

氏 名	つじ たか ひろ 辻 隆 宏
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2583 号
学位授与の日付	平 成 15 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 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts (Swiss 3T3 繊維芽細胞における Rho 依存性 Rac 活性化において ROCK と mDia1 は拮抗的に作用する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 井 手 千 東 教 授 成 宮 周

論 文 内 容 の 要 旨

低分子量 G 蛋白質 Rho はアクチン細胞骨格の再編成を介して、細胞周期進行、収縮環の形成、細胞移動、神経突起の伸展、退縮など様々な細胞反応を制御する。この多様な細胞反応は、活性化型 Rho に結合する複数の下流分子を介して起こる。例えば、培養繊維芽細胞で、Rho が活性化されると、アクチンストレスファイバーと接着斑が誘導されるが、整然と並んだストレスファイバーと成熟した接着斑は、Rho の下流分子のうち ROCK と mDia が協調した働きにより誘導されることが知られている。しかしながら、ROCK と mDia のそれぞれがどのように働くかについては不明な点が多い。

血清飢餓 Swiss 3T3 繊維芽細胞を血清成分の一つの LPA で刺激すると、Rho が活性化され、アクチンストレスファイバーと接着斑が誘導される。この誘導における Rho-ROCK 経路と ROCK 非依存性 Rho 経路の役割を明らかにするため、Rho を直接阻害する C3 酵素と ROCK 阻害薬の Y-27632 の効果を比較検討した。C3 酵素処理により細胞は円形化を来たし、上記 LPA 反応は完全に抑制された。一方、Y-27632 処理細胞では、LPA 刺激により細胞体の伸展とともに、Rac が活性化したときと同様の点状の接着斑と膜ラフリングの誘導が見られた。実際に、この形態変化は Rac の抑制体の発現によって消失した。この結果と一致して、Y-27632 処理細胞では LPA 刺激により GTP 結合型の活性化 Rac 量の有意な上昇が見られたが、C3 処理細胞では Rac の上昇は見られなかった。この結果、Rho から Rac を活性化するシグナル伝達経路が存在すること、この経路は ROCK が活性化しているときには抑制されていることが明らかとなった。

次にこのシグナル伝達機構を生化学的に解析するため、これら実験条件下での接着斑構成蛋白質のチロシンリン酸化を比較した。C3 酵素処理は、LPA 刺激によるパキシリン、FAK 及び Cas のチロシンリン酸化をすべて抑制した。これに対し Y-27632 処理はパキシリンと FAK のチロシンリン酸化は抑制したが、Cas のチロシンリン酸化には無効果であった。すなわち、LPA により誘導されるチロシンリン酸化の内、パキシリンと FAK のチロシンリン酸化は Rho-ROCK 依存的に起こるが、Cas のチロシンリン酸化は Rho 依存的、ROCK 非依存的に起こることが明らかになった。

次に Cas のチロシンリン酸化と ROCK 阻害時に認められる Rac の活性化の関係について解析した。Cas は Src kinase によりチロシンリン酸化され、アダプター分子 CrkII、Rac 活性化因子 DOCK180 と複合体を形成し、Rac を活性化することが知られている。Cas のチロシンリン酸化を Src kinase 阻害薬 PP1 により阻害すると Y-27632 処理細胞での Rac 活性化、膜ラフリング・接着点の形成は抑制された。Cas の抑制体を導入しても同様の阻害が認められた。さらに、リン酸化型 Cas や DOCK180 と結合しない CrkII の変異体の導入によっても、ROCK 阻害による形態変化は抑制された。以上の結果から、Cas は Rho 依存的、ROCK 非依存的に Src kinase によってリン酸化され、CrkII、DOCK180 と複合体を形成し、Rac を活性化することが明らかになった。

次に Rho 依存性の Rac 活性化における mDia の関与を探るため、この分子の各種変異体を作成し、これらの ROCK 阻害時に認められる膜ラフリング・接着点形成への効果を検討した。その結果、mDia の抑制型変異体を導入すると、Y-27632 処理による膜のラフリング・接着点形成が抑制されることを見出した。

以上のことから、Rho が mDia を介し、Cas のチロシンリン酸化を制御して Rac 活性化を起こす経路が存在すること、この mDia による Rac 活性化経路に対して ROCK が拮抗的に働くことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

低分子量 G 蛋白質 Rho はアクチン細胞骨格の再編成を介して、細胞接着、細胞質分裂、細胞移動、神経突起退縮など様々な細胞反応を制御する。この多様な細胞反応は、活性化型 Rho に結合する複数の下流分子を介して起こるが、その機構には未だ不明な点が多い。申請者は、Rho を不活化する C3 酵素と Rho の下流分子のうち蛋白質リン酸化酵素 ROCK を選択的に阻害する Y-27632、及び、別の Rho 下流分子 mDia の変異体を用いて、mDia 依存性の Rho のシグナル伝達経路を解析した。その結果、mDia が Rho によって活性化され、Cas のチロシンリン酸化を制御して別の低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化を起こすこと、この経路は、Rho より Rac 依存性の膜ラフリングの形成経路として働くこと、ROCK はこの mDia による Rac 活性化経路に対して抑制的に働くこと、を明らかにした。以上の研究は、細胞移動の分子スイッチの一つである Rho の新たなシグナル伝達経路を明らかにしたもので細胞生物学・細胞薬理学の進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15年2月3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。