

氏 名	木 村 一 志
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1761 号
学位授与の日付	平 成 13 年 11 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase. (Rho-キナーゼとミオシンフォスファターゼによる adducin とアクチンフィラメントとの相互作用の調節) 木村一志, 深田優子, 松岡洋一郎, Vann Bennett, 松浦善治, 大川克也, 岩松明彦, 貝淵弘三
論文調査委員	(主 査) 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 成 宮 周 教 授 井 出 千 東

論 文 内 容 の 要 旨

生体内には、分子量が2～3万の低分子量GTP結合蛋白質(G蛋白質)のスーパーファミリーが存在している。これらの低分子量G蛋白質が細胞内シグナル伝達系と密接に関係して様々な細胞機能を制御していることが次々と明らかになっている。Rhoファミリーに属するRhoはアクチン系系の細胞骨格を介して細胞運動や細胞質分裂, 細胞接着, stress fiberの形成などの細胞機能を制御していると考えられている。一方でここ数年Rhoの作用機構を明らかにするために、Rhoの標的蛋白質としてセリン/スレオニンキナーゼPKN, 新規のセリン/スレオニンキナーゼ(Rho-キナーゼと命名), mDia, Rhotekin, Rhoophilinなど数多くの分子が同定されている。

申請者はRhoの標的蛋白質として同定したRho-キナーゼとmyosin phosphataseのmyosin-binding subunit(MBS)の作用機構の解析を行ってきた。これまでに、Rhoにより活性化されたRho-キナーゼが直接myosin light chain(MLC)をリン酸化すること, またMBSのリン酸化を介してmyosin phosphataseを抑制することを示し、Rho-キナーゼとMBSがMLCのリン酸化レベルを制御することを明らかにした。さらに、申請者は、MBSがある種の上皮細胞では細胞間接着部位に濃縮することを見出した。MBSの細胞間接着における作用機構を解析するために、MBS結合蛋白質を探索した。

本論文で申請者は、glutathione-S-transferase(GST) fusion MBSを用いたアフィニティカラムにより、牛大脳膜画分からのMBSに特異的に結合する蛋白質を見出した。この蛋白質を精製し、部分アミノ酸配列を決定したところ、得られた配列がヒトのadducinのアミノ酸配列とはほぼ一致した。また、これらのタンパク質は抗adducin抗体によって認識された。したがって、この蛋白質はadducinであると結論された。adducinは細胞膜裏打ち構造であるアクチン-スペクトリン複合体に結合し、上皮細胞では細胞間接着部位に局在することが知られている。adducinはMBSと直接結合し、上皮細胞においてadducin, MBSともに、さらにはRho-キナーゼも細胞間接着部位に局在することが判明した。次に、MLC同様にadducinが活性型Rho-に依存してRho-キナーゼによってリン酸化されることを見いだした。また、Rho-キナーゼによるadducinのリン酸化がアクチンフィラメントとの結合を促進することを明らかにした。さらには、ミオシンフォスファターゼがadducinを脱リン酸化すること、この脱リン酸化反応はRho-キナーゼによるMBSのリン酸化によって抑制されることを見いだした。このRho-キナーゼによるadducinのリン酸化は細胞内においても確認された。

以上の実験結果から、Rho-キナーゼとMBSが、細胞間接着部位においてadducinのリン酸化レベルを制御していると考えられる。また、Rho-キナーゼによるadducinのリン酸化はadducinのアクチンフィラメントへの結合を促進し、細胞膜裏打ち構造の形成・維持に関係しているものと考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

低分子量G蛋白質Rhoは、細胞骨格の再構築を介して多様な細胞機能を制御している。申請者はRhoの標的蛋白質として同定したRho-キナーゼとミオシンフォスファターゼのミオシン結合サブユニット(MBS)の作用機構の解析を行って

きた。これまでに Rho により活性化された Rho-キナーゼが直接 myosin light chain (MLC) をリン酸化すること、また MBS のリン酸化を介してミオシンフォスファターゼを抑制することが判明し、それによって Rho-キナーゼと MBS が MLC のリン酸化レベルを制御することが明らかにされている。

本論文で申請者は、MBS の細胞間接着における作用機構を解析するために、MBS 結合蛋白質を探索したところ、MBS が adducin と結合することを見出した。Adducin は細胞膜裏打ち構造であるアクチン-スペクトリン複合体に結合し、上皮細胞では細胞間接着部位に局在することが知られている。一方で、申請者は、Rho-キナーゼが、adducin を直接リン酸化することを見出した。また、ミオシンフォスファターゼが Rho-キナーゼによってリン酸化された adducin を脱リン酸化し、そのフォスファターゼ活性が Rho-キナーゼによる MBS のリン酸化によって抑制されることも明らかにした。さらに、Rho-キナーゼによる adducin のリン酸化は adducin のアクチンフィラメントとの結合を促進することを明らかにした。以上のことより、Rho-キナーゼと MBS が、細胞間接着部位において、adducin のリン酸化レベルを制御することで、細胞接着やその裏打ちを制御していると考えられる。

以上の研究は低分子量 G タンパク質 Rho の作用機構の解明に貢献し、細胞骨格や細胞接着の分子生物学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13年8月28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。