

論文内容の要旨

申請者氏名 堀部 修平

ヘテロ三量体 GTP 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 (GPCR)と共役し、細胞外の情報を細胞内へ伝達する分子スイッチとして機能する。一方、GPCR 非依存的な G タンパク質活性化因子として Ric-8 が同定され、G タンパク質の新たな活性制御機構が提唱されている。Ric-8 は G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) の GDP-GTP 交換因子として $G\alpha$ を活性化すること、シャペロン活性、ユビキチン化阻害活性により $G\alpha$ の安定化に寄与することが報告されている。哺乳動物には Ric-8A と Ric-8B の二つのホモログが存在し異なる $G\alpha$ を標的とするが、哺乳動物において Ric-8 がどのような生命現象に関与するかについては不明な点が多い。中心体は微小管形成中心 (Microtubule Organizing Center: MTOC) として働き細胞分裂期に紡錘体の起点となる細胞小器官である。これまで G タンパク質が中心体形成に関与する報告は無く、本研究にて Ric-8A が G タンパク質シグナルを介して中心体形成を制御することを見出した。

まず Ric-8A 発現抑制時の中心体およびその中の構造体である中心小体のタンパク質の発現と局在を免疫染色法で評価した。その結果、Ric-8A のノックダウンにより中心小体タンパク質 (CP110、Centrin、Talp1) 及び中心体タンパク質 (γ -tubulin) の数が増加する一方、他の中心小体タンパク質 (C-Nap1、SAS-6) の数は増加しなかった。CRISPR/Cas9 を用いて作成した Ric-8A ノックアウト (KO) 細胞でも同様の変化が確認された。これらの結果から、Ric-8A の発現抑制は中心小体に類似した構造体 (以下、中心小体様構造体: Centriole-Like Structure (CLS)) の形成を引き起こすことが示唆された。次に Ric-8A の標的 G タンパク質である $G\alpha_i$ に着目した。 $G\alpha_i$ はアデニル酸シクラーゼを抑制し cAMP 量の低下を引き起こし、PKA (Protein kinase A) の活性を低下させる。 $G\alpha_i$ 特異的阻害剤である百日咳毒素で細胞を処理したところ CLS 形成が観察され、PKA 阻害剤処理によりその CLS 形成がキャンセルされた。これらの結果から Ric-8A \rightarrow $G\alpha_i$ \rightarrow PKA というシグナル経路が中心体形成に関与することが示唆された。次に CLS 形成の要因として中心体へのタンパク質輸送を担う Centriolar satellites (CS) に着目した。Ric-8A KO 細胞にて CS タンパク質 PCM-1 の局在を検討した結果、PCM-1 の異常凝集及びその凝集に中心小体タンパク質 Centrin が共局在していることが確認された。次に CLS が MTOC 活性を有するかを検討した。Ric-8A KO 細胞の微小管ネットワークを低温処理で破壊後、CLS を基点に微小管の再形成が起きることを確認した。さらに、紡錘体形成を観察した結果、Ric-8A KO により異形紡錘体である pseudo bipolar 紡錘体や多極性紡錘体の形成が増加することが分かった。これらの結果から、中心体形成に G タンパク質および Ric-8A が関与していること、並びに Ric-8A は MTOC 形成制御を介して正常な細胞分裂の維持に重要な役割を担うことが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 堀部 修平

Ric-8 が G タンパク質共役受容体と同様に G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) の GDP-GTP 交換因子として $G\alpha$ を活性化すること、さらにそれとは別にシャペロン活性、ユビキチン化阻害活性により $G\alpha$ の安定化に寄与することなど生化学的な解析は進んでいる。しかし、哺乳動物における Ric-8 が制御する細胞機能に関してはほとんど明らかにされていない。哺乳動物の Ric-8 タンパク質が制御する細胞機能を解明する研究は、G タンパク質の新たな活性制御機構の生理的意義の解明へとつながる。

申請者は哺乳動物に存在する 2 つの Ric-8 (Ric-8A, Ric-8B) のうち Ric-8A が G タンパク質シグナルを介して細胞小器官である中心体の形成に関与することを見出した。中心体は、微小管形成中心 (Microtubule Organizing Center: MTOC) として働き細胞分裂期に紡錘体形成の起点となる。これまで G タンパク質が中心体形成に関与する報告は無い。免疫染色法により、Ric-8A の発現抑制はいくつかの中心体タンパク質を欠損した中心小体に類似する構造体 (中心小体様構造体: Centriole-Like Structure (CLS)) の形成を引き起こすことを見出した。次に Ric-8A の標的 G タンパク質である $G\alpha_i$ の特異的阻害剤である百日咳毒素処理による CLS が観察され、同時に PKA 阻害剤を処理することで CLS 形成がキャンセルされたことから、Ric-8A \rightarrow $G\alpha_i$ \rightarrow PKA というシグナル経路が中心体形成に関与することが示唆された。さらに、Ric-8A ノックアウト細胞にて中心体へのタンパク質輸送を担う Centriolar satellites (CS) の局在を検討した結果、CS の異常凝集が観察され、 γ -tubulin の有無を指標とした 2 種類の CLS が形成されていることが示された。このことから、Ric-8A は中心体に向けたタンパク質輸送を制御する可能性が示唆された。さらに CLS が MTOC 活性を有するか検討したところ、間期にて CLS を基点に微小管の再形成が観察され、分裂期にて異形紡錘体である pseudo bipolar 紡錘体や多極性紡錘体の形成が増加することが分かった。これらの結果から、中心体形成に G タンパク質及び Ric-8A が関与していること、並びに Ric-8A は MTOC 形成制御を介して正常な細胞分裂の維持に重要な役割を担うことが明らかとなった。

これまでに、Ric-8A が制御する細胞機能の報告例は殆どなく、本研究から申請者が見出した「Ric-8A による中心体形成制御機構」は G タンパク質が制御する新たな細胞機能を詳細に明らかにするための重要な知見である。また、中心体の数の異常は細胞分裂異常によりゲノム不安定性が誘導されることで癌の悪性化を起こすことが知られている。このことから、本研究成果は癌治療における新たなターゲットとして Ric-8A および G タンパク質シグナル分子が有用である可能性を示した。

以上のように、本論文は G タンパク質シグナルが制御する細胞機能の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。