

氏 名(本 籍)	^{すず} 鈴 ^き 木 ^{やす} 泰 ^{ゆき} 行 (茨 城 県)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,829 号
学位授与年月日	平成 10 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	ANALYSIS OF INHIBITION MECHANISM OF EGF-DEPENDENT STATACTIVATION VIA G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS (G 蛋白質共役型受容体による EGF 依存的な STAT 活性化の抑制機序の解析)
主 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 Ph. D. (理学) 多比良 和 誠
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副 査	筑波大学助教授 農学博士 宮 崎 均

論 文 の 内 容 の 要 旨

細胞膜を7回貫通する構造を持つ G 蛋白質共役型受容体は、ペプチドホルモン、カテコールアミン、脂質代謝産物などの受容体として働き、三量体 G 蛋白質を介して細胞内に情報を伝達することが知られている。このなかで三量体 G 蛋白質の Cq ファミリーに共役する受容体刺激により STAT (signal transducers and activators of transcription) とよばれる蛋白質が活性化されるという興味深い知見が報告された。STAT は、その名が示すように情報伝達因子と転写因子の両方の性質をもつユニークな蛋白質で、サイトカイン受容体、増殖因子受容体、そして G 蛋白質共役型受容体刺激により活性化されることが報告されている。STAT が核内で転写因子として機能するためには、チロシンリン酸化を受けて二量体化することが必要であり、サイトカイン受容体の場合は JAK ファミリーのチロシンキナーゼが、増殖因子受容体の場合は、受容体に内在するチロシンキナーゼがチロシンリン酸化を行う。最近、LPA (lysophosphatidic acid) が、G 蛋白質共役型受容体を介して EGF 受容体を活性化するという興味深い報告があったことから著者は STAT の活性化に関与するチロシンキナーゼが EGF 受容体ではないかという仮説を立て、EGF による STAT の活性化が報告されているヒト扁平上皮癌由来の細胞株である A431細胞を用いてこの研究を始めた。

まず、ゲルシフトアッセイを行い、A431細胞において EGF 依存的に Stat1が活性化されることを確認した。しかし、LPA 依存的な Stat1の活性化が検出できなかったため、LPA が EGF 依存的な Stat1の活性化を修飾する可能性を考え、実験を行った結果、LPA が EGF 依存的な Stat1の活性化を抑制することを発見した。LPA の抑制作用は、細胞を予め LPA 処理し、その後に EGF 処理した場合にのみ観察された。この抑制作用は、LPA 濃度に依存した。さらに、ルシフェラーゼアッセイによる検討の結果、LPA による抑制作用は転写レベルでも再現されることが明らかとなった。また、ブラジキニン、ATP 刺激により、LPA と同様の抑制作用が観察された。LPA、ブラジキニン、ATP は、A431細胞において、Gq ファミリーの三量体 G 蛋白質を介して、フォスホリパーゼ C (PLC) を活性化し、イノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP3) とジアシルグリセロール (DG) を産生する。IP3は細胞内カルシウム濃度を上昇させ、DG はセリン/スレオニンキナーゼであるプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化する。LPA による EGF 依存的な STAT 活性化の抑制作用は、PKC を活性化する薬剤であるフォルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA) により完全に再現された。

次に、LPAはサイトカイン依存的なSTATの活性化も同様に抑制するのかについて検討した結果、LPAはIFN- γ 依存的なStat1の活性化を抑制できなかった。このことから、LPAの標的がEGF受容体である可能性について検討した結果、LPA処理によりEGF受容体チロシン残基のリン酸化の低下が観察された。この原因として、LPA処理によるEGF受容体のチロシン脱リン酸化が考えられたため、チロシン脱リン酸化酵素（protein tyrosine phosphatase : PTP）の阻害剤の影響について検討した。その結果、LPAによる抑制作用はPTP阻害剤に感受性であるのに対して、PMAによる抑制作用はPTP阻害剤に非感受性であった。これは、LPAによる抑制作用に、PMAに依存しない経路も存在することを意味している。そこで、PLC阻害剤であるU-73122をもちいてPLC活性化に伴うPKCの活性化を阻害した状態での、LPAによる抑制作用を検討した。その結果、PLC阻害剤存在下でもLPAによる抑制作用が観察されたことから、Gqファミリーの三量体G蛋白質を介さないLPAによる抑制作用経路の存在が示唆された。LPA受容体はGq以外に三量体G蛋白質のGiファミリーを活性化することが報告されていることから、三量体G蛋白質のGiファミリーを不活性化する百日咳毒素（PTX）の影響について検討した結果、LPAによる抑制作用はPTXに感受性であることが明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、数多くの増殖因子やホルモンがそれぞれ単一の機能のみを持つのではなく、多様な場所や時期に、様々な活性を発現し、生体をバランスよく制御しているという考えが一般化してきた。このように生体制御分子の活性発現メカニズムを理解する上で、増殖因子受容体やホルモン受容体を介する細胞内情報伝達機構の解明が、増殖因子やホルモン及びその受容体の遺伝子発現調節機構の解明と並んで重要視されている。また、様々な増殖因子やホルモンが互いに協調して働き、個々の細胞機能を調節し、さらに生体機能をも調節しているという考え方のもと、細胞内情報伝達系におけるクロストークが注目されている。このような状況の中、ともに細胞増殖因子のカテゴリーに分類されるEGFとLPAとが、その細胞内情報伝達系においてクロストークし、LPAがEGF依存的な情報伝達物質（STAT）の活性化を抑制することを発見したことは非常に意味があることと思われる。さらに、LPAの作用機序についての解析も行い、LPAの抑制作用にはタンパク質チロシン脱リン酸化酵素（PTP）の活性化が重要な役割を担うことも明らかとなった。今後、上記の抑制作用に関与するPTPを同定し、活性化の機序を解明することにより、EGF依存的な情報伝達機構にとどまらず、細胞増殖、分化誘導といった現象をより深く理解することにつながると期待される。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。