



Characterization of a Novel Ras-Binding Protein Ce-FLI-1 Comprising Leucine-Rich Repeats and Gelsolin-Like Domains

五島, 正裕

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1989

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001989>

※ 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）	ごしま まさ ひろ 五 島 正 裕	（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1233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	Characterization of a Novel Ras-Binding Protein Ce-FLI-1 Comprising Leucine-Rich Repeats and Gelsolin-Like Domains （ロイシンリッチリピートドメインとゲルゾリン様ドメインから成る新規 Ras 結合タンパク質 Ce-FLI-1 の解析）	
審査委員	主査 教授 片 岡 徹 教授 黒 田 嘉 和 教授 松 尾 雅 文	

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

低分子 GTP 結合蛋白質 Ras は酵母から哺乳動物に至るまで保存されており、細胞膜受容体の活性化から核内での遺伝子発現に至るシグナル伝達を制御している。また、*ras* 癌遺伝子により形質転換した細胞の表現型から、Ras はアクチン細胞骨格の制御にも関与すると考えられる。Ras は受容体の活性化に伴って不活性型（GDP 結合型）から活性型（GTP 結合型）に変換され、種々のエフェクター蛋白質に結合してそれらを活性化する。Ras のエフェクターとしては、哺乳動物では Raf-1, B-Raf, RalGDS, PI3-キナーゼ, 出芽酵母ではアデニル酸シクラーゼ, 分裂酵母では Byr2 等が知られている。

酵母アデニル酸シクラーゼの Ras 結合領域は、ロイシンに富む23アミノ酸単位配列の反復構造（ロイシンリッチリピート, LRRs）を持ち、その立体構造は哺乳動物の Raf-1 や RalGDS の Ras 結合領域のそれ（ユビキチンフォールド）とは大きく異なると推測される。しかし、最近、哺乳動物の RSP-1 や線虫 *C. elegans* の SUR-8 等、高等生物においても LRRs ドメインを持つ蛋白質が Ras を介するシグナル伝達に関与することが明らかになってきた。今回我々は、線虫 *C. elegans* から LRRs ドメインを持つ新規 Ras 結合蛋白質（Ce-FLI-1）を見出し解析した。FLI-1 は線虫、ショウジョウバエ、ヒトの間で保存されており、アクチン結合蛋白質ゲルゾリンに対して相同性の高い領域（ゲルゾリン様ドメイン）をも持つことから、多くの生物において Ras によるアクチン細胞骨格の制御に関与している可能性がある。

実験方法と結果

Ce-FLI-1 の遺伝子クローニング

線虫 *C. elegans* のゲノムシーケンズプロジェクトにおいて、酵母アデニル酸シクラーゼの LRRs のドメインに極めて相同性の高いペプチドをコードする DNA 配列が見い出された。この配列をプローブとして線虫 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、1257アミノ酸をコードする全長 cDNA を得たが、この遺伝子はショウジョウバエ *flightless-1 (fli-1)* 遺伝子の線虫ホモログ（*Ce-fli-1*）であ

ることが判明した。Ce-FLI-1 蛋白質は、N 末端側の LRRs ドメインと C 末端側のゲルゾリン様ドメインの二つのドメインからなる蛋白質であった。Ce-FLI-1 をウサギに免疫して得た抗体は、ウエスタンイムノブロット法において予想通り 140kDa の線虫蛋白質を検出した。

Ce-FLI-1 の Ras 結合活性

1) Ce-FLI-1 の LRRs ドメインと GTP 型または GDP 型のヒト Ha-Ras との結合を試験管内で検討した。Ce-FLI-1 LRRs ドメインは *in vitro* 転写/翻訳システムにより作成し、Ha-Ras は glutathione S-transferase (GST) との融合蛋白質 (GST-Ha-Ras) として大腸菌で発現し glutathione agarose レジンに固定した。

Ce-FLI-1 LRRs ドメインは GTP 型 GST-Ha-Ras, GDP 型 GST-Ha-Ras の両方と結合した (GTP 非依存性結合)。一方、対照として用いた B-Raf は GTP 型 GST-Ha-Ras に選択的に結合した (GTP 依存性結合)。また、同じ条件下では、Ce-FLI-1 LRRs ドメインは他の低分子量 GTP 結合蛋白質 (GST-Rac 1, -RhoA, -Cdc42, -RalA) とは結合しなかった。

2) 精製した酵母 RAS 2 蛋白質は、試験管内で酵母アデニル酸シクラーゼを活性化することが出来るが、その系に精製した GST-Ce-FLI-1 (全長) を加えると、用量依存性にアデニル酸シクラーゼの活性化が阻害された。しかし、GST-Ce-FLI-1 から LRRs ドメインを削ると、阻害効果は失われた。阻害パターンのカイネティックな解析から、GST-Ce-FLI-1 が RAS 2 蛋白質に直接結合してアデニル酸シクラーゼの活性化を競合阻害していることが明らかとなった。また、結合の解離定数 (K_d) は 11nM 前後と計算された。

3) RAS 2 遺伝子に活性化型変異を持つ酵母株は熱ショック感受性という表現型を示すが、Ce-FLI-1 を過剰発現させると熱ショック感受性は失われた。しかし、LRRs ドメインを持たない Ce-FLI-1 を過剰発現させても熱ショック感受性には影響しなかった。

Ce-FLI-1 のアクチン結合・切断活性

1) Ce-FLI-1 は agarose レジンに固定された G アクチン (アクチンモノマー) に結合した。ゲルゾリンの G アクチン結合活性は mM レベルの Ca^{2+} を必要とするが、Ce-FLI-1 は必要としなかった。

2) F アクチン (アクチンポリマー) は超遠心により沈殿するが、Ce-FLI-1 (ゲルゾリン様ドメイン) を F アクチンと共にインキュベートしたのち超遠心にかけて、Ce-FLI-1 は F アクチンと共に沈殿した。この結果は Ce-FLI-1 が F アクチンにも結合することを示していた。

3) 同じ実験系においてアクチンに対する Ce-FLI-1 のモル比を増加させると、アクチンも Ce-FLI-1 も沈殿しなくなった。電子顕微鏡で観察すると、F アクチンは消失し、その断片 (アクチンオリゴマー) のみが認められた。これらの結果は Ce-FLI-1 が F アクチン切断活性を持つことを示唆した。

考察

Ras 結合モジュールとしての LRRs ドメイン

近年多くの Ras エフェクターあるいはエフェクター候補が見つかったが、いずれも GTP 依存性に Ras と結合し、LRRs ドメインを持つ酵母アデニル酸シクラーゼも例外ではない。これに対して、Ce-FLI-1 LRRs ドメインと Ras との結合は GTP 非依存性であり、Ce-FLI-1 は典型的な Ras エフェクターとは考えにくい。しかし、Ras との結合が GTP 非依存性であっても LRRs ドメインを持つ蛋白質が Ras を介するシグナル伝達に関与する例が最近見つかってきている。例えば、SUR-8 は Ras による線虫の陰門形成に必須であるが、GTP 型 Ras, GDP 型 Ras のいずれとも結合する。

20-28アミノ酸の単位配列からなる LRRs ドメインは多数の蛋白質でみつかっており、それらが多彩な蛋白質間相互作用を仲介することはよく知られている。しかし、酵母アデニル酸シクラーゼ, SUR-8, RSP-1 および Ce-FLI-1 の LRRs ドメインは23アミノ酸の特異なコンセンサス配列 (PXXaXXLXXLXXLXLNXLXXa; a 脂脂肪酸アミノ酸) を持つサブグループを形成しており、このサブグループに属する LRRs ドメインのみが Ras 結合モジュールとして機能する可能性がある。Ras との結合が GTP 依存性であるか非依存性であるかは、非コンセンサスアミノ酸の性質によって規定されているのかもしれない。

Ce-FLI-1 と Ras の結合は GTP 非依存性であったが、その結合親和性は高く、 K_d 値は Raf-1 や Byr 2 等の Ras エフェクターのそれに匹敵する。さらに、Ce-FLI-1 が酵母細胞において活性化型変異 RAS 2 遺伝子による表現型を抑圧したことは、Ce-FLI-1 が細胞内でも Ras と結合して Ras を介するシグナル伝達を制御する可能性を示唆する。一方、最近、FLAP や TRIP といった新規蛋白質がヒト FLI-1 の LRRs ドメインと結合するという報告がなされているが、これらの蛋白質の機能は全く不明である。

ゲルゾリン様ドメインの活性とその制御機構

Ce-FLI-1 の C 末端領域はゲルゾリンと高い相同性を持つが、ゲルゾリンのような Ca^{2+} 結合モチーフを持たず、Ce-FLI-1 のゲルゾリン様ドメインが Ca^{2+} による制御を受けないという実験結果と一致する。最近、ヒト FLI-1 の G アクチン結合活性が報告されているが、 Ca^{2+} 依存性の有無は検討されていない。

Ce-FLI-1 が F アクチン結合・切断活性を持つことは、FLI-1 がアクチン細胞骨格の崩壊と再構築というダイナミックな現象に関与することを示唆する点でさらに興味深い。実際、Ce-*fli-1* mRNA (4.8kb) は線虫の形態形成期に最も強く発現しており、*fli-1* 遺伝子がショウジョウバエの初期発生や飛行筋形成におけるアクチン線維の構築に関与するという報告とも矛盾しない。また、最近 Smith-Magnis 症候群患者において *fli-1* 遺伝子の欠損が報告されているが、同症候群には種々の形態形成異常が見られる。

LRRs ドメインとゲルゾリン様ドメインの機能的な関連は未だ不明である。しかし、LRRs ドメインが Ras と結合することから、この結合による Ce-FLI-1・Ras 複合体の形成がゲルゾリン様ドメインの活性を調節している可能性が考えられる。また、SUR-8 や RSP-1 は scaffold 蛋白質として Ras および Raf と三者複合体を形成すると考えられており、Ce-FLI-1 LRRs ドメインが Ras および Ras エフェクターと三者複合体を形成する可能性もある。例えば、Ras エフェクター候補の一つである PKC ζ がその複合体の一部となれば、ゲルゾリン様ドメインがリン酸化され活性化されることも考えられる。この場合、PKC ζ と Ras との結合は GTP 依存性であるため、ゲルゾリン様ドメインは Ras が GTP 型である時にのみ選択的に活性化されることになる。

おわりに

アクチン細胞骨格に対する Ras の作用の幾つかは Rac 1 や RhoA 等の他の低分子量 GTP 結合蛋白質を介すると考えられてるが、Ras 自身が直接アクチン細胞骨格の制御に関与している可能性もある。FLI-1 が細胞内でアクチン細胞骨格に対する Ras の直接作用を仲介する可能性について、今後さらに解析を進める必要がある。線虫 *C. elegans* は遺伝子操作が迅速に行えるモデル生物であり、生化学的解析に加えて遺伝学的解析が強力な解析手段となり得る。

論文審査の結果の要旨

低分子 GTP 結合蛋白質 Ras は酵母から哺乳動物に至るまで保存されており、細胞膜受容体の活性化から核内での遺伝子発現に至るシグナル伝達を制御している。また、*ras* 癌遺伝子により形質転換した細胞の表現型から、Ras はアクチン細胞骨格の制御にも関与すると考えられる。Ras のエフェクターは、哺乳動物では Raf, RalGDS, PI3 キナーゼ等であるが、出芽酵母ではアデニル酸シクラーゼであることが知られている。酵母アデニル酸シクラーゼの Ras 結合領域は、ロイシンに富む23アミノ酸単位配列の反復構造（ロイシンリッチリピート, LRRs）を持ち、その高次構造は哺乳動物の Raf や RalGDS の Ras 結合領域のそれ（ユビキチンフォールド）とは大きく異なると推測される。本研究者は、線虫 *C.elegans* から酵母アデニル酸シクラーゼと類似した LRRs ドメインを持つ新規 Ras 結合蛋白質（Ce-FLI-1）を見出し解析した。

線虫 *C. elegans* のゲノムシーケンズプロジェクトにおいて、酵母アデニル酸シクラーゼの LRRs のドメインに極めて相同性の高いペプチドをコードする DNA 配列が見い出された。本研究者は、この配列をプローブとして線虫 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、1257アミノ酸をコードする全長 cDNA を得たが、この遺伝子はショウジョウバエ *flightless-1* (*fli-1*) 遺伝子の線虫ホモログであることが判明した。Ce-FLI-1 蛋白質は、N 末端側の LRRs ドメインと C 末端側のゲルゾリン様ドメインの二つのドメインからなる蛋白質であった。Ce-FLI-1 をウサギに免疫して得た抗体は、予想通り 140kDa の線虫蛋白質を検出した。

Ce-FLI-1 の LRRs ドメインとは試験管内でヒト Ha-Ras と GTP 非依存性に結合したが、他の低分子量 GTP 結合蛋白質とは結合しなかった。さらに、Ce-FLI-1（全長）による Ras 依存性酵母アデニル酸シクラーゼ活性の競合阻害パターンからの反応速度論的解析から、結合の解離定数 (*K_d*) は 11nM 前後と計算された。RAS 2 遺伝子に活性化型変異を持つ酵母株は熱ショック感受性という表現型を示すが、Ce-FLI-1 を過剰発現させると熱ショック感受性が失われ、Ce-FLI-1 と Ras と *in vivo* での結合が証明された。

一方、Ce-FLI-1 のゲルゾリン用ドメインは G-アクチン結合能力を有していた。ゲルゾリンの G-アクチン結合活性は mM レベルの Ca²⁺ を必要とするが、Ce-FLI-1 は必要としなかった。更に、超遠心沈殿法および電子顕微鏡による観察から、Ce-FLI-1 が F-アクチンと結合して切断する活性も有することが示された。

Ce-FLI-1 LRRs ドメインと Ras との結合は GTP 非依存性であり、Ce-FLI-1 は典型的な Ras エフェクターとは考えにくい。しかし、Ce-FLI-1 と Ras との結合親和性は高く、*K_d* 値は Raf 等の Ras エフェクターのそれに匹敵した。最近、Ras との結合が GTP 非依存性であっても LRRs ドメインを持つ蛋白質が Ras を介するシグナル伝達に関与する例が見つかってきており、線虫の陰門形成に必須である SUR-8 等が例として挙げられる。20-28アミノ酸の単位配列からなる LRRs ドメインは多数の蛋白質でみつかっており、多彩な蛋白質間相互作用を仲介することが知られている。しかし、酵母アデニル酸シクラーゼ、SUR-8、RSP-1 および Ce-FLI-1 の LRRs ドメインは 23アミノ酸の特異なコンセンサス配列（PXXaXXLXXLXXLXNLXXα; α は脂肪族アミノ酸）を持つサブグループを形成しており、このサブグループに属する LRRs ドメインのみが Ras 結合モジュールとして機能する可能性がある。

Ce-*fli-1* mRNA (4.8kb) は線虫の形態形成期に最も強く発現しており、Ce-FLI-1 が F-アクチ

ン結合・切断活性を持つことは、アクチン細胞骨格の崩壊と再構築というダイナミックな現象に関与することを示唆する点で興味深い。また、最近 Smith-Magenis 症候群患者において *fli-1* 遺伝子の欠損が報告されているが、同症候群には種々の形態形成異常が見られる。LRRs ドメインとゲルゾリン様ドメインの機能的な関連は未だ不明である。SUR-8 や RSP-1 は scaffold 蛋白質として Ras および Raf と三者複合体を形成するとされており、Ce-FLI-1 が Ras および Ras エフェクターと三者複合体を形成してシグナル伝達を制御する可能性が考えられる。線虫 *C.elegans* は遺伝子操作が迅速に行えるモデル生物であり、生化学的解析に加えて遺伝学的解析が強力な解析手段となり得る。

本研究は、LRRs ドメインを有する線虫の新規蛋白質 FLI-1 について、その機能を研究したものであるが、従来未解明であった Ras 結合能力と F-アクチン切断活性を証明したものとして価値ある集積であると認める。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。