

Rasタンパク質のエフェクター領域  
C末端側領域の役割の解析

吉 垣 純 子

①

# 学 位 論 文

<<Studies on the role of the amino acid residues adjacent to the effector region of Ras.>>

(Rasタンパク質のエフェクター領域  
C末端側領域の役割の解析)

平成5年3月博士（理学） 申請

東京大学大学院理学系研究科  
生物化学 専攻  
吉垣 純子

指導教官 横山 茂之

# 目 次

第 1 章	序 論	
1.1	Rasタンパク質	1
1.2	Rasタンパク質の構造	1
1.3	Rasタンパク質の機能	3
1.4	Rasタンパク質と相互作用するタンパク質	
1.4.1	GTPase activating protein	3
1.4.2	GDP/GTP exchange factor	5
1.5	Krev-1タンパク質	6
1.6	Rasタンパク質のシグナル伝達経路	7
1.7	本研究の目的	8
第 2 章	エフェクター領域 C 末端側領域の変異体のシグナル伝達活性	
2.1	序	15
2.2	実験材料および方法	
2.2.1	変異遺伝子の作成	16
2.2.2	PC12細胞におけるRasのシグナル伝達活性の測定	16
2.2.3	PC12細胞内の変異Rasタンパク質のウエスタンブロットティングによる検出	17
2.2.4	Rasタンパク質の大量調製	17
2.2.5	GTPの非水解アナログGMPPNPを結合した変異体のマイクロインジェクション	18
2.2.6	GDPおよびGTP解離速度の測定	18
2.2.7	GTP加水分解速度の測定	19

2.3	結果	19
2.3.1	変異体のPC12細胞におけるシグナル伝達活性	20
2.3.2	GDPおよびGTP解離速度	21
2.3.3	変異体のGTPase活性	21
2.4	考察	21
第3章 変異Rasタンパク質とGTPase activating protein (GAP)の相互作用		
3.1	序	39
3.2	実験材料および方法	
3.2.1	GAPの精製	40
3.2.2	変異体のGAP感受性の測定	40
3.2.3	ペプチドの作成および精製	41
3.3	結果	
3.3.1	変異体のGAP感受性	41
3.3.2	Rasタンパク質によるGAP活性の変化	42
3.3.3	ペプチドによるGAP活性の変化	43
3.4	考察	44
第4章 総合討論		
		60
謝辞		
		66
参考文献		
		67

### 1.1 Rasタンパク質

ras 遺伝子はラット肉腫ウイルスからがん遺伝子として見いだされたが、正常細胞にも存在していることが明らかになり、細胞の増殖や分化に関わっていると考えられている[Barbacid, 1987]. ヒト正常細胞には、Ha-ras, Ki-ras, N-rasの3種類のras遺伝子が存在し、その遺伝子産物Rasは、アミノ酸189残基または188残基からなる約21kDaのタンパク質である。GDPあるいはGTPを一分子結合しており、弱いGTPase活性を持つ。GTP結合タンパク質である大腸菌のelongation factor-Tu (EF-Tu)との類似から、Rasタンパク質の機能制御のメカニズムは次のように考えられた(図 1.1) [Kaziro, 1978]. すなわち、Rasタンパク質は普段はGDPを結合しているが、何らかの増殖因子刺激によってGDPをGTPに交換し、活性型になる。そこでターゲットと相互作用し、シグナルを伝達する。その後GTPを加水分解し、不活性型であるGDP結合型に戻る。12番のアミノ酸をグリシンからプロリン以外のアミノ酸に置換したり、61番のグルタミンを他のアミノ酸に置換すると、GTPase活性が低下し活性型であるGTP結合型に留まるので、シグナルを伝え続けるために、発癌性になる。このサイクルに関わるものとして、GDPの解離を促進する因子や、GTPase活性を上昇させるGTPase activatibng protein (GAP), NF1などが存在する。これらのRasタンパク質と相互作用することが知られているタンパク質についてはこの章の4節で述べる。

### 1.2 Rasタンパク質の構造

Rasタンパク質については、変異体による解析や他のGTP結合タンパク質との比較から、一次構造上での機能ドメインが、明らかにさ

れていた(図 1.2)。アミノ酸残基で10-16番, 57-61番, 116-119番, および144-147番が, グアニンヌクレオチドの結合に関わっている[Barbacid, 1987]。また, 32-40番のアミノ酸に変異を導入するとシグナル伝達活性が失われることから, この領域はターゲットと相互作用する部位と考えられており, エフェクター領域と呼ばれている[Sigal et al., 1986; Wiilumsen et al., 1986; Stone et al., 1988]。

Rasタンパク質の高次構造は, X線結晶解析やNMRによる解析によって明らかになってきている。U.C.BerkleyのKim, Max-Planck InstituteのWittinghoferの二つのグループで, X線結晶解析による短鎖型Rasタンパク質(Ras<sup>1-171</sup>, Ras<sup>1-186</sup>)の高次構造が報告されている[deVos et al., 1988; Pai et al., 1989]。それによると, 短鎖型Rasタンパク質は6つのβストランド(β1-β6)および5つのαヘリックス(α1-α5)から成っていることが示されている。我々の研究室でも, <sup>15</sup>N標識による二次元および三次元NMR解析により, 短鎖型Rasタンパク質(1-171)のほぼ総ての主鎖アミドプロトンの帰属を行ない, 二次構造を決定している(図 1.3; Muto et al.)。GDP結合型では, X線結晶解析とNMRによる結果は, 細かい点を除いて大部分一致している。これまでに, グアニンヌクレオチド結合部位やエフェクター領域は, ループ1, 4, 8, 10および2に対応することが明らかになった。

GTP結合型では, いくつかの点でX線結晶解析とNMRによる解析で結果が食い違っている。我々の研究室では, NMR法による解析から, エフェクター領域の一部を含む逆平行βシートが, GDP型からGTP型に変換する際に, 開裂することを示している[Yamasaki et al., 1989]。このような構造変化はX線結晶解析では見いだされていない。X線結晶解析でも, グアニンヌクレオチド交換に伴いエフェクター領域, およびリン酸基結合部位に大きな構造変化が起こることを報告しているが, 我々は, <sup>15</sup>Nラベルを用いたHSQC法により, X線結晶解析では明らかにされていない構造変化や局所的な多

型性も、見いだしている。結晶中では、Rasタンパク質同士がエフェクター領域で相互作用しているため、水溶液中とは異なった構造をとっている可能性がある。

### 1.3 Rasタンパク質の機能

Rasタンパク質はがん遺伝子であるが、そのことはNIH 3T3細胞に遺伝子を導入すると、細胞の形態変化が起こることや接着非依存性が生じることによって証明されている。そのほかに、PC12細胞の神経様突起形成 [Noda et al., 1985; Bar-Sagi & Feramisco, 1985] やアフリカツメガエルの卵成熟、カリウムチャンネルとムスカリンリセプターとの共役阻害 [Yatani et al., 1990] 等に関わっていることが示されている。出芽酵母においては、Rasタンパク質がアデニレートサイクレーズの活性化に関わっていることが示されている [Broek et al., 1985; Toda et al., 1985] し、分裂酵母では、接合や減数分裂に関わっている [Fukui et al., 1986; Nadin-Davis et al., 1986]。ショウジョウバエにおいては、sevenlessの下流に存在し、R7細胞の分化に関わっている [Neuman-Siberberg et al., 1984]。このように、Rasタンパク質は一見異なった様々な現象に関わっており、そのシグナル伝達経路は複雑であると考えられる。

### 1.4 Rasタンパク質と相互作用するタンパク質

#### 1.4.1 GTPase activating protein

Rasタンパク質自身のGTP加水分解速度は低い ( $\sim 7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) が、Traheyらは細胞内では *in vitro* でよりもGTPの加水分解が速いことを示し、Rasタンパク質のGTPase活性を上昇させるタンパク質 (GTPase activating protein; GAP) の存在を示した [Trahey and McCormick, 1987]。そののち精製され [Gibbs et al., 1988]。遺

伝子がクローニングされ、分子量120Kのタンパク質であることが示された[Trahey et al., 1988; Vogel et al., 1988]. GAPはC末端334残基(702-1044)にRasタンパク質のGTPase活性を上昇させる活性を持つ部位が存在し、N末端側にはSrcと相同性を持つSH2, SH3ドメインが存在する(図1.4)[Marshall et al., 1989; Vogel et al., 1988].

EF-Tuがリボソーム上でGTPase活性が上昇する[Kaziro, 1978]ことから、Rasタンパク質もターゲットと相互作用した後、速やかにGTPを加水分解すると考えられたため、GAPはRasタンパク質のターゲットではないかと考えられた。シグナル伝達活性を失ったエフェクター領域の変異体が、GAPによるGTPase活性の上昇を起こさないことから、GAPがRasタンパク質のターゲットであるという仮説が支持された[Adari et al., 1988; Cales et al., 1988; Vogel et al., 1988; McCormick, 1989; Farnsworth et al., 1991]. また、カリウムチャンネルとムスカリンリセプターとの共役をRasが阻害し、GAPも同じ活性を示すこと[Yatani et al., 1990]、またアフリカツメガエルの卵成熟の系で、Rasタンパク質の発現もGAPの大量発現も、同様にphosphatidylcholine phospholipase C(PC-PLC)の活性化を引き起こすこと[Dominguez et al., 1991]から、GAPがRasタンパク質のターゲットの一部であることが示唆される。さらに、GAPのSH2やSH3ドメインが、カリウムチャンネルの共役阻害、fosの活性化、アフリカツメガエルの卵成熟に関わっていることが報告されており、シグナル伝達における重要性が指摘されている[Martin et al., 1992; Medema et al., 1992; Duchesneet al., 1993]。しかし、後にGAPによるGTPase活性の上昇は起こるのに、活性を失っている変異体が存在することや、GAPをNIH3T3細胞で大量発現させると、*c-ras*や*src*のトランスフォーミング活性を阻害することから、少なくともGAPだけがターゲットであるのではないということが明らかになった[Zhang et al., 1990a; DeClue et al., 1991; Nori et al., 1991]. McCormickらはGAPおよびRasタンパク質が、



もう一つの因子と複合体を形成し、シグナルを伝達するという仮説を提案している [DeClue et al., 1991]。このように、GAPがターゲットであるか、負の制御因子であるか、決着はついていない。

neurofibromatosis 1という遺伝病はNF1遺伝子の欠損によって生じるが、このNF1がGAPのカタリティックドメインと相同性を持つことが示された [Xu et al., 1990]。NF1は、遺伝学的解析によりRASタンパク質の負の制御因子として出芽酵母で見いだされたIRA1, 2 [Tanaka et al., 1989] や分裂酵母で見いだされたgap1 [Imai et al., 1991] とさらに高い相同性を持つことがわかった (図1.4)。NF1を欠損した細胞ではRasタンパク質のGTP結合型の割合が高くなっており、細胞内で実際にRasタンパク質のGTP型の割合を抑える役割を果たしていると考えられる [Basu et al., 1992]。

また、Rasタンパク質のGTPase活性を抑えるタンパク質として、GTPase inhibitor (GI)が見いだされている [Tsai et al., 1990]。これらのRasタンパク質のGTPase活性を制御する因子は、いずれも脂質によって活性が影響される [Tsai et al., 1990; Bollag and McCormick, 1991]。たとえば、アラキドン酸やホスファチジン酸によってGAPおよびNF1の活性が阻害されるが、NF1の方が低い濃度で阻害される。また、GIは逆にアラキドン酸によって活性化される。このように、脂質が作用し、それぞれの活性が変化することによって、Rasタンパク質のGTP結合型の割合が制御されているものと考えられる。たとえば、血清刺激によりアラキドン酸やホスファチジン酸は細胞内で増加するが、それによってGAPの活性は抑えられ、GIの活性は活性化されるため、GTP結合型の割合が増加すると考えられる。

#### 1.4.2 GDP/GTP exchange factor

EF-TuのGDPの解離は遅いが、EF-Ts存在下では解離が速くなり速やかに活性型であるGTP結合型になる。Rasタンパク質のGDPの解離の速度は遅い ( $\tau_{1/2} = 30\text{min}$ ) ため、やはりなんらかのGDP解離促

進因子が存在すると考えられてきた。GAPが見いだされたことによって、GAPの不活性化によってGTP型が増加するという考え方がされたが、最近実際にRasタンパク質のGDPの解離を促進するタンパク質が見ついている。出芽酵母におけるRAS1, 2にたいするグアニンヌクレオチド交換因子であるCDC25やSDC25との相同性を持つ遺伝子が、マウスからクローニングされ、RasのGDPの解離を促進することが確認された[Shou et al., 1992]。また、K-Rasや、Krev-1のGDPの解離を促進するGDP dissociation stimulator (GDS)が見いだされている[Yamamoto et al., 1990]。これらの活性がどのように制御されているかは未だ明らかではない。

#### 1.5 Krev-1タンパク質

最近多くのGTP結合タンパク質が見いだされ、細胞の分化やタンパク質の細胞内輸送に関わっていることが示されている。特に注目すべきなのは、rap1a (Krev-1, smg p21A)で、これはRasタンパク質と非常に相同性が高く、特に、エフェクター領域である32-40番のアミノ酸残基は完全に一致していたにもかかわらず、Rasの作用を抑えることが見いだされている[Pizon et al., 1988; Kawata et al., 1989; Kitayama et al., 1989]。したがって、RasとKrev-1の活性は、エフェクター領域以外の部位によって区別されていると考えられた。すでにキメラを用いた研究により、17-31番のアミノ酸がRasとKrev-1の活性の切り替えに重要であること、40-60番のアミノ酸がRasのトランスフォーミング活性に重要であることが示唆されている[Zhang et al., 1990b]。さらに、Krev-1はRasタンパク質にたいするGAPによって、そのGTPase活性は上昇しないものの、結合はすることが報告されている。したがって、エフェクター領域以外にGAPと結合する領域が存在することが示唆される。GAPとRasタンパク質の結合がシグナル伝達活性に必須であるかどうかを解析すると同時に、Krev-1がどのようにRasタンパク質の作用を抑制す

るかを調べるためにも、Rasタンパク質におけるGAPの認識部位を同定することは重要である。

#### 1.6 Rasタンパク質のシグナル伝達経路

最近、Rasタンパク質のシグナル伝達の経路に関する因子が多数見いだされつつある(図1.5)。Rasタンパク質の上流の因子としては、血小板由来成長因子(PDGF)、上皮成長因子(EGF)、インシュリン刺激などにより、活性型であるGTP結合型が増えることが示されている[Gibbs et al., 1990; Satoh et al., 1990a; Satoh et al., 1990b; Burgring et al., 1991]。また、インターロイキン(IL)2, IL3, 神経成長因子(NGF), GM-CSFなどの刺激によっても、Rasタンパク質が活性化する[Satoh et al., 1991; Qui et al., 1991; Nakafuku et al., 1992; Muroya et al., 1992]。またv-srcによるトランスフォーメーションが、GAPを大量発現することによって抑制されることが示されている。したがって、これらのシグナル伝達の下流にRasタンパク質が存在していると考えられる。ショウジョウバエでは、EGFリセプターと相同性を持つsevenless, および出芽酵母のCDC25と相同性のある son of sevenless の下流に、ras1が存在すると考えられている[Neuman-Silberberg et al., 1984; Rogge et al., 1991]。最近、Rasの活性を優性に抑える変異体Ser17→Asnを用いた研究により、RasがMAP kinaseおよびRaf-1の活性化に関わっていることが示された[deVries-Smits et al., 1992; Wood et al., 1992; Thomas et al., 1992]。さらに、アフリカツメガエル未受精卵の可溶性画分にRasタンパク質を加えることによって、MAP kinase activatorが活性化されることが報告されている[Shibuya et al., 1992; Hattori et al., 1992]。Raf-1が、MAP kinase activatorをリン酸化するという報告[Dent et al., 1992; Howe et al., 1992]もあり、Rasタンパク質のシグナル伝達の経路がかなり明らかになってきている。

### 1.7 本研究の目的

上で述べた様に、Rasタンパク質のシグナル伝達に関わる様々な現象が、いままでに見いだされている。MAP kinaseやRaf-1の活性化、c-fosの活性化、細胞内脂質の変化、カリウムチャンネルの共役阻害など、多様な現象がRasタンパク質の活性化によって引き起こされるが、それらが構成する情報ネットワークの全容は明らかにされていない。またKrev-1のように、Rasタンパク質と相同性がありながら、全く逆の活性を持つタンパク質が見いだされており、シグナル伝達にどのように関わっているのか、興味深い。

また、GAPやNF1、GI、GDSといったRasタンパク質の活性を制御するタンパク質が、Rasタンパク質のシグナル伝達に複雑に絡んでいると思われる。特にGAPについては、GAPがシグナルを伝達するターゲットであるか、負の制御因子であるか、またはその両者であるかわかっておらず、Rasのシグナル伝達の多様性の一端を担っている可能性がある。GAPとの結合部位としては、エフェクター領域およびリン酸基結合部位(Q61-S65)が同定されているが、その他にも相互作用する領域が存在する可能性がある。エフェクター領域においては、シグナル伝達活性とGAPの結合は多くの場合一致しているが、それ以外の領域でも一致しているかは明らかにされていなかった。

現在までに、Rasタンパク質の変異体が数多く作られており、その活性が調べられている。その結果、グアニンヌクレオチド結合部位、エフェクター領域、C末端のイソプレノイド修飾部位などの機能部位が同定されている[Barbacid, 1987]。しかし、Rasタンパク質の多機能性を考えると、現在同定されている以外にも、Rasタンパク質のシグナル伝達に関わる機能部位が存在している可能性があった。また、Rasタンパク質の活性を制御する様々なタンパク質の結合部位を同定することも重要である。本研究では、すでにシグナル伝達に関わっているらしいことが示唆されていたエフェクター領域C末端側領域、K42-L53に変異を導入し、シグナル伝達に必

須なアミノ酸残基を同定することを試みた。さらに、Rasタンパク質の活性を制御するタンパク質のうち、ターゲットの候補のひとつであるGAPとの相互作用を調べることにした。このようにしてRasタンパク質の新しい機能部位を見いだすことによって、Rasの機能のうち特異的な作用だけを失った変異体が得られれば、Rasタンパク質のシグナル伝達経路を単純化して考えることが出来、シグナル伝達経路の解析の手がかりとなることが期待される。

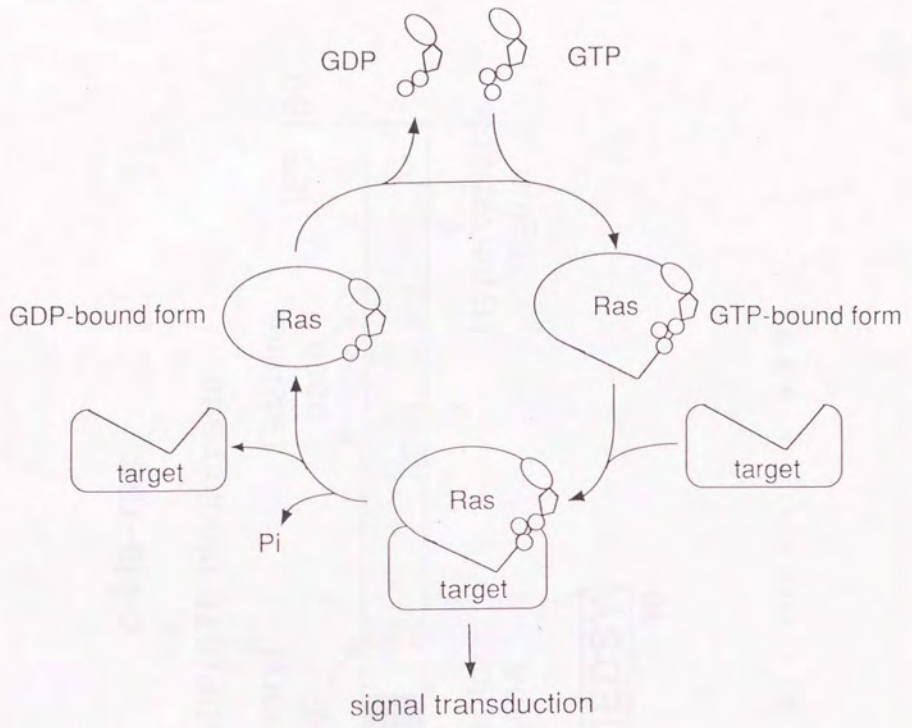


図1.1 Rasタンパク質の機能発現のメカニズム

# c-Ha-ras

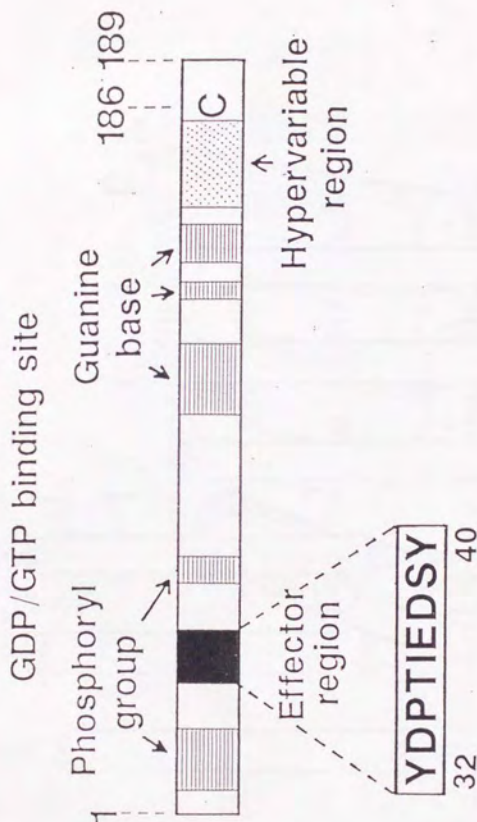


図1.2 Rasタンパク質の一次構造

# Ras GDP-bound form

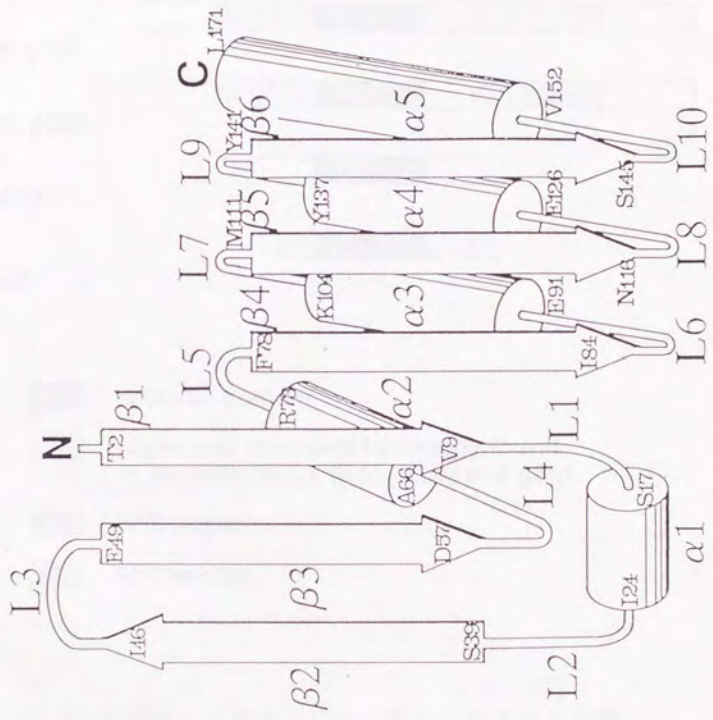
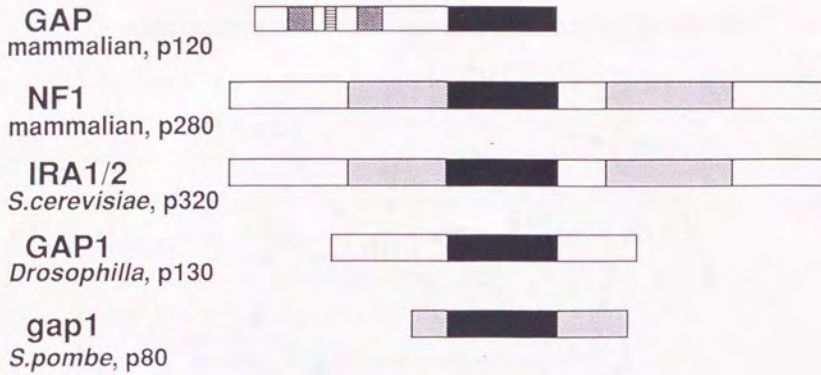


図1.3 Rasタンパク質の二次構造









-  catalytic domain
-  regions of extended homology found in neurofibromin, IRA1, IRA2 and gap1.
-  SH2 region
-  SH3 region

図1.4 GAPおよびその類似タンパク質の一次構造の比較  
(Hall et al., 1992)

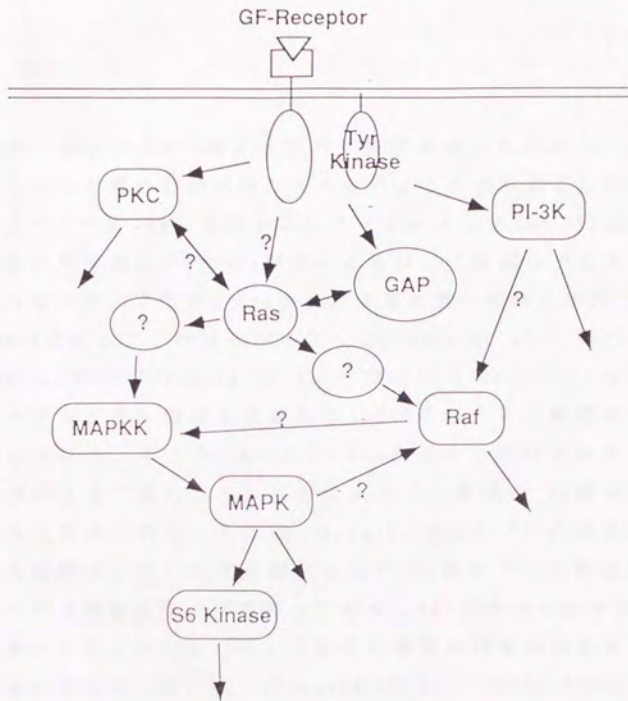


図1.5 Rasタンパク質のシグナル伝達経路

## [ 第 2 章 ]

エフェクター領域 C 末端側領域の変異体のシグナル伝達活性

### 2.1 序

近年、数多くのGTP結合タンパク質が発見されており、細胞の増殖やタンパク質の分泌に関わっていることが示されている。その一つとして、v-K-rasによりトランスフォームしたNIH 3T3細胞を、正常細胞に戻す遺伝子Krev-1がみいだされ、この遺伝子によってコードされるタンパク質が、Rasタンパク質と高い相同性を持つRap1a, smgp21Aであることが明らかになった[Pizon et al., 1988; Kawata et al., 1989; Kitayama et al., 1989]。Krev-1とRasにおいて、特にエフェクター領域と呼ばれる32-40番のアミノ酸配列は完全に一致していた。そこで、Krev-1とRasの活性の違いを担うアミノ酸残基がいままで言われていたエフェクター領域32-40番以外にも存在すると考えられた。その後、Krev-1とRasタンパク質のキメラを用いた実験で、その活性を調べると17-31番のアミノ酸残基が二つのタンパク質の活性の差を担っており、40-60番のあいだにRasタンパク質のトランスフォーミング活性に重要な残基が存在することが明らかになった(図2.1) [Kitayama et al., 1990; Zhang et al., 1990b]。そこで、それぞれのタンパク質の活性を担うアミノ酸残基を同定し、Rasタンパク質とKrev-1の機能を解析するために、エフェクター領域のC末端側に変異を導入することにした。

## 2.2 実験材料及び方法

### 2.2.1 変異遺伝子の作成 (図2.2)

大塚らによって完全人工合成されたヒトc-Ha-ras遺伝子を、トリプトファンプロモーターの下流に組み込んだpBR322由来のベクターpHR-L9 [Miura et al., 1986] を大腸菌発現用ベクターとして用いた (図2.3a)。

部位特異的変異を導入するため、pHR-L9より、ClaI, SalIで切り出した、12番目のアミノ酸をグリシンからバリンに置換したras遺伝子 (ras<sup>V12</sup>) を、AccI/SalI siteでM13に組み込んだものを用いた。変異の導入はkunkel法に従い、Cyclone™ Plus (Milligen/Bio research) により合成したDNA、およびin vitro mutagenesis kit Muta-Gene™ (Bio-Rad) を用いて行なった。変異導入したras遺伝子は塩基配列を確認した。

生化学的活性を調べるためには、変異が導入されたM13DNAをBssHII, HindIIIにより切断し、12番目のアミノ酸がグリシンである正常型のpHR-L9のBssHII/HindIII断片とつなぎ変えた。PC12細胞での発現のためには、M13DNAをXbaI, SalIにより切断し、NheI/SalIで切断した哺乳動物発現用ベクターpMAM-neo (Clontech) につないだ (図2.3b)。

### 2.2.2 PC12細胞におけるRasのシグナル伝達活性の測定

PC12細胞は、Dulbecco's modified Egls' medium (日水)、10% 牛胎児血清 (Gibco)、5% 馬血清 (Gibco) の培地で、37°C、0.5% CO<sub>2</sub>で培養した。

変異を導入したpMAM-ras(V12)5 μgを、リン酸カルシウム法 [Chen and Okayama, 1987] によってPC12細胞に導入した。抗生物質 G418 (400 μg/ml) を添加した培地で培養し、形質転換した細胞を選択した。2x10<sup>5</sup>個の形質転換細胞を直径35mmのシャーレにまきなおして、24時間後に培地中にデキサメタゾン (最終濃度1 μM) を加えて

Rasタンパク質の発現を誘導した。神経様突起形成率は、Rasタンパク質の発現を誘導して24時間後に細胞を観察して、突起が細胞の半分以上の長さを占めている細胞の数を全体の細胞数の百分率で示した。対照として、神経成長因子nerve growth factor (NGF)による神経様突起形成を見るときには、50ng/mlになるようにNGFを加え、24時間後に観察した。

### 2.2.3 PC12細胞内の変異Rasタンパク質のウエスタンブロッティングによる検出

変異ras遺伝子を組み込んだPC12細胞を $1 \times 10^6$  cells/dishの濃度で90mm dishにまき、24時間後に培地中にデキサメタゾン（最終濃度 $1 \mu\text{M}$ ）を加えてRasタンパク質の発現を誘導した。24時間後に細胞を集め、sample buffer [62.5mM Tris-HCl(pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol] 100  $\mu\text{l}$ を加える。細胞抽出物300  $\mu\text{g}$ を15% SDS-PAGEにかけ、ニトロセルロース膜にトランスファーし、3%ゼラチンでブロッキングしたのち、抗Ras抗体NCC-RAS-004 [Kanai et al., 1987]と室温でインキュベートした。その後、horse radish peroxidase-conjugated protein Aでインキュベートし、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride により検出した。

### 2.2.4 Rasタンパク質の大量調製

それぞれの変異の入った ras 遺伝子をつないだベクターをHB101株にトランスフォーメーションし、グルコース (5g/l) とカザミノ酸 (4g/l) を加えたM9培地で培養した。

まず、over-night cultureにした100mlの前培養液を2Lの培地に加え、対数増殖期中期でインドールアクリル酸を50mg/Lになるよう加えてRasタンパク質の発現を誘導した。対数増殖期後期に培養を停止し、集菌したところ、培養液1Lあたり5~10gの菌体を得た。菌体1gあたり7mlの緩衝液O [50mM HEPES-NaOH (pH7.5), 10mM DTT, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0.01% NP-40, 25% glucose] に、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

lysozymeを加えた溶液中で0°C, 15分間溶菌した。これに2mM MgCl<sub>2</sub> および100 μg/ml DNase Iを加え, 15分たったのちに, 30,000xgで20分間遠心し, 上清を得る。これを精製用Hepes緩衝液 [50mM Hepes-NaOH (pH7.5), 5mM DTT, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF] を用いて, DEAE-Sephacel (Pharmacia) による陰イオンカラムクロマトグラフィー, 次にSephadex G-75 superfine (Pharmacia) によるゲルろ過を行ない精製した。精製の全過程は0~4°Cで行なった。Rasタンパク質の最終的な純度は, SDS-PAGEを行ないクマジー染色により95%以上であることを確認した。

#### 2.2.5 GTPの非水解アナログGMPPNPを結合した変異体のマイクロインジェクション

Rasタンパク質は, 精製時GDPを結合している。精製した変異Rasタンパク質にGTPの非水解アナログGMPPNPを結合させ, その活性を測定した。GMPPNPは, GTPのβとγのリン酸の間の酸素がイミド基になったものである。0.4mgのRas<sup>Q12L</sup>を, EDTA存在下, Mg<sup>+</sup>イオンをキレートした条件で, 100nmolのGMPPNPと30°C, 10minインキュベートしたのち, MgCl<sub>2</sub>で反応を止めセントリコン10 (Amicon) で遊離のヌクレオチドを除去した。この交換反応を3回繰り返し, 95%以上交換していることをHPLCにより確認した。Rasタンパク質を4mg/mlに濃縮して, PC12細胞にマイクロインジェクションした。インジェクトスコープIMT2-SYFを用い, 100~200cellにインジェクションした。

#### 2.2.6 GDPおよびGTP解離速度の測定

精製したRasタンパク質 (2 μM) 450 μl に5mM EDTA存在下, [8, 5'-<sup>3</sup>H]GTPまたは[8, 5'-<sup>3</sup>H]GDP (2Ci/mmol, 100 μM) 10 μlを加え, 37°C, 10minインキュベートし, 結合ヌクレオチドを交換する。1M MgCl<sub>2</sub>を5 μlおよびGTP (100 μM, 10 μl)を加え, 交換反応を開始する。各時間反応後, 反応溶液から100 μlずつ, ニトロセルロースフ

フィルターにのせ、20mM Tris-HCL(pH7.5), 1mM MgCl<sub>2</sub> 2mlで5回洗浄する。フィルターに残った<sup>3</sup>H放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。片対数プロットにより、GDPおよびGTPの解離速度を求めた。

#### 2.2.7 GTP加水分解速度の測定

精製したRasタンパク質溶液(4μM, 75μl)を1mM EDTA存在下で[8,5'-<sup>3</sup>H]GTP(28μM, 43.6Ci/mmol)10μlと37°C, 5minインキュベートし、ヌクレオチドを交換する。そこに精製用Hepes緩衝液1mlを加え、Centricon-10を用いた限外ろ過により、100μlまで濃縮する。さらに精製用Hepes緩衝液1mlで希釈し、再び濃縮することで遊離のヌクレオチドを除去した。最終的に100μlに濃縮したRasタンパク質溶液を25μlとり、37°Cで反応させる。反応開始後、時間ごとに5μlずつとり、5μlの溶液2[5mM GDP, 5mM GTP, 10mM EDTA, 0.5% SDS]と混ぜ、70°Cに熱し、タンパク質を変性させヌクレオチドを遊離させた後、ポリエチレンイミンセルローズ薄層プレート(Merck)にスポットし、展開液[0.5M LiCl, 1M HCOOH]で展開した。そして、GDPとGTPの部分を切り取り、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

### 2.3 結果

Rasタンパク質のエフェクター領域C末端側K42-L55に(図2.4)のような変異を導入した。Krev-1と比較して、Krev-1とRasタンパク質の間で異なるアミノ酸については、それぞれKrev-1タンパク質の対応するアミノ酸に置換した。また、それぞれのアミノ酸残基についてアラニンの置換体を作成した。

### 2.3.1 変異体のPC12細胞におけるシグナル伝達活性

12番目のグリシンがバリンになっている発癌性のras遺伝子にたいして、前述の変異を導入した変異体をPC12細胞で発現させ、変異のシグナル伝達活性に与える影響を調べた。その結果、Gly12→Val/Lys42→Ala, Gly12→Val/Glu45→Val, Gly12→Val/Gly48→Cys, およびGly12→Val/Leu53→Alaの変異体を組み込んだPC12細胞は、デキサメタゾン添加後も神経様突起形成は全く見られなかった。また、Gly12→Val/Ile46→AlaおよびGly12→Val/Gly48→Alaの変異体を組み込んだ細胞では、形態は親細胞と比べて変化が見られたが、突起形成率は明らかに低下していた(図2.5)。細胞の直径と同程度に突起を形成している細胞の割合を計算したところ、Gly12→Valを組み込んだ細胞は、約90%の細胞が神経様突起を形成していた。Gly12→Val/Lys42→Ala, Gly12→Val/Glu45→Val, Gly12→Val/Gly48→Cys, およびGly12→Val/Leu53→Alaでは2-3%, Gly12→Val/Ile46→Alaでは20%, Gly12→Val/Gly48→Alaでは45%まで低下していた。他の変異体は、ほぼ70-90%の神経様突起形成率を示した(図2.6)。シグナル伝達活性が低下している変異体については、PC12細胞内でタンパク質が発現していることを、Rasタンパク質のモノクローナル抗体 NCC-RAS-004 [Kanai et al., 1987] を用いたウエスタンブロット法により確認した(図2.7)。

次に、完全に活性が失われていた変異体について、大腸菌から精製したRas(12番目のアミノ酸はグリシン)にGTPの非水解アナログであるGMPPNPを結合させて、PC12細胞にマイクロインジェクションを行なった。すると、正常型のRasタンパク質は、マイクロインジェクションした細胞のうち、70%程度が神経様突起を形成した。また、Leu53→Ala変異体をインジェクションした細胞は、20%程度が神経様突起を形成した。しかし、残りの変異体はやはりシグナル伝達活性を回復しなかった(図2.8)。

さらに、NGF刺激による神経様突起形成を、これらの変異体が阻害するかどうか調べた。デキサメタゾンを培地に加えて24時間後、



変異Rasタンパク質が発現したのちに、NGFを加え、神経様突起を形成している細胞の割合をRasタンパク質を発現していない細胞と比較した。しかし、この領域の変異体では、NGF刺激の障害は見られなかった。

### 2.3.2 GDPおよびGTPの解離速度

シグナル伝達活性を失った変異体について、大腸菌から精製した変異Rasタンパク質のGDPおよびGTPの解離速度を測定した。12番のアミノ酸が野生型と同様にグリシンのままのRasを用いた。野生型では、GDPの解離がGTPの解離よりも速かった。変異体でも、Leu53→Ala変異体以外ではその傾向は変化していない。Leu53→Ala変異体では、GDPの解離速度が野生型の約2.8倍、GTPの解離速度の約5倍上昇していた。Lys42→Ala, Val45→Glu, Ile46→Ala, Gly48→AlaおよびGly48→Cys変異体では、GDPおよびGTPの解離速度は、野生型（それぞれ $5.5 \times 10^{-3}$ および $4.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ）とほとんど差が無かった（表2.1）。

### 2.3.3 変異体のGTPase活性

作成した変異Rasタンパク質について、37°CでのGTP加水分解速度を測定した。その結果、Leu52→Met/Asp54→Glu変異体は、GTPase活性が野生型に比べ、約2倍に上昇していた。他の変異体では、シグナル伝達活性を失っているものも、保持しているものも、ほとんど野生型のGTP加水分解速度（ $1.4 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ）と差は見られなかった（図2.9）。

## 2.4 考察

Rasのエフェクター領域のC末端側領域では、シグナル伝達活性を失う変異体の報告は少ない。現在までに報告されている例としては、Lys42→Asp変異体がシグナル伝達活性を失うこと [Willumsen

et al., 1986], また, Gln43→Argが温度感受性変異体になること [Stein et al., 1986] が報告されているのみである. 本研究ではこのC末端側領域 (K42-L53) にシグナル伝達活性に必須なアミノ酸残基が, 複数個存在していることを新たに示した. Val145→Glu, および Gly48→Cysについては, すでにFEBS Letterにて報告済みである [Fujita-Yoshigaki et al., 1991]. Val145→Glu変異体がシグナル伝達活性を失うことは, 他のグループからも最近報告されており, 本研究の結果と一致している [Marshall et al., 1991; Nur-E-Kamal et al., 1992]. Krev-1の配列と比較してみると, Krev-1と共通しているアミノ酸残基 (Lys42, Leu53) でも一致していないアミノ酸 (Val145, Ile46, Gly48) でもシグナル伝達に重要なアミノ酸が存在していることがわかる.

今回変異を導入した領域は, Rasタンパク質の二次構造では,  $\beta 2$  および  $\beta 3$  ストランドから成る逆平行  $\beta$  シートを形成している (図2.10).  $\beta 3$  につらなるループ4はリン酸結合部位であり, Asp57はマグネシウムイオンとの結合に関わっていることが示されている.  $\beta 3$  の Leu52, Leu53, Asp54 に変異を導入すると, ループ4に影響をあたえ, グアニンヌクレオチドとの結合が変化しているのかもしれない. Leu53→Alaの変異はGDPおよびGTPの解離速度が共に速くなっているが, GTPの解離の方が特に速くなっている. このことが, Gly12→Val/Leu53→Alaの変異体が活性を失っている一因であり, あらかじめGMPPNPを結合させたLeu53→Ala変異体が20%程度のシグナル伝達活性を示したことと, 対応すると考えられる. また, 完全にはシグナル伝達活性が回復しないことから, それ以外の原因もあると考えられる. Leu53はRasタンパク質の内側に存在しており, 全体の高次構造を支えているために, 変異が構造に影響を与えたのではないか. 今回導入した変異がこの逆平行  $\beta$  シート構造に与える影響は様々である. Gly48はII型  $\beta$  ターンを形成しているが, これをグリシン以外のアミノ酸に置換するとI型  $\beta$  ターンに変換する. しかしそれだけでは, まわりの構造を大きく変えるものではない. 他の変異

では、例えば、Val45→Gluは $\beta$ シートを崩しやすい変異であるし、Lys42→Alaは逆に $\beta$ シートを安定化する変異である。Ile46→AlaやLeu53→Alaは、ほとんど二次構造には影響しない。

Rasタンパク質のX線結晶解析の結果によれば、今回シグナル伝達活性に重要であることが明らかになったアミノ酸残基は、Leu53以外はタンパク質の表面に露出している(図2.11)。この高次構造は短鎖型Rasタンパク質(Ras<sup>1-171</sup>)であり、C末端18残基およびC末端のイソプレノイドや脂肪酸の修飾が存在すると、必ずしもタンパク質表面にあるとは限らない。しかし、明らかに内側に存在しおそらくタンパク質の構造を支えているLeu53と他の残基は性質が異なると考えられる。他の残基は、直接なんらかのターゲットと相互作用している可能性がある。

しかし、これらの変異がエフェクター領域の高次構造を崩している可能性もあるため、失活した変異体のひとつIle46→Ala変異体のNMR解析を行なった。野生型とIle46→Alaの変異体の、GDP結合型およびGTP結合型の高次構造を比較したところ、変異を導入した近辺の構造には差があったが、エフェクター領域の構造は二つのタンパク質でほとんど差が見られなかった(図2.12; Onozuka et al.)。つまり、Ile46→Alaの変異は、エフェクター領域の構造には影響を与えなかった。我々の研究室では既に、Rasのグアニンヌクレオチドの交換に伴い、エフェクター領域を含む逆平行 $\beta$ シートが開裂することを報告している[Yamasaki et al., 1989]。Ile46→Ala変異体について解析した結果、この逆平行 $\beta$ シートにおけるコンフォメーション変化も野生型同様、観察された(図2.13)。すなわち、ヌクレオチドの交換に伴うエフェクター領域の高次構造変化も正常に起こっていると考えられる。にもかかわらず、活性が失われていることから、このアミノ酸残基は、シグナル伝達に直接関わっていると考えられる。そこで、構造を崩したと思われるLeu53→Alaの変異を除いて、残りのアミノ酸残基は第2のエフェクター領域と言うことが出来る。そこで、この領域をエフェクター領域(E領域)に対し

て、E'領域と呼ぶことにした。

ただ、図2.12で見られる様に、Ile46→Alaの変異はE'領域だけでなく、C末端側にも構造変化が及んでいる。C末の $\alpha$ ヘリックスは空間的にE'領域に近いことが示されている[deVos et al., 1988]。C末端のシステインは、イソプレノイドや脂肪酸の修飾を受けることが知られており、しかもシグナル伝達活性に重要な役割を果たしている[Gutierrez et al., 1989; Hancock et al., 1989]。ターゲットがイソプレノイドの修飾や修飾による高次構造変化を認識している可能性も指摘されている[Kuroda et al., 1992]。E'領域の変異体がイソプレノイドの修飾や、ターゲットによるイソプレノイドの認識、修飾による高次構造変化を妨げている可能性もある。

また、E'領域のGln-Val-Valという配列はシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンと相同性があり、実際にRasタンパク質が、カテプシンB, L, およびババインなどのシステインプロテアーゼを阻害することが示されている(Hiwasaki et al., 1987)。E'領域の変異体の中には、カテプシンBにたいする阻害活性が変化しているものも見いだされている(Hiwasaki et al., 1993)。このような阻害活性が、生理的にどのような意味を持つかは明らかではないが、E'領域の配列が、タンパク質同士の相互作用に関わるモチーフを形成している可能性もある。

さらに、E'領域がPC12細胞の神経様突起形成以外のRasタンパク質の機能(アフリカツメガエルの卵成熟、NIH 3T3細胞のトランスフォーメーション等)に関わっているかは、これから解析しなければならない。これらのRasの作用が共通のメカニズムによるものを解明する手がかりになると思われる。

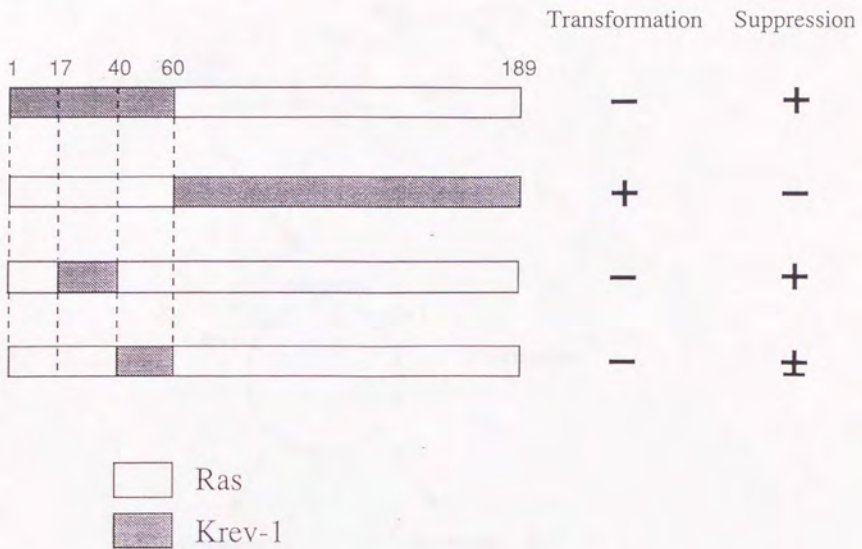
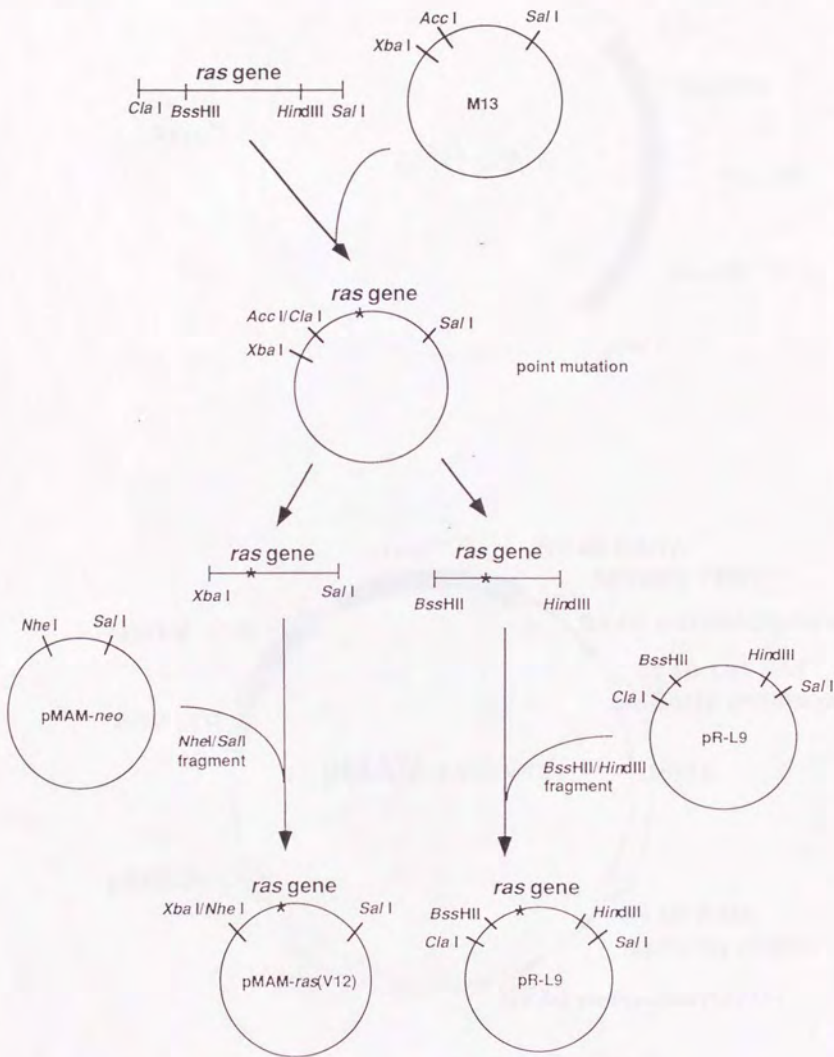


図2.1 RasとKrev-1のキメラの活性  
(Zhang et al., 1991)



哺乳動物細胞用ベクター      大腸菌発現用ベクター

図 2.2 変異 *ras* 遺伝子の作成

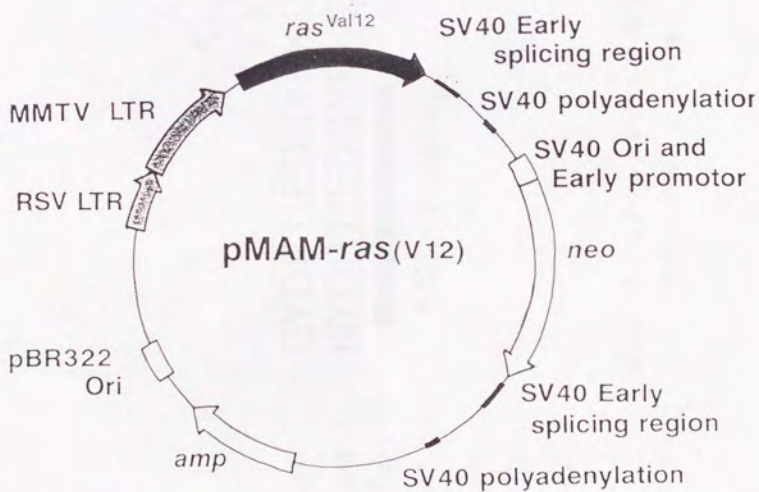
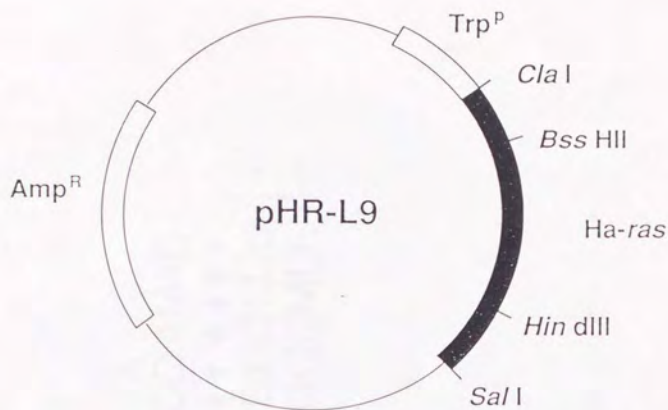


図 2.3 a. 大腸菌発現用ベクター； b. 哺乳動物細胞用ベクター



図2.4 RasとKrev-1のアミノ酸配列の比較。矢印のとおり，Rasタンパク質に変異を導入した。



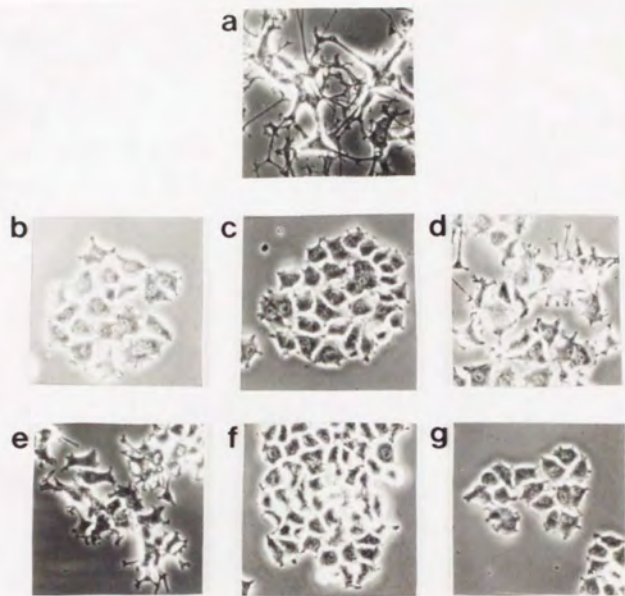


図2.5 変異ras遺伝子を組み込んだPC12細胞. a, Gly12→Val;  
 b, Gly12→Val/Lys42→Ala; c, Gly12→Val/Val45→Glu;  
 d, Gly12→Val/Ile46→Ala; e, Gly12→Val/Gly48→Ala;  
 f, Gly12→Val/Gly48→Cys; g, Gly12→Val/Leu53→Ala.  
 1 μM dexamethasone を培地に添加し, 24時間後の細胞の形態変化を観察した.

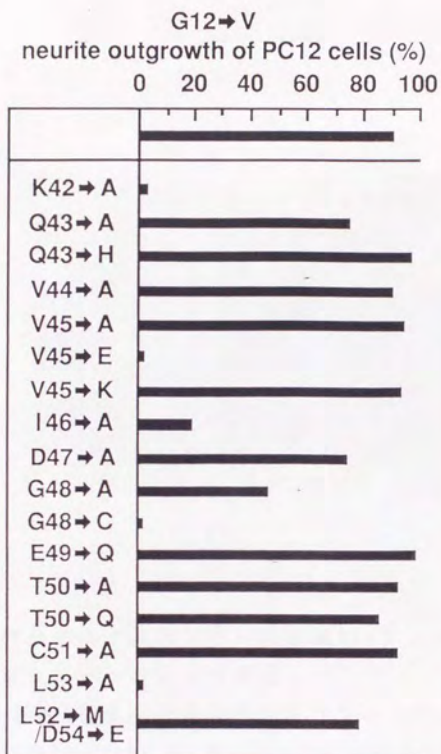


図 2.6 変異ras遺伝子のシグナル伝達活性. 変異ras遺伝子(Gly12→Val)を組み込んだPC12細胞の培地に, dexamethasone (最終濃度 1 $\mu$ M)を加えてRasタンパク質の発現を誘導し, 24時間後に神経様突起を形成した細胞の割合を求めた.

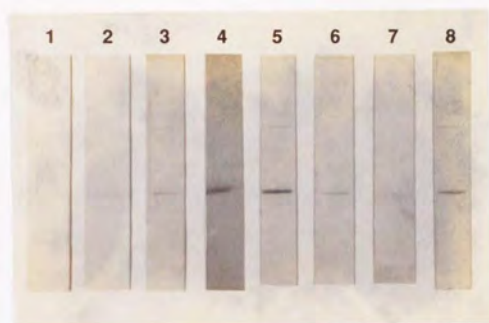


図2.7 PC12細胞内で発現している変異Rasタンパク質のウエスタンブロットティングによる検出.

- 1, 外来ras遺伝子を組み込んでいないPC12細胞;
- 2, Gly12→Val; 3, Gly12→Val/Lys42→Ala;
- 4, Gly12→Val/Val45→Glu; 5, Gly12→Val/Ile46→Ala;
- 6, Gly12→Val/Gly48→Ala; 7, Gly12→Val/Gly48→Cys;
- 8, Gly12→Val/Leu53→Ala.

それぞれの変異Rasタンパク質を組み込んだPC12細胞の培地に、 $1\mu\text{M}$  dexamethasoneを添加し、24時間後に集めた細胞抽出物にたいして、抗Rasモノクローナル抗体NCC-RAS-004を用いて、ウエスタンブロットティングを行なった。

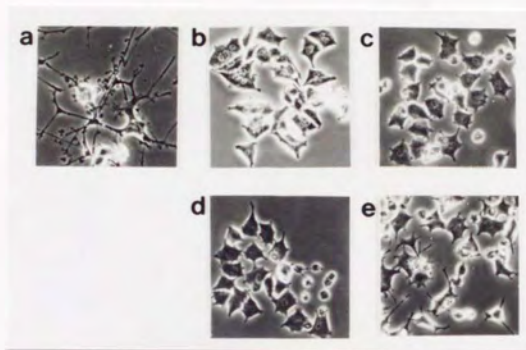


図2.8 GMPPNPを結合したRasタンパク質のPC12細胞へのマイクロインジェクション. a, wild type; b, Lys42→Ala; c, Val45→Glu; d, Gly48→Cys; e, Leu53→Ala. GMPPNPを結合させた変異Rasタンパク質 (Gly12 type; 10mg/ml) を100-200個のPC12細胞にマイクロインジェクションし, 24時間後に写真撮影した.

	GDP/GTP dissociation rates ( $k \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ )	
	GDP	GTP
WT	5.5	4.4
Lys42→Ala	5.3	4.6
Val45→Glu	7.6	5.8
Ile46→Ala	6.6	5.7
Gly48→Ala	5.5	4.3
Gly48→Cys	4.6	4.1
Leu53→Ala	15.4	21.2

表 2.1 変異 Ras タンパク質の GDP および GTP の解離速度。

[8,5'- $^3\text{H}$ ]GTP または [8,5'- $^3\text{H}$ ]GDP を結合させた変異 Ras タンパク質 (Gly12 type) に、ラベルしていない GTP を加えて、 $\text{Mg}^{2+}$  存在下、37°C での [8,5'- $^3\text{H}$ ]GTP または [8,5'- $^3\text{H}$ ]GDP の解離速度を測定した。

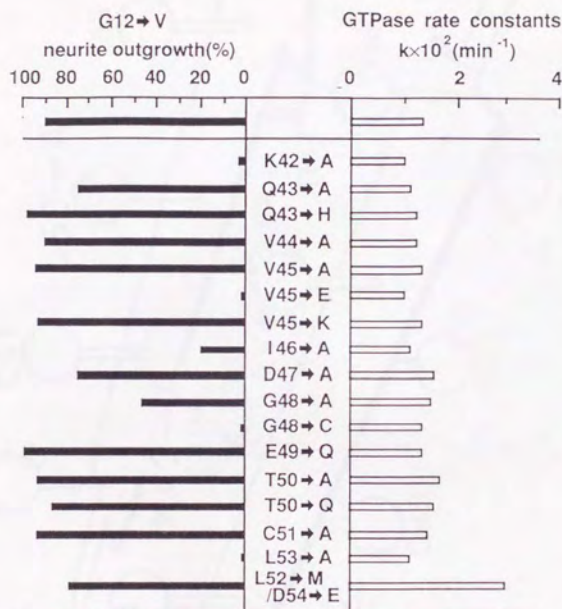


図2.9 変異Rasタンパク質のGTP加水分解速度。  
 左にシグナル伝達活性 (Gly12→Val), 右に37°CでのGTP加水分解速度 (Gly12 type) を示す。

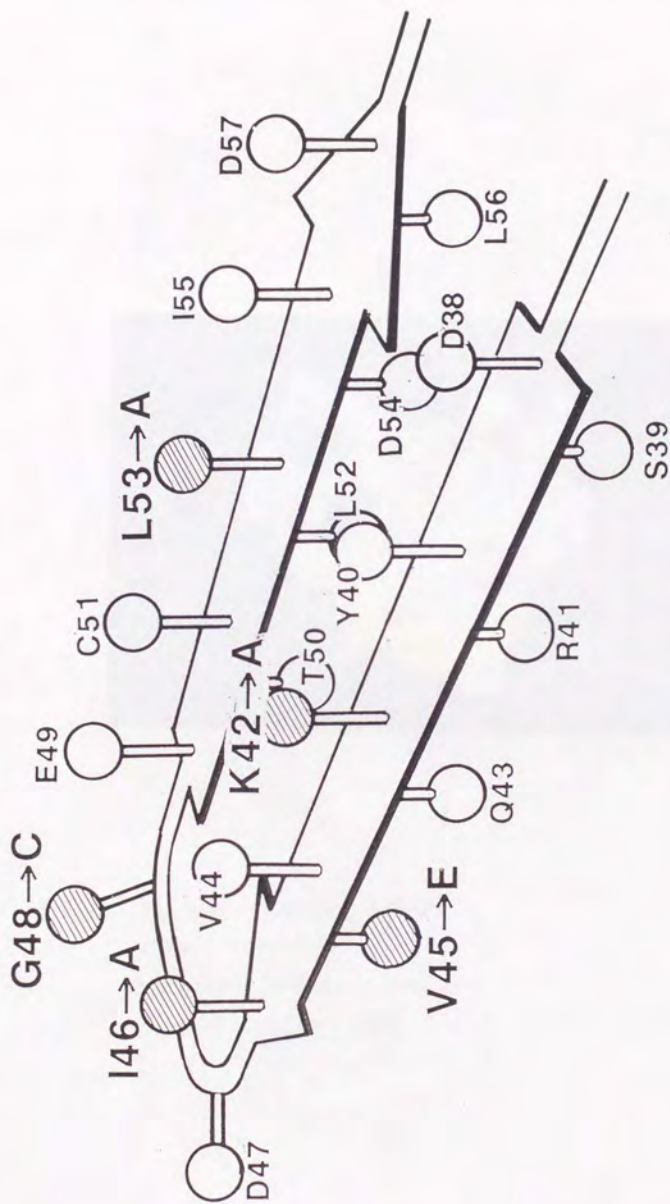


図2.10 シグナル伝達活性に必要なアミノ酸残基，β2およびβ3からなる逆平行βシート上に存在している。

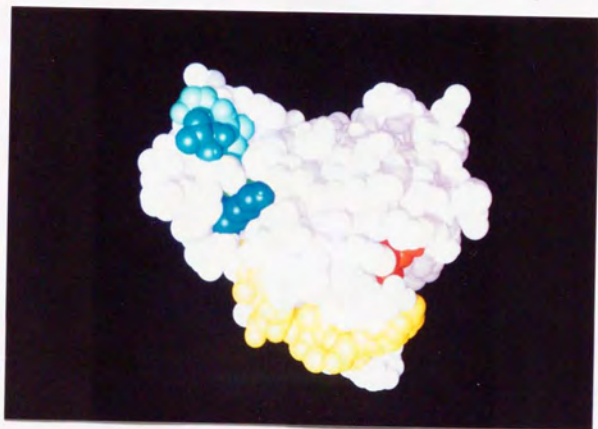


図2.11 Rasタンパク質の高次構造.

red: GMPPCP.

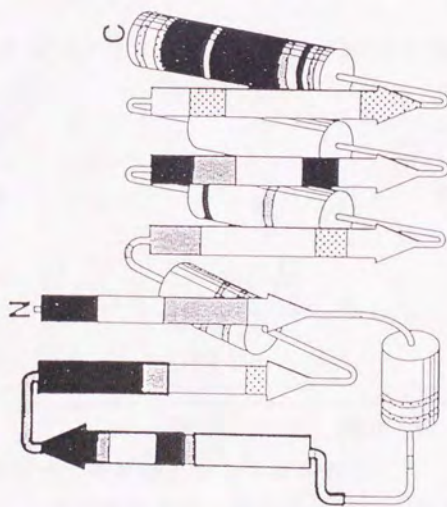
yellow: effector region.

blue: Lys42, Val45, Ile46, Gly48, Leu53.



WILD TYPE → I46A

GDP-BOUND FORM



GTP-BOUND FORM

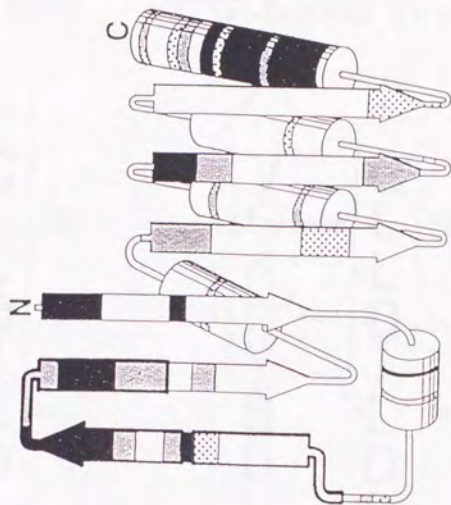
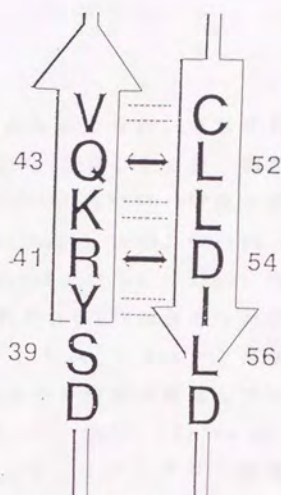
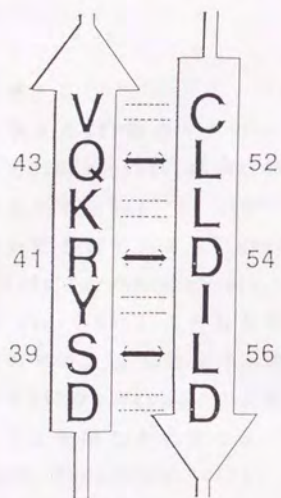


図2.12 Ile46→Alaの変異によって高次構造が変化する領域。  
 ■ > 目 > 図の順に変化の大きさを表している。

# Ras

GDP-bound form

GTP-bound form



GDP-bound form

GMPPNP-bound form

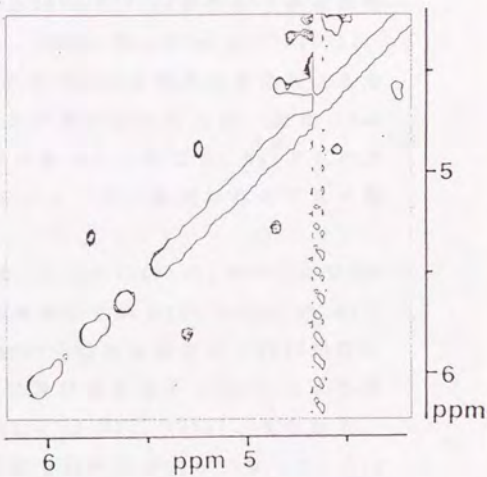
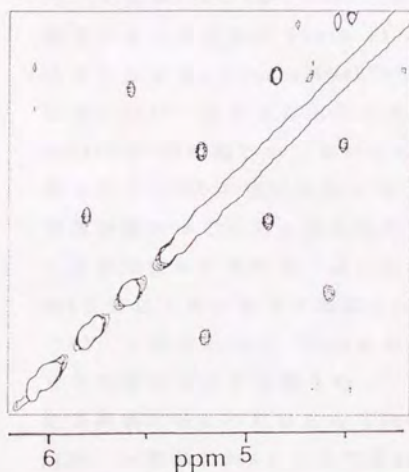


図2.13 GDP/GTP交換に伴う逆平行 $\beta$ シートの開裂。

逆平行 $\beta$ シートが開裂すると、逆平行 $\beta$ シートに特徴的な $\alpha$ - $\alpha$ 間のNOEが消失する。Ile46 $\rightarrow$ Ala変異体でも同様の構造変化が見られる。

[第3章]

変異Rasタンパク質とGTPase activating protein (GAP)の相互作用

[序]

様々なGTP結合タンパク質が発見されるにつれ、それぞれに対応するGTPase activating protein (GAP)も見いだされ、精製されてきている。GAP<sup>Ras</sup>、GAP<sup>Rho</sup>、GAP<sup>Krev-1</sup>、GAP<sup>Ras p21</sup>などがすでに見いだされている [Trahey and McCormick, 1988; Garret et al., 1989; Burstein et al., 1991; Kikuchi et al., 1989; Polakis et al., 1991]。それらのGAPはそれぞれのGTP結合タンパク質に特異的であり、交差反応は起こらない。しかし、Rasタンパク質に対するGAPが、Rasタンパク質のエフェクター領域を認識しているらしいことが明らかになった [Adari et al., 1989; Cales et al., 1989; McCormick, 1991]。したがって、エフェクター領域が共通しているKrev-1が、GAP<sup>Ras</sup>と相互作用するのではないかと考えられた。その後Krev-1が、GAP<sup>Ras</sup>によるRasのGTPase活性の上昇を抑制することが示された [Hata et al., 1990; Frech et al., 1990]。このことから、Krev-1はGAP<sup>Ras</sup>によるGTPase活性の上昇は起こらないが、GAP<sup>Ras</sup>と結合はしていることが明らかになった。逆に、RasはGAP<sup>Krev-1</sup>と結合もしないことがわかった。そこで、Rasタンパク質とそのGAPとの相互作用には、エフェクター領域以外のアミノ酸残基が関わっていると考えられる。

すでに我々の研究室では、Asp30、およびGlu31が、GAPによるGTPase活性の上昇に必須であることを報告している [Shirouzu et al., 1992]。しかも、Glu31→LysというKrev-1型の変異体は、PC12細胞の分化を引き起こす活性を失い、逆に神経成長因子 (NGF) による分化を抑制するようになった [Shirouzu et al., 1992]。すなわち、Krev-1と同様にRasタンパク質の活性を抑制するようになった。Glu31→Lys変異体は、NIH 3T3細胞においても、トランスフォーミング

活性を失い、逆にv-rasによるトランスフォームを抑制するようになった[Kitayama et al., 1991]. このように、Glu31が、GAPによるGTPase活性の上昇と、RasとKrev-1の活性の切替えの両方を担っていることが明らかになった。また、Asp30、Glu31以外にも、リン酸基結合部位である61-65番の残基がGAPとの相互作用に関わっているという報告もある[Maruta et al., 1991] (表3.1)。そこで、今まで見いだされた残基以外にも、Rasタンパク質とGAPとの相互作用に関わっているアミノ酸残基が存在しているか調べることにした。そして、GAPとの相互作用とシグナル伝達活性が、どのように関わっているかを検討した。

### 3.2 実験材料および方法

#### 3.2.1 GAPの精製

rat由来のGAP遺伝子をpUC19につないだベクターを用いた[Satoh et al., 1990]. このベクターをトランスフォームした大腸菌HB101株をLB培地で培養した。まず、over-night cultureにした200mlの前培養液を4Lの培地に加え、 $1\mu\text{M}$  IPTG中でGAPの発現を誘導し、一晚培養する。集菌した菌体16gを100mlの緩衝液A [ $50\text{mM}$  Hepes-NaOH (pH7.5),  $1\text{mM}$  DTT,  $1\text{mM}$  EGTA,  $1\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1\text{mM}$  PMSF] に $100\mu\text{g/ml}$  lysozymeを加えた溶液中で溶菌した。これにDNaseIを加え、15分間たったのちに、 $30,000\times g$ で30分間遠心し、上清を得る。これを緩衝液Bを用いて、DEAE-Sephacelによる陰イオンカラムクロマトグラフィー、次にHeparin-Sepharoseによるアフィニティークロマトグラフィーを行なった。これにより、ほぼ均一なバンドが得られた。

#### 3.2.2 変異体のGAP感受性の測定

GAPの濃度を変えて、Rasタンパク質のGTPase活性を測定した。1-2-6で述べた方法で調製した [ $8,5'$ - $^3\text{H}$ ]GTPを結合したRas ( $4\mu\text{M}$ ) 5

$\mu\text{l}$ にたいして、 $30\text{nM}$ ~ $1\mu\text{M}$  GAP  $5\mu\text{l}$ を加えて、 $10^\circ\text{C}$ で2分間反応させる。得た試料からヌクレオチドを遊離させ、それを薄層クロマトグラフィーによって展開し、GDPの割合を求めた。

### 3.2.3 ペプチドの作成および精製

Rasタンパク質の逆平行 $\beta$ シートに対応する20残基からなるペプチド、Asp-Ser-Tyr-Arg-Lys-Gln-Val-Val-Ile-Asp-Gly-Glu-Thr-Cys-Leu-Leu-Asp-Ile-Leu-AspをApplied Biosystem 431Aを用いて合成した。合成したペプチドを、 $0.1\%$  TFA- $20\%$   $\text{CH}_3\text{CN}$ に溶かし、HPLC AB 1783A, 1406AおよびカラムC18によって精製し、約 $50\text{mg}$ の精製ペプチドを得た(図3.1)。アミノ酸組成分析によって目的のペプチドであることを確認した(図3.2)。

## 3.3 結果

### 3.3.1 変異体のGAP感受性

シグナル伝達活性を失った変異体について、GAPにたいする感受性を調べた。GAPの濃度を変え、 $10^\circ\text{C}$ でのGTP加水分解速度を測定した。加えたGAPの量に対して、変異RasのGTP加水分解速度が上昇する様子を図にプロットした(図3.3)。すると、Val45→Glu変異体は、野生型に比べ低いGAP濃度で、GTP加水分解速度が上昇することが明らかになった。それに対し、Ile46→Ala, Gly48→Ala, Gly48→Cys変異体は、野生型の2倍程度のGAPを加えなければ、GTPase活性が上昇しなかった。Lys42→AlaおよびLeu53→Ala変異体は、ほぼ野生型と同程度にGAPによるGTPase活性の上昇が見られた。いずれの変異体でも、GAPの濃度を十分に高くした条件では、GTP加水分解速度は、 $0.8\text{ min}^{-1}$ 程度まで上昇した。

また、E'領域の変異体と比較するために、エフェクター領域の変異体で、シグナル伝達活性の低下しているPro34→Ala, Asp38→Asn

について、GAP存在下でのGTPase活性を測定した。これらの変異体はGAP感受性が野生型に比べ著しく低下していたため、反応温度を上げて測定した。加えたGAP量に対し、2分間反応後の結合ヌクレオチドのうちのGDPの割合をプロットした(図3.4)。この条件では、グラフからわかるように、野生型が300nM GAP存在下でGTPase活性が上昇しているのに対して、Asp38→Asnは多量のGAP存在下でも分解速度の上昇の割合が野生型より低く、それ以上上昇しない。したがって、GAPと結合はするものの、GAPとの結合の結果生じるGTPase活性の上昇が十分に起こらないと考えられる。Pro34→Alaは、野生型に比べ、GAP濃度に依存したGTPase活性の上昇が緩やかであり、GAPとのアフィニティーが低下していると思われる。

### 3.3.2 Rasタンパク質によるGAP活性の変化

E'領域は、グアニンヌクレオチドの交換によって、高次構造が変化しない領域である(図3.5; Ito et al.)。その領域の変異によって、GAPによるGTPase活性の上昇の割合が変化することから、GDP結合型Rasタンパク質でも、GAPと結合するのではないかと考えた。そこで、GDP結合型およびGMPPNP結合型の野生型Rasを調製し、その添加が、 $[8,5'\text{-}^3\text{H}]$ GTPを結合したRasのGAPによるGTPase活性の上昇にどのような影響を与えるか調べた。 $[8,5'\text{-}^3\text{H}]$ GTPを結合したRas ( $4\mu\text{M}$ )にたいして、8nM GAP、および、1-200  $\mu\text{M}$ のGDP結合型またはGMPPNP結合型Rasを加え、25°C、10分間反応させた。様々な濃度でRasを加えた場合のそれぞれの $[8,5'\text{-}^3\text{H}]$ GTP加水分解速度をプロットした(図3.6)。今までにも報告されているように、GMPPNPを結合した野生型Rasの量に依存して、 $[8,5'\text{-}^3\text{H}]$ GTP加水分解速度は低下した。それにたいして、GDP結合型Rasを加えると濃度依存的に $[8,5'\text{-}^3\text{H}]$ GTP加水分解速度が上昇することが明らかになった。このことから、GAPとの結合において、GMPPNPを結合したRasは、 $[8,5'\text{-}^3\text{H}]$ GTPを結合したRasと競合しており、このため、 $[8,5'\text{-}^3\text{H}]$ GTPの加水分解を阻害していることがわかる。それに対し、GDP結合型Ras

は、GAPの、「Rasタンパク質のGTPase活性を上昇させる」という活性を促進していることがわかる。

そこで、GAP感受性の上昇していたVal145→Glu変異体と、低下していたGly48→Cys変異体、エフェクター領域の変異体で、GAPとのアフィニティーが低下しているPro34→Ala変異体、GAPによるGTPase活性の上昇が小さかったAsp38→Asn変異体が、野生型RasにたいするGAP活性にどのように影響するか調べた。まず、GDP結合型の変異体を添加したときの、野生型RasのGAP依存性GTPase活性の変化を測定した。Asp38→Asnを添加したときには、野生型と同程度に野生型RasのGAP依存性GTPase活性が上昇した。すなわち、Asp38→Asnは、GDP結合型では野生型と同程度にGAPと相互作用し、GAP活性を上昇させた。Pro34→Alaは野生型の約1/2倍、Val145→Gluは約1/10倍の濃度でGAP活性を上昇させた。それに対して、Gly48→Cysでは、多量に添加しないと、GTPase活性が上昇しなかった(図3.7)。

次に、GMPPNP結合型における変異体のGAP活性に対する影響を見た。まず、Asp38→Asnは、GMPPNPを結合した野生型と同程度にGAP存在下での野生型RasのGTP加水分解速度を低下させた。すなわち、野生型と同程度にGAPに結合し、競合阻害したと解釈出来る。Gly48→Cysは、野生型よりも低い濃度で、GAP依存性GTPase活性を阻害した。Pro34→Alaでは、GMPPNP結合型でも、GDP結合型と同様にGAP活性を上昇させた。ただし、その度合はGDP結合型のときよりも小さかった。Val145→Gluは、低い濃度で添加した場合にはGAP依存性GTPase活性を上昇させたが、濃度が高くなると逆に、GTPase活性を低下させるようになった(図3.8)。

### 3.3.3 ペプチドによるGAP活性の変化

E'領域を含む20個のアミノ酸残基からなるペプチド(E'ペプチド)および17-32番に対応するペプチド(ペプチド17-32)を合成して、これらによるRas-GAP相互作用にたいする影響を調べた。4  $\mu$ M Rasにたいして、8 nMのGAP存在下、E'ペプチドを1-100  $\mu$ Mの濃度で加え

て、RasのGTP加水分解速度を測定した。すると、以前から報告されていたとおり、ペプチド17-32は、GAPによるRasのGTPase活性の上昇を阻害した [Schaber et al., 1989]。それに対し、E'ペプチドは、Rasタンパク質のGAP依存性GTPase活性を上昇させることがわかった (図3.9)。GAPはC末端側334残基(702-1044)だけでも、Rasタンパク質のGTPase活性促進能を保持していることが報告されている [Serth et al., 1991]。そこで、ウシ由来のGAP<sup>702-1044</sup>によるRasのGTPase活性上昇に、E'ペプチドがどのような影響を与えるかを調べた。4  $\mu$ M Rasに対し、GAP<sup>702-1044</sup>を20nMになるように加えて、ペプチドを1-100  $\mu$ Mの濃度で添加して、GTP加水分解速度を測定した。すると、GAP<sup>702-1044</sup>依存性GTPase活性の、E'ペプチド添加による上昇は、全長GAPに比べて小さかった (図3.10)。

#### 3.4 考察

いままでに、GAPとの結合に関わる部位としては、エフェクター領域およびループ4のリン酸結合部位が報告されている [Vogel et al., 1989; Maruta et al., 1991; Adari et al., 1989; Cales et al., 1989; McCormick, 1989]。本研究において新たに、E'領域がGAPとの結合に関わっていることが示された。しかも、E'領域の結合によってGAPとRasの相互作用が変化することが明らかになった。

変異Rasタンパク質によるGAP活性の様々な変化は、次のように考えることが出来る。エフェクター領域はGDP結合型ではGAPに結合しないが、GTP結合型になるとGAPの触媒部位に結合する。それに対して、E'領域はGDP結合型でもGTP結合型でも、GAPの触媒部位以外に結合してGAPのコンフォメーション変化を引き起こし、GAP活性を上昇させる。すなわち、E'領域はGAPの調節部位に結合していると言えることが出来る。従って、GDP結合型でのGAP活性の上昇は、E'領域とGAPの相互作用を表すものであるが、GTP結合型でのGAP活性の変化は、エフェクター領域による競合阻害とE'領域によるGAP活性の



上昇効果の両方によるものである (図3.11)。

この考えに基づいて、3.3.3の結果を解釈すると、まずGDP結合型では、Val45→Gluは低い濃度でGAPのRasにたいするGTPase活性促進能を上昇させる。したがって、Val45→Gluの変異は、GAPとのアフィニティーを上昇させたと考えられる。Gly48→Cysはそれに比べ、結合が弱くGTPase活性を上昇させない。このように、E'領域の変異はGAPの調節部位との結合の強さを変化させ、GAP活性の促進能に影響を与える。エフェクター領域の変異体Asp38→Asnは、野生型とほぼ同程度にGAP活性を促進する。Pro34→Ala変異体は野生型よりも低い濃度でGAP活性を上昇させたが、これはプロリンからアラニンという変異が、高次構造に影響をあたえ、E'領域のコンフォメーションを変化させたためであると考えられる。いずれにしても、エフェクター領域への変異は、E'領域の変異に比べ、GAP活性促進能への影響が小さかった。

GTP結合型においては、エフェクター領域がGAPの触媒ドメインに結合出来るRasタンパク質 (野生型, Asp38→Asn, Val45→Glu, Gly48→Cys) は、GAP依存性GTPase活性を競合的に阻害する。グラフから求められるKiから考えると、Asp38→AsnはGAPによってGTPase活性は上昇しないが、野生型と同程度のアフィニティーでGAPと結合していることがわかる。Val45→GluはE'領域のGAP活性の上昇効果が大きいため、低い濃度ではGAP活性を上昇させ、濃度が高くなると、エフェクター領域によるGAPの競合阻害が起こるのだろう。Gly48→Cysは、E'領域によるGAP活性の上昇効果が弱くなっているために、野生型よりも低い濃度で競合阻害が起こる。Pro34→Alaは、エフェクター領域がGAPと結合しなくなっているために競合阻害が起こらず、GTP結合型でもE'領域の効果だけが表れていると考えられる。このように、エフェクター領域とE'領域は、それぞれ独立してGAPと相互作用していることが明らかになった。

このように、Rasタンパク質にGAPとの結合部位が2箇所存在することは、GAPにたいする変異Rasの感受性に影響を与えているものと

考えられる。図3.3で示したように、E'領域の変異体のGAP感受性が変化していたが、これは結合の強さが変化しているのではなく、E'領域によるGAP活性の促進能の変化のためである可能性がある。E'ペプチド、もしくはGDP結合型Ras存在下で、GAPの活性を十分に促進したうえで、GAP感受性を測定すれば、二つの可能性のどちらであるかを決定することが出来るであろう。

Rasタンパク質によるGAP活性の上昇のグラフ(図3.7)からHill定数を求めたところ、1.3-1.5になった。すなわち、E'領域とGAPの調節部位の結合に見かけ上なんらかの協同性がある。実際にGAPにE'領域の結合部位が2カ所以上存在する可能性もあるが、GAPのアミノ酸配列ではそれらしい繰り返し配列もみられない。Hill定数が1以上になるのは、一つの可能性としては、GAPがaggrigationしやすいことから考えると、GAPが会合体になっており、E'領域が一つの調節部位に結合するとaggrigationが解消して、他の調節部位が露出するという可能性がある。また、基質として存在している $3\mu\text{M}$ の[8,5'- $^3\text{H}$ ]GTPを結合した野生型RasがすでにGAPを活性化しているために、GDPを結合したRasを添加しても立ち上がりが遅く、見かけ上Hill定数が大きくなっているとも考えられる。もしそうであるならば、基質のRas濃度を変えれば、GAP活性の促進能は見かけ上変わって来るはずである。様々な基質濃度でGAP活性の促進能を測定しなければならない。現在までにいくつかのグループが、GAPと変異体Rasタンパク質の結合定数を測定し報告しているが、必ずしも一致していない[Shaber et al., 1989; Farnsworth et al., 1991; Marshall et al., 1991; Bollag and McCormick, 1991; Gideon et al., 1992]。GDP結合型のRasを加えると、GAP活性が上昇するという報告も無い。これは、基質Ras濃度によりGAP活性促進能が見かけ上変化し、そのためGTP結合型によるGAPの競合阻害の程度も異なって来るためであると考えられる。したがって、E'領域によるGAP活性の上昇を考慮に入れば、RasとGAPの結合定数を正確に求めることが可能になると思われる。

E'領域の結合はGDP型とGTP型とどちらがGAPに結合しやすいであろうか。Pro34→Ala変異体で見ると、GDP結合型の方がGTP結合型よりも低い濃度でGAP活性を上昇させている。しかし、Pro34→Alaは変異により野生型とE'領域の構造が異なっている可能性がある。野生型ではGDP型とGTP型のGAP活性促進能は、エフェクター領域とGAPの触媒部位との結合があるため、比較出来ない。やはり、E'領域とGAPの結合をGAP活性の変化では無く、直接検出出来る方法で測定しなければならない。その方法として、蛍光の変化による結合定数の測定が考えられる。Rasタンパク質にはトリプトファン残基が存在しないので、Rasタンパク質を添加した際のGAPのトリプトファンの蛍光変化の測定を予備的に試みたが、GAPには9残基トリプトファンが存在しているため、有意な蛍光変化が検出できなかった。現在、一部のトリプトファン残基をフェニルアラニンに置換した変異GAPを作成中である。また、E'ペプチドのGAP存在下でのTRNOEを測定することも試みている。

では、RasのE'領域はGAPのどの領域に結合しているのだろうか。GAPのC末端触媒ドメインだけでRasのGTPase活性を上昇させることが以前報告されており [Serth et al., 1991]、RasのGTPase活性を上昇させる触媒部位はGAPの900番近辺に存在するらしいことがわかっている。しかし最近、全長GAPに比べ、GAP<sup>702-1044</sup>は、Rasタンパク質の結合が約1/5、GTPase活性の上昇が1/20程度に落ちているという結果が報告された [Gideon et al., 1992]。本研究では全長GAPとGAP<sup>702-1044</sup>の由来が異なるので一概には比較出来ないが、GAP<sup>702-1044</sup>は、約2/5程度GTPase活性促進能が低かった。同程度にRasのGTPase活性を促進する濃度で、E'ペプチドによる影響を比較したところ、全長GAPはE'ペプチドによってGAP活性が上昇したが、GAP<sup>702-1044</sup>のGAP活性の上昇は小さかった。このことから、E'領域がGAPの主にN末端側ドメインに結合している可能性がある。もしくは、GAP<sup>702-1044</sup>とも弱い相互作用があることから、C末端側ドメインではあるが、N末端側ドメインの近くに結合部位が存在して

おり、N末端側ドメインを欠損したため高次構造が崩れて、E'領域との相互作用が弱くなったとも考えられる。GAPの一次構造(図1.4)を考えると1-124番は疎水性残基が集まっており、膜結合に関わっているのではないかと考えられている。また、それに続くSH2-SH3-SH2ドメインは、それぞれリン酸化チロシン結合部位やアクチン系結合に関わっていると言われている [Moran et al., 1990]。従って、E'領域との結合部位は、360番以降に存在しているのではないか。このように、E'領域はGAPの触媒部位以外の部位に結合しており、GAPのコンフォメーション変化を引き起こすと考えられる。

DSYRKQVVIDGETCLLDILD

(E' peptide)

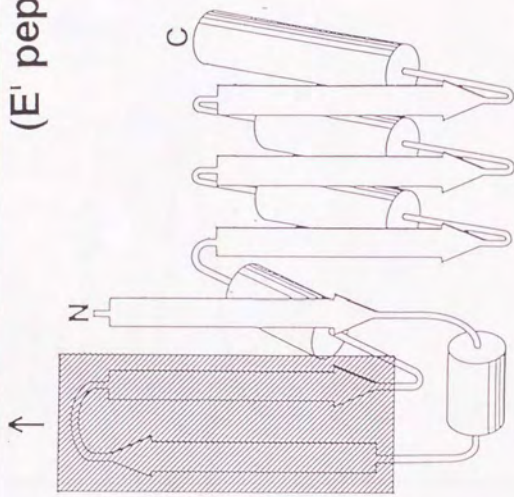


図3.1 E'ペプチドの構造

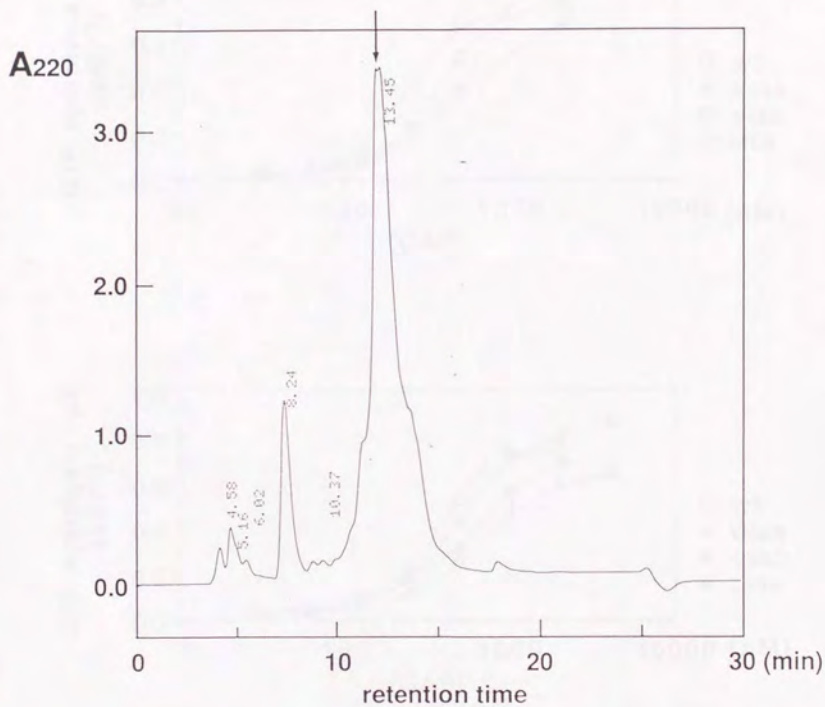


図3.2 E'ペプチドの精製

0.1% TFA-20% CH<sub>3</sub>CNにペプチドを溶かし、C18カラムを用いて20-70% CH<sub>3</sub>CNのグラジエントにより溶出した。矢印でペプチドの溶出位置を示した。

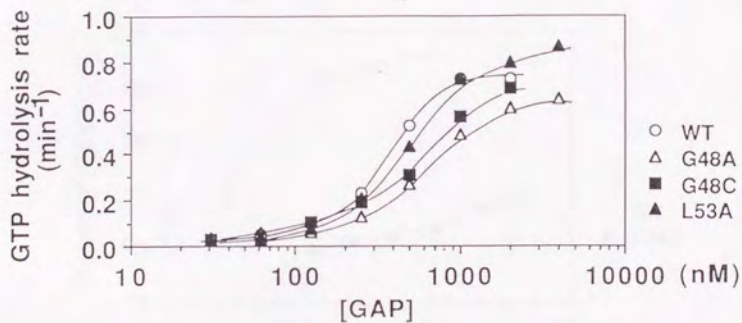
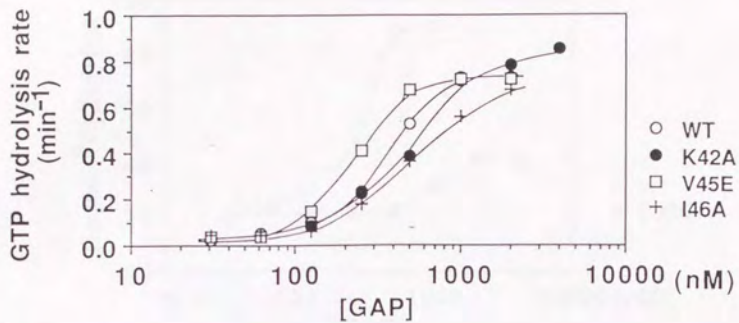


図3.3 E'領域の変異Rasタンパク質のGAP感受性.

[8,5'-<sup>3</sup>H]GTPを結合させたRas (3 μM) に対して、横軸の濃度のGAPを加え、10°C、2分間反応させ、[8,5'-<sup>3</sup>H]GTPの加水分解速度を求めた。

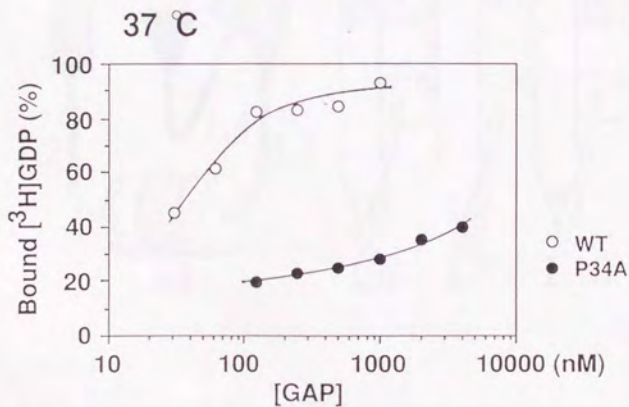
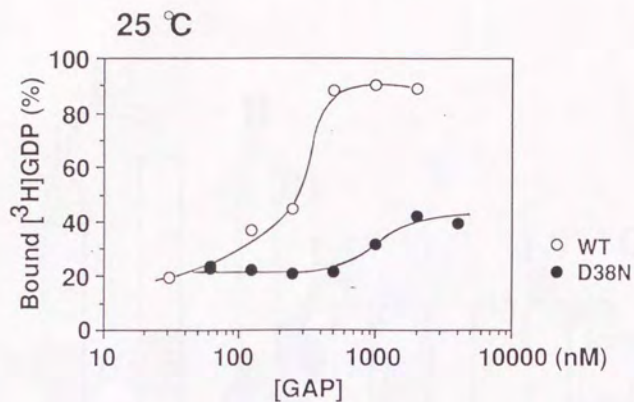


図3.4 エフェクター領域の変異Rasタンパク質のGAP感受性。  
 [8,5'-<sup>3</sup>H]GTPを結合させたRas (3 μM) に対して、横軸の濃度のGAPを加え、2分間反応させ、結合ヌクレオチドのうちGDPの割合を求めた。



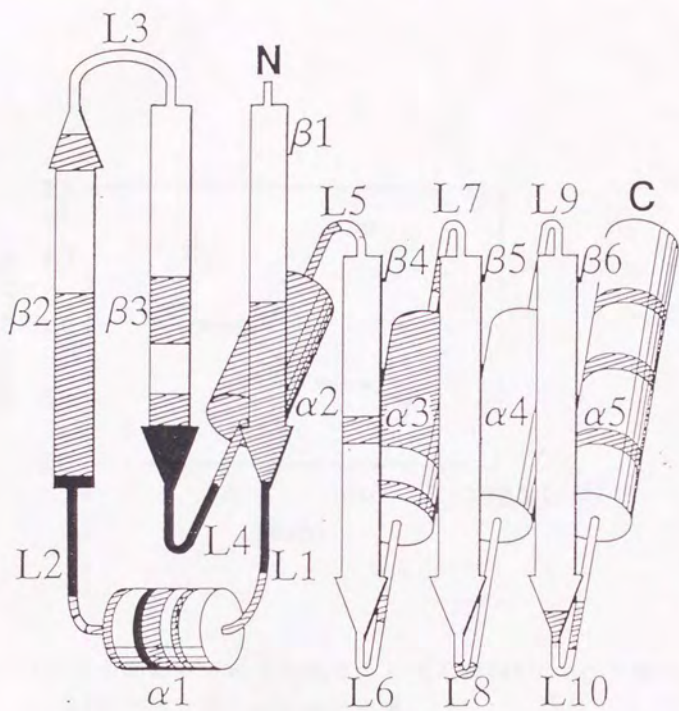


図3.5 グアニンヌクレオチドの交換に伴う高次構造変化が起こる領域。

■: GTP結合型になると構造多型になる領域

▨: ヌクレオチドの交換に伴う構造変化が見られた領域

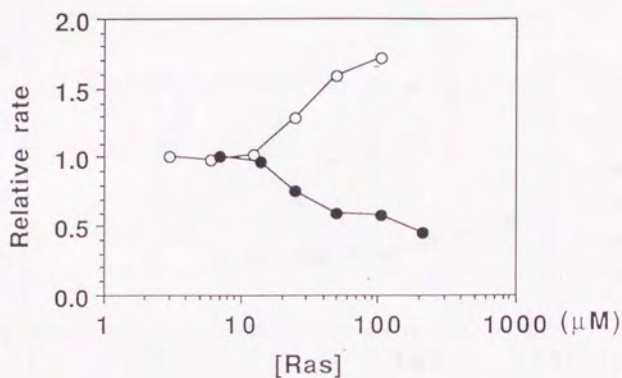


図3.6 GDPおよびGMPPNP結合を結合した野生型Rasタンパク質によるGAP依存性GTPase活性の影響。

[8,5'-<sup>3</sup>H]GTPを結合させた野生型Ras (3 μM) に対し, 8 nMのGAPを加え, さらにラベルしていないGDPあるいはGMPPNPを結合した野生型Rasを図の横軸の濃度で加えて, 25°C, 10分間反応させ, [8,5'-<sup>3</sup>H]GTPの加水分解速度を求めた。縦軸は, unlabeled GDPまたはGMPPNPを結合したRas非存在下での加水分解速度を1としたときの, 速度の比で表してある。

○: GDP-bound Ras

●: GMPPNP-bound Ras

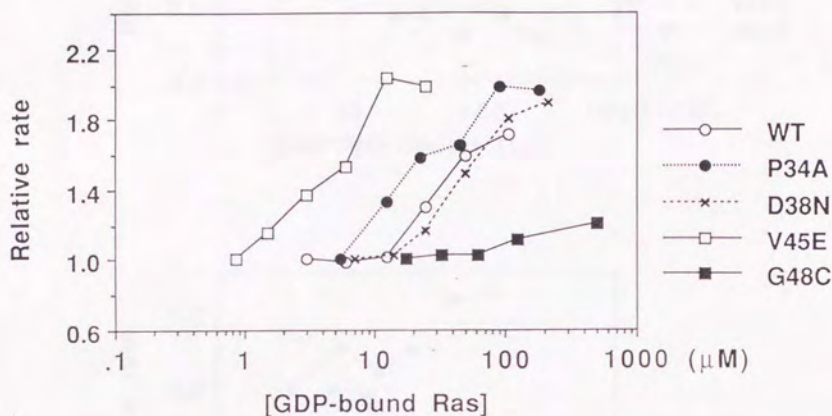


図3.7 GDPを結合した変異Rasによる野生型RasのGAP依存性GTPase活性の変化。

[8,5'-<sup>3</sup>H]GTPを結合させた野生型Ras (3 μM) に対し, 8nMのGAPを加え, さらにラベルしていないGDPを結合した変異Rasを図の横軸の濃度で加えて, 25°C, 10分間反応させ, 野生型Rasによる[8,5'-<sup>3</sup>H]GTPの加水分解速度を求めた。縦軸は, unlabeled GDPを結合したRas非存在下での加水分解速度を1としたときの, 速度の比で表してある。

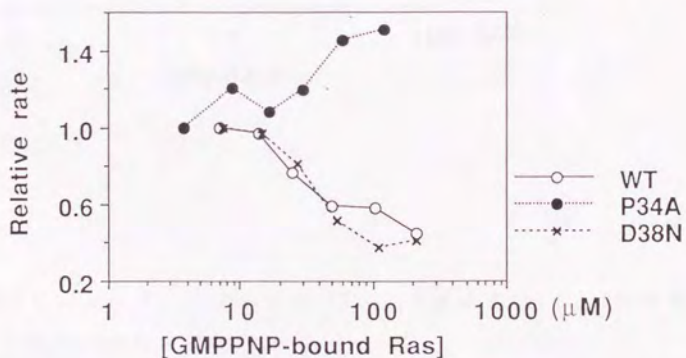
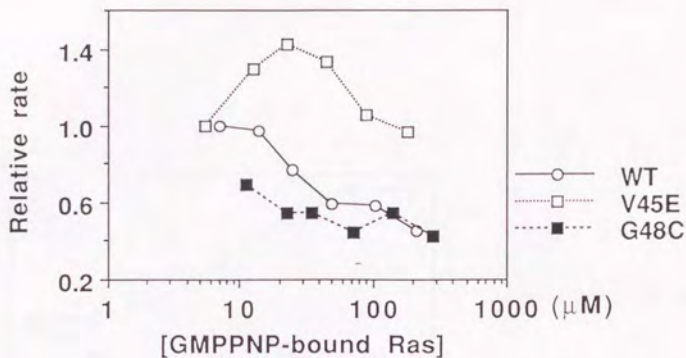


図3.8 GMPPNPを結合した変異Rasによる野生型RasのGAP依存性GTPase活性の変化。

[8,5'-<sup>3</sup>H]GTPを結合させた野生型Ras (3 μM) に対し、8 nMのGAPを加え、さらにラベルしていないGMPPNPを結合した変異Rasを図の横軸の濃度で加えて、25°C、10分間反応させ、野生型Rasによる[8,5'-<sup>3</sup>H]GTPの加水分解速度を求めた。縦軸は、unlabeled GMPPNPを結合したRas非存在下での加水分解速度を1としたときの、速度の比で表してある。

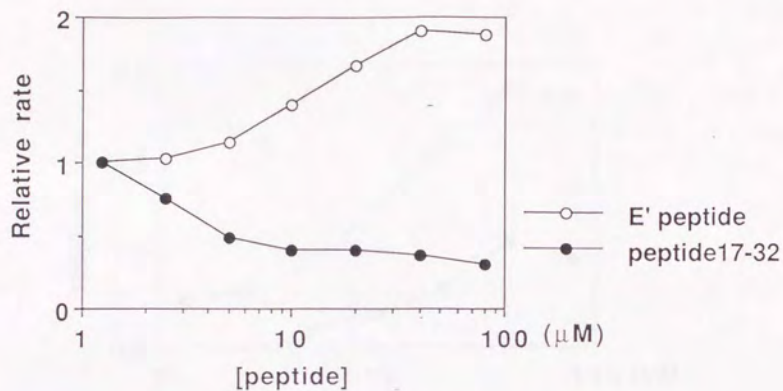


図3.9 E'ペプチド、ペプチド17-32による野生型RasのGAP依存性GTPase活性の変化。

[ $8.5' - ^3\text{H}$ ]GTPを結合させた野生型Ras ( $3\mu\text{M}$ ) に対し、 $8\text{nM}$ のGAPを加え、さらにペプチドを図の横軸の濃度で加えて、 $25^\circ\text{C}$ 、10分間反応させ、野生型Rasによる[ $8.5' - ^3\text{H}$ ]GTPの加水分解速度を求めた。縦軸は、ペプチド非存在下での加水分解速度を1としたときの、速度の比で表してある。

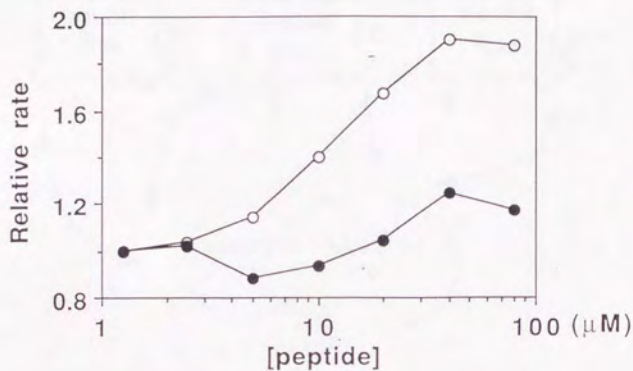


図3.10 E'ペプチドによる野生型Rasの全長および短鎖GAP依存性GTPase活性の変化。

[8,5'- $^3\text{H}$ ]GTPを結合させた野生型Ras (3  $\mu\text{M}$ ) に対し, 8nMの全長GAPまたは20nMのGAP<sup>702-1044</sup>を加え, さらにE'ペプチドを図の横軸の濃度で加えて, 25°C, 10分間反応させ, [8,5'- $^3\text{H}$ ]GTPの加水分解速度を求めた。縦軸は, ペプチド非存在下での加水分解速度を1としたときの, 速度の比で表してある。

○: 全長GAP依存性GTPase活性

●: GAP<sup>702-1044</sup>依存性GTPase活性

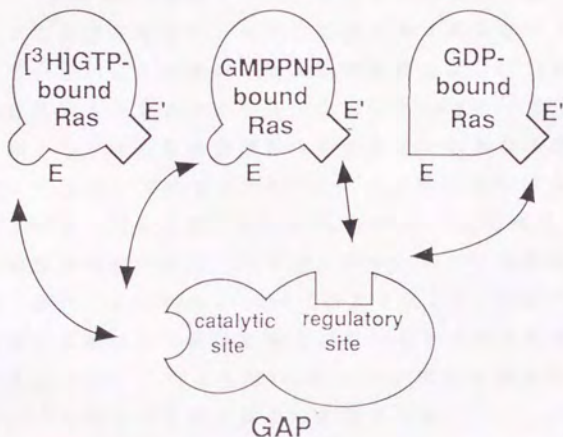


図3.11 エフェクター領域 (E領域) とE'領域によるGAPとの相互作用。

エフェクター領域はGAPの触媒部位に結合し、その結合によりRasタンパク質のGTPase活性が上昇する。E'領域はGAPの調節部位に結合してGAPのコンフォメーション変化を起し、触媒部位によるGTPase活性の上昇を促進する。GDP結合型RasはE'領域での結合しかできないので、 $[^3\text{H}]$ GTPを結合したRasのGTP分解速度を上昇させるが、GMPPNPを結合したRasはエフェクター領域でもGAPと結合できるため、 $[^3\text{H}]$ GTPを結合したRasとGAPの相互作用を阻害する。

現在数多くのGTP結合タンパク質が見いだされており、細胞の増殖や分化、タンパク質の分泌に関わっていることが示されている。Rasタンパク質はGTP結合タンパク質の一つであり、様々な現象を引き起こすことが知られているが、そのメカニズムについてはまだ解明されていないことが多い。哺乳動物細胞では、PC12細胞の分化やNIH3T3細胞のトランスフォーメーションといった一見正反対の現象を引き起こし、さらに出芽酵母や分裂酵母でも異なる現象に関わっている。そして、その他にもRasタンパク質による様々な現象が報告されている。たとえば、MAP kinaseやRaf-1の活性化、c-fosの活性化、細胞内脂質の変化、カリウムチャンネルの共役阻害などが見られる。また、protein kinase Cのように、Rasタンパク質のシグナル伝達の上流にも下流にも存在していると考えられているタンパク質も存在する。このようなRasタンパク質の多機能性はどのようなメカニズムによって得られるものだろうか。

本研究では、Rasタンパク質のシグナル伝達に関わる領域を新たに見いだした。この領域の変異は、グアニンヌクレオチド結合能にも、GTPase活性にも影響を与えていなかった。NMRを用いた高次構造解析によると、Rasタンパク質全体の構造を崩すこともなく、特にエフェクター領域の構造にはほとんど変化がなかった。また、X線結晶解析によるRasタンパク質の構造によると、今回シグナル伝達に必須であることが示されたアミノ酸残基は、Rasタンパク質の表面に露出しているらしいことがわかった。したがって、これらのアミノ酸残基はなんらかのターゲットと直接相互作用する部位であると考えられ、この領域は第2のエフェクター領域であると言える。そこでこの領域をE'領域と呼ぶことにした。

エフェクター領域とE'領域は隣接してはいるが、タンパク質表面上ではむしろ別方向を向いている(図2.11)。また、我々の研究室



では、Rasタンパク質のグアニンヌクレオチドの交換に伴う高次構造変化を解析を行なっているが、その結果、エフェクター領域はグアニンヌクレオチドの交換に伴い大きな構造変化を起こすが、E'領域はほとんど変化が見られなかった。そして、E'領域の変異がRasタンパク質の構造に及ぼす影響をNMR解析により調べたところ、E'領域の変異は、E'領域のコンフォメーションは変化させたが、エフェクター領域の構造にはほとんど影響が見られなかった。これらのことから、エフェクター領域とE'領域は高次構造上かなり独立していると思われる。この2つのエフェクター領域の独立性が、Rasタンパク質の多機能性と対応している可能性がある。

さらにE'領域は、GAPのコンフォメーション変化を引き起こし、そのGTPase活性促進能を上昇させることがわかった。すなわち、エフェクター領域はGAPの触媒部位に結合し、E'領域はGAPの調節部位に結合する。このように、エフェクター領域とE'領域はGAPとの結合という点でも独立して働いている。それでは、Rasタンパク質のE'領域とGAPの調節部位との結合は、Rasのシグナル伝達にどのように関わっているのだろうか、一つには、GAPになんらかの修飾が入るとE'領域がGAPに結合しても触媒部位でのGAP活性は上昇せず、エフェクター領域と協同してなんらかのシグナルを伝えるということが考えられる(図4.1A)。または、E'領域にはGAP以外のなんらかのターゲット因子Xが結合し、GAPのSH2、SH3ドメインや、ターゲットXからシグナルが伝わる可能性がある(図4.1B)。Rasタンパク質が過剰に存在しているときや、シグナルを伝え終わった後に、E'領域がGAPの調節部位に結合すると、RasのGTPase活性を上昇させて、不活性型であるGDP結合型に抑えるのではないか(図4.1C)。

また、Val145→Glu変異体ではE'領域とGAPとの結合が強くなったのに対して、Gly48→Cysは結合が弱くなっていた。それにもかかわらず、二つの変異体はともにシグナル伝達活性が見られなかった。この結果も二通りに解釈が出来る。一つは、E'領域がGAPとの結合を通してシグナル伝達に関わっている場合で、この場合にはVal145

→Glu変異体は、GAPとの結合が強くなり、GAP活性を上昇させるにかかわらず、シグナル伝達に必要なGAPのコンフォメーション変化は引き起こさなかったという可能性がある。もう一つは、GAPとの結合は負の制御で、他のなんらかの因子Xとの結合がシグナル伝達に必要な場合には、Val45→GluおよびGly48→Cys変異体は両方共Xとの結合が弱くなっていると解釈出来る。このように、これだけでは、E'領域とGAPの結合がシグナル伝達の正負どちらに働いているかを定めることは出来ない。正負のどちらに働いているかを知るために、E'領域の変異体のうち、シグナル伝達活性を失っていないものが、GAPの調節部位と結合しているかどうかを現在検討している。E'領域とGAPの結合がシグナル伝達の正負いづれに働いているかを解析し、さらにE'領域に結合するGAP以外のターゲットを検索することは、Rasタンパク質のシグナル伝達の高機能性を解明するために重要であると思われる。また、GAPとGAP以外のターゲットXのE'領域との結合様式に共通点が存在するならば、GAPとの結合が強くなっている変異体Val45→Gluは、ターゲットXの検索に有用であると期待される。

McCormickらは、カリウムチャンネルとムスカリンリセプターの共役阻害にはGAPとRasが両方必要だが、GAPの触媒ドメインを除いてN末端側ドメインだけにすると、Rasタンパク質が不要になることを示している。そこで、RasがGAPのコンフォメーション変化を引き起こしており、GAPのSH2、SH3ドメインがシグナルを伝達するという仮説を提案している [Martin et al., 1992]。このように、E'領域とGAPの相互作用が、Rasタンパク質のシグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性がある。

Rasの変異体の中には、Asp30→Glu/Glu31→Lysや、Ser17→Asn、RAS1<sup>1-105</sup>(Gln68→Leu)のように、Rasの作用を優性に抑える変異体も見いだされている [Shirouzu et al., 1992; Feig and Cooper, 1988; Farnsworth and Feig, 1991; Gibbs et al., 1989]。しかし、E'領域の変異体で、NGF刺激による神経様突起形成を阻害する

変異体は見いだされなかった。これは、Zhangらによるキメラを用いた研究の結果とも対応する。Krev-1がRasを抑制する機構については、Krev-1は、Rasよりも高いアフィニティーでGAP<sup>R\*\*</sup>に結合するが、GTPase活性の上昇は受けないことから、RasのGAPへの結合を競合阻害するためであるという考え方もある。しかし、Rasを優性に抑制する変異RasであるAsp30→Glu/Glu31→Lysは、逆にGAPへの結合は弱くなっているという報告 [Marshall et al., 1991] もあり、抑制機構はよくわかっていない。Val45→Gluのように、GAPとの結合が強くなった変異体が優性にRasのシグナル伝達を抑えないということも、GAPのシグナル伝達における役割の手がかりになるかもしれない。

そして、エフェクター領域とE'領域の変異体が生体内で、どのような活性の差を示すかは、興味深い。Rasは、MAP kinaseやRaf-1の活性化を引き起こしているという報告がある [Pomerance et al., 1992; Robbins et al., 1992]。PC12細胞でも、NGF刺激によるMAP kinaseやRaf-1の活性化にRasタンパク質が関わっているという報告がある [Thomas et al., 1992; Wood et al., 1992]。エフェクター領域やE'領域の変異体が、これらのkinaseを活性化するかどうか、その活性化に差が見られるかを調べることはRasのシグナル伝達経路の解明に有用である。さらに、fosの活性化、細胞内脂質の変化など、Rasによって引き起こされるとされてきた様々な現象も、二つのエフェクター領域が協同して担っていると予想される。また、出芽酵母では、RAS1、RAS2はアデニレートサイクレーズを活性化していることが明らかになっているが、ras1ras2変異株では、それ以外に温度感受性が変化する [Morishita et al., 1992]。酵母と哺乳動物細胞ではRasタンパク質の働きは異なるかもしれないが、ヒトのras遺伝子を出芽酵母に組み込んでも相補することができる。そこで、ras1ras2変異株に、E領域およびE'領域の変異体を導入することによって、アデニレートサイクレーズの経路、または温度感受性に関わる経路のどちらかを相補することが出来るかどうかを調

べることは興味深い。また、このような経路の二重性が哺乳動物細胞でも存在し、二つのエフェクター領域の役割と対応している可能性がある。

本研究により、Rasタンパク質の機能部位として新たに、E'領域が見いだされたが、Rasタンパク質の多機能性を考えると、さらにシグナル伝達活性に重要な機能部位が存在することも考えられる。例えば、無細胞系におけるMAP kinaseの活性化や、酵母でのアデニレートサイクレーズの活性化には、RasのC末端のイソプレノイドの修飾が必要であることが示されており、イソプレノイドおよびその近辺の構造をターゲットが認識していると考えられる [Horiuchi et al., 1992; Kuroda et al., 1993]。またGAP以外に、Rasと相互作用するタンパク質として、NF1やguanine nucleotide releasing proteinなどが存在する。これらのタンパク質との相互作用に関わる機能部位についても、さらに解析を行なうべきであろう。このように、Rasタンパク質の機能部位を同定し、特定の機能が失われた変異体を得ることによって、Rasタンパク質による複雑なシグナル伝達を、単純な素過程に分割出来る可能性がある。これが可能であれば、Rasタンパク質のシグナル伝達の経路の解析が、容易になると期待される。

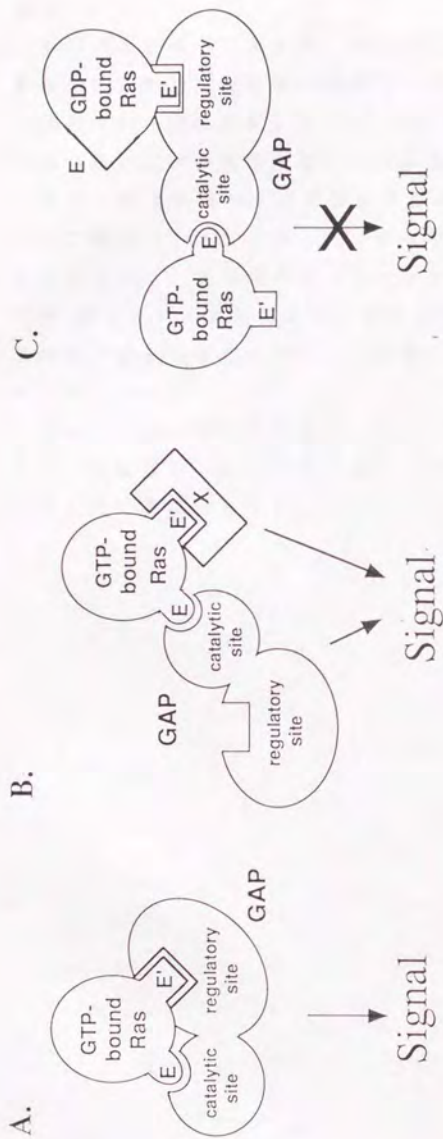


図4.1 エフェクター領域とE'領域によるシグナル伝達モデル.

E'領域とGAPの結合がシグナル伝達に正に働く場合.

A. GAPに何らかの修飾が入ると、GAPがコンフォメーション変化を起こし、E'領域が結合してもGAP活性が上昇しなくなる。エフェクター領域とE'領域が協同してシグナルを伝達する。

B. E'領域に何らかの因子Xが結合すると、GAPがコンフォメーション変化を起こし、GAPのSH2, SH3ドメインやXから、シグナルが伝達される。

E'領域とGAPの結合がシグナル伝達に負に働く場合.

C. Rasが過剰に存在するときや、シグナルを伝達した後に、E'領域がGAPに結合すると、GAP活性を上昇させRasをGDP結合型にする。

## 謝辞

本研究を行なうにあたり、常に適切にご指導いただきました指導教官の横山茂之教授に深く感謝致します。また、卒業研究および修士課程の間、指導教官としてお世話になりました東京大学名誉教授（現 蛋白工学研究所所長）宮澤辰雄先生に感謝致します。

また、萬有製薬つくば研究所所長の西村 暹博士には、常に有意義なご意見をいただきました。心よりお礼申し上げます。Krev-1の研究について、有意義なディスカッションをして頂いた癌研究所の野田 誠先生に感謝致します。横山研究室助手の武藤 裕博士には、NMRの解析などについて、ご指導いただきました。ありがとうございます。

最後に、横山研究室の皆様、特に一緒に研究を進めてきた山崎和彦氏、伊藤隆氏、白水美香子さん、小野塚昭氏、小塩尚代さん、外山洋一氏に感謝致します。

## REFERENCES

- Adari, H., Lowy, D. R., Willumsen, B. M., Der, C. J.,  
McCormick, F. (1988) *Science* 240, 518-521.
- Barbacid (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 779-827.
- Bar-Sagi, D. and Feramisco, R. (1985) *Cell*, 42, 841-848.
- Basu, T. N., Gutmann, D. H., Fletcher, J. A., Glover, T. W.,  
Collins, F. S. and Downward, J. (1992) *Nature* 356, 713-715.
- Birchmeier, C., Broek, D. and Wigler, M. (1985) *Cell*, 43, 615-621.
- Bollag, G. and McCormick, F. (1991) *Nature* 351, 576-579.
- Broek, d., Smiy, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F.,  
Northup, J. and Wigler, M. (1985) *Cell* 42, 763-769.
- Burgring, B, M. T., Medema, R. H., Maassen, J. A., de Wetering,  
M. L., McCormick, F. and Bos, J. L. (1991) *EMBO J.* 10, 1103-  
1109.
- Burstein, E. S., Linko-Stentz, K., Lu, Z. and Macara, I. G.  
(1991) *J. Biol. Chem.* 266, 2689-2692.
- Cales, C. J., Hancock, J. F., Marshall, C.J., Hall, A. (1988)  
*Nature* 332-335.
- Chen, D. and Okayama, H. (1987) *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2745-2752.
- Contense, S., Kenyon, K., Rimoldi, D. and Friedman, R. M. (1990)  
*Science*, 249, 796-799.
- DeClue, J. E., Zhang, K., Redford, P., Vass, W. C. and Lowy, D.  
R. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 2819-2825.
- Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A. J., Vincent, L. A., Roberts,  
T. M. and Sturgill, T. W. (1992) *Science* 257, 1404-1407.
- de Vries-Smith, A. M. M., Burgering, B. M. Th., Leervers, S. J.,  
Marshall, C. J. and Bos, J. L. (1992) *Nature* 357, 602-604.
- deVos, A. M., Tong, L., Milburn, M. V., Matias, P. M., Jancarik,  
J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Otsuka E., and Kim,  
S.-H. (1988). *Science* 239, 888-893.
- Dominguez, I., Marshall, M. S., Gibbs, J. B., Herreros, A. G.,  
Cornet, M. E., Graziani, G., Diaz-Meco, M. T., Johansen, T.,  
McCormick, F. and Moscat, J. (1991) *EMBO J.* 10, 3215-3220.
- Duchesne, M., Schweighoffer, F., Parker, F. C., Frobert, Y.,  
Thang, M. N., Tocque, B. (1993) *Science* 259, 525-528.

- Farnsworth, C. L. and Feig, L. A. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 4822-4829.
- Farnsworth, C. L., Marshall, M. S., Gibbs, J. B., Stacey, D. W. and Feig, L. A. (1991) *Cell* 64, 625-633.
- Feig, L. A. and Cooper, G. M. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 3235-3243.
- Feramisco, J. R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M. and Sweet, R. M. (1984) *Cell*, 38, 109-117.
- Frech, M., John, J., Pizon, V., Chardin, P., Tavitian, A., Clark, R., McCormick, F. and Wittinghofer, A. (1990) *Science* 249, 169-171.
- Fujita-Yoshigaki, J., Shirouzu, M., Koide, H., Nishimura, S. and Yokoyama, S. (1991) *FEBS Lett.* 294, 187-190.
- Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T. and Yamamoto, M. (1986) *Cell* 44, 329-336.
- Garrett, M. D., Self, A. J., van Oers, C. and Hall, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10-13.
- Gibbs, J. B., Schaber, M. D., Allard, W.J., Sigal, I. S. and Scolnick, I. M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5026-5030.
- Gibbs, J. B., Schaber, M. D., Schofield, T. L., Scolnick, E. M. and Sigal, I. S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6630-6634.
- Gibbs, J. B., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., Dixon, R. A. F. and Vogel, U. S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20437-20442.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E. and Wittinghofer, A. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 2050-2056.
- Gutierrez, L., Magee, A. I., Marshall, C. J. and Hancock, J. F. (1989) *EMBO J.* 8, 1093-1098.
- Hall, A. (1992) *Cell* 69, 389-391.
- Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E. and Marshall, C. J. (1989) *Cell* 57, 1167-1177.
- Hata, Y., Kikuchi, A., Sasaki, T., Schaber, M. D., Gibbs, J. B. and Takai, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7104-7107.



- Hattori, S., Fukuda, M., Yamashita, T., Nakamura, S., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20346-20351.
- Haung, Y. K., Kung, H.-F. and Kamata, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8008-8012.
- Hiwasa, T., Yokoyama, S., Noguchi, S., Ha, J.-M. and Sakiyama, S. (1987) *FEBS Lett.* 211, 23-26.
- Hiwasa, T., Fujita-Yoshigaki, J., Shirouzu, M., Koide, H., Sawada, T., Sakiyama, S. and Yokoyama, S. (1993) *Cancer Lett.* in press.
- Horiuchi, H., Kaibuchi, K., Kawamura, M., Matsuura, Y., Suzuki, N., Kuroda, Y., Kataoka, T. and Takai, Y. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12, 4515-4520.
- Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P. and Marshall, C. J. (1992) *Cell* 71, 335-342.
- Imai, Y., Miyake, S., Hughes, D. A. and Yamamoto, M. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 3088-3094.
- Jurnack, F., Heffron, S. and Bergmann, E. (1990) *Cell* 60, 525-528.
- Kamata, T. and Feramisco, J. R. (1984) *Nature*, 310, 147-150.
- Kanai, T., Hirohashi, S., Noguchi, M., Shimoyama, Y., Shimosato, Y., Noguchi, S., Nishimura, S. and Abe, O. (1987) *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 1314-1318.
- Kawata, M., Matsui, Y., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y. and Takai, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18965-18971.
- Kikuchi, A., Sasaki, T., Araki, S., Hata, Y. and Takai, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 9133-9136.
- Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y., Noda, M. (1989) *Cell* 56, 77-84.
- Kitayama, H., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. and Noda, M. (1990a) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 445-448.
- 北山仁志, 松崎朋子, 井川洋二, 野田亮 (1990) 第13回日本分子生物学会年会
- Kaziro, Y. (1978) *Biochem. Biophys. Acta.* 505, 95-127.
- Kawata, M., Matsui, Y., Kondo, J., Hishida, T., Teranishi, Y. and Takai, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18965-18971.
- Kuroda, Y., Suzuki, N. and Kataoka, T. (1993) *Science* 259, 683-686.

- Lacal, J. C., Fleming, T. P., Warren, B. S., Blumberg, P. M. and Aaronson, S. A. (1987) *Mol. Cell. Biol.*, 7, 4146-4149.
- Marshall, M. S., Hill, W. S., Ng, A. S., Vogel, U. S., Schaber, M. D., Sigal, I. S. and Gibbs, J.B. (1989) *EMBO J.* 8, 1105-1110.
- Marshall, M. S., Davis, L. J., Keys, R. D., Mosser, S. D., Hill, W. S., Scolnick, E. M. and Gibbs, J. B. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 3997-4004.
- Martin, G. A., Yatani, A., Clark, R., Conroy, L., Polakis, P., Brown, A. M., McCormick, F. (1992)-*Science* 255, 192-194.
- Maruta, H., Holden, J., Sizeland, A. and D'Abaco, G. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 11661-11668.
- McCormick, F. (1989) *Cell* 56, 5-8.
- Medema, R. H., deLaat, W. L., Martin, G. A., McCormick, F. and Bos, J. L. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 3425-3430.
- Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A. T., Yamaizumi, J., Nishimura, S., and Kim, S.-H. (1990). *Science* 247, 939-945.
- Miura, K., Inoue, Y., Nakamori, H., Iwai, S., Otsuka, E., Ikehara, M., Noguchi, S. and Nishimura, S. (1986) *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 77, 45-51.
- Molly, C. J., Bottaro, D. P., Fleming, T. P., Marshall, M. S., Gibbs, J. B. and Aaronson, S. A. (1989) *Nature*, 342, 711-714.
- Moran, M. F., Koch, C. A., Anderson, D., Ellis, C., England, L., Martin, G. S. and Pawson, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8622-8626.
- 森下卓, 光沢浩, 安楽泰宏 (1992) 第15回日本分子学会年会
- Muroya, K., Hattori, S. and Nakamura, S. (1992) *Oncogene*, 7, 277-281.
- Nadin-Davis, S. A., Nasim, A. and Beach, D. (1986) *EMBO J.* 5, 2963-2971.
- Nakafuku, M., Satoh, T. and Kaziro, Y. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 19448-19454.
- Neuman-Silberberg, F. S., Schejter, E., Hoffmann, F. M. and Shilo, B. Z. (1984) *Cell* 37, 1027-1033.

- Noda, M., Ko, M., Ogura, A., Liu, D.-G, Amano, T., Takano, T. and Ikawa Y. (1985) *Nature*, 318, 73-75.
- Nori, M., Vogel, U. S., Gibbs, J. B. and Weber, M. J. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 2812-2818.
- Nur-E-Kamal, M. S. A., Sizeland, A., D'Abaco, G. and Maruta, H. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1415-1418.
- Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, V., Holmes, K. C., John, J. and Wittinghofer, A. (1989) *Nature* 341, 209-214.
- Perucho, M., Goldfarb, M., Shimizu, K., Lama, C., Fogh, J., and Wigler, M. (1981). *Cell* 27, 467-476.
- Pizon, V., Chardin, I., Lerosey, I., Oloffson, B. and Tavitian, A. (1988) *Oncogene* 3, 201-204.
- Polakis, P. G., Rubinfeld, B., Evans, T. and McCormick, F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 239-243.
- Pomerance, M., Schweighoffer, F., Tocque, B. and Pierre, M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 16155-16160.
- Robbins, D. J., Cheng, M., Zhen, E., Vanderbilt, C. A., Feig, L. A. and Cobb, M. H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6924-6928.
- Rogge, R. D., Karlovich, C. A. and Banerjee, U. (1991) *Cell* 64, 39-48.
- Qui, M. S. and Green, S. H. (1991) *Neuron*, 7, 937-946.
- Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Nakamura, S. and Kaziro, Y. (1990a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 5993-5997.
- Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, M., Akiyama, T., Yamamoto, T. and Kaziro, Y. (1990b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 7926-7929.
- Satoh, T., Nakafuku, M., Miyajima, A. and Kaziro, Y. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3314-3318.
- Schaber, M. D., Garsky, V. M., Boylen, D., Hill, W. S., Scolnick, E. M., Marshall M. S., Sigal, I. S. and Gibbs, J. B. (1989) *Proteins Struct. Funct. Genet.* 6, 306-315.
- Serth, J., Lautwein, A., Frech, M., Wittinghofer, A. and Pingoud, A. (1991) *EMBO J.* 10, 1325-1330.

- Shibuya, E. K., Polverino, A. J., Chang, E., Wigler, M. and Ruderman, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 9831-9835.
- Shih, T. Y., Weeks, M.O., Gruss, P., Dhar, R., Oroszlan, S., and Scolnick, E. M. (1982). *J. Virol.* 42, 253-261.
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Hiroyoshi, M., Isomura, M., Araki, S., Sasaki, T. and Takai, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 20672-20677.
- Shirouzu, M., Fujita-Yoshigaki, J., Ito, Y., Koide, H., Nishimura, S. and S. Yokoyama (1992) *Oncogene*, 7, 475-480.
- Shou, C., Farnsworth, C. L., Neel, B. G. and Feig, L. A (1992) *Nature* 358, 351-354.
- Sigal, I. S., Gibbs, J. B., D'Alonzo, J. S. and Scolnick, E. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4725-4729.
- Stone, J. C., Vass, W. C., Willumsen, B. M. and Lowy, D. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 3565-3569.
- Szeberenyi, J., Cai, H. and Cooper, G. M. (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10, 5324-5332.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. and Tho-e, A. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 757-768.
- Temeles, G. L., Gibbs, J. B., D'Alonzo, J. S., Sigal, I. S. and Scolnick, E. M. (1985). *Nature* 313, 700-703.
- Thomas, S. m., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S. and Brugge, J. S. (1992) *Cell* 68, 1031-1040.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. and Wigler, M. (1985) *Cell* 40, 27-36.
- Tong, L., Milburn, M. V. and Kim. S.-H. (1989) *Science* 245, 244.
- Trahey, M. and McCormick, F. (1987) *Science* 238, 542-545.
- Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G. A., Lander, M., Long, C. M., Crosier, W. J., Watt, K., Kohts, K. and McCormick, F. (1988) *Science* 242, 1697-1700.
- Tsai, M.-H., Yu, C.-L., Wei, F.-S., Stacey, D. W. (1989) *Science* 243, 522-526.

- Tsai, M.-H., Yu, C.-L. and Stacey, D. W. (1990) *Science* 250, 982-985.
- Vogel, U. S., Dixon, R. A. F., Schaber, M. D., Diehl, R. E., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., Sigal, I.S. and Gibbs, J. B. (1988) *Nature* 335, 90-93.
- Willumsen, B. M., Norris, K., Papageorge, A. G., and Lowy, D. R. (1982). *Nature* 310, 583-586.
- Willumsen, B. M., Papageorge, A. G., Kung, H., Bekesi, E., Robins, T., Johnson, M., Vass, W. C. and Lowy, D. R. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 2646-2654.
- Wolfman, A. and Macara, I. G. (1990) *Science* 247, 67-69.
- Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M. and Blenis, J. (1992) *Cell* 68, 1041-1050.
- Xu, G., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., White, R. and Weiss, R. (1990) *Cell* 62, 599-608.
- Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Mizuno, T., Hiroyoshi, M., Shirataki, H. and Takai, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 266, 16626-16634.
- Yamasaki, K., Kawai, G., Ito, Y., Muto, Y., Fujita, J., Miyazawa, T., Nishimura, S., and Yokoyama, S. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 1054-1062.
- Yatani, A., Okabe, K., Polakis, P., Halenbeck, R., McCormick, F. and Brown, A. M. (1990) *Cell*, 61, 769-776.
- Zhang, K., DeClue, J. E., Vass, W. C., Papageorge, A. G., McCormick, F. and Lowy, D. R. (1990a) *Nature* 346, 754-756.
- Zhang, K., Noda, M., Vass, W.C., Papageorge, A. G., Lowy, D. R. (1990b) *Science* 249, 162-165.

卒論製本  
ヤマザキ  
☎ (03) 3958-1681

