

氏名 武内恒成

学位（専攻分野） 博士（学術）

学位記番号 総研大甲第64号

学位授与の日付 平成5年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 Structure and Function of Band4.1 Superfamily
Members.

論文審査委員 主査 教授 小幡邦彦
教授 月田承一郎
教授 岡田泰伸
教授 池中一裕
教授 菅野富夫（北海道大学）

Band4.1 protein is one of peripheral membrane proteins of erythrocyte membranes, which directly binds to glycophorin C, an integral membrane protein, at its N-terminal half. Recently, the amino acid sequence of the N-terminal half of this protein was found to be conserved in the N-terminal end of several distinct proteins, pointing to the existence of the band4.1 superfamily. In addition to band4.1 protein, this band4.1 superfamily includes ezrin, radixin, moesin, talin and protein-tyrosine-phosphatases (PTPH1 and PTPMEG). Furthermore, the tumor suppressor protein for neurofibromatosis 2 named 'merlin' is also reportedly included in this superfamily. For a better understanding of the structure and functions of these superfamily members, I first tried to clarify the more detail picture of this superfamily using polymerase chain reaction (PCR) methods (Chapter I), and next to examine the physiological functions of ezrin/radixin/moesin by the use of antisense oligonucleotides (Chapter II).

In the Chapter I, in order to examine the structural diversity of this superfamily members, using the PCR method with synthesized mixed primers, I have attempted to list up as many members of the band4.1 superfamily as possible expressing in mouse teratocarcinoma F9 cells and the mouse brain tissue. In total, 14 distinct types of cDNA clones were obtained; 8 clones were identical to the corresponding parts of cDNAs for the so far identified members, while 6 clones appeared to encode novel members (NBL 1-6 : Novel Band4.1-like proteins). Sequence analyses of these clones revealed that the band4.1 superfamily can be subdivided into 6 gene families such as band4.1 protein, ERM (ezrin/ radixin/ moesin), talin, PTPH1 (PTPH1/ PTPMEG/

NBL1-3), and NBL4 (NBL4/ NBL5) and merlin (merlin/ NBL6) families. The existence of the NBL4 family was first recognised here. I screened F9 cell cDNA library and obtained a full length (2.5-kb) cDNA encoding an NBL4. NBL4 cDNA contains an open reading frame of 554 amino acids. Its N-terminal half segment is more homologous to those of the PTPases and band4.1 protein than the other superfamily members. Its band4.1 homology domain bears a putative myristoylation site and phosphorylation sites for A-kinase and protein-tyrosine kinases, suggesting its possible involvement in the regulation of cellular events just beneath the plasma membrane. In this study, I describe initial characterization of these new members and discuss the evolution of the band4.1 superfamily.

In the Chapter II, to examine the functions of ERM family members, antisense oligonucleotides to the N-terminal sequences of ERM family members were constructed and added to cultures of mouse epithelial cells (MTD-1A cells) and thymoma cells (L5178Y), which coexpress all the members. Immunoblotting revealed that each antisense oligonucleotides selectively suppressed the expression of the corresponding member to the undetectable level. Immunofluorescence microscopy of these ezrin, radixin or moesin "null" cells showed that all the ERM family members are colocalized at cell-to-cell adherens junctions, microvilli and cleavage furrows where actin filaments were densely associated with plasma membranes. The ezrin/radixin/moesin antisense oligonucleotides mixture induced the destruction of both cell-cell and cell-substrate adhesion and the disappearance of microvilli. Ezrin or radixin antisense oligonucleotides singly affected the initial step of the formation of both cell-cell and cell-substrate adhesion, but showed no effects on the microvilli structures. In sharp contrast, moesin antisense oligonucleotide did not singly show any effect on cell-cell and cell-substrate adhesion, whereas it partly affected the microvilli structure. These data indicate that ezrin and radixin can be functionally substituted for each other, that

moesin has some synergetic functional interaction with ezrin and radixin, and that these ERM family members are directly involved in cell-cell and cell-substrate adhesion as well as microvilli formation.

論文の審査結果の要旨

赤血球膜のBand4.1とこれと相同性の高いEzrin、Radixin、Moesin(ERMと総称)、及びチロシンフォスファターゼ、タリン等はBand4.1スーパーファミリーを形成している。これらは細胞膜直下に局在し、細胞膜と細胞骨格の相互作用や情報伝達に重要な機能を果たしていると考えられる。

このBand4.1スーパーファミリーの全体像は未だ明らかでないので、ミックスプライマーを用いたPCR法によってこのスーパーファミリーに属する新規の分子の検索を試みた。この結果、既知の分子種の他に新しい7分子が同定された。このうち5分子はMerlinとその新しいホモログ及びチロシンフォスファターゼ・サブファミリーに属する分子であった。残りのNBL4及び5は既知のサブファミリーに属さないものと考えられた。NBL4について全長クローニングと構造解析を行ったところ、全長554アミノ酸から成る特徴的な分子で、C末側は他の分子群と高いホモロジーがないことがわかった。この分子の詳細な機能の解析は今後の課題である。

Band4.1スーパーファミリーのうちERM3分子は互いに極めてよく似ており、種々の細胞に広く共発現して、膜との結合や情報伝達に重要な役割を果たすと考えられるがその機能は明らかではなかった。そこでアンチセンスDNAを用いてERMの遺伝子発現を制御することにより、これら分子の機能解析を行った。Ezrin、Radixinは、単独の発現抑制で形成途上の細胞基質間と細胞間の接着を阻害した。またERM全ての分子の発現抑制によってすでに存在する細胞接着の離脱がみられた。Moesin単独の発現抑制では、接着には大きな影響はないが、浮遊細胞系では微絨毛の消失が認められた。ERM3分子を抑制すると、微絨毛が消失した。これら高いホモロジーを持ったERM3分子は、細胞間、細胞基質間、及び微絨毛形成に関与していることが明らかとなった。

以上のごとく本論文ではBand4.1スーパーファミリー分子の構成と機能を研究し、新たなメンバーを発見するとともにERMの生理的役割を解析して、細胞生物学における重要課題である細胞接着、細胞構造形成のメカニズムに新たな知見を加えたものであり、十分、博士(学術)の学位に値する。

なお試験においては論文の内容について明解な説明が行われ、関連事項に対する質疑に対して的確に回答した。また細胞接着、膜輸送機構、蛋白合成機構等につき試問し満足すべき回答を得たので、細胞生物学、生理学において十分な学識を有するものと判定した。本論文の英語は適正であり、学術雑誌への投稿論文(英語)も作成したことから、外国語の学力は十分と判定した。