

氏 名	いし ざき とし まさ 石 崎 敏 理
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1888 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 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase に関する研究 (myotonic dystrophy kinase に相同性を有し、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho に結合、活性化される 160kDa セリン/スレオニンキナーゼ)
論文調査委員	(主 査) 教 授 月田承一郎 教 授 永田和宏 教 授 中西重忠 教 授 成宮 周

論 文 内 容 の 要 旨

Rho は Ras 類似型低分子量 GTP 結合蛋白質の一群に属し, Rac および Cdc42 と共に Rho サブファミリーを構成する。Rho サブファミリーはアクト-ミオシン系の制御を通じ細胞運動, 細胞接着, 細胞質分裂, 並びに転写の調節を行い, ガン細胞の浸潤, 転移への関与も示唆されている。無血清培地にて処置した培養細胞を血清成分であるリゾフォスファチジン酸 (LPA) で刺激すると, ストレス線維の亢進および細胞接着斑の増加とともに細胞内チロシンリン酸化レベルの亢進, セリン/スレオニンキナーゼの活性化が認められる。これらは, Rho を非活性化するボツリヌス菌菌体外酵素 C3 により阻害される。これらの結果から, 細胞外刺激による細胞接着には細胞内で Rho が分子スイッチとして機能し, この作用発現の少なくとも一部にキナーゼカスケードが存在することが考えられる。しかし, この分子機構については全く不明であった。そこで本研究は Rho の細胞内情報伝達機構を明らかにするため, Rho が直接働く標的蛋白質の同定を試みた。

Rho は, GDP 型 (不活性型) から GTP 型 (活性化型) への変換により下流の分子に情報を伝達する。従って, 標的分子は活性化型である GTP 結合型 Rho に選択的に結合すると考えられる。そこで, GTP の非水解アナログである GTP γ S により標識した Rho をプローブに用い, ヒト血小板ホモジェネートについて ligand overlay blotting により結合蛋白質の同定を試みた。その結果, SDS-PAGE 上での分子量約 160kDa 付近に活性型 Rho と選択的に結合する蛋白質を得た。(以下 p160 と称する) そこで, ヒト血小板より p160 を精製し, Rho サブファミリー内での結合特異性を検討したところ, 活性化型 Rho に強く結合し, Rac, Cdc42 との結合は認められなかった。また, [γ -32P]ATP と混和することにより, p160 に自己リン酸化を認めた。このリン酸化は phosphoamino analysis により, セリン, スレオニンリン酸化

であると同定された。また精製 p160 にヒストンを基質とするリン酸化酵素活性を認めた。さらに、活性型 Rho により、p160 のリン酸化活性の上昇を確認した。以上の結果から、p160 はセリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素であることが示唆された。

次に、精製 p160 の部分アミノ酸配列を得、これをもとに、MEG-01S 細胞 cDNA ライブラリーから p160 cDNA を単離した。p160 は新規の蛋白質であり、N 端にキナーゼ触媒領域、中央に coiled-coil 形成領域、C 端には pleckstrin homology (PH) とシステインに富んだ領域を有した。これら特徴から、p160 を Rho-associated coiled-coil containing protein kinase, p160ROCK と命名した。次いで P160ROCK cDNA を発現させ、Rho との結合、その結合によるキナーゼの活性化を *in vivo* で検討した。COS-7 細胞に Rho と p160ROCK を共発現させ、p160ROCK を免疫沈降したところ、その沈降物中に Rho が認められ、その際キナーゼ活性は発現ベクターにみのものと比して、有意な上昇が認められた。これらの結果は、*in vitro* で確認された結果と一致するものである。

p160ROCK のキナーゼ触媒領域には筋硬直性ジストロフィーの原因遺伝子、myotonic dystrophy protein kinase (MD-PK) と高い相合性が認められた。MD-PK は骨格筋、平滑筋、心筋において筋線維が細胞膜に結合する部位に集積することが知られており、その部位において機能することが予想される。これらの構造は培養細胞での細胞接着斑と極めて類似した構造である。これらのこと、および細胞接着斑の形成には Rho が不可欠であることから、p160ROCK は Rho による細胞接着斑の形成に極めて重要な分子であると考えられた。以上、本研究は、Rho による細胞運動、細胞接着、細胞質分裂の分子機序に解明に大きな寄与を果たしたものである。

論文審査の結果の要旨

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho はアクターミオシン系を通じ細胞運動、細胞接着、細胞質分裂の制御を行い、ガン細胞の浸潤、転移への関与も示唆されている。しかし、これらの分子機構については全く不明であった。本研究はこの点を明らかにするため、Rho が直接働く標的蛋白質の同定を行ったものである。

ヒト血小板ホモジェネートを用い、活性型 Rho をリガンドに overlay 法を試みた。その結果、活性型 Rho と選択的に結合する約 160kDa の蛋白質（以下 p160 と称する）を同定した。そこで数種のカラムクロマトグラフィーを用い p160 を精製、精製蛋白から部分アミノ酸配列を得て、これをもとに、MEG-01S 細胞 cDNA ライブラリーから p160cDNA を単離した。p160 は新規のセリンスレオニキナーゼであり、キナーゼ触媒領域の他に、coiled-coil 形成領域、C 端には pleckstrin homology とシステインに富んだ領域を有していた。これらの特徴から、これを ROCK (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase) と命名した。ROCK のリン酸化酵素活性は *in vitro* の活性化型 Rho 添加で約 2 倍上昇し、COS-7 細胞での発現実験で Rho との複合体形成と *in vivo* での活性化を認めた。これらの結果から p160ROCK は細胞内でも活性化型 Rho と結合し、活性化される蛋白質リン酸化酵素であることが判明した。

以上の研究は、Roh 分子機序の解明に貢献し、細胞生物学の発展に寄与することが多い。

従って、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。