

論文の内容の要旨

論文題目

「神経組織特異的な発現を示す新奇 Ras ファミリー蛋白質 Di-Ras の機能解析」

氏名 多田 稔

【序】

Ras を代表とする低分子量 G 蛋白質は、細胞外からの刺激に応答して、GDP の結合した不活性型から GTP の結合した活性型へとそのコンホメーションを変換することで下流へとシグナルを伝達するスイッチ分子として機能している。癌原遺伝子として同定された Ha-Ras をはじめ、これまでに Ras と相同性の高い低分子量 G 蛋白質が複数同定されており、一群の Ras ファミリーを形成している(図1)。それらは細胞の分化や増殖のみならず、近年では細胞の接着や形態形成など多彩な細胞機能を制御することが示唆されており、様々な細胞内情報伝達系において重要な役割を担うことが明らかとなりつつある。

私はヒトゲノム情報をもとにした新奇 Ras ファミリー蛋白質の同定およびその機能解析により、Ras ファミリー蛋白質の介在する新たな生理応答の制御を明らかにすることを目的として研究を進めてきた。本研究では、線虫から哺乳動物に至るまで動物種をこえて神経組織特異的な発現を示す新奇 Ras ファミリー蛋白質 Di-Ras (Distinct subgroup of Ras family GTPases) を同定し、培養細胞および線虫を用いた解析により Di-Ras が神経ペプチドの放出に関与し得ることを明らかにしたので報告する。

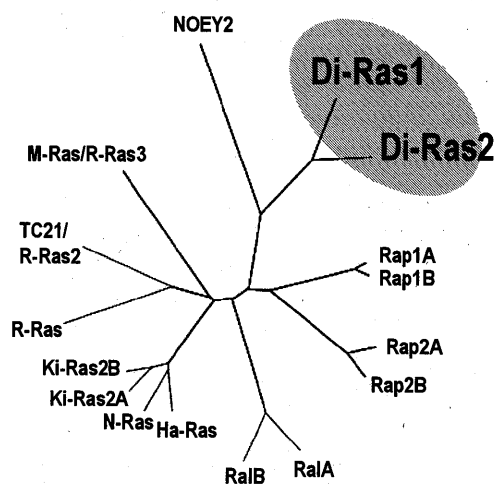


図1 ヒト Ras ファミリー蛋白質の進化系統樹

【結果】

1. Di-Ras は神経組織特異的な発現を示す新奇 Ras ファミリー蛋白質である。

既存の Ras 蛋白質との相同性を指標にヒトゲノムデータベースを探索した結果、複数の新奇 Ras ファミリー蛋白質を同定した。その中でも Di-Ras はヒトにおいて Di-Ras1, Di-Ras2 の二つの相同因子が存在し、新たな Ras サブファミリーを形成することが明らかとなった(図1)。また、Di-Ras はグアニンヌクレオチドとの結合に必須な G ドメインと呼ばれる領域や膜との結合に重要な脂質修飾部位において他の Ras ファミリー蛋白質と高い相同性を有する一方で、標的蛋白質との結合に重要なエフェクタードメインにおけるアミノ酸配列が異なるなど、一次構造上ユニークな特徴を有していた。ノザンプロットによりマウスにおける Di-Ras mRNA の発現臓器の検討を行った結果、Di-Ras1, Di-Ras2 とともに脳特異的に発現することが明らかになった(図2上)。さらに、ゼブラフィッシュおよび線虫における Di-Ras の相同因子が神経細胞特異的な発現を示したことから(図2下)、Di-Ras が動物種をこえて何らかの神経機能に関与する可能性が考えられた。

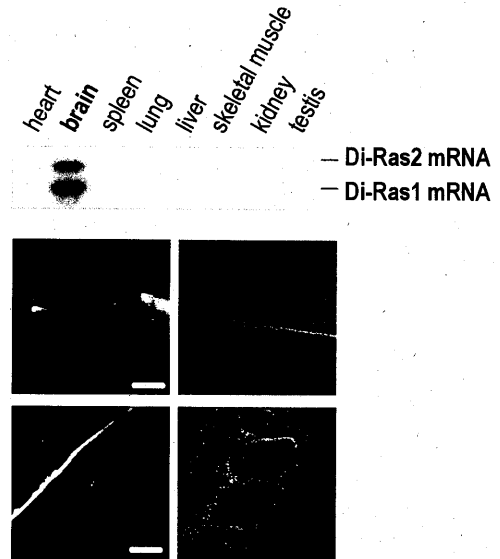


図2 Di-Ras は神経組織特異的な発現を示す
(上) ノザンプロットによる発現臓器の解析
(下) 線虫における GFP レポーターの発現

2. Di-Ras は既存の Ras とは異なり Raf-MAPK 経路を活性化しない。

既存の Ras 蛋白質の多くは代表的な標的因子である Raf を介して、MAP キナーゼ経路を活性化することが知られている。そこで、Di-Ras が同様のシグナル伝達経路に関与するのかを知る目的で、ERK のリン酸化を指標に MAP キナーゼ経路への関与を検討した。マウス神経芽腫由来の細胞株である Neuro2a 細胞に Di-Ras を過剰発現したところ、Ha-Ras の活性化型変異体の発現によって見られるような ERK のリン酸化の亢進は検出されなかった。また結合実験の結果、Di-Ras は Raf との結合能を有さないことが明らかとなった。さらに、Ras の他の代表的な経路の一つである PI3K-Akt 経路においても Di-Ras の関与は認められなかったことから、Di-Ras は既存の Ras とは異なるシグナル伝達経路に関与する可能性が示唆された。

3. Di-Ras は Prohormone Convertase2 (PC2) と相互作用し、分泌小胞上で共局在する。

Di-Ras の関与するシグナル伝達経路を探る目的で、ヒト脳 cDNA ライブラリーを用いて酵母 Two-hybrid スクリーニングを行い、Di-Ras の相互作用因子としてペプチドホルモンの成熟・分泌に関与するプロテアーゼ Prohormone Convertase2 (PC2) を同定した。Neuro2a 細胞を用いた実験により、Di-Ras と PC2 が培養細胞内で相互作用すること(図3)、および両者が分泌小胞上において共局在することが明らかになり、Di-Ras が PC2 を介した神経ペプチドの成熟や分泌に関与する可能性が考えられた。

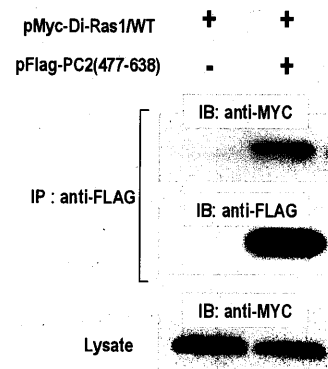


図3 共沈降実験による Di-Ras と PC2 の結合の確認

4. Di-Ras の過剰発現によりペプチドホルモンの放出が亢進する。

プロオピオメラノコルチン (POMC) は PC2 による切断をうけ刺激依存的に分泌されるペプチドホルモンの前駆体である。そこで POMC と β -Gal を融合した蛋白質を発現するレポーター遺伝子を作製し、分泌過程における Di-Ras 過剰発現の影響を検討した。Neuro 2a 細胞にレポーター遺伝子を発現させ、細胞外に分泌される β -Gal 融合蛋白質の活性を測定した結果、Di-Ras1 との共発現によりレポーター蛋白質の分泌が著しく亢進することを

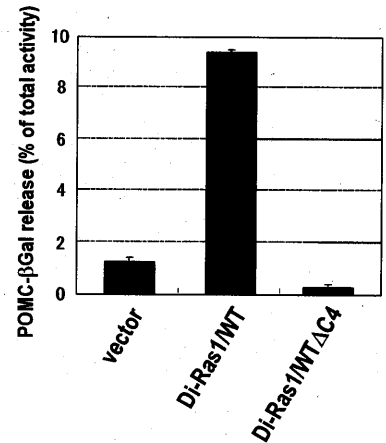
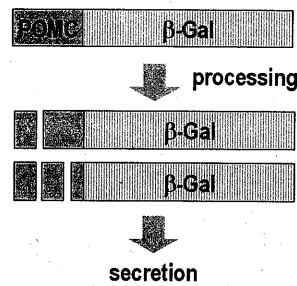


図4 POMC-bGal レポーターを用いたペプチド放出実験

見出した (図4)。一方、C 末端の脂質修飾部位を欠き膜への結合能を失った変異体 (Di-Ras1/WTΔC4) ではこのような分泌の亢進は認められないことから、Di-Ras が分泌小胞上に局在することで、その放出に関与する可能性が示唆された。

5. Di-Ras の線虫相同因子 *drn-1* 遺伝子の変異株では運動神経におけるアセチルコリンの放出に異常が生じる。

哺乳動物では Di-Ras1, Di-Ras2, NOEY2 (Di-Ras3) の3つの遺伝子が Di-Ras サブファミリーを形成している。一方、線虫においては *drn-1* (Di-Ras/Rig/NOEY2 homolog) 遺伝子のみが存在する。そこで線虫 *drn-1* 遺伝子破壊株を用いて Di-Ras の個体レベルにおける神経機能への関与について検討を行った。その結果、*drn-1* 変異株はアセチルコリンエステラーゼの阻害薬である aldicarb による運動麻痺に対して抵抗性を示すことを見出した (図5)。

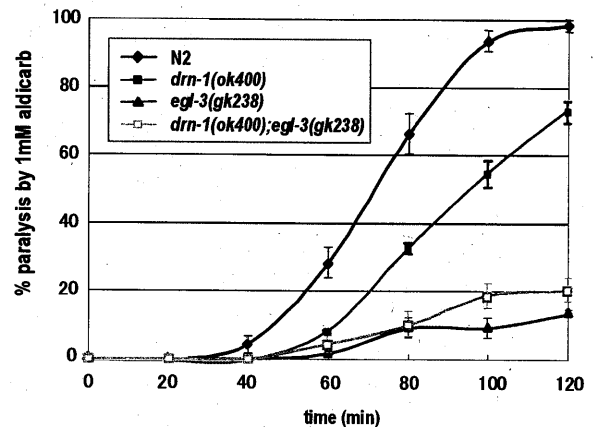


図5 *drn-1* 変異株における aldicarb 感受性の低下

の添加による運動麻痺は野生型と変わらなかったことから、*drn-1* 変異株においては神経筋接合部におけるアセチルコリンの放出が減少していると考えられた。先に述べた Di-Ras と相互作用が認められた PC2 の線虫相同因子 *egl-3* の変異株においても神経ペプチドの放出異常により *drn-1* 変異株と同様の表現型が報告されている。そこで二重変異株を用いた解析により *drn-1* と *egl-3* の遺伝学的相互作用について検討したところ、両者の表現型に相加性は認められず DRN-1 が EGL-3 の介在するシグナル経路の上流に位置する可能性が示唆された。

【総括】

本研究において私は、神経組織特異的な発現を示す新奇 Ras ファミリー蛋白質 Di-Ras を単離・同定し、Di-Ras が分泌小胞上で PC2 と相互作用することで神経ペプチド放出を促進する可能性を見出した。また、Di-Ras の機能を欠損した線虫では運動神経におけるアセチルコリンの放出に異常が生じている可能性を示した。これまでに PC2 をはじめ神経ペプチドの放出に関与するプロテアーゼや神経ペプチド自身の変異株において、*drn-1* 変異株と同様の表現型が報告されており、運動神経からアセチルコリンの放出を促す神経ペプチドシグナルの介在が示唆されている。予備的な実験から、運動神経におけるアセチルコリンの放出過程に DRN-1 は直接関与しないという知見を得ており、本研究で得られた結果と考えあわせると DRN-1 が EGL-3 を介した神経ペプチド放出の制御により運動神経からのアセチルコリンの放出に促進的に働くというモデルが考えられる(図6)。

近年になって細胞内セカンドメッセンジャーによって活性化される Ras の活性制御因子が神経細胞における分泌過程に関与することが数多く報告されている。今後はこれら上流因子による Di-Ras の活性制御機構の解明により、Ras ファミリー蛋白質を介した神経ペプチド放出制御の詳細な分子メカニズムの解明が期待される。

【参考文献】

Kenji Kontani, Minoru Tada, Tomohiro Ogawa, Takuro Okai, Kota Saito, Yasuhiro Araki, and Toshiaki Katada. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 41070-41078

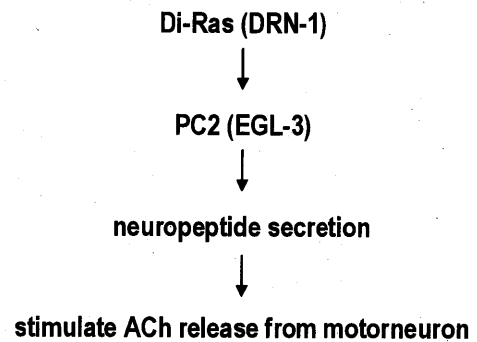


図6 本研究から想定されるモデル