



Post-translational Modification of H-Ras Is Required for Activation of, but Not for Association with, B-Raf.

岡田, 知代

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1499

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001499>

※ 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)	岡 田 知 代 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1025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8年3月31日
学位論文題目	Post-translational Modification of H-Ras Is Required for Activation of, but Not for Association with, B-Raf. (H-Ras蛋白質の翻訳後修飾はB-Rafとの結合に必要ではないが、B-Rafの活性化には必要である。)
審査委員	主査 教授 片 岡 徹 教授 千 原 和 夫 教授 松 尾 雅 文

論文内容の要旨

1. はじめに

プロト癌遺伝子産物Ras蛋白質は、酵母から哺乳動物に至る真核生物の進化の過程で広く保存されており、細胞の分化および増殖を制御する重要な分子として機能することが知られている。最近の研究により、細胞表面のチロシンキナーゼ型受容体からのシグナルは、Rasを活性型に変換し、活性型であるGTP結合型Rasは、セリン/スレオニンキナーゼRaf蛋白質と直接結合し、その結果細胞内でRaf蛋白質の活性化が起こり、さらにMEK, MAP kinaseのリン酸化カスケードの活性化が引き起こされることが明らかにされてきた。しかし、RasとRafとの直接的結合がどのようにRafの活性化につながるかに関する詳しいメカニズムはいまだ解明されていない。

B-Raf蛋白質は、三つの保存された領域を有するセリン/スレオニンキナーゼであるRafファミリーの一つで、NIH3T3細胞のトランスフォーム活性を指標としてヒトEwing肉腫DNAより見いだされた。Rasとの結合解析などが詳しくなされているRaf-1が広範な組織において発現が見られるのに対し、B-Rafの発現は神経組織特異的であり、Rasとの相互作用については殆ど解析がなされていなかった。

Ras蛋白質は、細胞内においてそのC末端のCAAX motifと呼ばれる部位に以下のような翻訳後修飾を受けることが知られている。すなわち(1)CAAX motifのシステイン残基のファルネシル化、(2)C末端の3アミノ酸AAXの切り離し、(3)新たに生じたC末端システイン残基のカルボキシメチル化、により中間型が生成される。H-Rasの場合この中間型に次のステップとしてすぐ上流の、181番目と184番目のシステイン残基にパルミトイル化が起こり最終産物としての蛋白質が生成される。これらの翻訳後修飾はRas蛋白質が細胞膜へ移行し様々な生物活性を示すために必要である。我々は、この翻訳後修飾、特にファルネシル化のステップがRasによるB-Rafとの結合には必須ではないが、B-Rafの活性化において重要な役割を果たすことを見いだした。

2. 実験方法と結果

1) Ras依存性アデニル酸シクラーゼ活性の競合的阻害の測定による、B-RafとH-Rasとの直接的結合の解析

B-RafについてはRasとの直接結合についての具体的な解析については報告されていないので、まず我々はB-RafがRasと直接結合しうるかを、出芽酵母におけるRas蛋白質のエフェクターであるアデニル酸シクラーゼの活性化の阻害反応を利用して測定した。H-Ras蛋白質はバキュロウイルスの系を用いてSf-9細胞にて発現、精製した。B-RafのN末端、1-326アミノ酸と1-445アミノ酸の部分マルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質として大腸菌で発現、精製したポリペプチドを、H-Rasによるアデニル酸シクラーゼ活性化の系に加えていくと、濃度依存性に効率よく活性化の阻害が見られた。H-Rasの濃度を変化させて得られたアデニル酸シクラーゼの活性を、種々の量のB-Raf存在下で測定して、反応速度論的に解析し、H-Ras蛋白質とB-Raf N末端ペプチドとの結合曲線を求めた。この方法によりH-RasとB-Rafとの結合定数は、7 nM (1-326アミノ酸) および5 nM (1-445アミノ酸) と求められ、高親和性に結合することが示された。

2) RasGTP水解活性促進蛋白質(GAP)の活性阻害による、B-RafとH-Rasの結合活性の測定

B-Rafとの結合におよぼすH-Rasの翻訳後修飾の影響を調べるため、Rasのエフェクター結合領域と相互作用することが知られているRasGAPのRasに対するGTP水解促進活性を競合阻害するかどうかを指標としてB-RafとH-Rasとの結合を測定し、翻訳後修飾ありとなしのH-Rasについて比較検討した。修飾型および非修飾型のH-RasにおいてRasGAPによる水解促進活性の効率は同等であり、この系にB-Raf N末端ポリペプチドを加えていくと、濃度依存性にこの活性が阻害された。この結果はH-RasとB-Rafの直接結合を示すものであり、その結合効率に翻訳後修飾の影響は見られなかった。

3) B-RafとH-Rasの結合活性に及ぼすH-Rasの翻訳後修飾の影響の解析

H-RasとB-Rafとの直接結合をさらに詳しく解析するために、次の実験を行った。MBP-B-Rafを固定化したアミロースレジンに、GTP γ SあるいはGDP β S化したH-Rasを加えて反応させ、数回洗浄した後、マルトースをふくむ緩衝液でレジンより溶出させ、Western blottingにてB-Rafに結合したH-Rasを検出した。この方法により翻訳後修飾ありなしの両タイプのH-Rasともに、GTP依存性にB-Raf N末端に結合することが示された。さらにH-Rasのエフェクタードメイン内の38番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基に置き換えた変異体ではこの結合活性が失われていた。さらに翻訳後修飾ありなしのH-Rasについて、B-Rafに対する結合親和性を定量的に比較した。加えるH-Rasの濃度を変えていくと、B-Rafに結合するH-Rasは増加しプラトーに達した。結合のパターンに両タイプのH-Rasで違いは見られず、およそそのKd値は50nMと算定された。以上の結果からH-RasはB-RafのN末端部分に、GTP依存性に、H-Rasのエフェクタードメインを介して結合し、結合に関してはH-Rasの翻訳後修飾は必要でないことが示された。

4) H-RasによるB-Raf活性化の測定のための試験管内無細胞系の確立

これまでにラット脳細胞においてRas蛋白質はRaf-1ではなくB-Rafを介してMAPキナーゼカスケードを活性化することが示されている。我々はRasの活性を試験管内で測定し、活性化に対する翻訳後修飾の影響を調べるために、ラット脳細胞を用いて、無細胞系を確立した。ラット脳の細胞質分画をMONO Sカラムで分画した各分画に、グルタチオン-S-転移酵素(GST)との融合蛋白質として精製したGST-MEK, GST-ERK2およびミエリン塩基性蛋白質を基質として加え、H-Rasの存在下に、 $[\gamma\text{-P}^{32}]$ のミエリン塩基性蛋白質への取り込みを測定した。NaCl濃度勾配によって溶出した分画中にH-Ras依存性のMAP kinase活性の単一ピークが見られた。この分画ではミエリン塩基性蛋白質

リン酸化活性はGTP γ S依存性であり、エフェクター領域変異体のH-Ras (D38N) はこの活性を消失していた。またこの活性はGST-MEK, GST-ERK2の存在に依存しており、いずれのリン酸化も、B-RafのN末端ペプチドを加えることにより効率よく抑制された。この分画中にB-Rafが存在することをB-Rafに対する抗体でのImmunoblottingにて確認した。さらにこのRas依存性の活性はB-Rafに対する抗体で吸収することによりほぼ消失したが、Raf-1に対する抗体による吸収では変化が見られなかったことより、このRas依存性の活性がB-Rafによることが証明された。以上のことからこの無細胞系においてH-RasはB-Rafを活性化することでMEK-MAPキナーゼカスケードを活性化していることが示された。この系を用いて以下の実験を行った。

5) H-RasによるB-Raf活性化における翻訳後修飾の影響の解析

GTP γ S化した翻訳後修飾ありとなしとのH-Ras各々につき種々の濃度でのB-Raf促進活性を測定した。修飾型H-Rasによるミエリン塩基性蛋白質リン酸化促進におけるKa値は約2 nMで、これはアデニル酸シクラーゼの阻害活性により求めたB-Raf N末端とH-Rasとの結合のKd値とよく一致していた。他方、非修飾型H-Rasはリン酸化促進活性をほとんど有しなかった。H-Rasの翻訳後修飾は2段階のステップを経て完成されるが、B-Rafの活性化にどのステップが重要であるかを調べるため、H-RasのC末端部分の変異体、すなわち181番目と184番目のシステイン残基をセリン残基に置換したためファルネシル化のみでパルミトイル化を受けない中間型H-Ras (S181, S184) と、翻訳後修飾をまったく受けない非修飾型変異体H-Ras (S186) を作製し精製した。各々のB-Raf活性化能を同様の系により測定したところ、ファルネシル化のみの中間型H-Ras (S181, S184) は完全修飾型と同等の活性を保持していたが、非修飾型H-Ras (S186) は高濃度でも活性はほとんど検出されなかった。これら変異体について酵母のアデニル酸シクラーゼ活性化能においても同様の結果を得た。以上の結果からH-Rasの翻訳後修飾、とくにファルネシル化がB-Rafの活性化において重要であることが示された。

3. 結論と考察

本研究により、Ras蛋白質の翻訳後修飾は、Rasがそのエフェクター分子の一つであるB-Rafと相互作用して活性化する際、両分子間の結合には必要ではないが、その後B-Rafが活性化されるに至る段階で必須であることが証明された。同様の結論が、酵母のRAS2およびH-Rasがアデニル酸シクラーゼを活性化する際にもあてはまり、Rasの翻訳後修飾が一般的にエフェクターとの結合ではなく活性化に必須であることが示唆された。またこのことより、RasによるB-Raf活性化の無細胞系を確立し得たことも含めて、Rasの翻訳後修飾はRasを細胞膜へ移行させるだけでなくRasの機能発現にとっても重要であることを示された。本研究により示されたように、B-Rafの活性化においてRasの翻訳後修飾（特にファルネシル化）を必要とすることの説明としては、B-Rafが活性型コンフォメーションをとるのにH-Rasとの結合だけでなくH-Rasのファルネシル化を必要としている可能性、もうひとつはH-RasとB-Rafの2分子以外に第三ファクターが活性化に関与していて、そのファクターとRasとの結合をファルネシル化が促進させるためという可能性も考えられる。Rasによるエフェクター活性化の分子機構を解明する上での今後の課題として、精製したB-Rafの試験管内でのRas蛋白質依存性活性化の系の確立が必要であると思われる。

論文審査の結果の要旨

プロト癌遺伝子産物Ras蛋白質は、酵母から哺乳動物に至る真核生物の進化の過程で広く保存されており、細胞の分化および増殖を制御している。最近の研究により高等動物細胞では、細胞表面のチロシンキナーゼ型受容体からのシグナルはRasを活性型に変換し、活性型であるGTP結合型Rasは、セリン/スレオニンキナーゼRaf蛋白質と直接結合して活性化し、その結果MEK,MAPキナーゼのリン酸化カスケードの活性化が起きることが明らかにされてきた。しかし、Rasとの直接的結合がどのようにRafの活性化につながるかに関する詳しいメカニズムはいまだ解明されていない。

B-Raf蛋白質は、Rafファミリーセリン/スレオニンキナーゼの一員であり、Rasとの結合が詳しく解析されているRaf-1が広範な組織で発現が見られるのに対し、その発現は神経組織特異的であり、Rasとの相互作用に関して殆ど解析されていなかった。

Ras蛋白質は、細胞内においてそのC末端のCAAX motifと呼ばれる部位に以下のような翻訳後修飾を受けることが知られている。すなわち(1)CAAX motifのシステイン残基のファルネシル化、(2)C末端の3アミノ酸AAXの切り離し、(3)新たに生じたC末端システイン残基のカルボキシメチル化、により中間型が生成される。H-Rasの場合この中間型に次のステップとしてすぐ上流の二つのシステイン残基にパルミトイル化が起こり最終産物としての蛋白質が生成される。これらの翻訳後修飾はRas蛋白質が細胞膜へ移行し様々な生物活性を示すために必要である事が知られていた。本研究者は、このRasの翻訳後修飾のB-Rafとの相互作用における意義を研究した。

本研究者は、先ず出芽酵母におけるRas蛋白質のエフェクターであるアデニル酸シクラーゼのRas蛋白質による活性化反応の阻害を目安にして、B-RafとRasの結合反応を測定した。H-Ras蛋白質はバキュロウイルスの系を用いてSf-9細胞にて発現、精製した。B-RafのN末端、1-326アミノ酸と1-445アミノ酸の部分マルトース結合蛋白質(MBP)との融合蛋白質として大腸菌で発現、精製したポリペプチドを、H-Rasによるアデニル酸シクラーゼ活性化の系に加えていくと、濃度依存性に活性化の阻害が見られた。この反応を反応速度論的に解析し、H-Ras蛋白質とB-Raf N末端ペプチドとの結合曲線を求めた。その結果、H-RasとB-Rafとの結合定数は、7 nM (1-326アミノ酸) および5 nM (1-445アミノ酸) と求められ、高親和性に結合することが示された。

さらに、Rasのエフェクター結合領域と相互作用することが知られているRasGTP水解活性促進蛋白質(GAP)のRasに対するGTP水解促進活性を競合阻害するかどうかを指標にB-RafとH-Rasの結合活性を測定し、翻訳後修飾ありとなしのH-Rasについて比較検討したところ、B-Rafとの結合能力に翻訳後修飾の影響は見られなかった。また、樹脂に固定化したMBP-B-Rafとの試験管内結合測定によっても、H-RasがGTP依存性にB-Raf結合し、結合活性にはH-Rasの翻訳後修飾は影響ないことを証明した。

次に、本研究者はRasの活性を試験管内で測定して翻訳後修飾の影響を調べるために、ラット脳細胞を材料にB-Raf活性化の測定のための試験管内無細胞系を確立した。ラット脳の細胞質分画をMONO Sカラムで分画した各分画に、大腸菌で産生し精製したMEK,MAPキナーゼおよびミエリン塩基性蛋白質を基質として加え、H-Rasの存在下に、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ のミエリン塩基性蛋白質への取り込みを測定し、H-Ras依存性のMAP kinase活性化の単一ピークを得た。抗B-Raf抗体による吸収でこの活性は除去されたので、この系ではB-RafがMEKキナーゼとして機能していることが証明された。

この系を用いて、翻訳後修飾ありとなしとのH-Ras各々につき種々の濃度でのB-Raf促進活性を測定した。修飾型H-Rasによるミエリン塩基性蛋白質リン酸化促進における K_a 値は約2 nMで、これ

はアデニル酸シクラーゼの阻害活性により求めたH-Rasとの結合のKd値とよく一致していた。他方、非修飾型H-Rasはリン酸化促進活性をほとんど有しなかった。H-Rasの翻訳後修飾のどのステップが重要であるかを調べるため、H-RasのC末端部分の変異体各種のB-Raf活性化能を測定したところ、ファルネシル化のみの中間型は完全修飾型と同等の活性を保持していたが、非修飾型は高濃度でも活性はほとんど検出されなかった。これら変異体について酵母のアデニル酸シクラーゼ活性化能においても同様の結果を得た。以上の結果からH-Rasの翻訳後修飾、とくにファルネシル化がB-Rafの活性化において重要であることが示された。

本研究は、Rasの翻訳後修飾について、そのB-Raf活性化における作用機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった翻訳後修飾のエフェクター活性化における意義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。