

# 論文内容の要旨

申請者氏名 西村 明 幸

三量体Gタンパク質（Gタンパク質）は、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）を介した細胞外からの情報を細胞内シグナル伝達因子に伝えるトランスデューサーとして機能している。Gタンパク質は $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3つのサブユニットからなり、その $\alpha$ サブユニット（ $G\alpha$ ）にグアニンヌクレオチド結合部位があり、GDP結合型とGTP結合型との間でコンホメーションを変化させることによってGタンパク質の活性を調節している。この $G\alpha$ の活性化不活性化サイクルは三種類の調節分子、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）、GTPase活性化因子（GAP）、GDP解離阻害因子（GDI）により制御されている。申請者は、細胞内カルシウム応答を引き起こすGタンパク質 $G_q$ の $\alpha$ サブユニット（ $G\alpha_q$ ）に対する新しい活性調節因子Ric-8AとYM-254890が、どのようにGタンパク質シグナルを制御するか、そのメカニズムを解明するための研究を行なった。

Ric-8Aは、*in vitro*においてGPCRと同様に $G\alpha$ に対するGEF活性を示す新しいタイプの非受容体型Gタンパク質活性調節因子である。しかし、細胞内において実際Ric-8AがGタンパク質シグナルにどのように関わっているか詳細は不明であった。まずRic-8Aが哺乳動物細胞内において $G_q$ シグナル経路の制御に関与しているのかを検討した。293T細胞の内在性Ric-8AをsiRNAにより発現抑制すると、 $G_q$ 共役型受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇とERK活性化を指標とした細胞応答が抑制された。次にRic-8Aの局在を調べたところ、通常は細胞質に均一に存在しており、それが $G_q$ 共役受容体の活性化に伴って一部が細胞膜に移行することを見出した。Ric-8Aが膜移行することで $G_q$ シグナルの調節因子として機能することが示唆されたことから、Ric-8Aに膜移行シグナルを付加し細胞膜に局在させたところ、 $G_q$ シグナルの促進が観察された。以上の結果から、Ric-8Aは哺乳動物細胞内においてGPCRを介した $G_q$ シグナルを細胞膜においてポジティブに制御していることが明らかとなった。

YM-254890は血小板の凝集を阻害する化合物として、土壌細菌QS3666株の培養液から単離された新規環状デプシペプチドである。YM-254890はこれまでに $G_q$ 共役型受容体を介したシグナル伝達経路を特異的に阻害することが明らかとなっていたが、その詳細な作用機構については不明であった。申請者は、YM-254890の $G_q$ シグナル阻害機構について解析を行い、YM-254890が $G\alpha_q$ からのGDP解離を抑制することによりGDP/GTP交換反応を阻害することを明らかにした。さらに $G\alpha_{q16}$ キメラと $G\alpha_q$ 点変異体を用いた解析から、 $G\alpha_q$ のスイッチI領域部分、特に190番目のIleと192番目のTyr<sup>192</sup>がYM-254890の阻害作用に重要であることを見出した。そして、これらの変異体を用いた解析を基にしたYM-254890と $G\alpha_q$ のドッキングシミュレーションから両者の結合予想モデルを提唱した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 西村明幸

G タンパク質を介するシグナル伝達は、神経系、心臓血管系や免疫系を含むさまざまな組織・細胞の機能に関与している。このシグナル経路の制御において中心的役割を担うのが、G タンパク質共役型受容体から細胞内エフェクターに情報を伝達する G タンパク質である。G タンパク質シグナルの研究は他のシグナル伝達系の研究に比べると先行して進んでいるが、未だ G タンパク質の活性化、不活性化の詳細な分子機構の解明は大きな課題として残っている。申請者は G タンパク質の活性を調節する新たな制御分子 Ric-8A と YM-254890 についてその機能解析を行い、新しい活性制御機構を明らかにした。

まず申請者は、Ric-8A が N 末側の 301 アミノ酸部分で細胞内カルシウム上昇を引き起こす G タンパク質 G<sub>q</sub> の  $\alpha$  サブユニット (G $\alpha_q$ ) と相互作用することを明らかにした。そして Ric-8A が G<sub>q</sub> 共役型受容体を介したシグナルの活性制御に関与することを Ric-8A の siRNA と過剰発現を用いて明らかにした。さらに Ric-8A は G<sub>q</sub> 共役型受容体の活性化に伴い膜移行し、細胞膜において G<sub>q</sub> シグナルの活性を促進していることを見出した。以上のことから、非受容体型 G タンパク質活性化因子 Ric-8A は G<sub>q</sub> 共役型受容体の下流で機能し、G<sub>q</sub> シグナルをポジティブに制御していることが初めて明らかとなった。

次に申請者は、土壌細菌から単離された環状デプシペプチド YM-254890 が G<sub>q</sub> シグナル経路を阻害する機構について解析を行った。まず YM-254890 が G $\alpha_q$  からの GDP 解離を直接阻害していることを明らかにした。一方、活性型の G $\alpha_q$  に対して YM-254890 は GTP との親和性を低下させることを見出した。さらに G $\alpha_{q16}$  キメラと G $\alpha_q$  点変異体を用いた解析から、YM-254890 が作用するのに必須の G $\alpha$  の構造領域がスイッチ I 領域であることを明らかにした。また、コンピュータシミュレーションから得られた 2 種類の G $\alpha_q$ -YM-254890 結合予想モデルの妥当性について実験的手法を用いて評価するとともに、モデルから示唆される YM-254890 の GDP 解離阻害機構について考察を行った。YM-254890 は G タンパク質のヌクレオチド交換反応を直接阻害する初めての化合物であり、その分子機構を初めて明らかにした本論文は、G タンパク質を標的とした新たな阻害剤開発などに大きく貢献していくものと思われる。

以上のように、本論文は G タンパク質の活性制御機構について新たな知見を示すものであり、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。