

氏名	ふじ 藤	さわ 澤	かず 和	こ 子
学位(専攻分野)	博士(医学)			
学位記番号	医博第1884号			
学位授与の日付	平成9年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻			
学位論文題目	Identification of the Rho-binding Domain of p160ROCK, a Rho-associated Coiled-coil Containing Protein Kinase (Rhoの標的分子である p160 ^{ROCK} の Rho 結合領域の同定)			
論文調査委員	(主査) 教授 月田承一郎 教授 眞崎知生 教授 成宮 周			

論文内容の要旨

低分子量 G 蛋白質 Rho は培養細胞における細胞接着斑やストレス線維の形成, 細胞質分裂, 平滑筋の収縮, 転写因子の調節など多岐にわたる機能を持つことが報告されている。これまで, Yeast two hybrid 法と ligand overlay 法を用いて, 5 種類の標的分子, すなわち Rho-associated coiled-coil containing protein kinase(ROCK), PKN, rhophilin, rhotekin, citron を同定した。これより Rho 蛋白質には複数の標的分子が存在することが明らかとなった。これら標的分子と Rho 蛋白質の相互作用の機序として以下の二つが考えられる。一つは, 異なる細胞, もしくは細胞周期の異なった時期に別々の Rho 標的分子が発現され, 各々が Rho 蛋白質の異なる機能を伝達するというものである。二つ目は, Rho 蛋白質の異なる部位に各々の標的分子が結合し, 一つの複合体を形成し, 相互に協調しながら細胞内で作用を発揮するというものである。

そこで, ligand overlay 法によりクローニングされた ROCK について Rho 結合領域の同定を行った。ROCK は N 末にキナーゼ領域, 続いて α -helix, C 末にプレクストリン相同領域を有する。これらの各ドメインごとに大腸菌を用いてリコンビナント蛋白質を発現させ, ligand overlay を行った結果, α -helix の後半部分に Rho 結合活性があることを見出した。そこでこの領域を更に細分化し, 各々についてリコンビナント蛋白質を作製, これらの Rho 結合活性を ligand overlay 法と two hybrid 法により検討した。その結果, Rho 結合領域がアミノ酸残基934-1015にあることを見出した。ついで, この領域に15の点突然変異を導入して変異体を作製, Rho 蛋白質との結合に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。これより, K934M, L941A, E1008A 変異体では Rho 結合活性が減弱し, 特に I1009A 変異体では活性が消失することを見出した。

以上より, ROCK の Rho 結合領域はアミノ酸残基934-1015にあり, coiled-coil 構造とプレクストリン相同領域の間に位置することが明らかとなった。またアミノ酸残基934番目のリジン, 941のロイシン, 1008のグルタミン酸, 特に1009のイソロイシンがこの結合に重要であることが明らかになった。ROCK

は細胞刺激に伴い、Rho 依存性に細胞膜、細胞骨格にターゲットされると考えられているが、上記の Rho 結合領域の位置は、本分子のプレクストリン相同領域が Rho の結合により開かれ、膜のリン脂質や膜蛋白と相互作用する可能性を示唆するものである。また、他の Rho 標的分子、rhopilin, rhotekin, PKN の Rho 結合領域はどれも N 末の調節領域に位置し互いに相同性が高いが、ROCK のそれとは有意な相同性を示さなかった。また citron の Rho 結合領域も高い相同性を示さなかった。このことから、ROCK の Rho 結合領域は、これまで報告されている他の標的分子のそれとは異なる新規のモチーフであり、Rho 標的分子が Rho 蛋白質との結合領域の相同性に基づいて複数に分類できることが示された。

論文審査の結果の要旨

低分子量 G 蛋白質 Rho は培養細胞における細胞接着斑やストレス線維の形成、細胞質分裂など多様な機能を調節することが知られている。我々は Rho 標的分子を複数同定した。これらの分子のうち、Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) の Rho 結合領域を明らかにするために、本分子の truncation 変異体と点突然変異体を作製し、これらに対する Rho の結合をリガンドオーバーレイ法とツーハイブリッド法を用いて検討した。その結果、ROCK の Rho 結合領域がキルドコイル領域と PH 領域の中間、アミノ酸残基934-1015にあり、934, 941, 1008と1009番目のアミノ酸残基がこの結合に重要であることを明らかにした。また、他の Rho 標的分子 rhophilin, rhotekin, PKN の Rho 結合領域とは有意な相同性を示さなかった。このことから、Rho の標的分子が Rho 結合領域の相同性に基づいて複数に分類できることが示された。

以上の研究は、Rho を介する情報伝達機構の解明に貢献し、これに対する薬物制御の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年2月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。