

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 荻田 佳孝

低分子量Gタンパク質は150以上のタンパク質から構成される一つのスーパーファミリーを形成する。低分子量Gタンパク質の活性は、GDP/GTP交換反応によりGDP結合型（不活性化型）からGTP結合型（活性化型）となり、GTP加水分解によりGDP結合型へ戻るというスイッチ機構により調節されることが知られている。一方で、GTP結合型（活性化型）を好む低分子量Gタンパク質が同定されており、脳組織に特異的に発現するRas GTPアーゼであるDi-Rasや、ヒト腫瘍にみいだされた低分子量Gタンパク質（RasやRac）の活性化型変異がある。

(1) アティピカル低分子量Gタンパク質Di-Rasの動態・活性制御に関する研究

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もつが、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。Di-Rasの生化学的性質は他の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。典型的な低分子量Gタンパク質が通常GDP結合型で待機するのに対し、培養細胞に発現させたDi-Rasは前述の生化学的特徴を反映して、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、ほとんどわかっていない。Di-Ras2タンパク質は脳組織に特異的に発現しており、脳組織のDi-Ras2は細胞膜だけでなく細胞質に局在し、細胞質に局在するDi-Ras2はSmgGDSとの複合体として精製されることが判明している。そこで本研究では、SmgGDSがDi-Ras2の活性化・不活性化を調節する何らかの役割を持つと仮定し、Di-Ras2とSmgGDSの相互作用の生理的意義、そして、活性化型をとりやすいDi-Ras2の活性制御機構の解明を試みた。

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り、様々な低分子量Gタンパク質との相互作用の報告や、GEFとして作用しうるとの報告がある一方、近年のリコンビナント体を用いた解析ではRhoA及びRhoCへのGEF作用が報告されている。このことからまず、大腸菌で発現・精製したDi-Ras2、RhoA、SmgGDS各リコンビナント体を用いて、Di-Ras2のグアニンヌクレオチド結合特性に対するSmgGDSの作用に関して解析を行った。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の存在下で、RhoAへのGTP γ S結合及びGDP結合は促進した一方で、Di-Ras2へのGTP γ S結合量及びGDP結合量の減少がみられた。SmgGDSがDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性を変化させている可能性を調べるため、次に、Di-Ras2、RhoAへのGTP γ S結合若しくはGDP結合が平衡状態に達した後にSmgGDSを添加したところ、RhoAに結合するグアニンヌクレオチド量はSmgGDS添加後も変化しなかったが、Di-Ras2に結合するグアニンヌクレオチド量はSmgGDS添加後速やかに減少し別の平衡状態へ移行した。このことから、SmgGDSの作用によりDi-Ras2、RhoAのいずれにおいても、グアニンヌクレオチド解離がおこるが、その後RhoAではSmgGDSが離れグアニンヌクレオチドが再び結合するグアニンヌクレオチド交換反応が進む一方、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のではないかと考えられた。そこで、Di-Ras2及びSmgGDSが上記のグアニンヌクレオチド結合アクセシと同一条件下で複合体を形成しうるかどうかをゲルろ過クロマトグラフィーにより確認したところ、GTP γ S存在下でRhoAとSmgGDSの複合体は検出されないが、Di-Ras2とSmgGDSの安定な複合体が検出された。このことから、Di-Ras2はSmgGDSとの安定な複合体を形成し、それに伴いDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合親和性が低下すると考えられた。

次に、細胞レベルでDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合型や結合量へのSmgGDSの作用を検討した。培養細胞に発現させたDi-Ras2に結合するGDP/GTPの比はSmgGDSの共発現により影響を受けないが、単位Di-Ras2あたりのGDP結合量並びにGTP結合量は、SmgGDS共発現により有意に減少する結果が得られた。このことから、細胞内においてSmgGDSはDi-Ras2のグアニンヌクレオチド結合量低下をもたらすと考えられた。

更に、培養細胞にDi-Ras2とSmgGDSを共発現させた際のDi-Ras2タンパク質発現レベルが、Di-Ras2のみを発現させた場合と比べ高いことを経験していたことから、Di-Ras2タンパク質が、SmgGDSと複合体を形成することで安定化している可能性を考えた。この可能性を、 ^{35}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検討したところ、培養細胞に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。また、1時間のラベリング終了直後にはDi-Ras2・SmgGDS複合体が検出されることから、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。

SmgGDSは、特にプレニル化された低分子量Gタンパク質と結合することが報告されている。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ところ、CAAX部位を欠失したDi-Ras2 (Di-Ras2 Δ C4) は、SmgGDSとの複合体をほとんど形成しなかった。このことから、Di-Ras2はその生合成後、プレニル化依存的にSmgGDSとの強固な複合体を形成し、その結果Di-Ras2は安定に存在できるようになると推測された。

本研究で得られた以上の結果から、GTP結合型をとりやすいDi-Ras2は、その生合成後、速やかにSmgGDSと固く相互作用し複合体を形成することで、グアニンヌクレオチド結合親和性が低

下した状態, すなわち不活性化型の状態で安定に待機するという調節のモデルが考えられた。更に, SmgGDSの解離の調節や, Di-Ras2のGTP結合型の安定化に関わる, 他の相互作用タンパク質や翻訳後修飾等の存在が推測される。これらの解明により, 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。また, これらのDi-Ras2に関する知見は, GDP/GTP交換及びGTP加水分解という従来知られるGタンパク質のスイッチ機構とは異なる制御機構で調節される低分子量Gタンパク質が存在し, Gタンパク質のスイッチ機構が多様である可能性を示唆している。

(2) ヒト癌組織及びヒト癌由来細胞株にみいだされた変異型Rac1の活性制御に関する研究

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, 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(コドンG12, G13, Q61等にみられるミスセンス変異)である。長い間Ras以外の低分子量Gタンパク質に癌に関わる遺伝子異常は報告されていなかったが, 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。更に, 新たに発見されたこれらの変異型Rac1において, 置換されたアミノ酸残基の位置はいずれも, これまで変異型Rasで報告された置換部位とは異なっていた。これまでに, 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く, また, 細胞増殖を促進することがみいだされている。しかし, どのようなメカニズムで活性化しているのかは未解明であった。そこで本研究では, 変異型Rac1タンパク質が活性化型をとりやすい特性の解明を試みた。

野生型Rac1及び変異型であるRac1(P29S), Rac1(N92I), Rac1(C157Y)の生化学的性質を解析するため, これらをリコンビナント体として大腸菌にて発現・精製し, まずGTP加水分解活性を測定した。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。このことから, これまでに知られる変異型Rasの性質とは異なり, 加水分解活性の欠失が活性化の原因ではないと考えられた。

次にグアニンヌクレオチド交換反応に関して検討した。生理的Mg²⁺濃度 (0.8 mM) 下でのGTP_γS結合を評価したところ, 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_γSを速やかに結合した。また同条件下でGDP解離アッセイをおこなったところ, いずれの変異型Rac1でも, 野生型と比べ速やかにGDPの解離する性質がみられた。更に, GTP_γS解離アッセイをおこなったところ, Rac1(C157Y)変異体のみ, 速やかにGTP_γSを解離する性質を示し, 他の変異型及び野生型ではGTP_γS解離はみられなかった。

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, その活性化はGTP加水分解活性の低下ではなくGDP解離・GTP結合の促進によりもたらされていると考えられた。さらに, Rac1(C157Y)はGTPの解離と結合を繰り返す点で, 他の変異体とも性質を異にしていた。変異型Rac1の性質と細胞増殖能の間にも関係があると考えられ, すなわちGTPを速やかに解離する性質をもつ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

維持が細胞の増殖に必要であると考えられた。

本研究で、ヒト腫瘍組織や癌細胞株から腫瘍増殖ドライバーとしてみいだされた変異型Rac1が活性化型を好むメカニズムは、GDP/GTP交換反応の亢進であることを明らかにした。この変異型Rac1は、Ras型ではない活性化メカニズムをもつヒト腫瘍組織中の低分子量Gタンパク質活性化型変異の初めての例であった。この異常なグアニンヌクレオチド交換を抑制することが、変異型Rac1を標的とした癌治療の標的になると考えられる。