

審査の結果の要旨

氏名 合 田 仁

Escherichia coli Ras-like protein (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 領域に加え、カルボキシ末端 (C 末端) に、ERA ホモログ間で保存された特徴的な領域を有する。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。一方、脊椎動物 ERA については、ヒト ERA (H-ERA) の GTPase 領域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、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が見いだされていた。しかし、これらの実験は、過剰発現系を用いているため、生理的条件下の実験系ではなく、脊椎動物 ERA の生理機能は未知であった。「脊椎動物 ERA の生理機能の解明」と題した本論文では、内在性 ERA 遺伝子欠損トリ DT40 細胞株の樹立に成功し、その表現型解析により、ERA は脊椎動物細胞の増殖・生存に必須のタンパク質であることを初めて明らかにした。さらに、脊椎動物 ERA は RNA 結合タンパク質であることを見出し、C 末端領域が ERA の RNA 結合活性および生理機能に必須であることを明らかにした。本論文は、脊椎動物 ERA は GTP 結合/GTPase 活性および RNA 結合活性を介して細胞の増殖・生存の制御を行っている」と述べている。

1. DT40 細胞を用いたトリ ERA (C-ERA) 欠損細胞株の樹立

高効率の相同組み換え能をもつトリ B 細胞株 DT40 を用い、野性株 (+/+) に存在する 2 つの *c-era* 遺伝子座のうち一方を破壊し、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。そこで、tetracycline (tet) 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 *c-era* 遺伝子座の破壊を行った結果、内在性 C-ERA の発現を消失させた C-ERA 欠損株 (-/-) の樹立に成功した。

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 tet 誘導體添加により停止させ、生細胞数をカウントした結果、C-ERA 発現細胞に比べ、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。また、フローサイトメーターにより DNA 含有量を調べたところ、アポトーシスに特徴的な sub G1 ピークが増

加した。これらの結果から、C-ERA は細胞増殖に必須であることが明らかとなり、その欠損はアポトーシスを誘導することが示唆された。さらに、C-ERA 欠損株にヒト ERA (H-ERA) を恒常的に発現させた細胞株を樹立し、tet 誘導体を添加し H-ERA のみ発現している状態にさせたところ、C-ERA 欠損による細胞死誘導が抑制された。この結果は、H-ERA は C-ERA の機能を相補することを示しており、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となった。

3. 脊椎動物 ERA の RNA 結合活性および ERA の生理機能への関与

C-ERA 欠損株に H-ERA の C 末端から 62 アミノ酸を欠損した変異体 (H1-375) を恒常的に発現させた細胞株を樹立し、外来性 C-ERA の発現を消失させたところ、死細胞の増加および sub G1 ピークの増加が観察された。このことから、脊椎動物 ERA の機能に C 末端領域が必須であることが明らかにされた。さらに、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、RNA 結合ドメインである KH ドメインと相同性を示すことを見出し、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、RNA beads を用いた HEK293T 細胞での過剰発現系による ERA の RNA 結合能の有無の検討を行ったところ、H-ERA と poly G および poly U の結合が観察された。また、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ところ、H-ERA タンパク質と oligo RNA の結合がみられたが、C 末端領域を完全に欠損させた変異体 (H1-334) では結合は観察されなかった。さらに、H1-375 を発現させた 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、H1-375 と poly U との結合はみられなかった。これらの結果は、ERA は RNA 結合活性を有し、その活性には C 末端領域が必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、C 末端領域を介した 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。

以上を要するに、本論文は、C-ERA 欠損 DT40 細胞株の樹立に成功し、ERA 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 C 末端領域が必要であること、さらに脊椎動物 ERA は RNA 結合活性をもち、C 末端領域がその活性に必要なことを見出した。これらの知見は、今まで未知であった脊椎動物 ERA の生理機能の解明に多大な貢献を付与するだけでなく、RNA を介した細胞の生存制御に関する新たなシグナル伝達機構の存在を示唆しており、博士 (薬学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。