

# 論文内容の要旨

申請者氏名 菅原 庸

三量体Gタンパク質は、細胞膜上においてGタンパク質共役型受容体が認識した細胞外からのシグナルを、細胞内のシグナルに変換する役割を果たしている。三量体Gタンパク質は $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の三つのサブユニットからなり、 $\alpha$ サブユニットはグアニンヌクレオチドとの結合能と、結合したGTPをGDPへと加水分解するGTPase活性を有している。 $\alpha$ サブユニットは一次構造とエフェクターの種類によりGs、Gi、Gq、G12/13の四つのサブタイプに大別される。これらのうちGqサブファミリーに属する分子は、エフェクターであるホスホリパーゼC $\beta$  (PLC $\beta$ ) を活性化し、イノシトール3リン酸とジアシルグリセロールという二つのセカンドメッセンジャーの産生を促し、細胞質内へのカルシウム動員とプロテインキナーゼCの活性化を引き起こす。しかしながら、Gqを介する細胞応答は、細胞増殖の促進と抑制、アポトーシス、アクチン骨格の再編成など多岐にわたり、これらの様々な細胞応答を引き起こすシグナル伝達についてPLC $\beta$ を介するもののみでは説明できず、未知のシグナル伝達システムの存在が示唆されている。この問題に取り組むために、申請者はGqの $\alpha$ サブユニット ( $G\alpha_q$ ) に結合する新たな候補分子として見出されたflotillinに注目しGqシグナルにおける、その機能解析を行った。

Flotillinは、コレステロールやスフィンゴ糖脂質、脂質修飾されたタンパク質などが集積する膜上のマイクロドメインである脂質ラフトに局在するタンパク質として知られる。また哺乳動物細胞においてはflotillin-1、-2の二つのホモログが存在している。しかしながら、flotillinの生理機能はほとんど明らかとなっていない。まず免疫沈降法や精製タンパク質を用いて結合実験を行ったところ、 $G\alpha_q$ との結合はflotillin-1、-2の両者について見られた。そしてこの相互作用は、 $G\alpha_q$ のグアニンヌクレオチドの結合状態に依存しなかったことから、既知のエフェクターやGTPase活性に対する調節因子とは異なる結合様式を持っていることが示唆された。シグナル伝達におけるflotillinの関与についてflotillinをRNAi法によりノックダウンし、Gq共役型受容体を介するMAPキナーゼ活性化に対する影響を調べた。その結果、 $G\alpha_q$ の下流で活性化されるERK、p38 MAPKの2種類のMAPキナーゼのうち、p38 MAPKの活性化のみがflotillin-2のノックダウンによって顕著に抑制された。一方、このp38 MAPKの活性化は、ラフトを破壊するコレステロール枯渇剤Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) や、Srcキナーゼの阻害剤PP2により抑制された。また $G\alpha_q$ 、Srcキナーゼ、flotillinが、ラフトにおいて共局在していることと、M $\beta$ CD処理により $G\alpha_q$ とSrcキナーゼがラフト画分より消失することをシヨ糖密度勾配遠心法を用いた生化学的解析により示した。以上の結果から、flotillin-2はラフトにおいて $G\alpha_q$ からSrcキナーゼの活性化にいたるシグナル伝達経路に介在し、その結果、p38 MAPKが選択的に活性化されることが示唆された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 菅 原 庸

近年、膜脂質や膜タンパク質は細胞膜上に均一に存在するのではなく、コレステロールやスフィンゴ糖脂質などが集積し、脂質ラフトと呼ばれる微小ドメインを形成していることが提唱されている。この微小ドメインにおいては細胞内小胞輸送、コレステロール輸送、免疫応答のシグナル伝達が起こり、様々な細胞機能を区画化する役割を担っていると考えられている。G タンパク質を介する細胞内シグナル系を構成する分子についても脂質ラフトに存在するものがいくつか報告されており、そのシグナル伝達における脂質ラフトの関与も示唆されている。しかしながら、脂質ラフトでのシグナル伝達の分子メカニズムについては未だ明らかとなっていない。申請者はラフトに存在する G タンパク質 Gq の  $\alpha$  サブユニット ( $G\alpha_q$ ) に結合するタンパク質として新規に同定されたラフトタンパク質 flotillin に着目し、脂質ラフトにおける Gq を介する細胞内シグナルの調節機構を解析した。

申請者は、まず免疫沈降法や精製タンパク質を用いた結合実験により  $G\alpha_q$  が flotillin と直接結合し、その結合は  $G\alpha_q$  の活性化状態に依存しないことを示した。このことから両者の結合は、既知のエフェクターや GTPase 活性に対する調節因子とは異なるものであることが示唆された。次に申請者は RNAi 法を用いた flotillin の発現抑制実験から、flotillin の 2 つのホモログのうち flotillin-2 が、Gq 共役型受容体を介して引き起こされる p38 MAPK の活性化シグナル系路に介在している可能性を見出した。一方で、同様に Gq 共役型受容体を介して活性化される MAP キナーゼである ERK の活性化に flotillin-2 が関与していないことを示し、flotillin-2 は Gq から p38 MAPK の活性化に至るシグナル伝達経路に選択的に働いていることを明らかにした。さらに p38 MAPK の活性化は脂質ラフトの破壊剤や Src キナーゼの阻害剤によって選択的に阻害されることを示し、脂質ラフトと Src キナーゼの関与を示唆した。また Src キナーゼ依存的にチロシンリン酸化されるいくつかのタンパク質について、flotillin-2 のノックダウンによって Gq 共役型受容体刺激依存的なチロシンリン酸化が抑制されることを明らかにし、flotillin-2 の Src キナーゼ活性化への関与を示唆した。以上の結果から、flotillin-2 が Gq から Src キナーゼ活性化にいたる経路において足場として働き、その結果 p38 MAPK の活性化を選択的に制御するというモデルを示した。

以上のように、本論文は G タンパク質シグナルにおいて、脂質ラフトが Src キナーゼを介するシグナル伝達経路に特異的に介在していることを明らかにし、さらにその経路への flotillin という具体的な分子の関与を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。