

## 審査の結果の要旨

氏名 多田 稔

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 (Ras ファミリー蛋白質) が複数同定されている。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。「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」と題した本論文においては、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神経ペプチド放出における Ras ファミリー蛋白質の新たな役割を見出している。

### 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。ノザンブ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 ともに脳特異的に発現することが明らかになった。さらに、ゼブラフィッシュおよび線虫における Di-Ras の相同因子も神経細胞特異的な発現を示したことから、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。

### 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、ERK のリン酸化を指標に MAP キナーゼ経路への Di-Ras の関与について検討した。その結果、Di-Ras の過剰発現による ERK のリン酸化の亢進および抑制は認められなかった。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り、Di-Ras は既存の Ras とは異なり Raf-MAPK 経路の活性化に関与せず、異なるシグナル伝達経路に関与する可能性が考えられた。

### 3. Di-Ras は prohormone convertase 2 (PC2) と相互作用し、分泌小胞上で共局在する

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 convertase 2

(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、および両者が分泌小胞上において共局在することが示された。

#### 4. Di-Ras の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  $\beta$ -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。その結果、Di-Ras1 の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見出した。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考えられた。

#### 5. Di-Ras の線虫相同因子 *drn-1* 遺伝子の変異体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

Di-Ras の線虫相同因子である *drn-1* 遺伝子の変異体を用いて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結果、*drn-1* 変異体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。一方、アセチルコリン受容体のアゴニストである levamisole 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* 変異体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。また、Di-Ras と相互作用が認められた PC2 の線虫相同因子 *egl-3* の変異体との二重変異体を用いた解析により、Di-Ras が個体レベルにおいても PC2 の介在する神経ペプチドシグナルに介在する可能性を示した。

#### 6. DRN-1 の介在する神経ペプチドシグナルの線虫運動神経における作用点の検討

線虫運動神経においてアセチルコリン放出の制御に関与する三量体 G 蛋白質を介したシグナル経路と *drn-1* との遺伝学的相互作用の検討を行った結果、DRN-1 の介在する神経ペプチドシグナルが DAG 分解酵素 DGK-1 の上流、すなわち  $G\alpha_{12}$  相同因子 GPA-12 の共役する受容体を介して運動神経からのアセチルコリン放出を制御する可能性を見出した。

本論文から、新奇 Ras ファミリー蛋白質 Di-Ras が分泌小胞上で PC2 を介したペプチドホルモン分泌に促進的に働くことが明らかとなり、線虫において Di-Ras の介在する神経ペプチドシグナルが運動神経における  $G\alpha_{12}$ -DGK を介してアセチルコリン放出に促進的に働くというモデルが提示された。本論文は新奇 Ras ファミリー蛋白質 Di-Ras の機能解析により、神経ペプチド放出という Ras ファミリー蛋白質の介在する新たなシグナル伝達経路を明らかにしたことに加え、線虫においてこれまで不明であった神経ペプチドによる運動神経からのアセチルコリン放出メカニズムの理解に有用な知見を提供しており、博士(薬学)の学位として十分な価値があるものと認められる。