

氏 名	まつ い たけし 松 井 毅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2204 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 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	Activation of ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins by the small GTP binding protein Rho (低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho による ERM 蛋白質の活性化機構)

論文調査委員 (主 査)
教 授 成 宮 周 教 授 西 川 伸 一 教 授 月 田 承 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

ERM (ezrin/radixin/moesin) 蛋白質は、N 末半分と C 末半分で細胞膜貫通蛋白質とアクチン線維に各々直接結合することにより、細胞膜とアクチン線維との間のクロスリンカーとして機能する。ERM 蛋白質にはクロスリンカーとして不活性型である closed form と、活性型である open form が存在する。この不活性型から活性型への変換は低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho により制御されることが示されてきた。そこで Rho の下流でこの ERM 蛋白質がどのように制御されるのかを明らかにすることにより、細胞膜とアクチン線維との間がどのような細胞内情報伝達経路で制御されるのかを解析した。

ERM 蛋白質は様々な部位がリン酸化されることによりその機能が制御されることが報告されている。そこでまず、Rho の標的蛋白質の一つであるセリン・スレオニンキナーゼ、Rho-kinase により ERM 蛋白質が直接リン酸化されるかどうかを検討した。その結果、活性型の Rho-kinase は ERM 蛋白質の C 末スレオニンを *in vitro* でリン酸化することが明らかとなった。全長の ERM 蛋白質は Rho-kinase によりリン酸化されなかったこと、C 末スレオニンがリン酸化された ERM 蛋白質 (CPERM) は N 末と C 末との相互作用が抑制されていたこと等により、このリン酸化は活性化型 ERM タンパク質の維持に働いていると考えられた。

次に生体内でのこのリン酸化の役割を解析する為に、CPERM 特異的モノクローナル抗体 297 S を作成した。無血清下で培養した Swiss 3 T 3 細胞を Rho を活性化する lysophosphatidic acid (LPA) で刺激し、297 S でイムノブロットしたところ、細胞内 CPERM 量が増加していた。この増加は Rho の特異的阻害剤である C3 毒素によって抑制された。また NIH 3 T 3 細胞に活性型変異体である V 12 Cdc 42, V 12 Rac 1, V 14 RhoA を過剰発現させ、297 S による蛍光抗体法を行ったところ、V 14 RhoA を発現した細胞のみで CPERM が濃縮した微絨毛の形成が観察された。これらの結果から、CPERM の産生は Rho family の中でも Rho の下流で特異的に起こる現象であることが明らかとなった。V 14 RhoA の導入で観察された現象は、Rho-kinase を含む ROCK kinases の特異的阻害剤である Y-27632 存在下では抑制されなかったことから、*in vivo* では ROCK kinases は CPERM の産生には関与しないことが示唆された。ところが、Rho の別の標的蛋白質である phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) 産生酵素、phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PI 4 P 5 K) を NIH 3 T 3 細胞に過剰発現させたところ、CPERM が濃縮した微絨毛が形成された。PIP₂ を産生しない PI 4 P 5 K の kinase-inactive 変異体ではこのような現象は観察されなかった。

以上の結果から本研究によって、ERM 蛋白質の C 末スレオニンのリン酸化を伴う活性化が実際に *in vivo* において Rho の下流に存在することが明確になった *in vitro* の実験から ERM 蛋白質は PIP₂ により活性化されることが示されていたことを考え合わせると、Rho の下流で ERM 蛋白質が、(1) PI 4 P 5 K によって産生される PIP₂ により活性化され、(2) 活性型の ERM 蛋白質の C 末スレオニンが Rho-kinase 以外の kinase によりリン酸化されることにより更に活性型で安定化し、(3) その結果、ERM 蛋白質は細胞膜とアクチン線維との間のクロスリンカーとして働き、微絨毛が形成され、細胞接

着や細胞質分裂に重要な役割を果たすと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ERM (エズリン / ラディキシン / モエシン) 蛋白質は、細胞膜・アクチン線維間の架橋蛋白質である。ERM の活性化は低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho により制御されることが示されてきた。ERM の C 末スレオニン Rho の標的蛋白質の一つである Rho-kinase によりリン酸化された。そこで更にこのリン酸化を解析するため、リン酸化型 ERM (CPERM) 特異的抗体を作製した。この抗体を用いて CPERM の産生は Rho family の中でも Rho 特異的現象であることを示した。しかし、Rho-kinase を含む ROCK kinases の特異的阻害剤の Y-27632 を用いた解析により *in vivo* では ROCK kinases は CPERM の産生には関与しないことが示された。次に、Rho の別の標的蛋白質である phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) 産生酵素, phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase を細胞に発現させると CPERM が産生された。これらの結果により、ERM のリン酸化を伴う活性化が実際に *in vivo* において Rho の下流で PIP₂ の産生を介して起こっていることが明らかとなった。その結果、ERM は細胞膜・アクチン線維間の架橋蛋白質として働き、細胞接着や細胞質分裂に重要な役割を果たすと考えられる。

以上の研究は細胞膜・アクチン線維相互作用の制御機構の解明に貢献し、細胞の極性形成、細胞接着の分子機構の解明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 12 年 1 月 26 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。