



Identification of Ce-AF-6, a novel *Caenorhabditis elegans* protein, as a putative Ras effector

渡, 康弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1871

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001871>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	渡 康 弘 ^{わたり やす ひろ} （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1185号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成11年3月31日
学位論文題目	Identification of Ce-AF-6, a novel <i>Caenorhabditis elegans</i> protein, as a putative Ras effector (線虫新規蛋白質 Ce-AF-6 の Ras 標的蛋白質候補としての同定)

審査委員	主査 教授 片岡 徹	
	教授 横山 光宏	教授 山村 博平

論文内容の要旨

はじめに

低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras は、増殖・分化を含む様々な生命過程を制御する分子スイッチとして機能している。近年、哺乳動物において Ras は、セリン／トレオニンキナーゼ Raf-1, RalGDP 解離促進因子 RalGDS, ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ等の複数のエフェクター分子（Ras エフェクター）に直接接合することにより、その作用を発揮することが明らかにされている。

線虫セノラプディティス・エレガンス（*Caenorhabditis elegans*, 以下 *C. elegans*）は、1,000個に満たない体細胞からなる小動物であるが、哺乳動物細胞で重要な働きを演じているシグナル伝達経路の多くを備えている。*C. elegans* の Ras 蛋白質は *let-60* 遺伝子によりコードされており、その下流には Raf 蛋白質である LIN-45が位置し、陰門形成等を制御していることが、遺伝学的手法により詳細に解明されている。しかし *C. elegans* においては、Raf (LIN-45) 以外の Ras エフェクターについてはほとんど明らかにされていなかった。今回我々は、*C. elegans* においても哺乳動物と同様に複数の Ras エフェクターが存在すると考え、LET-60蛋白質に結合する *C. elegans* 蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングした。その結果、ヒト AF-6 に類似の構造をもつ分子量約200kDa の新規 Ras 結合蛋白質 Ce-AF-6 が同定された。

実験方法と結果

1. Ce-AF-6 のクローニング

LET-60の活性型変異体 (LET-60^{val-12}) を“bait (釣り餌)”として、酵母 two-hybrid 法により *C. elegans* の cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングした。その結果 LIN-45, RalGDS ホモログをコードするものを含む70個の独立した cDNA クローンを得た。DNA シーケンスを決定した結果、その中の2個 (pACT16-1, pACT16-2) はオーバーラップする cDNA インサートを持つクローンであった。これらは新規 Ras 結合蛋白質の N 末端付近の領域をコードしていた。また、pACT16-1 の BLASTN ホモロジーサーチを行い、EST (expressed sequence tag) クローンの ykl32f 1 がこの蛋白質の C 末端部位をコードする cDNA を持つことが判明した。*C. elegans* の mRNA の 5' 末端に高頻度に存在する

spliced leader sequence (SL1) と pACT16-1 の塩基配列に基づいてプライマーを作成し、鋳型として *C. elegans* の cDNA ライブラリーを用いて行った PCR により、N 末端領域をコードする塩基配列も得られた。その結果、この cDNA は全体として 1666 アミノ酸よりなる蛋白質をコードしていることが明らかとなった。得られた配列に基づきジゴキシゲニンで標識した DNA プローブを作成し、*C. elegans* の野生株 (BristolN2) より調整した poly(A)⁺RNA を用いてノーザンブロット解析を行ったところ、約 5.7kb のサイズの単一の mRNA の発現が証明された。データベース検索 (BLAST) により、この蛋白質は、ヒト AF-6、ラット Afadin、ショウジョウバエの Canoe と構造的に高い相同性を持ち、Ras-associating domain (RA ドメイン) と呼ばれる領域が 2 ヶ所並んで存在し、PDZ domain (PSD-95/DlgA/ZO-1 domain) が 1 ヶ所存在していた。RA ドメインは、RalGDS や我々が最近 Ras 結合蛋白質として同定した PLC210 の Ras 結合部位間に保存されているモチーフとして最近 Ponting らが提唱したもので、約 100 アミノ酸残基からなる。また PDZ ドメインは細胞間結合部位に存在する蛋白質の多くに認められ、蛋白質間の相互作用を仲介すると考えられている。この新規 Ras 結合蛋白質の RA ドメインと PDZ ドメインは、ヒト AF-6、Afadin、Canoe のそれらに高い相同性を持っていたため、我々はこの蛋白質を Ce-AF-6 と命名した。

2. Ce-AF-6 と Ras の結合様式の解析

Ce-AF-6 の Ras 結合部位を決定するために、二つの RA ドメインのうち N 末端側の一つのみを含むアミノ酸残基 1-130 番の領域について、LET-60 結合能を酵母 two-hybrid 法を用いて検討した。その結果、N 末端側の RA ドメインのみでも Ras 結合能を有することが明らかになった。

Ce-AF-6 の N 末端側のアミノ酸残基 1-583 番の領域を、マルトース結合蛋白質 (MBP) との融合蛋白質として大腸菌内で発現させ精製したもの [MBP-Ce-AF-6 (1-583)] について、Sf9 昆虫細胞で発現させ精製したヒト Ha-Ras 蛋白質と試験管内で直接接合するかどうかを検討した。その結果 MBP-Ce-AF-6 (1-583) GTP 依存性に Ha-Ras に結合することが分かった。

3. Ce-AF-6 との結合における Ras 蛋白質のエフェクター領域の役割の解析

Ce-AF-6 (pACT16-1) と、Rap1A, RalA, RhoA, Rac1, Cdc42 などの Ras 以外の低分子量 GTP 結合蛋白質との結合を、酵母 two-hybrid 法を用いて検討した。その結果 Ce-AF-6 は、Ras と同一のエフェクター領域を持つ Rap1A とは結合したが、その他の蛋白質とは結合しなかった。

Ras 蛋白質はそのエフェクター領域 (Ha-Ras ではアミノ酸残基 32-40 番に相当) においてエフェクター分子と結合することが知られている。Ce-AF-6 との結合におけるエフェクター領域の役割を解析するため、同領域に様々の一アミノ酸置換変異を導入した Ha-Ras と Ce-AF-6 (pACT16-1) との結合を酵母 two-hybrid 法を用いて検討した。その結果、いずれの Ha-Ras 変異体も Ce-AF-6 とは結合しなかった。Raf, RalGDS, PLC210, 分裂酵母 Byr2, 出芽酵母アデニル酸シクラーゼ等の他の Ras エフェクター蛋白質と比較して、Ce-AF-6 は Ras のエフェクター領域のアミノ酸配列に対しても最も厳密な要求性を有している事が判明した。

考察

ヒト AF-6 は、急性白血病において染色体転座により ALL-1 遺伝子と融合した遺伝子として同定された。しかし、この融合遺伝子の細胞の形質転換における役割については、ほとんど明らかにされていない。しかしショウジョウバエより同定された Canoe や、最近ラットより同定された Afadin についての研究により、この AF-6 の蛋白質ファミリーは細胞内シグナル伝達経路に関係しているものと考えられている。すなわち Canoe は、細胞間結合部位に存在し、レセプター型の蛋白質である Notch 蛋白質の下流に位置しているものと考えられている。また、Afadin はアクチンと結合し、細胞

間結合部位に多く存在している。以上のことを考え合わせると、この蛋白質ファミリーは細胞間結合部位における、Notch に仲介されるシグナル伝達経路に関係しているものと思われる。

結語

今回我々は、酵母 two-hybrid 方を用いたスクリーニングにより、Ce-AF-6 を LET-60 (Ras) 結合蛋白質として同定した。この Ce-AF-6 が GTP 依存性に直接 Ras 蛋白質に結合すること、その結合が Ras 蛋白質のエフェクター領域の一部変異により失われることにより、Ce-AF-6 は線虫における新たな Ras エフェクターであることが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras は、増殖・分化を含む様々な生命過程を制御する分子スイッチとして機能している。近年、哺乳動物において Ras は、Raf-1, RalGDP 解離促進因子、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ等の複数のエフェクター分子に直接接合することにより、その作用を発揮することが明らかにされている。線虫 *Caenorhabditis elegans*, (*C. elegans*) は、1,000個に満たない体細胞からなる小動物であるが、哺乳動物細胞で重要な働きを演じているシグナル伝達経路の多くを備えている。*C. elegans* の Ras 蛋白質は *let-60* 遺伝子によりコードされており、その下流には Raf 蛋白質である LIN-45が位置し、陰門形成等を制御していることが、遺伝学的手法により詳細に解明されている。しかし *C. elegans* においては、LIN-45以外の Ras エフェクターについてはほとんど明らかにされていなかった。本学位申請者は、*C. elegans* においても哺乳動物と同様に複数の Ras エフェクターが存在すると考え、LET-60蛋白質に結合する *C. elegans* 蛋白質を検索した結果、分子量約200kDa の新規 Ras 結合蛋白質 Ce-AF-6 を同定し、その構造と性質を解析した。

本研究者は、LET-60 Ras を “bait (釣り餌)” として、酵母 two-hybrid 法により *C. elegans* の cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングした。その結果、LIN-45や RalGDS ホモログをコードするものを含む70個の独立した cDNA クローンを得、その中の2個は新規 Ras 結合蛋白質の N 末端付近をコードしていた。さらに全長 cDNA のクローニングに成功し、本蛋白質が1666アミノ酸より成ることを明らかにした。またノーザンブロット解析により *C. elegans* の野生株において cDNA の長さに対応する約5.7kb のサイズの単一 mRNA の発現が証明された。

データベース検索により、この蛋白質は、ヒト AF-6, ラット Afadin, ショウジョウバエ Canoe と構造的に高い相同性を持ち Ce-AF-6 と命名された。本蛋白質は RA (Ras-associating) ドメインを2つ、PDZ (PSD-95/DlgA/ZO-1) ドメインを1つ有していた。RA ドメインは、RalGDS や本研究者が最近 Ras 結合蛋白質として同定した PLC210の Ras 結合部位に保存されているモチーフとして提唱されたもので、約100アミノ酸残基からなる。また PDZ ドメインは細胞間結合部位に存在する蛋白質の多くに認められ、蛋白質間の相互作用を仲介すると考えられている。

次に、本研究者は、Ce-AF-6 を大腸菌内で発現して精製し、ヒト Ha-Ras 蛋白質と試験管内で GTP 依存性に直接結合することを証明し、さらに Ce-AF-6 の Ras 結合部位を決定して、2つの RA ドメインのうち N 末端側の1つのみで Ras 結合能力を有することを示した。

また、Rap 1 A, RalA, RhoA, Rac 1, Cdc42 などの Ras 以外の低分子量 GTP 結合蛋白質との結合を検討した結果、Ce-AF-6 は、Ras と同一のエフェクター領域を持つ Rap 1 A とは結合したが、その他の蛋白質とは結合しなかった。

Ras 蛋白質はそのエフェクター領域 (Ha-Ras ではアミノ酸残基32-40番に相当) においてエフェク

ター分子と結合することが知られている。Ce-AF-6 との結合におけるエフェクター領域の役割を解析するために、同領域に様々の1アミノ酸置換変異を導入した Ha-Ras と Ce-AF-6 との結合を検討した結果、いずれの Ha-Ras 変異体も Ce-AF-6 とは結合しなかった。この結果より、Raf, RalGDS, PLC 210, 分裂酵母 Byr 2, 出芽酵母アデニル酸シクラーゼ等の他の Ras エフェクター蛋白質と比較して、Ce-AF-6 は Ras のエフェクター領域のアミノ酸配列に対して最も厳密な要求性を有していることが示された。

ヒト AF-6 は、急性白血病において染色体転座により ALL-1 遺伝子と融合した遺伝子として同定されたが、細胞の形質転換における役割については不明である。しかしショウジョウバエの Canoe や、ラットの Afadin についての研究により、AF-6 の蛋白質ファミリーは細胞間結合部位におけるシグナル伝達経路に関係しているものと思われる。

本研究は Ras 癌遺伝子産物について、その線虫における機能を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった新しいエフェクターの存在について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。