学位授与番号	医博甲第1431号
学位授与年月日	平成12年5月31日
氏　　名	高　橋　博　人
学位論文題目	変異ラス導入繊維芽細胞に内在するras-GTPase活性タンパク質1のノックダウンによるイノシトール4リン酸依存的な受容体作動性Ca2＋流入の抑制
論文審査委員	主　査　教　授　東　田　陽　博
	副　査　教　授　加　藤　　聖
	教　授　狩　野　方　伸

内容の要旨及び審査の結果の要旨

細胞外からの Ca^{2+}流入は、細胞内 Ca^{2+}シグナルとしての重要な役割を担っている。Ca^{2+}流入経路の非容量性 Ca^{2+}流入は、受容体刺激後に生産されるイノシトール 1,3,4,5−四リン酸 [Ins(1,3,4,5)P_4]がCa^{2+}貯蔵庫の状態とは無関係にCa^{2+}流入を引き起こす。最近、Ins(1,3,4,5) P_4結合タンパク質として Ras−GTPase 活性タンパク質(GAP)1 がラットの GAPIII やヒトの GAP1[IRA3]' として脳や血球細胞から単離された。そこで今回、受容体刺激による Ins(1,3,4,5)P_4依存的で非容量性Ca^{2+}流入に GAP1 が関与しているか否かを検討した。

実験には、ブラジキニン刺激や Ins(1,3,4,5) P_4の細胞内導入による Ca^{2+}流入が確認されているマウス NIH/3T3 細胞を用いた。さらに、NIH/3T3 細胞を癌化変異 ras で形質転換した DT 細胞も用いた。GAPIII をクローニングし、さらにアンチセンス DNA を作製した。これらDNAをトランスフェクションに使用した。得られた結果は以下のように要約される。

1．　GAPIII アンチセンスおよびセンス導入株細胞 DTGIIIAS−16 と DTGIIIS−2細胞を樹立した。

2．　DTGIIIAS−16細胞の GAPIII 転写産物と GTPase 活性はの減少していた。

3．　DTGIIIAS−16 細胞ではブラジキニン刺激による Ca^{2+}オシレーションや Ca^{2+}流入が抑制された

4．　この細胞株では Ins(1,3,4,5) P_4の細胞内注入による Ca^{2+}流入の抑制が確認された。

5．　GAPIII と GFP の融合タンパク質を DT 細胞内に発現させると GFP の蛍光は DT 細胞の細胞膜表面に限局していた。

6．　DTGIIIAS−16細胞は正常 NIH/3T3 細胞に近い形態を示した

以上のことから、Ins(1,3,4,5) P_4受容体としての GAPIII は細胞膜表面に存在し Ins(1,3,4,5) P_4をセカンドメッセンジャーとした受容体作働性 Ca^{2+}流入経路(カスケード)の中にあって重要な役割を担っていることが明らかになった。

本研究はホルモンや神経伝達物質受容体刺激により産生される Ins(1,3,4,5)P_4 の下流に GAPIII が存在することを実証したはじめての報告で、細胞遺伝子学なかでも、シグナル伝達研究上極めて価値ある論文と評価された。