



# Quantitative Analysis of Mutually Competitive Binding of Human Raf-1 and Yeast Adenylyl Cyclase to Ras Proteins

港, 敏則

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1337

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001337>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	みなと 港	とし 敏	のり 則	（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）			
学位記番号	博い第925号			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
学位授与の日付	平成7年3月31日			
学位論文題目	Quantitative Analysis of Mutually Competitive Binding of Human Raf-1 and Yeast Adenylyl Cyclase to Ras Proteins （ヒトRaf-1蛋白質及び出芽酵母アデニル酸シクラーゼのRas蛋白質への競合的結合の定量的解析）			
審査委員	主査 教授	片岡	徹	
	教授	中村	肇	教授 吉川 潮

## 論文内容の要旨

### I. はじめに

rasプロト癌遺伝子産物（Ras蛋白質）は、低分子量GTP結合蛋白質ファミリーの一員で、真核細胞に広く存在し、細胞膜受容体から核へのシグナル伝達の間段階を担って細胞の増殖、分化に関わっている。最近、細胞増殖因子により刺激された受容体によりRas蛋白質が活性化される機構とともに、その下流のエフェクターの正体が明らかになってきている。

脊椎動物、ショウジョウバエ、線虫などでは、Ser,Thr-プロテインキナーゼ活性を持つrafプロト癌遺伝子産物（Raf蛋白質）がRas蛋白質と直接結合し、その結果Raf蛋白質の活性化、MEK（MAPキナーゼキナーゼ）-MAPキナーゼカスケードの活性化が引き起こされる。一方、出芽酵母では、Ras蛋白質のエフェクターはアデニル酸シクラーゼである事が確定している。すなわち、グルコース刺激によりCDC25（GDP-GTP交換促進因子）を介して活性化されたRas蛋白質は、アデニル酸シクラーゼと直接的に結合して活性化する。その結果活性化されたアデニル酸シクラーゼはcAMPを産生し、cAMPはcAMP依存プロテインキナーゼであるTPK1-3を活性化し、情報が下流に伝達される。本研究室における部位特異的突然変異導入実験によりアデニル酸シクラーゼの中間部600アミノ酸を占めるロイシンに富む反復配列により成るleucine-rich repeats領域がRas蛋白質との相互作用に必須であることがすでに証明されている。現時点での問題点は、RafのRas蛋白質結合部位であるアミノ末端領域と、出芽酵母アデニル酸シクラーゼのそのleucine-rich repeats領域および分裂酵母のRasのエフェクターと考えられるプロテインキナーゼByr2の三者間にアミノ酸配列の類似性が認められない事であり、このことは、三者のエフェクター間で結合に関するRas蛋白質上の構造要求性が異なることを示唆している。今回、出芽酵母アデニル酸シクラーゼのRas蛋白質によるin vivo, in vitroの活性化の系を用いて、エフェクター蛋白質によるRas蛋白質依存性シクラーゼ活性化の競合阻害を発見し、その反応速度論的解析を行う事により、Ras蛋白質とその各種エフェクター分子との間の結合反応を解析した。

## II. 実験方法と結果

### 1. アデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域によるRas蛋白質依存性アデニル酸シクラーゼ活性化の競合的阻害の解析

アデニル酸シクラーゼのRas蛋白質結合部位と考えられるleucine-rich repeats領域を含むポリペプチド（アミノ酸番号606-1380）をグルタチオン-S-転移酵素（GST）との融合蛋白質〔GST-CYR1（606-1380）〕として出芽酵母で産生し、精製した。それを出芽酵母Ras2蛋白質による出芽酵母アデニル酸シクラーゼの試験管内活性化の系に加えてシクラーゼ活性を測定した結果、dose-dependentに抑制が見られた。このことはleucine-rich repeats領域がアデニル酸シクラーゼとRas蛋白質を競合していることを示唆した。そこでleucine-rich repeats領域による阻害パターンを出芽酵母Ras2蛋白質及びleucine-rich repeats領域を含むポリペプチドの量を種々変えて反応速度論的に解析したところ、確かに競合して阻害していることが判明した。さらに、阻害パターンの解析にもとづいて出芽酵母Ras2蛋白質のleucine-rich repeats領域との結合曲線を求める事が出来、Ras2蛋白質は、leucine-rich repeats領域と解離定数（ $K_d$ ; dissociation constant）値13nMで強く結合する事が判明した。この値は、シクラーゼ活性化を指標として求めた出芽酵母アデニル酸シクラーゼのRas2蛋白質に対する $K_d$ 値7nMとほぼ同じであったので、leucine-rich repeats領域がアデニル酸シクラーゼのRas蛋白質結合部位であることが証明された。

### 2. ヒトRaf蛋白質によるRas蛋白質依存性アデニル酸シクラーゼ活性化の競合的阻害の定量的解析

Ras蛋白質による出芽酵母アデニル酸シクラーゼの試験管内活性化系に、大腸菌でマルトース結合蛋白質（MBP）との融合蛋白質として産生し、精製したヒトRaf蛋白質のアミノ末端257アミノ酸の領域〔MBP-Raf（1-257）〕を加えたところ、dose-dependentにシクラーゼ活性化の競合的阻害が見られた。その結果に基づいて1.の実験と同様にRaf蛋白質アミノ末端領域のヒトH-Ras蛋白質及び出芽酵母Ras2蛋白質に対する結合の解離定数（ $K_d$ ）を求めたところ、 $K_d$ 値は、各々3.5nM、24nMであった。この事は、ヒトRaf蛋白質が酵母Ras2よりも同じ種類のRas蛋白質の方に親和性が高い事を示した。

### 3. アデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域及びRaf蛋白質のRas蛋白質との結合が直接的であることの証明

アデニル酸シクラーゼをGSTとの融合蛋白質として出芽酵母で産生し、グルタチオンアガロースを用いて精製し、それを用いてRas蛋白質による試験管内活性化の系を構成し、〔GST-CYR1（606-1380）〕及び〔MBP-Raf（1-257）〕による阻害を調べた。その結果、いずれもdose-dependentにシクラーゼ活性化を競合阻害した。このことより、アデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域及びRaf蛋白質のアミノ末端領域が直接的にRas蛋白質と結合していることが判明した。

### 4. アデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域及びRafのアミノ末端領域の過剰発現による活性型RAS2<sup>Val19</sup>依存性の熱ショック感受性形質の抑制

活性型RAS2<sup>Val19</sup>を持つ出芽酵母細胞（TK161R2V）内でアデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域及びRafのアミノ末端領域を過剰発現すると、活性型RAS2<sup>Val19</sup>の表現型（熱ショック感受性）が抑制された。このことは、アデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域及びRaf蛋白質のアミノ末端領域が内在性のアデニル酸シクラーゼとRAS2<sup>Val19</sup>蛋白質またはアデニル酸シクラーゼ結合蛋白質（CAP）を競合し、表現型が抑制されたことを示唆した。

### 5. アデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域及びRafのアミノ末端領域の過剰発現によ

## るグルコース刺激に対する野性型RAS 2及び活性型RAS 2<sup>Val19</sup>—依存性の細胞内cAMP濃度上昇反応の抑制

熱ショック感受性の抑制は、RAS 2<sup>Val19</sup>蛋白質の結合のみでなくCAPを結合することによっても起こることが判明している。一方、グルコース刺激に対する野性型RAS 2をもつ酵母細胞（SP 1）及びTK161R 2 Vの細胞内cAMP濃度上昇反応の抑制は、CAPを競合する場合はTK161R 2 Vにおいてのみ細胞内cAMP濃度上昇反応を抑制するのに対し、RAS 2<sup>Val19</sup>蛋白質を競合する場合はTK161R 2 VだけでなくSP 1に対しても細胞内cAMP濃度上昇反応を抑制することがわかっている。そこで、いずれの機構で熱ショック感受性の抑制が現れたのかを調べるため、SP 1及びTK161R 2 Vで、Rafのアミノ末端領域及びアデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域を過剰発現し、グルコース飢餓後グルコース刺激によるcAMP濃度変化の測定を行った。その結果、SP 1及びTK161R 2 V共にcAMP濃度の上昇が抑制された。このことより、Rafのアミノ酸末端領域及びアデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域はいずれも、in vivoで内在性のアデニル酸シクラーゼとRas蛋白質を競合している事が示された。

### Ⅲ. 結 論

本研究によりRas蛋白質のエフェクターと考えられている出芽酵母アデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域、及び高等動物のRaf蛋白質アミノ末端領域は、いずれも内在性のアデニル酸シクラーゼと競合的にRas蛋白質に結合する事がin vitro, in vivoの系を用いて明らかにされた。さらにin vitroの系を用いてRasに対する結合の解離定数（ $K_d$ ）を求め、上記2種類のエフェクター分子のRas蛋白質に対する親和力が同程度であること、および、同種のRas蛋白質に対して親和力が高いことを示した。さらに精製したシクラーゼを用いた系を用いて、両エフェクター分子がRas蛋白質と直接的に結合している事を証明した。以上の結果より、互いにアミノ酸配列の類似性が認められないRafのアミノ末端領域及びアデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域がRas蛋白質上の同一または近接した領域に競合的に結合する事が示されたが、その機構は依然として不明であり、さらなる検討が必要であると考えられた。

今回、Ras蛋白質との結合測定のために確立した系は、液相の系であり、固相の系に比べて反応速度論的解析が容易で正確に行える利点があり、Rasの他のエフェクター分子とRas蛋白質の結合反応の解析に応用できると考えられる。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

rasプロト癌遺伝子産物（Ras蛋白質）は、低分子量GTP結合蛋白質ファミリーの一員で、真核細胞に広く存在し、細胞膜受容体から核へのシグナル伝達の間段階を担って細胞の増殖、分化に関わっている。最近、細胞増殖因子により刺激された受容体によりRas蛋白質が活性化される機構とともに、その下流のエフェクターの正体が明らかになってきている。

脊椎動物、ショウジョウバエ、線虫などでは、Ser,Thr-プロテインキナーゼ活性を持つrafプロト癌遺伝子産物（Raf蛋白質）がRas蛋白質と直接結合し、その結果Raf蛋白質の活性化、MEK（MAPキナーゼキナーゼ）—MAPキナーゼカスケードの活性化が引き起こされる。一方、出芽酵母では、Ras蛋白質のエフェクターはアデニル酸シクラーゼである事が確定している。すなわち、Ras蛋白質は、アデニル酸シクラーゼと直接的に結合してそれを活性化し、その結果cAMPが産生され情

報が下流に伝達される。アデニル酸シクラーゼの中央部にあるロイシンに富む反復配列leucine-rich repeats領域がRas蛋白質との相互作用に必須である。現時点での問題点は、RafのRas蛋白質結合部位であるアミノ末端領域と、出芽酵母アデニル酸シクラーゼのそのleucine-rich repeats領域、および分裂酵母のRasのエフェクターと考えられるプロテインキナーゼByr 2の三者間にアミノ酸配列の類似性が認められない事であり、このことは、三者のエフェクター間で結合に関するRas蛋白質上の構造要求性が異なることを示唆していた。本研究者は、Ras蛋白質とその各種エフェクター分子との間の結合反応を解析できる新しい測定系を開発し、詳細な解析を行った。

本研究者は、Ras蛋白質による出芽酵母アデニル酸シクラーゼの試験管内活性化の系を用いて、グルタチオン-S-転移酵素との融合蛋白質として産生して精製したアデニル酸シクラーゼのleucine-rich repeats領域、および、大腸菌でマルトース結合蛋白質との融合蛋白質として産生し精製したヒトRaf蛋白質のアミノ末端257アミノ酸の領域を含むポリペプチドを加えると、加える量に応じて活性化が阻害される事を見いだした。Ras蛋白質の濃度を変えて阻害のパターンを反応速度論的に解析したところ、両ポリペプチドは、アデニル酸シクラーゼとRas蛋白質を競合することにより阻害している事を証明し、それに基づいてRas蛋白質との結合曲線を得て、結合の解離定数を求める事に成功した。その結果、leucine-rich repeats領域がアデニル酸シクラーゼのRas結合部位であることが最終的に証明された。また、ヒトRafと酵母シクラーゼの2種類のエフェクターが同程度の親和性（解離定数：3～20nM）でRas蛋白質に競合的に結合すること、同種のRas蛋白質に対して高い親和性を持つことなども証明された。さらに、精製したアデニル酸シクラーゼを用いて、両エフェクターがRas蛋白質と直接的に結合すること。また、in vivoにおいてもRafのアミノ末端領域がRas蛋白質を競合して内在性シクラーゼ活性を阻害することを示した。この研究によって確立されたRas蛋白質との結合測定法は液相であり、他の固相の系に比べて反応速度論的解析が容易で正確に行える利点があり、Rasの他のエフェクター分子のRas蛋白質との結合反応の解析に広く応用できると考えられる。

本研究は、Ras蛋白質とそのエフェクター分子間の相互作用について、新しい測定方法を開発して反応速度論的解析を行ったものであるが、従来ほとんど行われなかった結合反応の特異性およびパラメータの測定について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。