

論文の内容の要旨

論文題目 神経組織特異的に発現する低分子量 G 蛋白質

Di-Ras の生化学的性状の解析

氏名 蛭原 有紗

【序論】

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じて GDP と結合した不活性型から GTP と結合した活性型へと立体構造を変換することで、下流へとシグナルを伝達する分子スイッチとして機能している。

当研究室で単離同定した Di-Ras は、Ras ファミリー蛋白質の中でも独立したサブグループを形成する新奇の Ras ファミリー分子である。これまでの解析により、1) Di-Ras は線虫から哺乳動物まで広範な多細胞生物種において神経特異的に発現していること、2) 哺乳動物では Di-Ras1、Di-Ras2 のサブタイプが存在し、主に Di-Ras2 が発現していること、3) Di-Ras は典型的な Ras シグナル経路には関与しないこと、4) 線虫 Di-Ras 機能欠損変異体では運動神経からのアセチルコリン放出に異常が生じることが明らかになっている。しかし、この Di-Ras の哺乳動物での生理的役割や細胞内局在、及びその活性調節機構に関しては不明である。

Di-Ras2 は典型的な Ras ファミリー分子とは異なり、細胞質にも多く存在することが知られているが、本研究で私は、細胞質中の Di-Ras2 が SmgGDS というタンパク質と結合して存在することを見だし、その結合様式および SmgGDS が Di-Ras2 のグアニンヌクレオチド結合活性に与える影響を検討した。さらに SmgGDS が、Di-Ras2 の細胞膜と細胞質の間の移行に関与する可能性についても検討したので以下に報告する。

【方法と結果】

1. ラット脳における Di-Ras2 の局在解析

ラットにおいて Di-Ras2 は胎生期には殆ど発現しておらず、生後約7日目から発現が上昇し、成体において高発現となる。また、ラット成体脳組織を細胞質画分と膜画分に分け、ウェスタンブロットを行ったところ、Di-Ras2 は細胞質画分、膜画分の両方に存在していた(図1)。次に、ラットの海馬初代培養細胞に GFP-Di-Ras2 を発現させ、その細胞内局在を検討したところ、Di-Ras2 は細胞膜、細胞質全体に存在し、特定の細胞内領域に局限した局在は見られなかった。

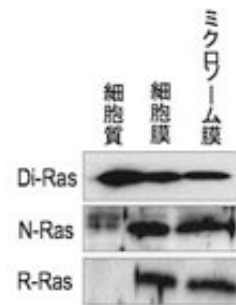


図1. Di-Ras は細胞質画分及び膜画分に存在する

2. 細胞質画分の Di-Ras2 は SmgGDS と結合している

一般的な Ras ファミリー蛋白質は C 末端の脂質修飾を介して細胞膜やオルガネラ膜にアンカーされて存在する。しかし、Di-Ras2 は細胞質にも多く存在していたことから、その局在様式について検討を行った。

初めに成体ラットの脳細胞質画分を、ゲル濾過カラムを用いた分離、精製を行なったところ、Di-Ras2 の大部分は単量体と想定されるよりも大きな分子量を示す画分に回収され、細胞質中で Di-Ras2 は何らかの複合体として存在していることが示唆された。そこで陰イオン交換カラム、ハイドロキシアパタイトカラム等を用いてさらに Di-Ras2 複合体と考えられる画分の精製を行ったところ、Di-Ras2 と挙動を共にする分子量約 60 kDa のタンパク質が存在することを見出した。そこで質量分析法による解析を行ったところ、そのタンパク質は SmgGDS であることが明らかとなった。また SmgGDS が Di-Ras2 と複合体を形成する可能性について検討する目的で、大腸菌から精製したリコンビナント蛋白質を用いたプルダウンアッセイを行なったところ、両者が直接相互作用することが分かった(図2)。

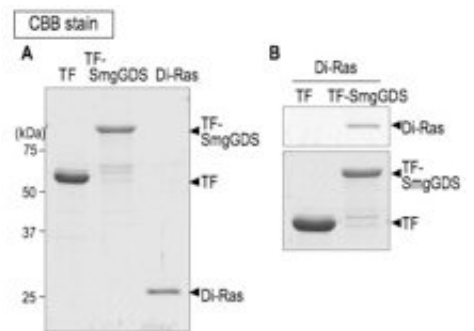
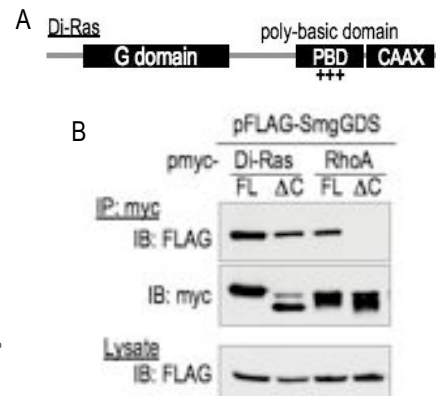


図2. Di-Ras と SmgGDS は直接相互作用する
A: 使用したリコンビナント蛋白質
B: TF 及び TF-SmgGDS を Di-Ras と混合し、TF (Trigger Factor) タグを用いてプルダウンした

3. Di-Ras2 は既存の低分子量 G 蛋白質とは異なる様式で SmgGDS と結合する

SmgGDS は RhoA や K-Ras など C 末端に塩基性アミノ酸に富む領域 (PBD: Poly-basic domain) をもつ低分子量 G 蛋白質と結合することや、それら低分子量 G 蛋白質の GDP-GTP 交換反応を促進するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF: Guanine-nucleotide exchange factor) として機能することが知られている。Di-Ras2 はその C 末端に PBD を有することから(図 3A)、Di-Ras2 と SmgGDS の結合が PBD を介しているかを検討した。まず、Di-Ras2 の PBD を含む C 末端を欠失した変異体を作製し、SmgGDS との相互作用を検討したところ、その欠失変異体も野生型と同様に SmgGDS と結合した(図 3B)。また、Di-Ras2 の C 末端を、H-Ras の C 末端 (PBD を有さない) に置き換えたキメラタンパク質を作製し、同様の検討を行ったところ、そのキメラタンパク質も SmgGDS と結合した。よって、Di-Ras2 と SmgGDS の相互作用は他の RhoA や



K-Ras などの低分子量 G 蛋白質と異なり、PBD に依存しないことが明らかとなった。

これまでの研究から、RhoA に関しては活性化型 (GTP 結合型) より不活性化型 (GDP 結合型) が、SmgGDS とより強固に結合することが知られている。そこで、Di-Ras2 のヌクレオチドフォームが SmgGDS との相互作用に与える影響を検討するため、Di-Ras2 の活性化型変異体 (G16V) および不活性化型変異体 (S21N) の SmgGDS との結合を検討した。その結果、いずれの変異体も野生型と同様に SmgGDS と結合した (図 3C)。よって、両者の相互作用は Di-Ras2 のヌクレオチドフォームに依存しないことが分かった。以上の結果から、Di-Ras2 と SmgGDS との相互作用は、既知の SmgGDS 結合タンパク質とは異なる様式であることが示唆された。

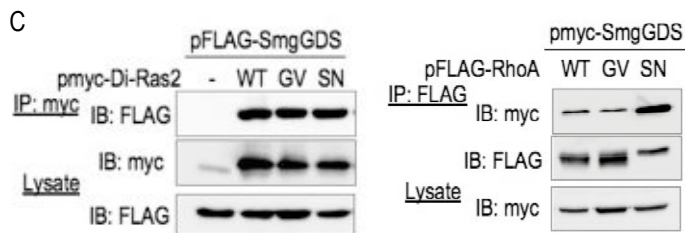


図3. Di-Ras は既存の SmgGDS の基質とは異なる様式で結合する

4. SmgGDS は Di-Ras のヌクレオチド結合能を低下させる

SmgGDS は各種低分子量 G 蛋白質に対して GEF 活性を有することが知られていることから、SmgGDS が Di-Ras2 に対して GEF 活性を示すかを、精製タンパク質を用いて検討した。まず Di-Ras2 に結合した GDP の解離速度を示標にして、SmgGDS の GEF 活性を評価したところ、SmgGDS は Di-Ras2 の GDP 解離速度に影響を与えず、Di-Ras2 に対して GEF 活性を有さないことが示唆された (図 4A)。一方 Di-Ras2 に対する GTP γ S の結合実験において、SmgGDS の添加により平衡状態に達した際の GTP γ S 結合量の減少が見られた (図 4B)。そこで Di-Ras2 の GTP γ S に対する親和性を検討したところ、SmgGDS の存在下ではその親和性が低下することが分かった (GTP γ S に対する K_d 値は、SmgGDS 非存在下で 0.26 μ M、存在下で >1 μ M)。以上の結果から、SmgGDS は Di-Ras2 のヌクレオチド結合能を低下させる作用があると考えられた。

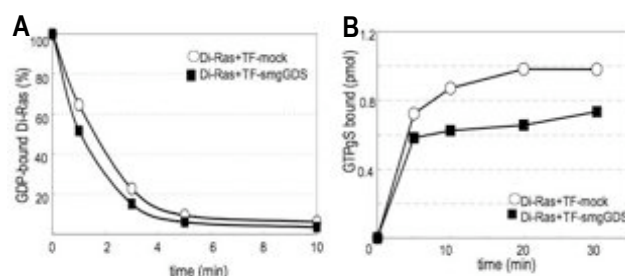


図4. SmgGDS は Di-Ras の GTP への親和性を低下させる (A) GDP の解離 (B) GTP γ S との結合

5. SmgGDS は Di-Ras を膜から細胞質へ移行させる

一般的に Ras ファミリー蛋白質は、膜画分において活性化型 (GTP 結合型) となり、エフェクター分子を介して機能を発揮すると考えられている。SmgGDS が細胞質中で Di-Ras2 と結合し、その GTP γ S に対する親和性を低下させる作用を示したことから、SmgGDS は Di-Ras2 の膜局在性の制御を介して、その活性調節に関与している可能性が考えられた。そこで、SmgGDS が Di-Ras2 の細胞内局在に与える影響について検討する目的で、Di-Ras2 を含むラット脳細胞膜画分にリコンビナント SmgGDS を加えてインキュベートした。その結果、

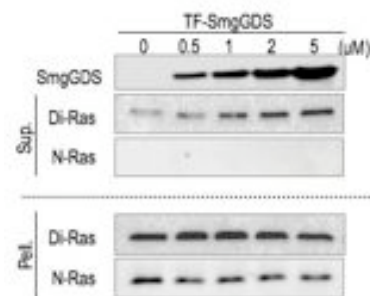


図5. SmgGDS の添加により膜中の Di-Ras が遊離する膜画分とリコンビナント SmgGDS をインキュベートした後、超遠心により上清 (sup) と沈殿 (pell) に分けた

SmgGDS の濃度依存的に Di-Ras2 が細胞膜から遊離することを見いだした(図 5)。よって、SmgGDS との結合によって、Di-Ras2 の膜局在性が変化する可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究において私は、新奇 Ras ファミリー G 蛋白質 Di-Ras2 の細胞質における存在状態を検討した。その結果、Di-Ras2 は細胞質において SmgGDS と複合体を形成していることを見出した。その結合は、SmgGDS との結合が知られる他の低分子量 G 蛋白質とは異なる結合様式であり、SmgGDS は Di-Ras2 に対して GEF 活性を示さず、むしろ Di-Ras2 の GTP 結合親和性を低下させる作用を有することを見いだした。

一般的に Ras ファミリー G 蛋白質は GDP に対する結合親和性が高く、GEF の作用によって GDP の解離が起こり、グアニンヌクレオチド交換反応が促進されることで、GTP を結合した活性化型となる。Di-Ras2 はこれまでの研究から、そのグアニンヌクレオチド交換反応が非常に早いことや、GDP よりも GTP に対する親和性が高く、定常状態においても細胞内で主に GTP 型で存在することが報告されている。これらの知見を併せて考えると、Di-Ras2 は SmgGDS との結合によって GTP やエフェクターとの結合が抑制された状態で細胞質に留められており、何らかの刺激に応じて SmgGDS との結合が解除されると、細胞膜への移行および GTP の結合が起こることでエフェクターに作用し、その後は再び SmgGDS と結合することで膜から遊離するという全く新しい制御モデルが想定される。

生理的条件下における Di-Ras2 の活性化のタイミングは現在のところ不明であるが、近年 Di-Ras2 がカルモジュリンと結合するという報告もなされ、Ca²⁺シグナルへの関与が示唆されている。今後、Ca²⁺シグナルが Di-Ras2 と SmgGDS の相互作用に与える影響や、Di-Ras2 のエフェクター分子を明らかにすることを通じて、Di-Ras2 を介した神経伝達物質の放出制御の詳細な分子メカニズムが解明されることが期待される。