

審査の結果の要旨

氏名 蛭原有紗

低分子量 G 蛋白質は、上流からの刺激に応じて GDP が結合した不活性型から GTP が結合した活性型へと構造を変換し、下流にシグナルを伝える分子スイッチとして多様な生理応答の制御に介在している。新奇 Ras ファミリー G 蛋白質である Di-Ras は、これまでの解析から、多様な動物種の神経系において特異的に発現すること、典型的な Ras シグナルには関与しないこと、さらに、線虫においては、運動神経からのアセチルコリンの放出に関与することが明らかにされてきたが、その活性がどのように調節されるのかは不明であった。「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」と題した本論文は、Di-Ras2 が細胞質において別種の蛋白質 SmgGDS と複合体を形成することで、活性化に重要な膜への局在および GTP との結合が抑制され、典型的な Ras ファミリー蛋白質とは異なる活性制御を受けることを見出している。

1. 細胞質画分の Di-Ras2 は SmgGDS と結合している

一般に Ras 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 の膜局在性を調べるため、ラットの脳ライセートを細胞質画分と膜画分に分けてウェスタンブロットを行ったところ、Di-Ras2 は両方の画分に存在していた。そこで細胞質での局在様式を検討するため、細胞質画分に対してゲルろ過カラムを用いた分離、精製を行った結果、Di-Ras2 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た。さらに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 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 の蛋白質が存在することを見出した。質量分析法による解析を行った結果、その蛋白質は SmgGDS であることが明らかとなった。また、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から、両者が直接相互作用することが見出された。

2. 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 蛋白質と結合し、それらの低分子量 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、Di-Ras2 と SmgGDS の結合が PBD を介しているかを検討した。その結果、PBD を含む C 末端を欠失した Di-Ras2 変異体も野生型と同様に SmgGDS と結合した。

またこれまでの研究から、RhoA に関しては活性型 (GTP 結合型) より不活性型 (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した結果、Di-Ras2 の活性型変異体 (G16V) および

不活性型変異体 (S21N) は、いずれも野生型と同様に SmgGDS と結合した。以上の結果から、Di-Ras2 と SmgGDS との相互作用は、既知の SmgGDS 結合蛋白質とは異なる様式であることが示された。

3. SmgGDS は Di-Ras2 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、精製リコンビナントタンパク質を用いて検討した。まず Di-Ras2 に結合した GDP の解離速度を指標にして、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めされた。一方、非水解性 GTP アナログである GTP γ S の Di-Ras2 へ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。そこで GTP γ S に対する Di-Ras2 の親和性を測定した結果、SmgGDS の存在下ではその親和性が低下することが見出された (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 のグアニンヌクレオチド結合能を低下させる作用があることが見出された。

4. SmgGDS は Di-Ras2 を膜から細胞質へ移行させる

一般的に Ras ファミリー G 蛋白質は、膜画分において活性型 (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、活性調節に関与している可能性が考えられた。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、内在性の 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ところ、SmgGDS の濃度依存的に Di-Ras2 が細胞膜から遊離することを見出した。すなわち、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めされた。

一般に Ras ファミリー G 蛋白質は、細胞膜において GDP が結合した不活性な状態で存在しており、GEF の作用によってグアニンヌクレオチド交換反応が促進されることで、GTP が結合した活性型となる。一方 Di-Ras2 は、1) 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不活性状態で細胞質に留められており、2) 何らかの刺激によって SmgGDS との結合が解除されると、細胞膜への移行および GTP の結合が起こり、3) この GTP 結合 Di-Ras2 はエフェクターに作用し、その後再び SmgGDS と再結合して膜から遊離する、という全く新しい活性制御モデルが想定される。以上を要するに、本論文は Ras ファミリー蛋白質の制御機構について、新たに重要な知見を提示しており、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。