

(目的)

低分子量 G 蛋白質 Rap2 は、*ras* 癌遺伝子産物 (Ras) の類縁分子であり、同じ Ras ファミリーに属する Rap1 と同様に、Ras の標的分子の殆どと結合する。一方、Ras と Rap1 の標的分子結合領域が同一であるのに対し Rap2 のそれはアミノ酸残基が 1 つ異なる (F39)。従って、Rap2 にのみ特異的に結合する未知の標的分子が存在し Rap2 がそれを介して Ras とは異なる独自のシグナル伝達経路を制御する可能性がある。ヒトのシグナル伝達分子の殆どは線虫 *C. elegans* にも相同分子が存在することから、今回我々は線虫を用いて Rap2 の未知の特異的標的分子を検索した。

(方法)

線虫 Rap2 に結合する分子を酵母 Two-hybrid 法により線虫 cDNA ライブラリーからスクリーニングし、得られた分子のヒト相同分子をヒト Rap2 の標的候補分子とした。標的候補分子と Rap2 の結合の特異性と分子機構は、酵母

Two-hybrid 法と組替え蛋白質同士の試験管内結合実験で検討した。また、両者により制御される下流シグナル伝達経路の出力指標として、アクチン細胞骨格の再編成による細胞形態の変化を定量解析した。

(結果)

スクリーニングの結果、線虫分子 ZK669.1a をコードするクローンが得られたので、そのヒト相同分子 PARG1 をヒト Rap2 の標的候補分子とした。PARG1 は Ras、Rap1 には結合せず、Rap2 とのみ特異的に結合した。PARG1 と ZK669.1a は ZPH と呼ばれる機能未解明の領域を持つが、Rap2 との結合の分子機構として、この ZPH 領域が Rap2 の GTP 結合型コンフォメーションにおける F39 を認識することが判明した。また、PARG1 と ZK669.1a はアクチン細胞骨格の制御に関与する低分子量 G 蛋白質 Rho を不活性化する Rho GAP ドメインを持つ。そこで、培養細胞で PARG1 を強制発現し、アクチン細胞骨格の再編成による細胞形態の変

化を観察したところ、PARG1 は Rho の不活性化状態に特有の形態変化を引き起こした。しかし、PARG1 に加えて Rap2 を共発現させると、この形態変化が抑制された。一方、ZPH 領域を欠く変異体 PARG1 も細胞に同様の形態変化を引き起こしたが、Rap2 による抑制は認められなかった。

(考察)

以上の結果は、PARG1 が Rap2 の特異的標的分子として Rho を介するシグナル伝達を制御することを示しており、PARG1 は Ras ファミリーと Rho ファミリーという 2 つの代表的低分子量 G 蛋白質ファミリーのクロストークに関与する分子として進化を越えて保存されてきた可能性が高い。一方、PARG1 は C 末端でチロシン脱リン酸化酵素 PTPL1 と結合しているため、低分子量 G 蛋白質とチロシンキナーゼシグナル伝達経路とのクロストークに関与する可能性もあり、今後の解析を要する。

(別紙様式第 7 号)

論文審査結果の要旨 (1)

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	Bat-Erdene Myagmar
論文審査委員	審査日	平成 17 年 2 月 24 日	
	主査教授	安仁屋 洋子	印
	副査教授	田中勇悦	印
	副査教授	清の昭一	印
(論文題目)			
PARG1, a protein tyrosine phosphatase-associated RhoGAP, as a putative Rap2 effector			
(論文審査結果の要旨)			
上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
Rap2 は癌遺伝子産物 Ras の類縁分子であり、Ras と同様に細胞癌化や癌細胞の悪性形質に関与すると考えられている。Ras は標的分子と物理的に結合してシグナルを伝達する。Rap2 は Ras の標的分子群と結合することから、Ras と同じシグナルを伝達すると考えられていた。しかし実は、Rap2 と Ras では、標的分子との接触面 9 アミノ酸残基のうち 1 アミノ酸が異なる。従って、このアミノ酸 (フェニルアラニン 39) を認識して Rap2 に特異的に結合する未知の標的分子が存在する可能性がある。			
一方、線虫 C. エレガン스는ヒトゲノムプロジェクトの前哨戦として全ゲノムの解読が行われたモデル生物であり、多くのシグナル伝達分子をヒトと共有する。そこで著者らは、線虫を用いて Rap2 の未知の標的分子を探索し、得られた線虫分子のヒトにおける相同分子を解析するという戦略を試みた。			

- 備考 1 用紙の規格は、A4 とし縦にして左横書きとすること。
 2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。
 3 *印は記入しないこと。

2. 研究内容

線虫 Rap2 に結合する分子を Two-hybrid 法によるゲノムワイドスクリーニングで探索し、新規 Rap2 結合分子として線虫 ZK669.1a 蛋白質を得た。ZK669.1a とそのヒト相同分子 PARG1 は、両者の頭文字から ZPH と呼ばれる機能未解明のドメインを持つ。この ZPH ドメインが Rap2 のフェニルアラニン 39 を認識して結合することが、Two-hybrid 法と組替え蛋白質同士の試験管内結合実験から判明した。ZPH ドメインは Ras を含め他の類縁分子とは結合せず Rap2 とのみ結合した。

また、ZK669.1a と PARG1 は低分子量 G 蛋白質 Rho を不活性化するドメイン (RhoGAP ドメイン) も共有する。しかし、PARG1 の RhoGAP ドメインの細胞内機能は解析されていなかった。Rho はアクチン細胞骨格を介して細胞の形態を制御することから、PARG1 を強制発現した細胞の形態を観察した。その結果、PARG1 は Rho の不活性化状態に特有の形態変化を引き起こすことが判明した。この形態変化は Rap2 の共発現により抑制されたが、ZPH ドメインを欠く変異体 PARG1 は抑制を受けなかった。

以上の結果から、PARG1 は Rap2 の新規特異的標的分子であり、PARG1 の ZPH ドメインと Rap2 が結合することで PARG1 の RhoGAP ドメインの機能が抑制されると結論した。

3. 研究結果の意義と学術水準

本研究は、重要なシグナル伝達分子が進化を越えて保存されることを利用して Rap2 の新しい特異的標的分子 PARG1 を発見し、Rap2 が PARG1 を介して Rho を制御することを明らかにしたものである。

Rap2 は Ras ファミリーに属し、Rho は Rho ファミリーに属する。Ras ファミリーは癌細胞の異常増殖能、Rho ファミリーは癌細胞の浸潤転移能に関わると考えられている。本研究は PARG1 が両ファミリーのクロストークに関与することを初めて明らかにしたものであり、癌細胞の悪性形質の成り立ちを解明する端緒となる有意義で高い水準にある研究と考えられる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。