

論文内容の要旨

申請者氏名 鯉森 貴行

ヘテロ三量体グアニヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質) は、G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) を介した細胞外からのシグナルを細胞内へと伝達する分子スイッチとして機能する。最近、当研究室ではGタンパク質 α サブユニットの一つである Gas がユビキチン化による分解制御を受けることを報告した。また、線虫の遺伝学的解析から同定された Ric-8 の哺乳動物オルソログである Ric-8B が、Gas のユビキチン化を抑制することも見出した。しかし Gas のユビキチン化を制御する分子機構の詳細は不明である。そこで、本研究では Gas のユビキチン化を制御する分子機構を解明することを目的とした。

当研究室の先行研究において 225 種類の Ring-finger E3 リガーゼと Gas との分子間相互作用解析が行われ、Gas と相互作用する幾つかの E3 リガーゼ候補を得ていた。この研究結果を受けて、HEK293T 細胞へ siRNA を導入した際の Gas 発現量を調べ、MKRN1 および RNF125 の発現抑制が、Gas 発現量を上昇させることを見出した。次に免疫共沈降実験により MKRN1 および RNF125 と Gas との相互作用を検討した結果、Gas は MKRN1 および RNF125 と共沈降した。続いて、これら 2 つの候補分子が Gas のユビキチン化に与える影響を調べた結果、RNF125 が Gas のユビキチン化を促進することが判明した。また、E3 リガーゼ活性欠失変異体 RNF125 CA は野生型と同様に Gas と相互作用する一方、ユビキチン化は促進しなかった。次に RNF125 発現抑制細胞における Gas 発現量の上昇がタンパク質分解の減少によるものかを調べるために、cycloheximide (CHX) を用いた Chase 実験を行った。コントロール細胞と比較して、RNF125 発現抑制細胞では Gas タンパク質の減少の低下が認められた。次に RNF125 が Gas を直接ユビキチン化するかを検討するために、精製タンパク質を用いた *in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、RNF125 添加により Gas のユビキチン化バンドシフトを観察した一方で、RNF125 CA ではバンドシフトが認められなかった。また RNF125 が Gs シグナルに及ぼす効果を検討するため、Gas と共役するセロトニン受容体 5HT6 を用いて、CRE レポーターアッセイを行った。その結果、5HT6 と RNF125 を共発現させた細胞は、CRE 介在転写活性化が減弱していた。また、RNF125 を発現抑制した PC-3 細胞において、Gas と共役する β アドレナリン受容体のアゴニストである Isoproterenol 刺激による cAMP 産生量が有意に増加した。続いて HEK293T 細胞を用いた免疫沈降実験により RNF125 と Gas の結合に Ric-8B が影響を与えるか検討した。その結果、Ric-8B の発現は、RNF125 と Gas の共沈降を著しく減少させた。以上から、RNF125 は、Gas に対して E3 リガーゼ活性を示すことで Gas の分解に寄与し、リガンド刺激による Gs シグナルを負に制御する分子であることが示された。また、Ric-8B は、RNF125 と Gas の相互作用を阻害することでユビキチン化を抑制し、Gas を安定化していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 鯉森 貴行

ヘテロ三量体グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質)の一つであるGsは、アデニル酸シクラーゼを活性化し細胞内 cAMP を増加させるシグナルにおいて働く。近年、Gs の α サブユニット (Gas) がユビキチン化により分解制御を受けることや、心肥大モデル心筋細胞において Gas のユビキチン化の亢進と Gas の発現量の減少、さらに β アドレナリン受容体による cAMP 産生の減少が報告されている。これらのことから、Gタンパク質共役受容体による質的なGタンパク質活性制御とは別に Gas の分解による新たな量的な Gs シグナル調節機構の存在が示唆されてきた。しかしながら、Gas のユビキチン化制御機構の詳細は、現在までに殆ど解明されていない。

申請者は、先行研究における 225 種類の Ring-finger E3 リガーゼと Gas の分子間相互作用解析結果を基にして、E3 リガーゼを発現抑制した時の Gas 発現量が上昇する E3 リガーゼの探索を試みた。その結果、MKRN1 あるいは RNF125 の発現抑制により、Gas 発現量の上昇を観察した。これら 2 つの候補分子が Gas のユビキチン化に関与しているかを詳細に検討するために、先ず HEK293T 細胞を用いた免疫沈降実験により Gas との相互作用を検討した。その結果、Gas は MKRN1 および RNF125 と相互作用することが確認された。続いて *in vivo* ユビキチン化アッセイにより、これら 2 つの候補分子が Gas のユビキチン化に与える影響を調べたところ、RNF125 が Gas のユビキチン化を促進することが観察された。また、E3 リガーゼ活性欠失変異体 RNF125 CA は野生型と同様に Gas と相互作用するが、Gas のユビキチン化を亢進させなかった。次に *in vitro* ユビキチン化アッセイにより、RNF125 が Gas を直接ユビキチン化する E3 リガーゼであるかを検討したところ、試験管内においても RNF125 は Gas のユビキチン化を促進した。続いて、RNF125 が Gs シグナルに及ぼす効果を検討したところ、RNF125 の過剰発現は Gs シグナルを減弱させ、RNF125 の発現抑制では Gas と共役する β -アドレナリン受容体のアゴニストである Isoproterenol 刺激による cAMP 産生量が増加した。また Ric-8B は Gas と直接相互作用することが既に報告されており、また Ric-8B と結合することで Gas のユビキチン化を阻害することも当研究室によって見出されている。そこで、細胞内で RNF125 と Gas の結合に対して Ric-8B が競合するか検討を行ったところ、Ric-8B が RNF125 と Gas の結合を阻害することが明らかとなった。

以上のように、本論文は細胞内でのユビキチン化による Gas の量的な制御機構を担う酵素分子を明らかにした。心機能をはじめとして多くの生体調節系において Gs を介する cAMP シグナルは重要な働きをしており、Gas 分解の制御機構を分子レベルで明らかにしたことは、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。