必要であることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 深田 優子

本論文は低分子量G蛋白質Rhoの標的蛋白質であるRho-キナーゼとMBSの生理機能を解析することにより、Rhoによる細胞膜ラフリングや細胞運動の作用機構を分子レベルで明らかにしたものである。本論文の主要な成果は以下に要約される。

(1) 申請者はすでに、MBSのアフィニティーカラムを用いてウシの脳膜画分からMBS結合蛋白質の同定を試み、細胞膜裏打ち構造であるアクチン-スペクトリン複合体に結合しスペクトリンのアクチンへの結合を促進する蛋白質であるadducinを見出していた。申請者はさらに、adducinがRho-キナーゼの基質であることを見出し、Rho-キナーゼによってリン酸化されたadducinはそのアクチンフィラメント結合活性が上昇することを見出していた。また、ミオシンライトチェーンと同様にadducinもそのリン酸化レベルがRho-キナーゼとMBSを介した二つの経路により制御されていることを明らかにしていた。

(2) 本論文では、Rho-キナーゼによるadducinのリン酸化の生理機能を詳しく調べるために、Rho-キナーゼによるadducinのリン酸化部位を同定し、adducinのRho-キナーゼによるリン酸化状態を特異的に認識する抗リン酸化抗体を作成した。抗リン酸化抗体を用いた解析により、細胞内において、adducinがRhoの下流でRho-キナーゼを介してリン酸化されることを見出した。

(3) さらに、抗リン酸化抗体を用いた細胞内局在の検討により、リン酸化adducinが細胞膜ラフリング部位や運動細胞のリーディングエッジに特異的に濃縮していることを明らかにした。

(4) リン酸化部位の変異体を用いた解析によりRhoの下流におけるadducinのリン酸化が細胞膜ラフリングや細胞運動に必要であることを明らかにした。

以上のように、本論文はRhoが細胞運動を制御するメカニズムの一端を明らかにしたものである。また、RhoはRho-キナーゼやMBSを介してミオシンライトチェーンだけでなく複数の基質のリン酸化レベルを調節することにより、さまざまな生理機能を制御するという可能性を示唆するものである。

よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。