

Title	Regulation Mechanism of ERM Protein/Plasma Membrane Association : Possible Involvement of Phosphatidylinositol Turnover and Rho-dependent Signaling Pathway
Author(s)	Hirao, Motohiro
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3119666
DOI	10.11501/3119666
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	平 尾 素 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 4 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 12 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Regulation Mechanism of ERM Protein/Plasma Membrane Association: Possible Involvement of Phosphatidylinositol Turnover and Rho-dependent Signaling Pathway (ERM 蛋白質の細胞膜結合様式とその制御: ホスファチジルイノシトールリン酸および Rho の関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 宮 坂 昌 之 教 授 高 井 義 美

論 文 内 容 の 要 旨

<目 的>

細胞の運動性を司るアクチンフィラメントと細胞膜とのクロスリンカーである ERM 蛋白質ファミリー (エズリン, ラディキシン, モエシン) と膜貫通蛋白質 CD44 との結合様式の解析。また, その結合制御にたいする, Rho や 4,5-PIP₂ を介したシグナル伝達系の関与の研究。

<方法ならびに成績>

ERM 蛋白質ファミリーと CD44 との *in vitro* での結合を証明するため, まず GST-マウス CD44 細胞質ドメイン融合蛋白質およびマウス-エズリン, ラディキシン, モエシンそれぞれを, バキュロウイルスを用いて大量蛋白質発現させ, 精製した融合蛋白質をグルタチオン-セファロースビーズに吸着後, 各 ERM 蛋白質と反応させた。CD44 細胞質ドメインと結合する ERM 蛋白質を, 各蛋白質にたいするモノクローナル抗体によるウエスタンブロッティング法で調べた。この *in vitro* binding assay の結果, 低イオン強度で, 各 ERM 蛋白質と CD44 細胞質ドメインとの強い結合がみられた ($K_d = 9.3 \pm 1.6$ nM)。また, 生理的イオン強度下で, phosphatidylinositol 4-phosphate (4-PIP) や phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (4,5-PIP₂) などのホスファチジルイノシトールリン酸によって, 両蛋白質の結合が活性化する。4-PIP や 4,5-PIP₂ は, CD44 細胞質ドメインとは affinity を示さないが, ERM 蛋白質とはかなり強い affinity があることを, ゲル濾過法を用いて証明した。つまり, 4-PIP や 4,5-PIP₂ などのイノシトールリン酸が直接 ERM 蛋白質 (以下 ERM) に作用し, 生理的な条件下での CD44 細胞質ドメインとの結合を容易にさせていると予測された。また, モエシンの N 末端側半分と C 末端側半分をそれぞれバキュロウイルス蛋白質発現系にて精製し, *in vitro* binding assay を行った結果, N 末端側半分に CD44 細胞質ドメインとの結合部位が存在することも判明した。つぎに, BHK 細胞の lysate を用いた免疫沈降法により, CD44-ERM 複合体に Rho GDI (GDP dissociation inhibitor/GDP 解離抑制蛋白質) が共沈結合してくることを, V8 protease による一次元ペプチドマッピングで明らかにした。ここで CD44-ERM 結合制御に Rho を介したシグナル伝達系が関与している可能性が十分示唆されるため, GTP γ S や C3 を加えて, ERM の不溶性画分への移動を調べた。結果, GTP γ S によって, ERM は不溶性画分へかなり移動するが, C3

では抑制された。また、生きた BHK 細胞へ lipofectamine を用いて C3 を導入 4 時間後の ERM の分布をみてみると、非導入群に比べ、不溶性画分内の ERM は少なかった。

〈総括〉

ERM 蛋白質と膜貫通蛋白質 CD44 の結合様式の解析で、アクチン結合部位である ERM の C 末端側により三次元分子構造的にマスクされたその N 末端側が、4,5-PIP₂ などのシグナルによってフォールディングが解かれ、CD44 細胞質ドメインとの結合が可能になるものと思われる。また、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の下流のターゲットの一つとして注目される PIP-5 kinase が、Rho からのシグナルによって活性化され、結果として生成された 4,5-PIP₂ が細胞膜近傍で ERM に直接作用するといったシグナル伝達系の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞の運動性および形態の維持に必要なアクチンフィラメントと細胞膜との結合様式の解析として、膜貫通蛋白質 CD44 とその裏打ち蛋白質の一つと思われる ERM 蛋白質ファミリー(エズリン, ラディキシン, モエシン) (以下 ERM) の, *in vitro* の系での結合制御について検討した論文である。その結果, 低分子量 GTP 結合蛋白質である Rho やホスファチジルイノシトールリン酸の 4,5-PIP₂ などを介したシグナル伝達系の関与の存在が明らかとなった。

そのメカニズムとして, アクチン結合部位である ERM の C 末端側により三次元分子構造的にマスクされている N 末端側が, 4,5-PIP₂ などのシグナルによってフォールディングが解かれ, CD44 細胞質ドメインとの結合が可能になること, また, Rho の下流のターゲットの一つが, Rho からのシグナルによって活性化され, 細胞膜近傍で ERM に直接作用する可能性が示された。

ERM は神経線維腫症 II 型の癌抑制遺伝子産物であるマーリンと同じファミリーに属しているため, ERM は癌化や細胞増殖とも関係すると思われ, また CD44 は, そのヴァリアントタイプが各種癌の浸潤転移に関与する膜貫通蛋白質であるとも報告されている。そのため, 本論文は発癌や癌浸潤転移機構を解明する上でも重要な知見を示したものであり, 学位の授与に十分値するものと考えられる。