

博士論文

GTP結合優位型低分子量Gタンパク質の動態・活性制御  
に関する研究

荻田 佳孝



## 要旨

低分子量Gタンパク質の活性は、GTPが結合する活性化型とGDPが結合する不活性化型のスイッチ機構により調節されている。多くの低分子量Gタンパク質はGDP結合型で待機し、GDPからGTPへの結合ヌクレオチドの変換により、活性化型であるGTP結合型となり下流のエフェクター分子に作用する。一方、GTPの加水分解によってGDP結合型すなわち不活性化型へ戻ると考えられている。

Di-Ras(Distinct subgroup of the Ras family, Di-Ras1及びDi-Ras2)は、Rasファミリーに属しRasタンパク質に共通の構造上の特徴を有するが、分子系統樹上は他のRasタンパク質とは異なるサブグループを形成する。生化学的性質をみても他のRasタンパク質とは異なり、内在性のGTP加水分解活性が低く、GTPへの結合親和性が高いという特徴をもつ。培養細胞に発現させたDi-Ras1/Di-Ras2は前述の生化学的特徴を反映し、主にGTP結合型で存在する。このようなDi-RasのGTP結合型をとりやすいという生化学的性質が、生体内ではどのように調節されているのか、並びにDi-Rasがどのような生理機能をもつか、ほとんどわかっていない。これまでの研究によってDi-Ras2タンパク質は脳組織に特異的に発現していること、また脳組織のDi-Ras2は細胞膜とともに細胞質に多く局在し、細胞質に局在するDi-Ras2はSmgGDSとの複合体として精製され、この2分子の結合は直接の相互作用であることが示されている。そこで本研究では、Di-Ras2とSmgGDSの相互作用の生理的意義を解明することを通じて、GTP結合型をとりやすいDi-Ras2の活性制御機構を解明しようと試みた。過去の研究によりSmgGDSはRhoA及びRhoCのグアニンヌクレオチド交換促進因子(GEF)として働くことが示されていたが、Di-Ras2に対してはGEFとして作用せず、相互作用に伴って、Di-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性を低下させる作用がみられた。さらにパルスチェイス法により①Di-Ras2はその生合成後すぐにSmgGDSと複合体となること、②Di-Ras2とSmgGDSの複合体はDi-Ras2の安定性に寄与すること、③複合体形成はDi-Ras2 CAAXモチーフに依存すること、がみられた。これらの結果から、GTP結合型をとりやすいDi-Ras2は、その生合成後すぐにSmgGDSとの複合体を形成し、グアニンヌクレオチド低親和性の状態で細胞質に安定に存在すると考えられた。

Di-Ras2のように活性化型で待機する低分子量Gタンパク質として最もよく知られているものに、ヒト癌にみいだされた変異型K-Ras等、癌組織にみられるRAS遺伝子の体細胞変異産物(G12, G13, Q61等)にみられるミスセンス変異がある。いずれの変異型Rasも内在性のGTP加水分解活性低下による恒常活性化体である。近年、悪性黒色腫患者の腫瘍サンプルやヒト癌由来細胞株からヒト腫瘍の成長ドライバーとして、低分子量Gタンパク質RAC1遺伝子の複数の体細胞変異が同定された。

変異型Rac1で置換されたアミノ酸残基の位置はいずれも変異型Rasの変異箇所とは異なる。変異型Rac1であるRac1(P29S), Rac1(N92I), Rac1(C157Y)はいずれも活性化型をとりやすいことがみいだされているが、その活性化メカニズムは未解明であった。そこで、各変異型Rac1タンパク質が活性化型をとりやすい特性を解析したところ、いずれの変異体も内在性GTP加水分解活性を野生型と同様に保持しているものの、GDP解離及びGTP $\gamma$ S結合が促進がみられ、グアニンヌクレオチド交換反応の促進した変異体であることがわかった。また、変異型Rac1の性質と細胞増殖能の間にも関連があると考えられた。すなわち、GTP $\gamma$ Sをすみやかに解離する性質をもつRac1 C157Y変異体は、表現型である細胞増殖能が弱く、GTP結合状態の維持も細胞増殖に寄与していると考えられた。

# 目次

略語一覧	3
1 序論	5
1.1 低分子量 G タンパク質の活性調節機構	6
1.2 アティピカル低分子量 G タンパク質 Di-Ras2	6
1.3 ヒト腫瘍組織にみいだされた変異型 Rac1	7
2 アティピカル低分子量 G タンパク質 Di-Ras2	9
2.1 実験方法	10
2.1.1 抗体	10
2.1.2 大腸菌からのリコンビナント Di-Ras2, RhoA 及び SmgGDS タンパク質の精製	10
2.1.3 グアニンヌクレオチド結合アッセイ	10
2.1.4 グアニンヌクレオチド解離アッセイ	11
2.1.5 ゲルろ過クロマトグラフィーによる複合体形成の解析	11
2.1.6 細胞培養とトランスフェクション	11
2.1.7 培養細胞中の Di-Ras2 に結合したグアニンヌクレオチドの分析	12
2.1.8 パルスチェイス法による解析	12
2.2 結果	14
2.2.1 Di-Ras2 のグアニンヌクレオチド親和性は SmgGDS の結合に伴い低下する	14
2.2.2 RhoA の活性化に重要な SmgGDS 上のあるアミノ酸残基(N338)は Di-Ras2 との結合にも重要である	15
2.2.3 細胞内にて SmgGDS は Di-Ras2 へのグアニンヌクレオチド結合量を低下させる	16
2.2.4 SmgGDS との相互作用により Di-Ras2 タンパク質は安定化する	16
2.3 考察	18
3 ヒト腫瘍組織にみいだされた変異型 Rac1	23
3.1 実験方法	24

3.1.1	リコンビナント <b>Rac1</b> タンパク質の精製	24
3.1.2	<b>Rac1</b> タンパク質のグアニンヌクレオチド結合アッセイ	24
3.1.3	<b>Rac1</b> タンパク質のグアニンヌクレオチド解離アッセイ	24
3.1.4	<b>GTP</b> 加水分解活性の測定	25
3.2	結果	26
3.2.1	ヒト腫瘍にみられる変異型低分子量 G タンパク質 <b>Rac1</b> はグアニンヌクレオチド交換反応の促進した変異体である	26
3.3	考察	27
4	図表	29
5	図表解説	41
6	参考文献	45
7	謝辞	51

## 略語一覽

ATP	: adenosine 5'-(tetrahydrogen triphosphate)
BSA	: bovine serum albumin
cDNA	: complementary DNA
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
FBS	: fetal bovine serum
GAP	: GTPase activating protein
GAPDH	: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDP	: guanosine 5'-diphosphate
GDS	: guanine nucleotide dissociation stimulator
GEF	: guanine nucleotide exchange factor
GST	: glutathione S-transferase
GTP	: guanosine 5'-triphosphate
IP	: immunoprecipitation
IPTG	: isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
NCBI	: National center for biotechnology information
mAb	: monoclonal antibody
PBD	: p21-binding domain
PCR	: polymerase chain reaction
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	: tris-buffered saline
TCL	: total cell lysate
TLC	: thin layer chromatography
TF	: trigger factor
tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane
v/v	: volume per volume
w/v	: weight per volume



## 1. 序論

## 1.1. 低分子量Gタンパク質の活性調節機構

低分子量Gタンパク質は150以上のメンバーからなるRasスーパーファミリーを形成し、5つのサブファミリーが同定されている。例えばRas GTPaseはサブファミリーのひとつを構成しており、細胞の増殖や分化を含む様々な細胞生理機能に関わることが知られている(1-3)。Ras GTPaseは構造上、グアニンヌクレオチド/Mg<sup>2+</sup>結合ドメインやGTP加水分解ドメイン、カルボキシル末端のプレニル化修飾部位(CAAXモチーフ: C, A 及びXはそれぞれシステイン, 脂肪族アミノ酸, 不特定のアミノ酸,をあらわす)からなる低分子量Gタンパク質間で保存された機能ドメイン(Gドメイン)を有している。Ras GTPaseを含む低分子量Gタンパク質は、グアニンヌクレオチド交換により不活性化型であるGDP型から、活性化型であるGTP結合型へ、またGTP加水分解により再びGDP結合型となる、オン・オフのスイッチにたとえられる制御機構をもっている。このGTP結合型・GDP結合型間の変換にあたっては、別の機能分子による調節を受ける事も知られている。Ras GTPaseの活性化を促す分子として知られているのはグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)であり、Ras GTPaseのGDP/GTP交換反応を触媒し、Ras GTPaseを活性化させる。活性化されたGTP結合型のRas GTPaseは下流のエフェクター分子に作用し、上流のシグナルを下流に伝達するとともに、結合したGTPが加水分解されGDPになることで不活性化型へ戻る。この加水分解の過程は、GTPase活性化因子(GAP)により触媒されることが知られている(4)。この機構により、一般的に低分子量Gタンパク質はGDPの結合した不活性化型で待機していると考えられているが、一方で、GTP結合した活性化型であることを好む低分子量Gタンパク質もみいだされている。多様な生物種で脳組織特異的に発現するRas GTPaseであるDi-Rasや、近年ヒト腫瘍に新たにみいだされた低分子量Gタンパク質の活性化型変異である変異型Rac1があげられる。

## 1.2. アティピカル低分子量Gタンパク質 Di-Ras2

Di-Ras1及びDi-Ras2は分子系統樹において、Ras GTPaseファミリーに属する他のRas GTPaseとは異なるサブグループを形成している(5,6)。Di-Ras1及びDi-Ras2はともに、Ras GTPase間で高度に保存されている構造上の特徴(Gドメイン及びCAAXモチーフ)を有するが、生化学的に他のRas GTPaseとは異なる特徴を有している。例えば、内在性のヌクレオチド交換反応速度は、H-Rasのそれと比べ非常に大きく(6,7)、またGTP結合親和性が高い(6)。またDi-Ras1及びDi-Ras2は、それ単独ではGTPase活性をほとんどもたないため、結合したGTPはほとんど加水分解されない(6,7)。Di-Rasでは、H-RasでGTPase活性に関与するとされるアミノ酸残基

(Ala-59及びGln-61)に相当するアミノ酸残基がThr-63及びSer-65にそれぞれ置換されており、これがGTPase活性の低い理由ではないかと考えられている。これらの生化学的特徴を反映して、Di-Ras1及びDi-Ras2は実際に細胞内において主にGTP結合型で存在する(6)。この観察結果は、他のRas GTPase、例えばH-Rasが細胞内で主にGDP結合の不活性化型で存在することと対照的であった。*In vitro*での検討の報告の中には、Rap1GAP1やRap1GAP2がDi-Ras2のGTPase活性を高めるとの報告があるものの(7)、これまでの研究を通じて、細胞内でのDi-Ras1及びDi-Ras2の活性調節メカニズムは未解明である。

Di-Rasの生体内での機能については不明な点が多いが、Di-Ras1の過剰発現によりH-Rasが誘導する細胞の形質転換や転写因子Elk-1の活性化が阻害されるとの報告がある(5)。この知見は、Di-Ras1がH-Rasのエフェクターへの作用に拮抗的に働き、H-Rasを介したシグナル伝達を阻害しうる可能性を示唆している。一方で、Di-RasはRasのエフェクター分子であるRafやRalGDSのRas結合ドメインには結合しないとの結果も報告されている(6,7)。また、Di-Rasの発現分布をみると、Di-Ras1 mRNAはマウスの脳組織及び心臓組織に特異的に発現し、またDi-Ras2 mRNAは脳組織特異的に発現していることがわかっている(6)。また最近の線虫*C. elegans*を用いた検討により、*drm-1*(*C. elegans*のDi-Rasホモログ)が神経細胞に特異的に発現しており、シナプス活動の調節にかかわることが示唆されている(8)。

これまでの研究で、脳組織中のDi-Ras2タンパク質は、そのカルボキシル末端にCAAXモチーフを有するにも関わらず、細胞膜とともに細胞質に多く局在するという特徴があり、更に、細胞質に局在するDi-Ras2はSmgGDSとの複合体として部分精製された(9)。SmgGDSはRap1AへのGEF活性をもつタンパク質として同定されたが、その後Rasファミリー及びRhoファミリー分子を含む、多くの低分子量Gタンパク質と結合することがわかっている(10-14)。一方、最近のリコンビナント体を用いた検討で、SmgGDSは特にRhoA及びRhoCのGEFとして働くことが報告されている(15)。本研究では、Di-Ras2とSmgGDSの相互作用の詳細な解析をおこない生理的意義を解明することを通じて、GTP結合型をとりやすい特性をもつDi-Ras2の活性制御機構を解明しようと試みた。

### 1.3. ヒト腫瘍組織にみいだされた変異型Rac1

一方、Di-Ras2のように活性化型で待機する低分子量Gタンパク質として最もよく知られているのは、癌組織にみられるRAS遺伝子の体細胞変異産物であり、これまでに恒常活性化体

として知られる体細胞点変異が複数同定されている。たとえば、**K-RAS**遺伝子変異はもっとも頻度が高く、膵癌の約90%に認められるほか、大腸癌、肺癌にも高頻度に認められる (16)。**RAS**遺伝子の変異としてコドン12, 13, あるいは61の変異が知られ、いずれの変異型も内在性のGTP加水分解活性低下による恒常活性化体である。**Ras**以外の低分子量Gタンパク質に関して、その遺伝子の体細胞変異は長らく見出されてこなかったが、最近、**Krauthammer M.**ら及び**Hodis E.**らの二つの研究グループはほぼ同時期に、悪性黒色腫患者由来の腫瘍組織に**RAC1**遺伝子のミスセンス体細胞変異を報告し(29番目のプロリンがセリンへ置換された変異体**Rac1 P29S**)(17, 18), また**Rac1 P29S**は活性化型をとりやすいことを考察している。**Rac**は**Rho GTPase**ファミリーに属する低分子量Gタンパク質で(19), 細胞膜のラッフル部やラメリポディア形成, 細胞接着, 細胞増殖を含む多くのプロセスの制御に関与することが報告されている(20)。また, **Rac**を介したシグナル伝達経路が**Ras**の下流で癌化, 浸潤, 転移といった悪性の形質転換にも重要な役割をもち, **Rac1**への**G12V**変異導入も細胞の癌化を誘導する(21)。

河野らは, ヒト肉腫由来細胞株 **HT1080** から, **Rac1** の新たなミスセンス体細胞変異(産物は**Rac1 N92I** タンパク質)を同定した(22)。その他に, データベース及び他のヒト由来癌細胞株の検索により, 変異型 **Rac1** として既に報告のある **Rac1 P29S**, そして **Rac1 C157Y** を同定している。これら3つの変異型 **Rac1** はいずれも活性化型を好むが(22), その活性化メカニズムは未解明である。また, 変異型の種類によりその強さは異なるが, これら3つのいずれの変異型 **RAC1** を遺伝子導入された細胞株も, 増殖能を獲得することが示されている(22)。そこで本研究では, 各変異型 **Rac1** タンパク質の **GTP** 結合型をとりやすい特性の解明を試みた。

## 2. アティピカル低分子量Gタンパク質 **Di-Ras2**

## 2.1. 実験方法

### 2.1.1. 抗体

本研究で使用した抗体は，抗Di-Ras2抗体 (2D6)，抗GAPDH抗体 (Millipore)，抗SmgGDS(Rap1GDS1)抗体 (Sigma-Aldrich)，抗Myc抗体(9E10)及び抗FLAG抗体 (M2, Sigma-Aldrich)である。

### 2.1.2. 大腸菌からのリコンビナントDi-Ras2, RhoA及びSmgGDSタンパク質の精製

以下のタンパク質アミノ酸残基に対応するcDNAをGST融合タンパク質発現ベクターpGEX6P-1 (GE Healthcare Life Sciences)に導入し，大腸菌でのリコンビナントタンパク質発現に用いた。ヒトSmgGDSへの点変異(N338A, R112A+N116A+Y119A)を，PCR-based site-directed mutagenesis法により導入した。

- ・ ヒトDi-Ras2 (NCBI Reference Sequence: NP\_060064.2, アミノ酸残基1–195)
- ・ ヒトRhoA (NCBI Reference Sequence: NP\_001655.1, アミノ酸残基1–189)
- ・ ヒトSmgGDS (NCBI Reference Sequence: NP\_001093898.1, アミノ酸残基1–559)

目的遺伝子を導入した発現ベクターを大腸菌BL21-CodonPlus DE3株(Stratagene)に形質転換させ，GST融合タンパク質の発現を，0.1 mM Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG), 20 °Cの条件下で16時間培養することで誘導した。発現したリコンビナントタンパク質をglutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare life Sciences)を用いて精製した後，PreScission Protease (GE Healthcare Life Sciences) を用いた酵素切断によりGST部位を除去した。GST部位が切断されたタンパク質を回収するにあたり，SmgGDS回収時は予めTMDNバッファー(50 mM Tris·HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and 100 mM NaCl) で平衡化されたSephadex G-25ゲルろ過カラム(GE Healthcare Life Sciences)を使用した。RhoA及びDi-Ras2回収時は0.1% (w/v) Lubrol PX (Nakalai Tesque) を添加したTMDNバッファーで予め平衡化したSephadex G-25ゲルろ過カラム(GE Healthcare Life Sciences)を用いた。カラムからリコンビナントタンパク質を含むフラクションを回収し，使用時まで-80 °Cで保管した。

### 2.1.3. グアニンヌクレオチド結合アッセイ

グアニンヌクレオチド結合アッセイ ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  (非水解性GTPアナログ) もしくは  $[^3\text{H}]\text{GDP}$  結合アッセイ)は、文献(6)に従った方法でおこなった。具体的には、精製したRhoAあるいはDi-Ras2 (5–10 pmol)を、SmgGDS (40 pmol) の存在下あるいは非存在下で、1  $\mu\text{M}$   $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  (20,000 cpm/pmol) もしくは5  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{GDP}$  (4,000–6,000 cpm/pmol) を添加し30°Cでインキュベーションした。ヌクレオチド結合反応は、50  $\mu\text{l}$ のTMDNバッファー(0.002% (w/v) Lubrol PX及び100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSAを含む)中でおこなった。30 °Cで所定の時間インキュベート後、タンパク質に結合した $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 量もしくは $[^3\text{H}]\text{GDP}$ 量を、ニトロセルロース膜結合法により回収・定量した。具体的には、回収した反応液を1 mLの氷冷した洗浄バッファー [20 mM Tris·HCl (pH 7.5), 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM NaCl]に希釈し、反応液中のタンパク質をニトロセルロース膜 (0.45- $\mu\text{m}$  pore size; Advantec MFS)に吸着させた。ニトロセルロース膜を2 mLの氷冷した洗浄バッファーで4回洗浄し68 °Cで乾燥させ、ニトロセルロース膜の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。

#### 2.1.4. グアニンヌクレオチド解離アッセイ

40  $\mu\text{l}$ のTMDNバッファー(0.002% (w/v) Lubrol PX及び100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSAを含む)中で、RhoAもしくはDi-Ras2タンパク質 (5~10 pmol) をそれぞれ所定の時間(RhoAの場合は6時間, Di-Ras2の場合は30分間),  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  (1  $\mu\text{M}$ ) もしくは  $[^3\text{H}]\text{GDP}$  (5  $\mu\text{M}$ )と共にインキュベートし、予めグアニンヌクレオチドを結合させた。その後、SmgGDS(40 pmolもしくは0 pmolを含む溶液10 $\mu\text{l}$ )を反応液へ加え、更に所定の時間インキュベートし、タンパク質に結合している $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 量もしくは  $[^3\text{H}]\text{GDP}$ 量を、ニトロセルロース膜結合法により回収・定量した。

#### 2.1.5. ゲルろ過クロマトグラフィーによる複合体形成の解析

Di-Ras2 (0.6  $\mu\text{M}$ ) もしくはRhoA (0.6  $\mu\text{M}$ ) 及び5  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S}$ を、SmgGDS (4 $\mu\text{M}$ もしくは0  $\mu\text{M}$ ) と共に、500 $\mu\text{l}$ のTMDNバッファー(0.015% (w/v) Lubrol PX及び150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSAを含む)中で30°C, 30分間インキュベートした。その後反応液をSuperdex 200 prep grade (GE Healthcare Science) カラムクロマトグラフィー (1.6  $\times$  50 cm, 80 ml bed vol.)により分離し、各フラクションをSDS-PAGE及びイムノブロットニングにより解析した。

#### 2.1.6. 細胞培養とトランスフェクション

HEK293T細胞を37 °C, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で, 10% (v/v) FBSを含むDMEMを用いて培養した。細胞への発現ベクターのトランスフェクションにはLipofectAMINE 2000及び, 6-cm dishの場合は2 µg, 10-cm dishの場合は5 µgのプラスミドDNAを使用した。トランスフェクション後, 24時間もしくは48時間のインキュベーションの後, 各実験に使用した(インキュベーション時間は実験内容により異なるが同一実験内では統一している)。

以下のタンパク質アミノ酸残基に対応するcDNAをFLAG-taggedタンパク質発現ベクター及びMyc-taggedタンパク質発現ベクターに導入し, トランスフェクションに用いた。

- ヒトDi-Ras2 (NCBI Reference Sequence: NP\_060064.2, アミノ酸残基1-199)
- ヒトSmgGDS (NCBI Reference Sequence: NP\_001093898.1, アミノ酸残基1-559)の野生型及び変異型(N338A, R112A+N116A+Y119A)

#### 2.1.7. 培養細胞中のDi-Ras2に結合したグアニンヌクレオチドの分析

文献(6)の方法に従い, HEK293T細胞にFLAG-Di-Ras2及びMyc-SmgGDSもしくはMyc-Mockを発現させ, その後FLAG-Di-Ras2に結合したグアニンヌクレオチドを薄層クロマトグラフィー(TLC)法により解析した。具体的には, トランスフェクションしたHEK293T細胞を48時間培養した後, 更に2時間<sup>32</sup>P<sub>i</sub> (1.85 MBq/dish) を混合したphosphate-free DMEM中で培養することにより, グアニンヌクレオチドの標識を行った。その後, 細胞を洗浄バッファー(50mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)で洗浄した後, 0.5 mlの氷冷したTMDNバッファー[1% (w/v) Lubrol PX, 2 µg/ml aprotinin, 0.5 mM AEBSFを含む]に溶解し, 抗FLAG M2 agarose affinity gel (Sigma-Aldrich)と混合し4 °Cで15分間インキュベートした。Affinity gelを0.1%(w/v) Lubrol PXを含むTMDNバッファーで洗浄後, サンプルバッファー[20 mM Tris-HCl pH7.5, 20 mM Na-EDTA, 2% (w/v) SDS]に懸濁し68°C, 10 minインキュベートした後, 溶出されたGTP/GDPをTLC法により分離, BAS-1500 imaging analyzer (Fuji film)により検出・定量した。また, Di-Ras2タンパク質をウエスタンブロットにより検出・定量した。

#### 2.1.8. パルスチェイス法による解析

パルスチェイス実験は, Bonifacinoらの方法により実施した(23)。FLAG-Di-Ras2及びMyc-SmgGDSあるいはFLAG-Di-Ras2及びMyc-mockを共発現させたHEK293T細胞を準備し, EasyTag Express-[<sup>35</sup>S] Protein Labeling Mix (PerkinElmer) (2.775 MBq/dish) を混合した

methionine/cysteine-free DMEM中で1時間培養することでパルス標識を行い，その後最大48時間まで追跡した。各タイムポイントで，HEK293T細胞を0.5 mlの氷冷したTMDNバッファー(1% (w/v) Lubrol PX, 2 µg/ml aprotinin, 0.5 mM AEBSFを含む)に溶解し，M2 agaroseでのプレクリアを行ったのち，抗FLAG-M2 agarose affinity gelと2時間4°Cでインキュベートした。Affinity gelを0.1%(w/v) Lubrol PXを含むTMDNバッファーで洗浄した後，200 µg/mlのFLAGペプチドを含む同バッファーで溶出を行い，SDS-PAGEにより分離後，Typhoon FLA9000 phosphorimager (GE Healthcare Life Sciences)を用いて溶出物を解析した。

## 2.2. 結果

### 2.2.1. Di-Ras2のグアニンヌクレオチド親和性はSmgGDSの結合に伴い低下する

SmgGDSは、その分子内にタンパク質間相互作用に関わることが知られるアルマジロモチーフを複数有するタンパク質である。当初、Rap1のGEFとして同定されたSmgGDSは、その後、様々な低分子量Gタンパク質と相互作用しうることが示されている。更に近年、リコンビナント体を用いた解析により、SmgGDSは特に、RhoA及びRhoCのGEFとして作用することが報告されている(15)。このことから本研究ではまず、大腸菌で発現・精製したDi-Ras2, RhoA, SmgGDSを用いて、Di-Ras2のグアニンヌクレオチド結合特性にSmgGDSがどのような作用をもたらすかを検討した。

最初に、グアニンヌクレオチド結合アッセイによりDi-Ras2及びRhoAのグアニンヌクレオチド結合特性へのSmgGDSの作用を検討したところ、SmgGDSはRhoAへのGTP $\gamma$ SあるいはGDPの結合をいずれも促進するのに対して、Di-Ras2へのGTP $\gamma$ S結合量およびGDP結合量をいずれも減少させた(図1 A)。次に、SmgGDSがDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性を低下させている可能性を調べるため、Di-Ras2, RhoAへのGTP $\gamma$ S結合若しくはGDP結合が平衡状態に達した後にSmgGDSを添加した。SmgGDS添加後、Di-Ras2に結合するグアニンヌクレオチド量は急速に減少し別の平衡状態へ移行した。一方、RhoAに結合するグアニンヌクレオチド量にはSmgGDS添加による変化はみられなかった(図1 B)。

GEFは一般に、グアニンヌクレオチドの結合したGタンパク質よりもグアニンヌクレオチド非結合状態のGタンパク質により強く結合するといわれている。他研究グループによって、SmgGDSはグアニンヌクレオチド非結合のRhoAと*in vitro*で複合体を形成し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより検出されるが、グアニンヌクレオチドの結合したRhoAとの複合体は検出されないことが報告されている(15)。このことは、GEFがグアニンヌクレオチド非結合状態のGタンパク質とより強く結合することを示唆している。脳細胞質からDi-Ras2はSmgGDSとの複合体のまま精製されてきたことも考慮すると、Di-Ras2にみられたSmgGDS存在下でのグアニンヌクレオチド結合親和性低下は、両分子の安定な複合体形成に伴って起きた可能性を考えた。すなわち、SmgGDSが作用することでDi-Ras2, RhoAともにグアニンヌクレオチドが解離する点は共通しているが、その後RhoAではSmgGDSが離れグアニンヌクレオチドが再結合するグアニンヌクレオチド交換反応が起こる一方、Di-Ras2ではSmgGDSが安定に結合したままとなり、グアニンヌクレオチドが再び結合しないという反応

のモデルが考えられた(図2 A,B)。

そこで、Di-Ras2及びSmgGDSが上記のグアニンヌクレオチド結合反応と同じ条件下で複合体を形成しうるかどうかゲルろ過クロマトグラフィーにより確認したところ、GTP $\gamma$ S存在下でRhoAとSmgGDSはそれぞれの大きさに伴う別の挙動を示し、複合体は検出されないのに対し、Di-Ras2とSmgGDSは挙動を共にした(図3 A-C)。以上の結果から、RhoAと異なり、Di-Ras2はグアニンヌクレオチド存在下でもSmgGDSとの安定な複合体を形成し、それに伴いグアニンヌクレオチド結合親和性が低下し、すなわちグアニンヌクレオチド結合しにくい状態となっていると考えられた。

### 2.2.2. RhoAの活性化に重要なSmgGDS上のあるアミノ酸残基(N338)はDi-Ras2との結合にも重要である

Hamel B.らは、23の生物種のSmgGDS間で高度に保存されたアミノ酸残基へ点変異を導入・解析することにより、カルボキシル末端側に近いAsn-338をAlaに置換した変異体N338Aが、RhoAへのGEF活性を失うことをみだしている(15)。一方、アミノ末端側の保存領域への変異導入は(SmgGDS/R112A+N116A+Y119A変異体)、RhoAへのGEF活性に影響しない(図4 A及び(15))。

SmgGDSによるDi-Ras2グアニンヌクレオチド結合親和性低下への、これら変異型SmgGDSの影響を調べたところ、SmgGDS/N338Aは野生型SmgGDSのもつ作用を消失するが、SmgGDS/R112A+N116A+Y119Aは、野生型SmgGDSと同様の作用を保持した(図4 A)。次に、Di-Ras2及び変異型SmgGDSの複合体形成を、ゲルろ過クロマトグラフィーにより解析したところ、SmgGDS/N338AはDi-Ras2と複合体を形成しないが、SmgGDS/R112A+N116A+Y119Aは野生型SmgGDSと同様にDi-Ras2と複合体を形成した(図4 B)。

更に細胞内でのDi-Ras2・SmgGDS複合体形成を、FLAG-Di-Ras2及びMyc-SmgGDSを発現させたHEK293T細胞での抗Myc抗体による免疫沈降により検討した。Di-Ras2は野生型SmgGDSと共沈したが、SmgGDS/N338A変異体との共沈はほとんどみられなかった(図5)。以上の結果から、SmgGDS上の同一の部位(Asn-338)が、RhoAへのGEF活性及びDi-Ras2との安定な相互作用に関わると考えられた。

### 2.2.3. 細胞内にてSmgGDSはDi-Ras2へのグアニンヌクレオチド結合量を低下させる

次に、細胞レベルでDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合型へSmgGDSが与える影響を検討する目的で、FLAG-Di-Ras2及びMyc-SmgGDSを共発現させたHEK293T細胞を $^{32}\text{P}_i$ で2時間代謝ラベルし、FLAG免疫沈降物中のグアニンヌクレオチド、Di-Ras2及びSmgGDSをそれぞれ、薄層クロマトグラフィー、ウエスタンブロットにより解析・定量した。Myc-SmgGDSはDi-Ras2とともに免疫沈降された。また、Myc-SmgGDSの共発現は、細胞内でDi-Ras2に結合したGDP/GTPの比を変えないが、単位Di-Ras2あたりのGDP結合量並びにGTP結合量は、Myc-SmgGDSの共発現により有意に減少した(図6)。以上の結果から、細胞内でSmgGDSはDi-Ras2に相互作用し、Di-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性低下・結合量低下をもたらすと考えられた。

### 2.2.4. SmgGDSとの相互作用によりDi-Ras2タンパク質は安定化する

HEK293T細胞による前述の一連の実験を通じ、SmgGDS共発現時のDi-Ras2タンパク質発現レベルが、Di-Ras2のみを発現した場合と比べて高いことを経験していた。また、脳細胞質画分にもDi-Ras2はSmgGDSとの複合体で存在しえたことから、Di-Ras2タンパク質がSmgGDSと複合体を形成することで安定となっている可能性を考えた。そこで、 $^{35}\text{S}$ 標識メチオニン/システインによるパルスチェイス実験によりHEK293T細胞に発現させたDi-Ras2の半減期を検討したところ、Di-Ras2のみを発現させた際のDi-Ras2の半減期は16時間であったのに対し、SmgGDSを共発現させた際のDi-Ras2の半減期は33時間であった(図7 右)。また、1時間の標識終了直後にはDi-Ras2・SmgGDS複合体が検出されることから(図7 左)、Di-Ras2は生合成の直後にはSmgGDSとの複合体を形成すると考えられた。

他研究グループにより、SmgGDSはプレニル化された低分子量Gタンパク質と特異的に結合すると報告されている(24,25)。Di-Ras2も他の低分子量Gタンパク質と同様に、そのカルボキシル末端にプレニル化部位(CAAXモチーフ)をもつことから、CAAX部位の有無がDi-Ras2とSmgGDSの結合に与える影響をパルスチェイス実験により検討した。CAAX部位を欠失したDi-Ras2(Di-Ras2 $\Delta$ C4)はSmgGDSとの複合体をほとんど形成せず(図8 A)、またDi-Ras2 $\Delta$ C4の半減期はSmgGDSによる影響を受けなかった(図8 B)。以上の結果から、Di-Ras2は生合成後

にプレニル化を受けるとともにSmgGDSとの安定な複合体を形成し、その結果Di-Ras2が安定に細胞質に局在できるようになると推測された。

### 2.3. 考察

本研究では、Di-Ras2の活性がSmgGDSとの複合体形成を通じて、他の低分子量Gタンパク質とは異なる様式で調節される可能性を示した。すなわち、Di-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性はSmgGDSとの相互作用に伴い低下し、*in vitro*及び培養細胞の両方で、Di-Ras2へのヌクレオチド結合量が低下した状態をもたらすことを示す実験結果を得た。さらに、Di-Ras2はその生合成後すぐに、CAAXモチーフ依存的にSmgGDSとの複合体となり、Di-Ras2とSmgGDSの複合体形成がDi-Ras2の細胞内での安定性に寄与していることが示された。これらの結果から、GTP結合型をとりやすいDi-Ras2は、生合成後、おそらく脂質修飾された後、速やかにSmgGDSとの複合体を形成し、グアニンヌクレオチド低親和性の状態で安定に存在すると考えられた。

先行研究により、細胞質画分のDi-Ras2は、SmgGDSとの複合体として精製されたことから、脳細胞質でDi-Ras2はSmgGDSとの複合体で存在しうると考えられた(9)。SmgGDSは当初、Rap1AのGEFとして脳細胞質より精製・同定されたタンパク質である。その後、多くの低分子量Gタンパク質と相互作用し、GEFとして作用しうるとの報告が蓄積されている(10-14)。近年、Hamel, B.らは、リコンビナント体として精製した各低分子量Gタンパク質へのSmgGDSの作用を検討し、SmgGDSが種々の低分子量Gタンパク質のうち特にRhoA及びRhoCを活性化すると報告している。具体的には、種々の低分子量Gタンパク質に対するGDP蛍光アナログ(Mant-GDP)の結合・解離特性へのSmgGDS添加時の作用を検討し、RhoAからのMant-GDPの解離及び結合が、SmgGDS濃度依存的に促進されることを示している(15)。本研究でのRhoA並びにDi-Ras2へのグアニンヌクレオチド結合特性へのSmgGDSの作用の分析から、RhoAへGEFとして作用するSmgGDSは、Di-Ras2に対してはグアニンヌクレオチド親和性を低下させる作用を有しており、また、SmgGDSはDi-Ras2からグアニンヌクレオチドが解離した後のグアニンヌクレオチド再結合を妨げていると考えられた。

GEFは、グアニンヌクレオチド結合型の低分子量Gタンパク質よりも、非結合状態の低分子量Gタンパク質と、より親和性高く複合体を形成すると言われており、RhoAとSmgGDSの複合体に関しても、GTP存在下あるいはGDP存在下では検出されないが、EDTA存在下のグアニンヌクレオチド非結合の状態をとりやすい条件下では、複合体形成が報告されている(15)。一方、Di-Ras2とSmgGDSの結合はGTP $\gamma$ S存在下であっても観察されており、グアニンヌクレオチド結合アッセイの結果、及び細胞レベルでSmgGDSの結合に伴い単位Di-Ras2タンパク

質あたりのグアニンヌクレオチド結合量が減少した観察結果とあわせると、SmgGDSはDi-Ras2からグアニンヌクレオチドを解離させるとともに、ヌクレオチド非結合Di-Ras2と安定な複合体を形成し、グアニンヌクレオチドの結合しにくい状態を維持していると推測される。

なお、図1にみられるように、SmgGDS存在下でもDi-Ras2の一部にはグアニンヌクレオチドが結合しており、さらに、過剰量のSmgGDSの存在下においてもDi-Ras2タンパク質の全てからグアニンヌクレオチドが解離することはないことから(data not shown)、SmgGDSはグアニンヌクレオチド結合型のDi-Ras2とも、複合体を形成することができると推測される。

Di-Ras1及びDi-Ras2タンパク質はそのカルボキシル末端に、プレニル化修飾を受けるシグナル配列(CAAXモチーフ)をもち、またDi-Ras1は実際にファルネシル化を受けることが報告されている(5)。また、SmgGDS(ただし、本研究で用いたSmgGDSと同様のshort form。SmgGDSにはshort form, long formのスプライシングバリエーションが存在する)は細胞内で、プレニル化修飾を受けた低分子量Gタンパク質と特異的に相互作用することが報告されている(24,25)。これらの先行知見を受け、Di-Ras2のCAAXモチーフ欠失体(Di-Ras2 $\Delta$ C4)をもちいて、培養細胞の系でDi-Ras2 CAAXモチーフのSmgGDSとの相互作用への寄与を検討したところ、SmgGDSとDi-Ras2 $\Delta$ C4の複合体はほとんどみられなくなり(図8 A)、またDi-Ras2 $\Delta$ C4の安定性はSmgGDS存在下で変化しなかった(図8 B)。プレニル化修飾はタンパク質合成の後、速やかにおこるプロセスであると考えられており(26)、このことを考慮すると、Di-Ras2はプレニル化を受けた後にSmgGDSと結合し、細胞内で安定して存在するようになることが推測された。また、プレニル化されたDi-Ras2とSmgGDSの複合体は解離することなく安定であり、この安定な結合によってDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性の低下した状態が保たれることが推測された。

本研究ではDi-Ras2・SmgGDS複合体形成に関して、実験系により結果に若干の相違がみられる。リコンビナント体として精製し*in vitro*アッセイに用いたDi-Ras2はプレニル化されないDi-Ras2 $\Delta$ C4に相当するものの、同じくリコンビナント体として精製したSmgGDSと、安定した複合体を形成する(図3)。このことは、HEK293T細胞で実施したパルスチェイス実験の結果(図8)や、免疫沈降ではSmgGDSとDi-Ras2との結合に比べて、Di-Ras2 $\Delta$ C4との結合はわずかにしか検出されないことと(data not shown)、異なる結果であると思われた。他グループの研究でも、培養細胞の系ではSmgGDSはプレニル化修飾を受けた低分子量Gタンパク質と

特異的に相互作用するが、*in vitro*の結合アッセイではプレニル化修飾を受けていないリコンビナント低分子量Gタンパク質との結合も検出されると報告がある(25)。細胞での検討と*in vitro*アッセイで異なる実験結果が得られた理由として、ひとつは*in vitro*の実験系ではDi-Ras2とSmgGDSが安定した複合体を形成するに十分高いタンパク質濃度で検討されたためと考えることができる。あるいは、細胞レベルではSmgGDSあるいはDi-Ras2への別の翻訳後修飾か、別の分子が介在し、複合体形成に影響している可能性が考えられる。

SmgGDSは他のGEFにみられるようなグアニンヌクレオチド交換活性を触媒する機能ドメインを持たないが、タンパク質間相互作用に関わる構造として知られるアルマジロモチーフの繰り返し構造を有する。このモチーフの繰り返し構造は、植物由来タンパク質から哺乳動物タンパク質まで、幅広い種に共通して存在する(27)。SmgGDSの結晶構造解析はなされていないものの、Hamel B.らは23の生物種のSmgGDS間のホモロジーモデリング解析によって、生物種間で高度に保存されたアミノ酸残基を同定し、それらの点変異体の解析によってSmgGDS中の少なくとも二つの領域がRhoAへのGEF活性に関わることを示した(15)。これら二つの領域のうちの一つは、アルマジロモチーフの繰り返し構造の一部であり、この領域に変異を導入したSmgGDS/N338A変異体は、RhoAへのGEF作用を消失した(15)。同じSmgGDS変異体は、Di-Ras2との相互作用及びグアニンヌクレオチド結合親和性低下作用を消失することから、RhoAへの作用に重要とされるN338を含むアルマジロモチーフ構造が、Di-Ras2との複合体形成にも同様に重要であると推測される。

Hamel B.らの研究で示された、RhoAへのGEF活性に関わるSmgGDS上のもう一つの領域は、酸性アミノ酸が多く含まれ負の電荷を帯びている部位の中にみられた。RhoAカルボキシル末端側には塩基性アミノ酸に富んだ領域があり、この領域がSmgGDSのRhoAへのGEF活性に必要であると報告されており(15, 28)、このRhoAの塩基性に富む部位も、SmgGDSの負の電荷を帯びている部位との相互作用を通じてGEF活性に関わっている可能性が示唆される。本研究では、SmgGDS上の後者の酸性に富む領域に関しては検討をおこなっていないが、Di-Ras2のカルボキシル末端側に塩基性アミノ酸が複数含まれる領域があり(Lys-187 to Lys-195)、SmgGDS中の負電荷を帯びた部位との間で相互作用に関わっている可能性はある。

SmgGDS・Di-Ras2複合体の構造学的解析により、SmgGDS・Di-Ras2の安定した相互作用やグアニンヌクレオチド親和性低下の詳細が理解され、またSmgGDS・RhoA相互作用との分子基盤の違いを検討することを通じてSmgGDSのGEF作用への理解も深まると期待される。

SmgGDSと低分子量Gタンパク質との相互作用の生理的意義はよくわかっていない。SmgGDSがいくつかの低分子量Gタンパク質にはGEFとして作用するというこれまでの知見に加え、細胞内でSmgGDSが低分子量Gタンパク質に果たす役割として、以下のような可能性が提唱されている。すなわち、低分子量Gタンパク質が生合成され、新たにプレニル化修飾された後、ファルネシルトランスフェラーゼからの解離を促す役割、その後低分子量Gタンパク質のERへの移行を助ける役割、翻訳後修飾を受け成熟した低分子量Gタンパク質をERから細胞膜へ輸送する役割や、細胞膜から細胞質に低分子量Gタンパク質を引き抜く役割などの可能性があげられてきた(24,25,28)。Di-Ras2とSmgGDSの間に見いだされた相互作用も同様に、ファルネシルトランスフェラーゼからの解離を促す役割や、その後のERへの移行や更なる修飾過程の調節、また、細胞膜へのDi-Ras2の輸送に関わっている可能性は考えられる。これらの可能性に加え、脳組織中でDi-Ras2が細胞膜と細胞質の両方に存在すること、脳細胞質中のDi-Ras2がSmgGDSと複合体として精製されたこと、更に、本研究で得られた観察結果をあわせると、SmgGDSの働きとして特に、プレニル化されたDi-Ras2が細胞質内で可溶性タンパク質として安定に存在できるようにする役割があると考えられる。また、Di-Ras(Di-Ras1及びDi-Ras2)のGTP加水分解活性は非常に低い性質と、グアニンヌクレオチド交換活性が高く細胞内のGTP/GDP比を反映して主にGTP結合型で存在する性質(6,7)を考えると、その調節機構としてこれまで考察したようなSmgGDSとの相互作用によるグアニンヌクレオチド結合親和性低下作用は、Di-Ras2の自発的活性化を抑制し、不活性化状態を保つ手段であると推測される。これは従来のGDP/GTP交換及び加水分解によるサイクルとは異なるGタンパク質の制御の型であり、Gタンパク質のスイッチ機構は一様ではなく、多様性を含んでいるとも考えられる。

Di-Ras2と類似した生化学的性質を持つ低分子量Gタンパク質に、Rho GTPaseサブファミリーに属するRnd GTPaseがある。Rnd GTPaseは、GTP加水分解活性が低くGDPへの親和性が低いため、GTP結合型で存在する(29,30)。最近、このRnd GTPaseの活性調節に、細胞内シグナル調節タンパク質として知られる14-3-3タンパク質が関わることが報告された。具体的には、リン酸化されたRnd GTPaseに14-3-3タンパク質が相互作用し、Rnd GTPaseの細胞膜から細胞質への移行を促し、結果としてその機能を抑制するという活性調節である(31)。Di-Ras2とSmgGDSの安定な相互作用について、その結合や解離がどのように調節されているかが不明である。さらに別の因子の関与や、あるいは翻訳後修飾により調節されている可能性があ

る。この調節機構の解明を通じ、**Di-Ras**の活性制御の全体像や細胞生理上の働きに対する理解が進むと考えられる。

### 3. ヒト腫瘍組織にみいだされた変異型Rac1

## 3.1. 実験方法

### 3.1.1. リコンビナントRac1タンパク質の精製

野生型及び変異型Rac1(1-188アミノ酸残基)をコードするcDNAを、河野・間野両博士から提供されたRac1 cDNAから調整し、pGEX6p-1プラスミド(GE Healthcare Life Sciences)へ導入し、このプラスミドを大腸菌BL21- CodonPlus DE3 (Stratagene)株にトランスフォーメーションした。この大腸菌を0.1 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosideを加えた培地中で20 °C, 16 時間インキュベートすることで、GST-Rac1融合タンパク質として野生型及びその変異体の発現を誘導し、Glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare Life Sciences)を用いて精製した。精製した各GST融合タンパク質をPreScission Protease (GE Healthcare Life Sciences)及びGlutathione-Sepharose 4B beadsと16時間インキュベートすることでGST部分を除去し、切り出されたRacタンパク質を含む上清は、平衡化バッファー(50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1% (w/v) Lubrol PX (Nacalai Tesque))であらかじめ平衡化したSephadex G-25 ゲルろ過カラム(GE Healthcare Life Sciences)に通した。Racタンパク質を含む画分を回収し、使用時まで-80 °Cで保管した。

### 3.1.2. Rac1タンパク質のグアニンヌクレオチド結合アッセイ

Di-Ras2の解析と同様の手法によりRac1タンパク質の生化学的特性を調べた。すなわち、<sup>[35S]</sup>GTP $\gamma$ S結合アッセイでは、50- $\mu$ L反応溶液(50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.81 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.0008% (w/v) Lubrol PX, 200  $\mu$ g/mL BSA)中で精製タンパク質(5 pmol) と5  $\mu$ Mの標識ヌクレオチド (7,000 cpm/pmol)を30 °Cでインキュベートした。所定の時間インキュベートした後、サンプルを回収し、タンパク質に結合している<sup>[35S]</sup>GTP $\gamma$ S量もしくは<sup>[3H]</sup>GDP量を、ニトロセルロース膜結合法により回収・定量した。

### 3.1.3. Rac1タンパク質のグアニンヌクレオチド解離アッセイ

<sup>[3H]</sup>GDP解離アッセイ及び<sup>[35S]</sup>GTP $\gamma$ S解離アッセイでは、各タンパク質にあらかじめ標識ヌクレオチドを結合させるため、アッセイバッファー[50 mM Tris·HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.81 mM MgCl<sub>2</sub>(C157Y変異体) 若しくは0.1 mM MgCl<sub>2</sub>(P29S及びN92I変異体), 1 mM DTT, 0.0007% (w/v) Lubrol PX, 200  $\mu$ g/mL BSA]中で、精製タンパク質 (5 pmol) を5  $\mu$ Mの標識ヌクレオチド(2,000 dpm/pmolの<sup>[3H]</sup>GDP若しくは2,000 cpm/pmolの<sup>[35S]</sup>GTP $\gamma$ S)と

10分間インキュベートした。C157Y変異体へグアニンヌクレオチドを結合させる際に低Mg<sup>2+</sup>濃度(45 nM)では効率よくヌクレオチドを結合させることができなかつたことから、C157Y変異体のみMg<sup>2+</sup>濃度下(0.8 mM)でヌクレオチドを結合させている。P29S及びN92Iは45 nM Mg<sup>2+</sup>濃度下で結合させた。 [<sup>3</sup>H]GDP解離アッセイ及び [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S解離アッセイは、非標識ヌクレオチド及びMgCl<sub>2</sub>をそれぞれ終濃度で200  $\mu$ M及び0.8 mM Mg<sup>2+</sup>となるよう加えることで開始した。所定の時間、30 °Cでインキュベート後、 Rac1に結合した [<sup>3</sup>H]GDP量若しくは [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S量を、ニトロセルロース膜結合法により計測した。

#### 3.1.4. GTP加水分解活性の測定

GTP結合バッファー[100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.81 mM MgCl<sub>2</sub>(C157Y変異体) 若しくは0.1 mM MgCl<sub>2</sub>(P29S及びN92I), 1 mM DTT, 0.0008% (w/v) Lubrol PX, 200  $\mu$ g/mL BSA]中でRac1タンパク質(0.1  $\mu$ M)を5  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]GTP (4,000 cpm/pmol)とインキュベートし標識ヌクレオチドをあらかじめ結合させたのち、非標識のGTP及びMgCl<sub>2</sub>を終濃度でそれぞれ1 mM及び0.8 mM Mg<sup>2+</sup>となるよう加え、GTP加水分解反応を開始させた。30 °Cで規定時間インキュベートの後、5 pmolのRacタンパク質を含む反応液(50  $\mu$ L)を750  $\mu$ Lの氷冷した反応停止バッファー[50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5% (w/v) 活性チャコール (Wako Pure Chemical Industries)]と混合し氷上で15分間インキュベートし、加水分解反応を停止させた。この混合液を15,000  $\times$  gで10分間、4 °Cで冷却遠心し、液体シンチレーションカウンターにより上清に含まれる遊離<sup>32</sup>Pi量を測定した。

## 3.2. 結果

### 3.2.1. ヒト腫瘍にみられる変異型低分子量Gタンパク質Rac1はグアニンヌクレオチド交換反応の促進した変異体である

変異型Rac1(P29S), Rac1(N92I), Rac1(C157Y)がどのようなメカニズムで活性化するかを明らかにするため、リコンビナント体として野生型及び各変異型Rac1を精製し、これらのGTP加水分解活性及びグアニンヌクレオチドの結合・解離特性を検討・比較した。

最初に、GTP加水分解活性を測定したところ、各変異型Rac1は野生型と同様(P29S及びN92I)か、あるいは野生型と比較し少し高い傾向(C157Y)のGTP加水分解活性を示した(図9)。このことから、変異型Rac1の活性化メカニズムは従来知られる変異型Rasのそれとは異なることが推測された。

次に、グアニンヌクレオチド交換反応を検討した。生理的Mg<sup>2+</sup>濃度(0.8 mM)下において野生型Rac1と比較し、Rac1(P29S), Rac1(N92I), 及びRac1(C157Y)の各変異体はいずれも、GTP<sub>γ</sub>Sを速やかに結合した(図10 A)。また同条件下でのGDP解離アッセイでは、すべての変異型Rac1で、野生型と比べ速やかにGDPの解離する性質がみられた(図10 B)。更に、GTP<sub>γ</sub>Sの解離について検討したところ、Rac1(C157Y)変異体のみ、速やかにGTP<sub>γ</sub>Sを解離する性質を示したが、他変異型及び野生型ではGTP<sub>γ</sub>S解離はみられなかった(図10 C)。

以上の結果から、Rac1 (P29S), Rac1(N92I), 及びRac1(C157Y)のいずれの変異型Rac1も、GTP加水分解活性は野生型と類似している一方、グアニンヌクレオチド交換反応が速やかにおこる性質をもつ変異体であると考えられた。更に、Rac1(C157Y)は他の変異型と異なり、GTPも解離と結合を繰り返す点で、他の変異体と性質が異なっていた。

### 3.3. 考察

本研究では、新たにヒト悪性黒色腫組織やヒト癌細胞株から腫瘍増殖ドライバーとしてみいだされた複数の変異型Rac1の、活性化型を取りやすいメカニズム解明を目的に、これらの変異型Rac1タンパク質の生化学的性状を解析した。

その結果、これら変異型Rac1が活性化型をとりやすい理由はいずれも、GDPからGTPへのグアニンヌクレオチド交換反応の亢進であることを明らかにした。低分子量Gタンパク質で過去に同定された癌成長のドライバーは変異型Rasのみであり、その活性化メカニズムはすべてGTP加水分解活性の欠失であったことから、変異型Rac1の活性化メカニズムは、Ras型ではないメカニズムをもつヒト腫瘍組織・細胞株中の活性化型変異の初めての例である。

河野らにより、変異型RAC1遺伝子(P29S, N92I, あるいはC157Y変異体をコードする)を導入・発現する細胞株をマウス皮下へ移植したところ、Rac1野生型を発現する細胞は増殖能を持たないのに対し、変異型Rac1を発現する細胞株はいずれも細胞増殖能を獲得することが示されている(22)。この細胞増殖能の強さは変異体により異なり、P29S, N92I変異体と比べ、C157Y変異体の増殖能は弱い。本研究でのグアニンヌクレオチド結合特性の解析によると、このC157Y変異体は他の変異型と異なり、GTPを速やかに解離する性質を有していることから、細胞内のみかけ上のGTP結合型量に加え、Rac1タンパク質のGTP結合状態の安定性が、表現型である細胞増殖能に関連すると考えられる。

近年、Krauthammer M.ら及びHodis E.らの独立した二つの研究グループはほぼ同時期に、悪性黒色腫患者由来の腫瘍組織にRac1 P29SをコードするRAC1遺伝子のミスセンス体細胞変異を報告し(17, 18)、このRAC1遺伝子変異陽性が判明した悪性黒色腫腫瘍サンプルの一部はBRAF遺伝子変異(BRAF V600E)も陽性であり、これらの体細胞変異は互いに排他的ではなかった(17, 18)。このことから、RAC1 P29Sが真に発癌のドライバーかどうかについて疑問は残るが、本研究で検討した変異型Rac1タンパク質はいずれも活性化型変異であり、例えばGDP解離亢進を抑制する変異型Rac1阻害剤は、変異型Rac1に依存し増殖する腫瘍に対する有望な治療薬となる可能性がある。



#### 4. 図表

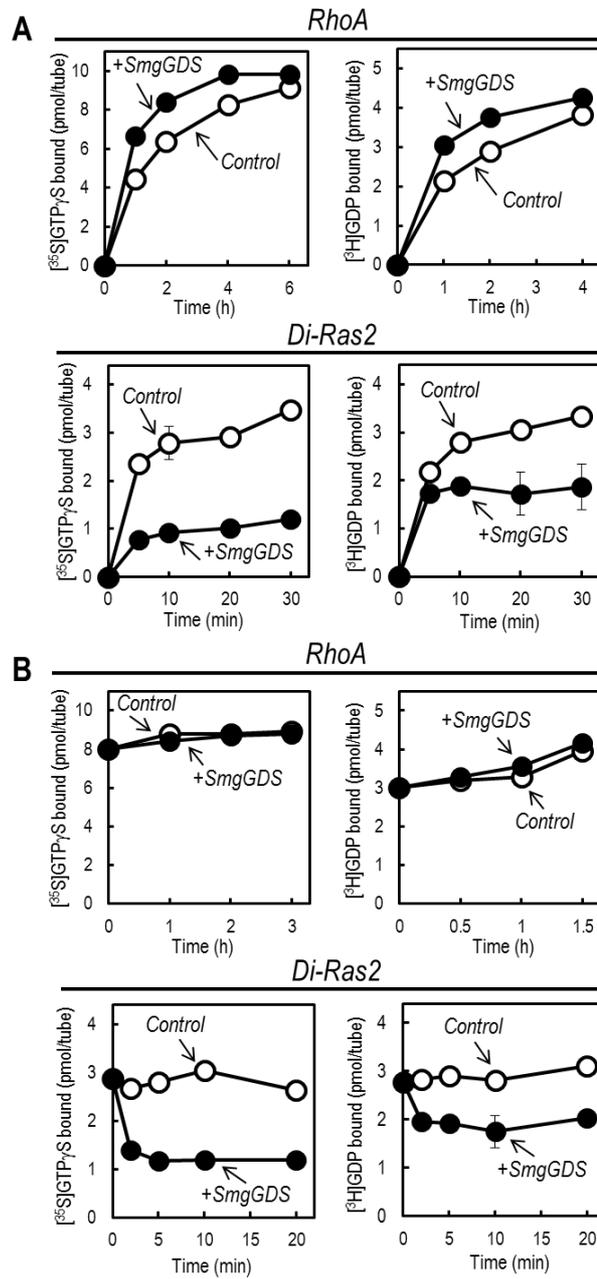
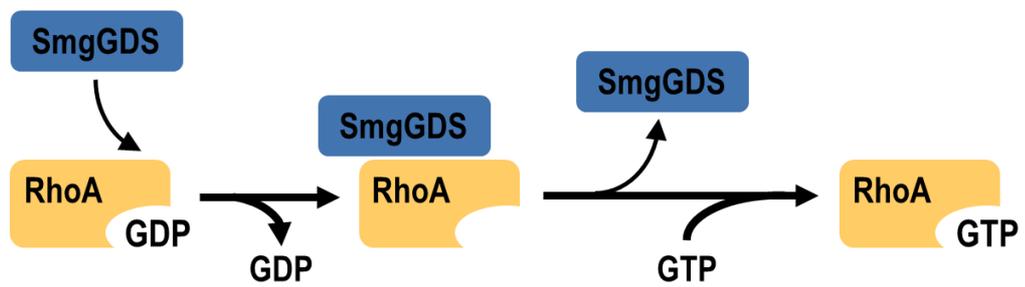


図 1

Di-Ras2 の Guanin Nucleotide 親和性は SmgGDS の結合に伴い低下する

A



B

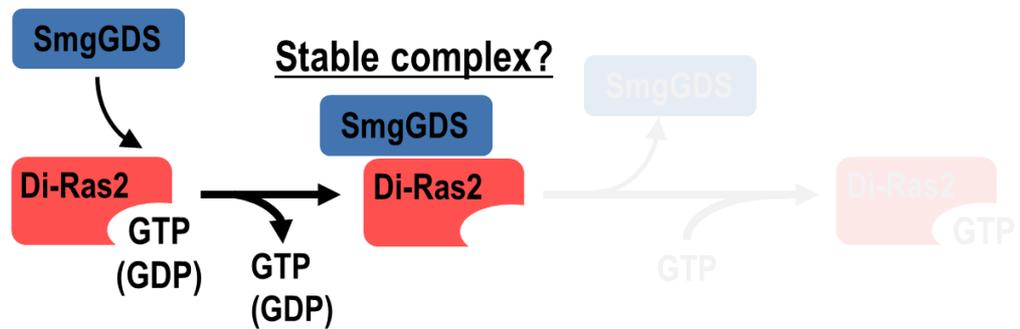


図 2

低分子量 G タンパク質への SmgGDS の作用のモデル

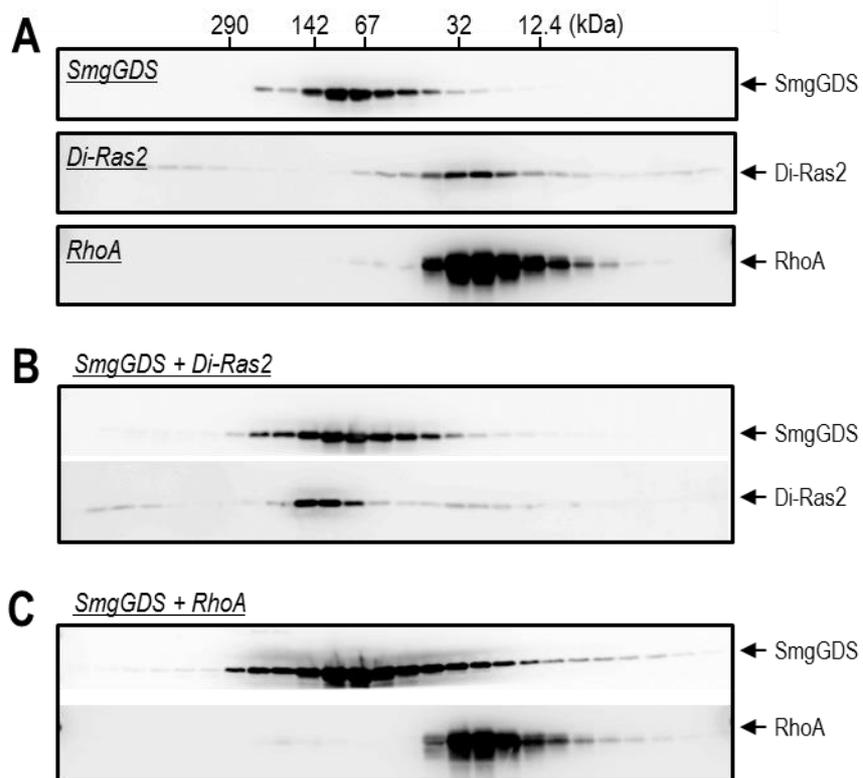


図 3

GTP $\gamma$ S 存在下で Di-Ras2 と SmgGDS は複合体を形成する

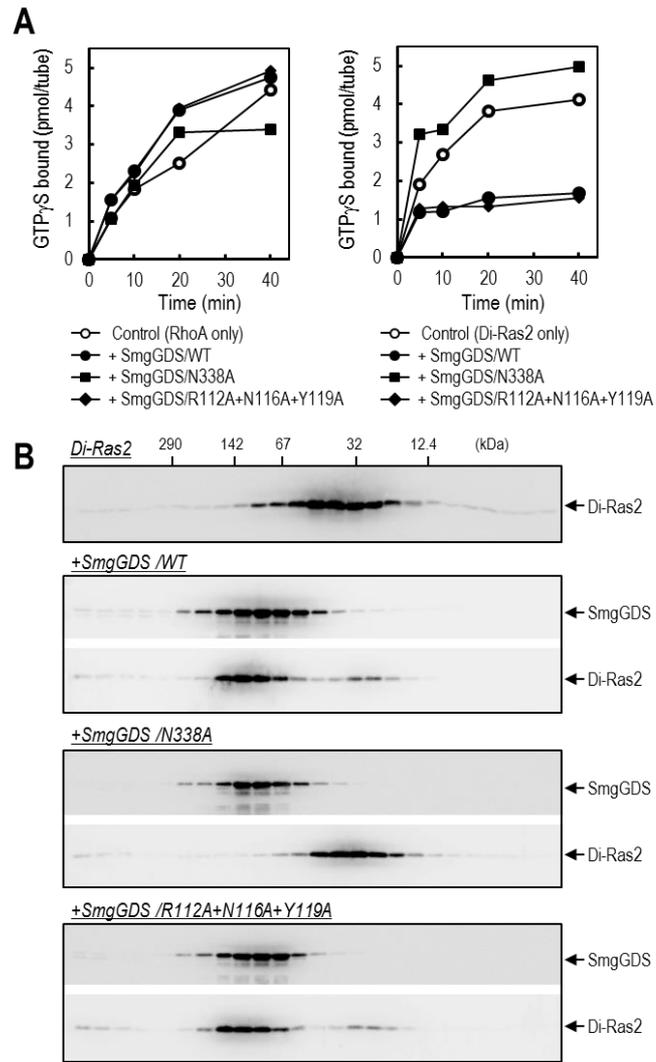


図 4

RhoA の活性化に重要な SmgGDS 上のアミノ酸残基(N338)は Di-Ras2 との結合にも重要である

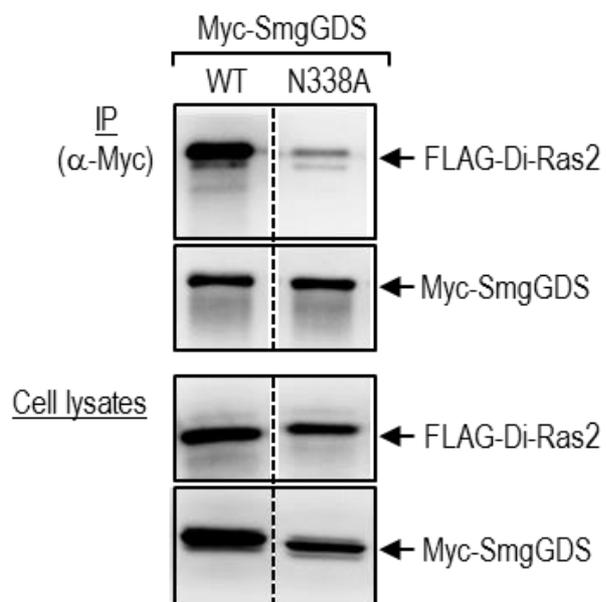


図 5

細胞内での Di-Ras2・SmgGDS 複合体形成に N338A は重要である

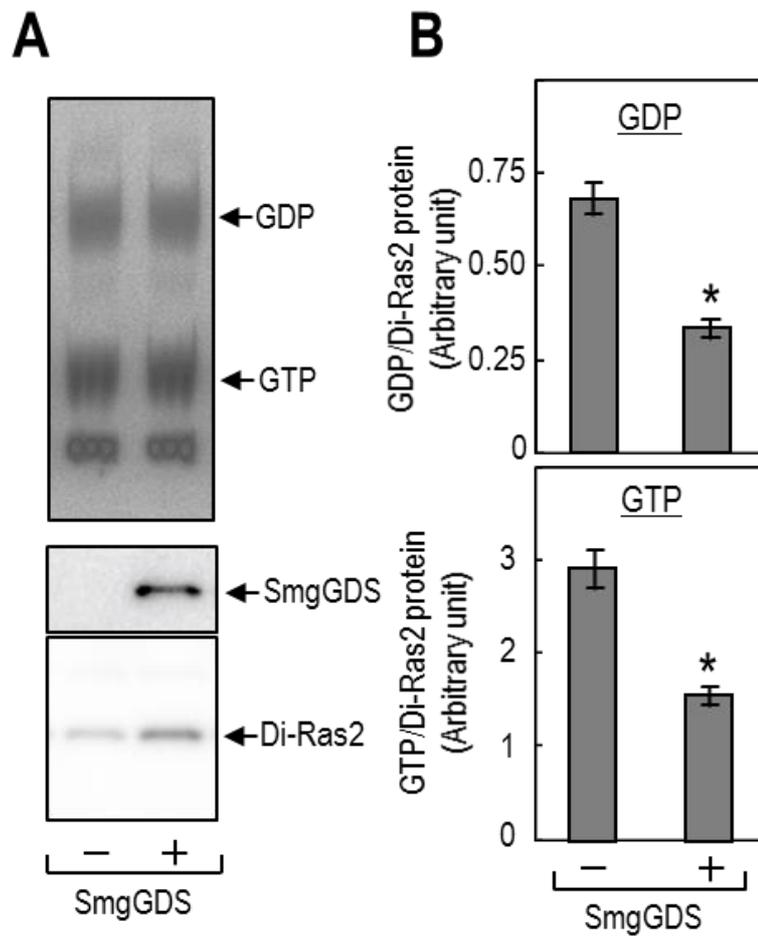


図 6

細胞内にて SmgGDS は Di-Ras2 へのグアニンヌクレオチド結合量を低下させる

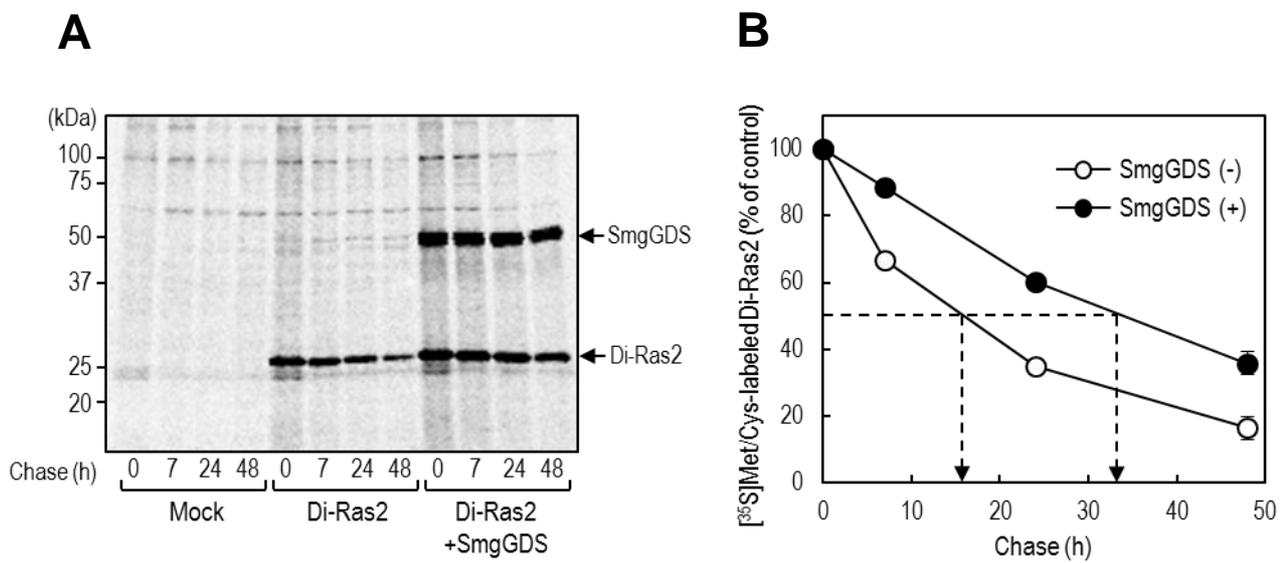


図 7

SmgGDS との相互作用により Di-Ras2 タンパク質は安定化する

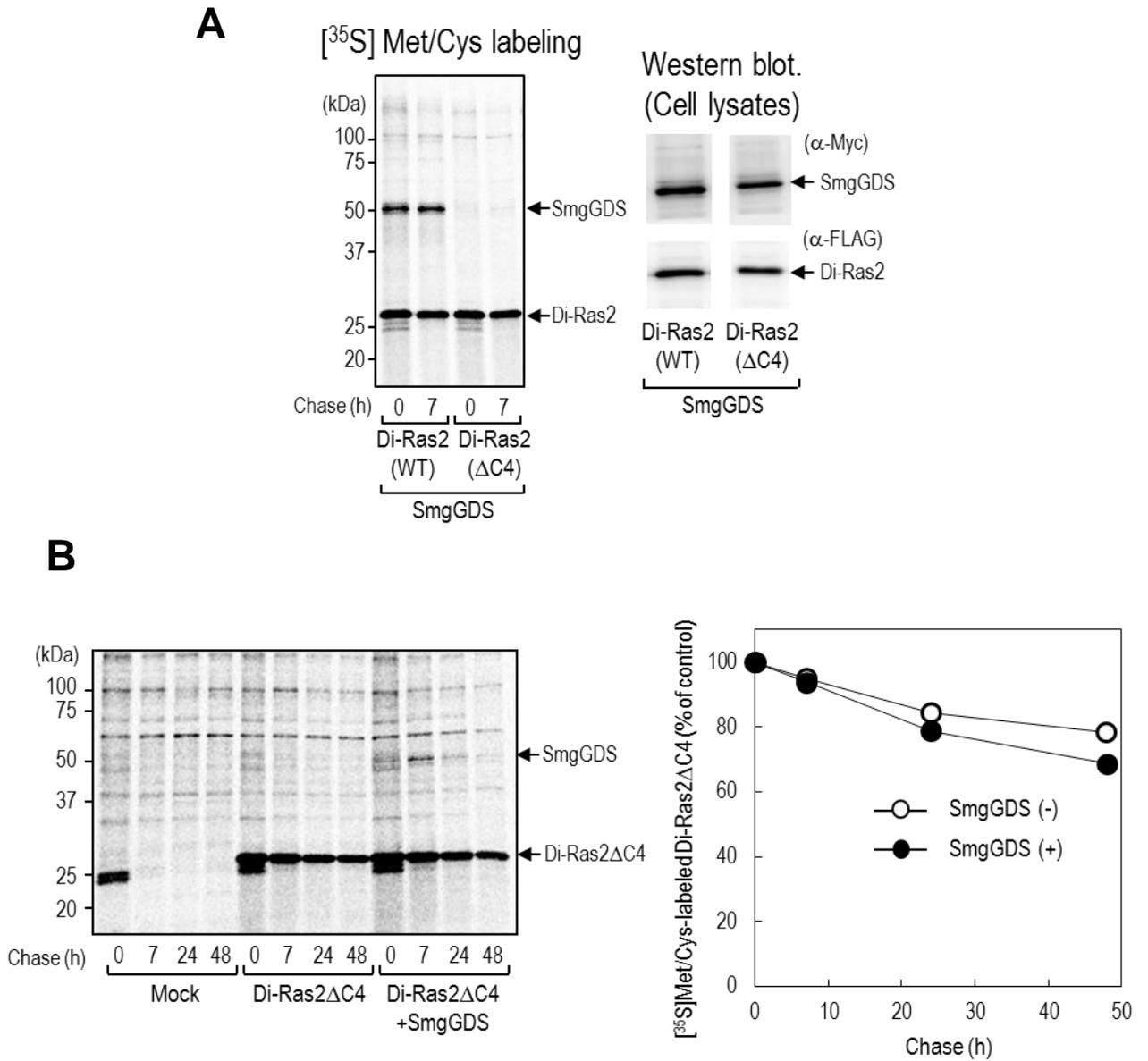


図 8

Di-Ras2 と SmgGDS の相互作用及び Di-Ras2 の安定化は CAAX モチーフ依存的である

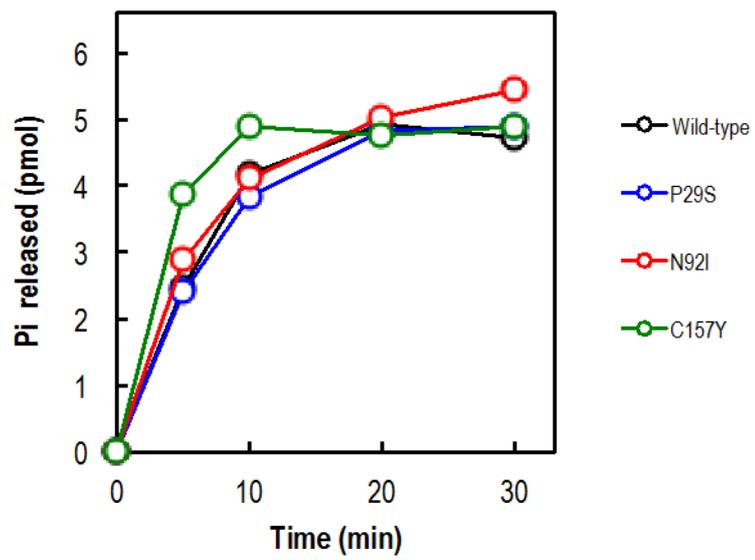


図 9

Rac1 の GTP 加水分解活性は野生型 Rac1 と同様である

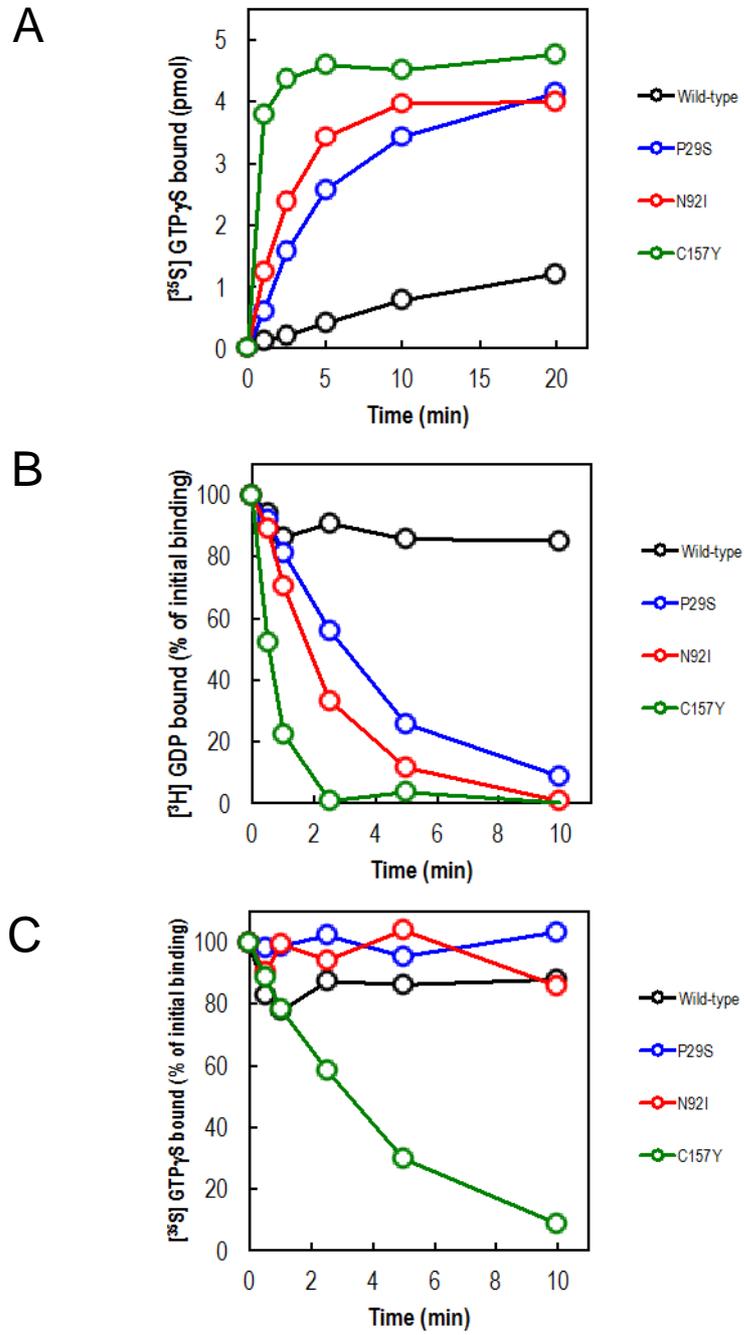


図 10

変異型 Rac1 はグアニンヌクレオチド交換反応が促進している



## 5. 図表解説

**図 1. Di-Ras2のグアニンヌクレオチド親和性はSmgGDSの結合に伴い低下する**

- A. SmgGDS存在下・非存在下でのRhoA及びDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合アッセイ。
- B. SmgGDS存在下・非存在下でのRhoA及びDi-Ras2のグアニンヌクレオチド解離アッセイ。

**図 2. 低分子量タンパク質へのSmgGDSの作用のモデル**

- A. RhoAへのSmgGDSの作用のモデル
- B. Di-Ras2へのSmgGDSの作用のモデル

**図 3. GTP $\gamma$ S存在下でDi-Ras2とSmgGDSは複合体を形成する**

- A. 精製リコンビナントタンパク質をゲルろ過により分離し、各フラクションのSDS-PAGE及びウエスタンブロッティングにより分析した。
- B. Di-Ras2をSmgGDSの存在下で30°C, 30分間インキュベートしたのち、その反応液をAと同様に解析した。
- C. RhoAをSmgGDSの存在下で30°C, 30分間インキュベートしたのち、その反応液をAと同様に解析した。

**図 4. RhoAの活性化に重要なSmgGDS上のアミノ酸残基(N338)はDi-Ras2との結合にも重要である**

- A. RhoA (5–10 pmol) 若しくはDi-Ras2 (5–10 pmol)及び $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (1  $\mu\text{M}$ )を、野生型若しくは変異型SmgGDS(40 pmol)の存在下若しくは非存在下でインキュベート後、各タイムポイントでの $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合量を測定した。
- B. Di-Ras2を野生型若しくは変異型SmgGDSの存在下・非存在下で30°C, 30分間インキュベートした後、その反応液をゲルろ過により分離し、各フラクションをSDS-PAGE及びウエスタンブロッティングにより分析した。

**図 5. 細胞内でのDi-Ras2・SmgGDS複合体形成にN338Aは重要である**

FLAG-Di-Ras2及び野生型若しくはN338A変異型のMyc-SmgGDS発現ベクターをHEK293T細胞にトランスフェクションし、2日間培養後、抗Myc抗体による免疫沈降を

行った。免疫沈降物及び細胞ライセート中のFLAG-Di-Ras2及びMyc-SmgGDSを、抗FLAG抗体及び抗Myc抗体によるウエスタンブロットにより確認した。

#### 図 6. 細胞内にてSmgGDSはDi-Ras2へのグアニンヌクレオチド結合量を低下させる

- A. FLAG-Di-Ras2をMyc-SmgGDS若しくはMyc-mockとともにHEK293T細胞に一過的に発現させた。発現ベクターをトランスフェクションし2日後、細胞を $^{32}\text{P}_i$ で代謝ラベルし、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降した。沈降物に結合したグアニンヌクレオチド及びタンパク質をそれぞれ薄層クロマトグラフィー(上)及びウエスタンブロット(下)によりそれぞれ解析した。
- B. 沈降物に結合したグアニンヌクレオチド量の定量  $n=3$ ; \*,  $p < 0.05$  by Student's t test.

#### 図 7. SmgGDSとの相互作用によりDi-Ras2タンパク質は安定化する

HEK293T細胞にFLAG-mock及びMyc-mock, FLAG-Di-Ras2及びMyc-mock, 若しくはFLAG-Di-Ras2及びMyc-SmgGDS発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションの2日後、細胞を $^{35}\text{S}$ 標識メチオニン/システインで一定時間標識し、その後0~48時間追跡した。抗FLAG免疫沈降物をSDS-PAGEにより泳動分離後、乾燥させたゲルをオートラジオグラフィーにより分析(左図)するとともに、FLAG-Di-Ras2に相当するバンド密度を定量した(右図)。

#### 図 8. Di-Ras2とSmgGDSの相互作用及びDi-Ras2の安定化はCAAXモチーフ依存的である

- A. HEK293T細胞に野生型FLAG-Di-Ras2若しくはCAAXモチーフの欠失変異体であるFLAG-Di-Ras2 (Di-Ras2 $\Delta$ C4)を、Myc-SmgGDSとともに共発現させた。トランスフェクションの2日後、細胞を $^{35}\text{S}$ メチオニン/システインで一定時間標識した後、0時間及び7時間追跡した。抗FLAG免疫沈降物をSDS-PAGE及びオートラジオグラフィーにより分析した(左図)。トランスフェクションした細胞でのタンパク質の発現は抗FLAG抗体及び抗Myc抗体によるウエスタンブロットにより確認した(右図)。

- B. HEK293T細胞にFLAG-mock及びMyc-mock, FLAG-Di-Ras2ΔC4及びMyc-mock, 若しくはFLAG-Di-Ras2ΔC4及びMyc-SmgGDS発現ベクターをトランスフェクションし, その後図11と同様にパルスチェイス実験を行った。

#### 図 9. 変異型 Rac1 の GTP 加水分解活性は野生型 Rac1 と同様である

各Rac1に予め $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を結合させ, その後,  $0.8\text{mM Mg}^{2+}$ の存在下, 非標識GTPを加え, GTP加水分解反応を観察した。各タイムポイントでRac1から放出された $\text{P}_i$ 量を測定した。

#### 図 10. 変異型Rac1はグアニンヌクレオチド交換反応が促進している

- A. 大腸菌で発現・精製したRac1野生型若しくは変異型(Rac1 P29S, N92I, C157Y)各5 pmolを $0.8\text{mM Mg}^{2+}$ の存在下で $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ とともにインキュベートし, 各タイムポイントで $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合量を測定した。
- B.  $[\text{}^3\text{H}]\text{GDP}$ を結合させた各Rac1に,  $0.8\text{mM Mg}^{2+}$ の存在下, 非標識 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ を添加した。各タイムポイントでRac1に結合した $[\text{}^3\text{H}]\text{GDP}$ 量を測定し, Rac1からのGDP解離を観察した。
- C.  $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ を結合させた各Rac1に,  $0.8\text{mM Mg}^{2+}$ の存在下, 非標識 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ を添加した。各タイムポイントでRac1に結合した $[\text{}^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 量を測定し, Rac1からの $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 解離を観察した。

## 6. 参考文献

1. Colicelli, J. (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* **2004**, RE13
2. Macara, I. G., Lounsbury, K. M., Richards, S. A., McKiernan, C., and Bar-Sagi, D. (1996) The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J* **10**, 625-630
3. Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208
4. Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-877
5. Ellis, C. A., Vos, M. D., Howell, H., Vallecorsa, T., Fults, D. W., and Clark, G. J. (2002) Rig is a novel Ras-related protein and potential neural tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9876-9881
6. Kontani, K., Tada, M., Ogawa, T., Okai, T., Saito, K., Araki, Y., and Katada, T. (2002) Di-Ras, a distinct subgroup of ras family GTPases with unique biochemical properties. *J Biol Chem* **277**, 41070-41078
7. Gasper, R., Sot, B., and Wittinghofer, A. (2011) GTPase activity of Di-Ras proteins is stimulated by Rap1GAP proteins. *Small GTPases* **1**, 133-141
8. Tada, M., Gengyo-Ando, K., Kobayashi, T., Fukuyama, M., Mitani, S., Kontani, K., and Katada, T. (2012) Neuronally expressed Ras-family GTPase Di-Ras modulates synaptic activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* **17**, 778-789
9. 蛭原有紗 (2012) 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 学位論文No. 128343
10. Chuang, T. H., Xu, X., Quilliam, L. A., and Bokoch, G. M. (1994) SmgGDS stabilizes nucleotide-bound and -free forms of the Rac1 GTP-binding protein and stimulates GTP/GDP exchange through a substituted enzyme mechanism. *Biochem J* **303 ( Pt 3)**, 761-767

11. Hiraoka, K., Kaibuchi, K., Ando, S., Musha, T., Takaishi, K., Mizuno, T., Asada, M., Menard, L., Tomhave, E., Didsbury, J., and et al. (1992) Both stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins, smg GDS and rho GDI, are active on multiple small GTP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 921-930
12. Mizuno, T., Kaibuchi, K., Yamamoto, T., Kawamura, M., Sakoda, T., Fujioka, H., Matsuura, Y., and Takai, Y. (1991) A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6442-6446
13. Vikis, H. G., Stewart, S., and Guan, K. L. (2002) SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms. *Oncogene* **21**, 2425-2432
14. Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Mizuno, T., Hiroyoshi, M., Shirataki, H., and Takai, Y. (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of proteins that regulate the GDP/GTP exchange reaction of smg p21s, ras p21-like GTP-binding proteins. *J Biol Chem* **265**, 16626-16634
15. Hamel, B., Monaghan-Benson, E., Rojas, R. J., Temple, B. R., Marston, D. J., Burridge, K., and Sondek, J. (2011) SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC. *J Biol Chem* **286**, 12141-12148
16. Bos, J. L. (1989) ras Oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689
17. Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J. P., Cheng, E., Davis, M. J., Goh, G., Choi, M., Ariyan, S., Narayan, D., Dutton-Regester, K., Capatana, A., Holman, E. C., Bosenberg, M., Sznol, M., Kluger, H. M., Brash, D. E., Stern, D. F., Materin, M. A., Lo, R. S., Mane, S., Ma, S., Kidd, K. K., Hayward, N. K., Lifton, R. P., Schlessinger, J., Boggon, T. J., and Halaban, R. (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006-1014
18. Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S.,

- Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., Ardlie, K., Wagle, N., Wargo, J., Chong, K., Morton, D. L., Stenke-Hale, K., Chen, G., Noble, M., Meyerson, M., Ladbury, J. E., Davies, M. A., Gershenwald, J. E., Wagner, S. N., Hoon, D. S. B., Schadendorf, D., Lander, E. S., Gabriel, S. B., Getz, G., Garraway, L. A., and Chin, L. (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–263
19. Wertheimer, E., Gutierrez-Uzquiza, A., Rosemlit, C., Lopez-Haber, C., Sosa, M. S., and Kazanietz, M. G. (2012) Rac signaling in breast cancer: A tale of GEFs and GAPs. *Cell. Signal.* **24**, 353–362
20. Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401–410
21. Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. (1995) An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**, 457–459
22. Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y. L., and Mano, H. (2013) Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3029–3034
23. Bonifacino, J. S. (2001) Metabolic labeling with amino acids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 7**, Unit 7 1
24. Berg, T. J., Gastonguay, A. J., Lorimer, E. L., Kuhnmuensch, J. R., Li, R., Fields, A. P., and Williams, C. L. (2010) Splice variants of SmgGDS control small GTPase prenylation and membrane localization. *J Biol Chem* **285**, 35255-35266
25. Schuld, N. J., Vervacke, J. S., Lorimer, E. L., Simon, N. C., Hauser, A. D., Barbieri, J. T., Distefano, M. D., and Williams, C. L. (2014) The chaperone protein SmgGDS interacts with small GTPases entering the prenylation pathway by recognizing the last amino acid in the CAAX motif. *J Biol Chem* **289**, 6862-6876

26. Repko, E. M., and Maltese, W. A. (1989) Post-translational isoprenylation of cellular proteins is altered in response to mevalonate availability. *J Biol Chem* **264**, 9945-9952
27. Peifer, M., Berg, S., and Reynolds, A. B. (1994) A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**, 789-791
28. Williams, C. L. (2003) The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal* **15**, 1071-1080
29. Foster, R., Hu, K. Q., Lu, Y., Nolan, K. M., Thissen, J., and Settleman, J. (1996) Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2689–2699
30. Riou, P., Villalonga, P., and Ridley, A. J. (2010) Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *BioEssays* **32**, 986–992
31. Riou, P., Kjaer, S., Garg, R., Purkiss, A., George, R., Cain, R. J., Bineva, G., Reymond, N., McColl, B., Thompson, A. J., O'Reilly, N., McDonald, N. Q., Parker, P. J., and Ridley, A. J. (2013) 14-3-3 proteins interact with a hybrid prenyl-phosphorylation motif to inhibit G proteins. *Cell* **153**, 640-653



## 7. 謝辭

何よりも堅田研に受け入れて下さり、本論文提出に至るまで厚くご指導下さった堅田利明先生に深く感謝申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、常に議論を交わし気づきを与えて下さった紺谷圈二先生に深く感謝申し上げます。

そして、私にこのかけがえのない研究の機会を作ってください、また、励まして下さった中外製薬株式会社の日比野仁様、小出徹様に深く感謝申し上げます。

堅田研究室の先生方・教室員の皆様には普段の研究生活を通じて、そして医学系研究科 細胞情報学分野の間野博行教授、薬学系研究科 蛋白構造生物学教室の清水敏之教授、藤間祥子助教には共同研究を通じてご指導いただき、大変感謝しております。

そして、本論文の提出に至るまで、温かく見守り支えてくれた家族に深く感謝いたします。

荻田佳孝 2015年 11月 20日

以下の論文をもとに本論文を執筆した。

Ogita, Y., Egami, S., Ebihara, A., Ueda, N., Katada, T., Kontani, K. (2015) Di-Ras2 protein forms a complex with SmgGDS protein in brain cytosol in order to be in a low affinity state for guanine nucleotides. *J Biol Chem.* **290**, 20245-20256

Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y. L., and Mano, H. (2013) Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3029–3034