

論文の内容の要旨

論文題目 脊椎動物 *Escherichia coli* Ras-like protein (ERA)

の生理機能の解明

氏名 合田 仁

【序】

ERA は、大腸菌からヒトにいたる様々な種間で保存された GTP 結合タンパク質であり、アミノ末端の GTPase ドメインに加え、カルボキシ末端に、ERA ホモログ間で保存された C 末端ドメイン (C-terminal domain ; CTD) を有する (Fig. 1)。大腸菌 ERA は増殖、生存に必須であるが、その分子機構は不明である (1)。一方、脊椎動物 ERA の機能については全く未知であったが、我々の研究室で、ヒト ERA (H-ERA) の GTPase ドメイン点変異体の過剰発現が HeLa 細胞にアポトーシスを誘導すること、さらには、C 末端領域を欠損させた変異体ではアポトーシス誘導活性が消失することを見出し、脊椎動物 ERA は、GTPase ドメインおよび CTD を介して細胞死を制御する可能性を示した (2)。しかし、これらの実験は、細胞内に ERA を過剰発現させた系を用いているため、ERA の生理的な機能を反映しているとは言い難く、脊椎動物 ERA の機能のさらなる解析が必要である。そこで、本研究では、ERA 遺伝子欠損トリ DT40 細胞株を樹立し、その表現型を調べることで、脊椎動物 ERA の生理機能の解明を目指した。

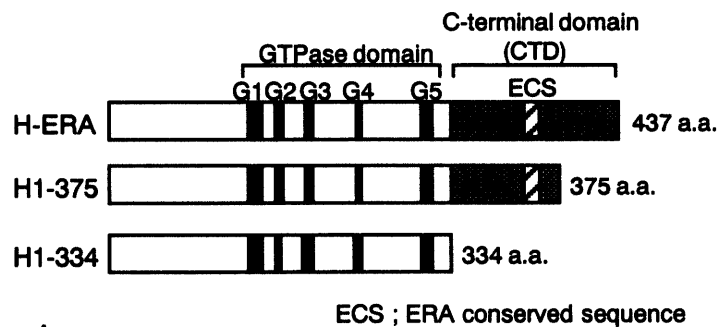
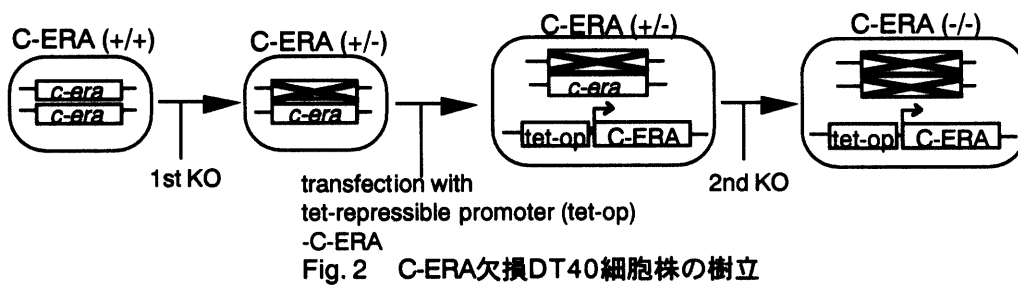


Fig. 1 H-ERAおよびC末端欠損変異体 H1-375、H1-334の構造

[実験方法と結果]

1. DT40 細胞を用いたトリ ERA (C-ERA) 欠損細胞株の樹立

トリ B 細胞株 DT40 は、高効率の相同組み換え能をもち、目的遺伝子の破壊が容易である (3)。まず、野生株 (+/+) に存在する 2 つの *c-era* 遺伝子座のうち一方を破壊し、*c-era* (+/-) のヘテロ株を得た。さらに残る 1 つの *c-era* 遺伝子座の破壊を行ったが、両遺伝子座を消失した C-ERA 欠損株 (-/-) を得ることができなかった。このことは、C-ERA の欠損が致死である可能性を示唆している。そこで、tetracycline 添加によって C-ERA の発現が抑制される発現ベクターをヘテロ株 (+/-) へ導入することにより、外来性 C-ERA を発現させた状態で残る 1 つの *c-era* 遺伝子座の破壊を行った結果、目的とする内在性 C-ERA の発現を消失させた C-ERA 欠損株 (-/-) (#19-3) の樹立に成功した (Fig. 2)。



2. C-ERA 欠損による細胞死の誘導

内在性 C-ERA 欠損株中の外来性 C-ERA の発現を tetracycline 誘導體 doxycycline 添加により停止させ、トリパンプルー染色により生細胞数をカウントした。その結果、C-ERA を発現した細胞に比べ、C-ERA の発現を消失した細胞では、生細胞数の減少とともに死細胞数の増加がみられた (Fig. 3A)。また、フローサイトメーターにより DNA 含有量を調

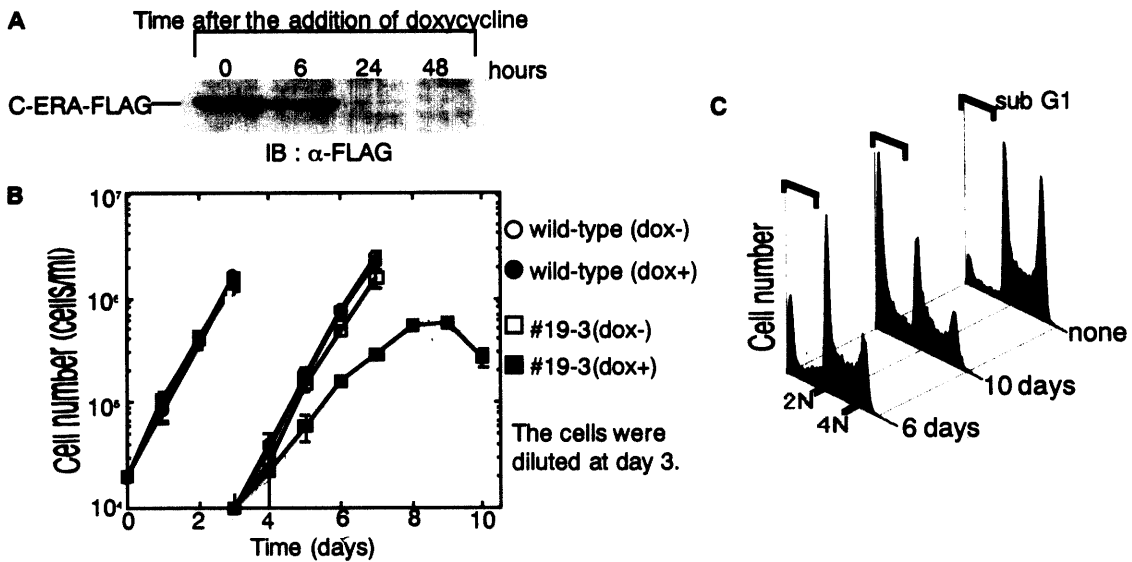


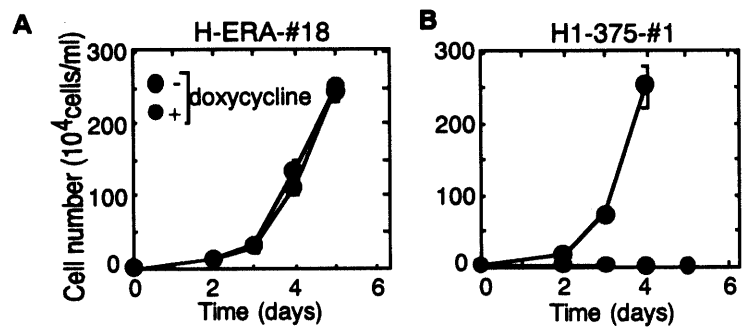
Fig.3 C-ERA欠損細胞 (#19-3)へのdoxycycline添加後の外来性C-ERAの発現消失 (A)、増殖抑制 (B)、およびアポトーシス誘導 (C)

べたところ、C-ERA を消失した細胞において、アポトーシスに特徴的な sub G1 ピークが増加した (Fig. 3C)。これらの結果から、C-ERA は細胞増殖に必須であり、その欠損はアポトーシスを誘導することが明らかとなった。つぎに、脊椎動物種間で ERA の生理機能が保存されているのか検討するために、C-ERA 欠損株 (#19-3) に、さらにヒト ERA (H-ERA) を恒常的に発現させた細胞株を樹立した。その細胞株に doxycycline を添加し、H-ERA のみ発現している状態にさせ、生細胞数をカウントした。その結果、C-ERA 欠損株で見られた顕著な細胞死の誘導が観察されなかった (Fig. 4A)。すなわち、H-ERA が C-ERA の機能を相補し、ERA の生理機能は脊椎動物種間で広く保存されていることが明らかになった。さらに、この現象は C-ERA 欠損 DT40 細胞株の解析によって得られた知見が哺乳動物 ERA にも適用できることを示している。



3. 脊椎動物 ERA の生理機能に対する CTD の必要性

CTD の一部 (H-ERA の C 末端から 62 アミノ酸) は G1 変異体過剰発現によるアポトーシス誘導活性に必要である。そこで、脊椎動物 ERA の機能発現に CTD が必要であるか検討するために、C-ERA 欠損株 (#19-3) に H-ERA の C 末端領域の一部を欠損したタンパク質 H1-375 (Fig. 1) を恒常的に発現させた細胞株を樹立した。この細胞株に doxycycline を添加し、C-ERA の発現を消失させることで、H1-375 のみが発現している状態にさせた。その結果、死細胞の増加および sub G1 ピークの増加が観察された (Fig. 4B)。このことから、脊椎動物 ERA の機能に CTD が必須であると結論した。



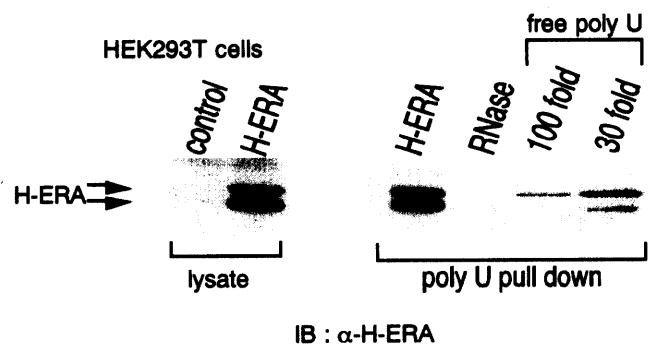
Treated with or without doxycycline for 4 days before day 0.

Fig. 4 H-ERA (A)、H1-375 (B) 発現の C-ERA欠損による増殖抑制への影響

この細胞株に doxycycline を添加し、C-ERA の発現を消失させることで、H1-375 のみが発現している状態にさせた。その結果、死細胞の増加および sub G1 ピークの増加が観察された (Fig. 4B)。このことから、脊椎動物 ERA の機能に CTD が必須であると結論した。

4. 脊椎動物 ERA の RNA 結合活性および ERA の機能への関与

脊椎動物 ERA の細胞死制御において CTD が必要であることを明らかにしたが、その分子機構は不明である。そこで、H-ERA の C 末端から 62 アミノ酸を中心にホモロジー検索を行ったところ、CTD が RNA 結合ドメインである hnRNP K homology (KH) ドメインと相同性を示すことを見出した。したがって、脊椎動物 ERA は RNA 結合タンパク質である可能性が示唆された。そこで、ERA の RNA 結合能の有無の検討を行った。



IB : α -H-ERA
Fig. 5 脊椎動物ERAのRNA結合活性

H-ERA を過剰発現させた HEK293T 細胞の抽出液に、poly A, poly G, poly C, poly U RNA

beads を加えインキュベートした後、各 RNA beads に結合した H-ERA を抗 H-ERA 抗体を用いた ウェスタン・ブロットにより解析したところ、H-ERA と poly G および poly U の結合が観察された。また、この結合は、poly U beads の RNase 前処理および結合反応液中への free poly U の過剰量添加により抑制された (Fig. 5)。

さらに、ランダムな塩基配列をもつ oligo RNA に対する組み換え H-ERA タンパク質の結合活性を検討した。Maltose binding protein (MBP) 融合 H-ERA タンパク質を大腸菌発現系により調製したのち、amylose-resin に結合させた。そこへ、³²P で放射ラベルした oligo RNA を添加しインキュベートしたのち、resin の放射活性を測定することで RNA 結合活性を評価した。その結果、resin および MBP を結合させた resin に比べ、MBP 融合 H-ERA において放射活性の増加がみられた (Fig. 6A)。一方、H1-375 では H-ERA よりも放射活性の上昇がみられたが、CTD をすべて欠損した H1-334 では (Fig. 1)、resin のみと同程度の放射活性を示し、RNA 結合活性が消失した (Fig. 6A)。これらの結果より、H-ERA は RNA 結合活性を有し、さらにその活性には CTD が必要であると結論した。

さらに、C-ERA、H-ERA、H1-375 の各発現 DT40 細胞の抽出液を用い、poly U beads への結合を検討したところ、C-ERA および H-ERA と poly U beads との結合はみられたが、H1-375 の結合は観察されなかった (Fig. 6B)。この結果は、H-ERA の RNA 結合活性に C 末端から 62 アミノ酸が重要であることを示している。さらに、H1-375 が H-ERA の機能を相補しないことを考慮すると、CTD を介した RNA 結合活性が H-ERA の生理機能に極めて重要であることを示唆している。

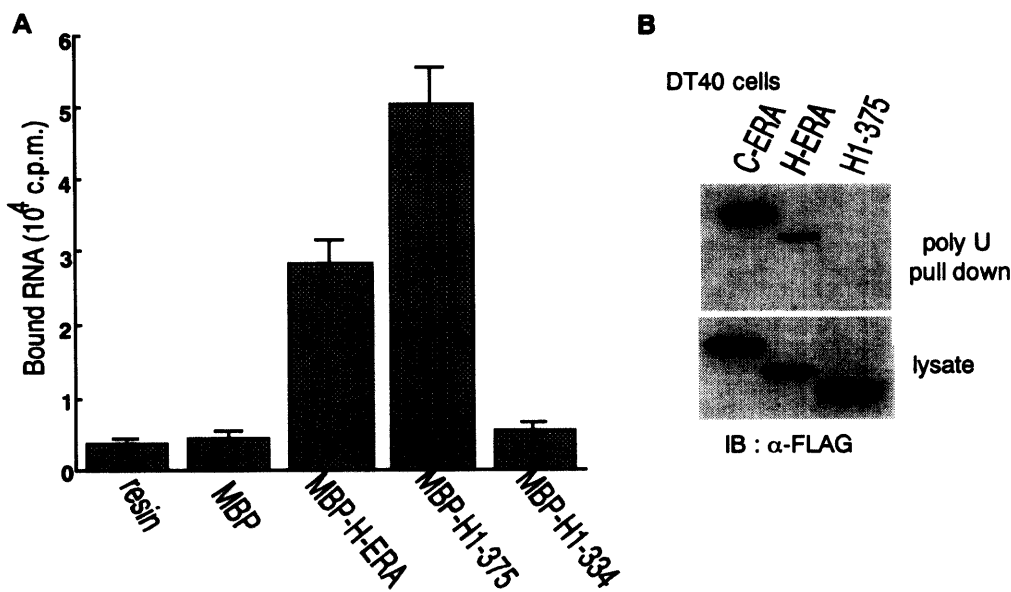


Fig. 5 H-ERAのRNA結合活性に対するCTDの必要性

A. Random RNAへの結合, B. Poly U beadsへの結合

5. 脊椎動物 ERA の RNA 結合活性に対する GTPase ドメインの影響

脊椎動物 ERA は、GTPase 活性を担う GTPase ドメインと RNA 結合活性を担う CTD の 2 つの機能ドメインを有する。そこで、両ドメイン間の機能関係を明らかにするために、

GTPase ドメイン点変異体の RNA 結合活性を評価した。

HEK293T 細胞に野生型 H-ERA および 2 種類の G1 領域点変異体 P122V、ST(127, 128)NN (Fig. 7A) を過剰発現させた細胞抽出液を用いて、poly U beads との結合を検討した。その結果、野生型 H-ERA と同様に、2 つの変異体ともに poly U への結合が観察された (Fig. 7B)。さらに、結合のアフィニティーを推測するために、細胞抽出液の NaCl を加え、高塩濃度条件下で結合反応を行ったが、野生型 H-

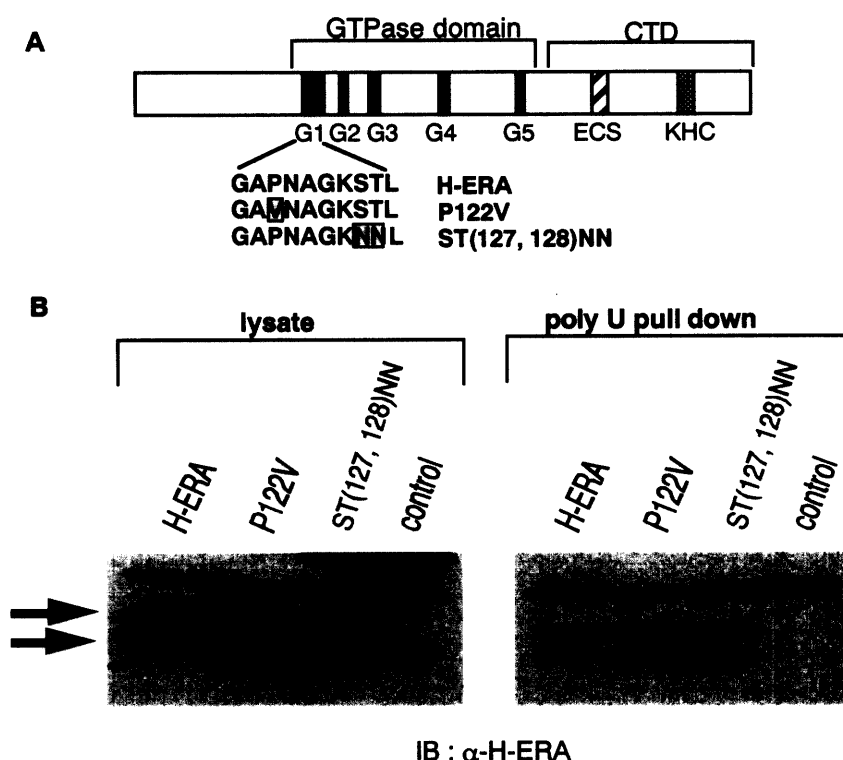


Fig. 7 H-ERAのG1領域変異体の構造 (A) とそのRNA結合活性 (B)

ERA および 2 つの変異体ともに 600 mM NaCl まで poly U との結合が観察された。このことから、GTPase 活性は RNA 結合活性に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

【総括】

本研究において、C-ERA 欠損 DT40 細胞株の樹立に成功し、ERA タンパク質が脊椎動物細胞の増殖および生存に必須の分子であり、その機能が脊椎動物種間で広く保存されていることを初めて明らかにした。また、脊椎動物 ERA の細胞死制御に CTD が必要であること、さらに脊椎動物 ERA は RNA 結合活性をもち、CTD がその活性に必要であることを見出した。これらのことから、脊椎動物 ERA は、RNA との結合を介し細胞の生死の制御に関与する可能性が示唆された。しかし、ERA の細胞死制御における RNA 結合の分子機構は未だ不明である。また、G1 領域への変異は RNA 結合活性に影響しないことが示唆されたが、CTD および GTPase 両機能ドメイン間の制御メカニズムは不明である。さらには、脊椎動物 ERA が担う生理的シグナルの解明も今後の課題である。

【参考文献】

- (1) Caldon, C.E. et al. : *Mol. Microbiol.*, **6**, 1253-1257 (2001)
- (2) Akiyama, T., Gohda, J., Arai, H. et al. : *Genes Cells*, **6**, 987-1001 (2001)
- (3) Lahti, J.M. ; *Methods*, **17**, 305-312 (1999)