



Membrane recruitment of Raf-1 is not the only function of Ras in Raf-1 activation

玉田, 昌子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1721

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001721>

※ 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） たま だ まさ こ 玉 田 昌 子 （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1119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9年12月31日

学位論文題目 Membrane recruitment of Raf-1 is not the only function of Ras in Raf-1 activation
(RasによるRaf-1の活性化におけるRaf-1の膜移行以外の機能の存在の検討)

審査委員 主査 教授 片岡 徹
教授 尾原 秀史 教授 前田 盛

論文内容の要旨

I. はじめに

低分子量GTP結合蛋白質Rasは、高等動物において、その標的蛋白質であるRaf-1とその下流のMAPキナーゼカスケードを介して細胞の増殖や分化を制御している。RasによるRaf-1の活性化機構については今だ不明な点が多いが、GTP結合型の活性型RasによってRaf-1が細胞膜に運ばれ、そこでRasに無関係にリン酸化等を受けて活性化されるといわれている。

RasはそのC末端のCAA Xモチーフにおいて翻訳後修飾を受ける。翻訳後修飾はRasとRasに結合したRaf-1を細胞膜へ移行させることで、Raf-1の活性化に欠かせないものとされているが、それ以外の機能の存在も考えられる。

X線結晶解析で、不活性型のGDP結合型Rasと活性型のGTP結合型Rasを比べたときに、構造が大きく変わるところが二つあり、一つはアミノ酸残基30-38でswitch I、もう一つは60-76でswitch IIと呼ばれている。switch Iは、各種変異体などを用いた実験の結果から、標的蛋白質と相互作用するエフェクター領域と考えられている。最近ではエフェクター領域の周辺で、GDP結合型とGTP結合型で構造が変わらない領域（アミノ酸残基26, 28, 31, 42, 45, 46, 48, 49に対応）もまたRasの機能に必須である事が判ってきており、アクチベーター領域と呼ばれている。このアクチベーター領域の変異体はRaf-1に結合するが細胞の分化、増殖を起こさないことが報告されている。

最近Raf-1に関して、従来よりいわれているRas結合領域（以下RBD, アミノ酸残基51-131）以外に、ジンクフィンガーを持つシステインリッチ領域（以下CRR, アミノ酸残基152-184）でもRasに結合していることが明らかにされた。また我々は、翻訳後修飾を受けていないRasや、アクチベーター領域の変異体は、このCRRに結合できないことを報告している。

以上より、RasはRaf-1の活性化において、単にRaf-1を細胞膜へ移行すること以外に重要な機能を有する可能性が強く示唆される。今回我々はアクチベーター領域の変異体Ha-Ras^{V45E}を用いてこのことを明確にすべく検討した。

II. 実験方法と結果

1. Ha-Rasの変異体とRaf-1との直接結合

本研究には、野性型Ha-Ras^{WT}、エフェクター領域の変異体Ha-Ras^{D38N}とアクチベーター領域の変異体Ha-Ras^{V45E}を用いた。どの変異体も12番目のアミノ酸をバリンに置換している。

それぞれのHa-Rasの変異体が*in vitro*でRaf-1に結合するかどうか調べるため、Sf 9細胞で、発現、精製したHa-Rasの変異体蛋白質をGTP、GDP化して、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Raf-1（アミノ酸残基1-206）に加えて、結合したHa-Rasを抗Ha-Rasモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより定量した。Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}と同様に、GTP依存性にMBP-Raf-1に結合したが、Ha-Ras^{D38N}は結合しなかった。

2. Ha-Ras変異体によるRaf-1の膜への移行

次にこれらの変異体によってRaf-1が膜に移行するかどうかを調べた。COS7細胞にRaf-1とそれぞれのHa-Ras変異体の発現プラスミドを同時にトランスフェクションして16時間無血清培地で培養した後に、細胞を集めて破碎し、核を除いた後に、100,000gで遠心した上澄みを細胞質画分、沈殿物を1%Nonidet-P40で抽出したものを膜抽出画分とした。各々の画分に存在するRaf-1をその抗体を用いて定量したところ、Raf-1のみ、もしくはRaf-1とHa-Ras^{D38N}を発現した時には、Raf-1は細胞質画分にのみ存在したが、Raf-1とHa-Ras^{WT}やHa-Ras^{V45E}を同時に発現したときには、Raf-1は細胞質画分と膜抽出画分両方に存在した。よってHa-Ras^{D38N}と異なり、Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}と同様にRaf-1を膜に移行できることが明らかになった。

3. 膜に移行したRaf-1の活性測定

次に各々のHa-Ras変異体により膜に移行したRaf-1の活性を検討した。

前述のRaf-1とそれぞれのHa-Ras変異体を共発現したCOS7細胞の膜抽出画分をRaf-1の抗体で免疫沈降したものに、大腸菌で発現、精製したMEKとERK2を加えERK2のリン酸化をオートラジオグラフィーで定量し、それをRaf-1の活性とした。Ha-Ras^{V45E}を発現したものではHa-Ras^{WT}とほぼ同量のRaf-1が膜抽出画分より免疫沈降されたが、その活性はHa-Ras^{WT}を発現した場合の約30%であった。

また膜上でHa-Ras^{WT}、Ha-Ras^{V45E}がRaf-1との複合体を安定して作っているかを確かめるために、COS7細胞にRaf-1とHA（インフルエンザ・ヘマグルチニン）のエピトープ・タグをつけたHa-Ras変異体を共発現し、その膜抽出画分を抗HA抗体で免疫沈降し、Raf-1がHa-Rasと共に免疫沈降されるかどうか調べた。Ha-Ras^{WT}、Ha-Ras^{D38N}、Ha-Ras^{V45E}ともにHa-Rasは、ほぼ同量免疫沈降されたが、Ha-Ras^{D38N}にはRaf-1は全く結合していなかった。Ha-Ras^{V45E}にはHa-Ras^{WT}とほぼ同量のRaf-1が結合していたが、その活性は前述と同様にERK2のリン酸化でみたところ、Ha-Ras^{WT}の約30%であった。

4. Ha-Ras 変異体によるERK2の活性化

次にこれらのHa-Ras変異体による*in vivo*でのMAPキナーゼカスケードの活性化を調べた。COS7細胞にそれぞれのHa-Ras変異体と共にFLAGエピトープ・タグをつけたERK2を発現し、その総細胞抽出液から、抗FLAG抗体を用いてERK2を免疫沈降し、ミエリン塩基性蛋白を基質として加えてそのリン酸化を定量しERK2の活性とした。Ha-Ras^{D38N}はERK2をほとんど活性化せず、

Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}の約30%活性化した。これはHa-Ras^{V45E}に結合し膜に移行したRaf-1の活性がHa-Ras^{WT}によるものの30%であることを反映していると考えられる。

Ⅲ. 結 論

本研究により、アクチベーター領域の変異体Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}と同様にRaf-1に結合しそれを膜に移行させるが、Raf-1やその下流のMAPキナーゼカスケードをHa-Ras^{WT}に比較して、わずか30%しか活性化できないことが判明した。

C末端にKi-Rasのポリベーシック領域とCAAXモチーフを付けて、Rasに非依存性に強制的に膜に移行させたRaf-1が活性を有しているという報告以来、Rasの役割はRaf-1を細胞膜に運ぶだけであると考えられてきたが、それに対し、今回の我々の結果は、RasによるRaf-1の活性化において、RasがRaf-1の膜への移行以外に重要な機能を有することを明確に示したと考えられる。

Ha-Ras^{V45E}を含めたアクチベーター領域の変異体はRaf-1のCRRと結合する能力を失っていることから、Rasの膜移行以外の機能にはCRRとの相互作用が関係している可能性が考えられる。その相互作用の詳細な検討により、新たな機能の解明に至る事が期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

低分子量GTP結合蛋白質Rasは、高等動物では、その標的蛋白質Raf-1と直接結合して、そのプロテインキナーゼ活性を活性化することが判明している。しかし、RasによるRaf-1の活性化機構については今だ不明な点が多い。幾つかの実験結果から、GTP結合型の活性型RasはRaf-1と結合して、それを細胞膜に運ぶ働きのみを有し、Raf-1は細胞膜でRasに無関係にリン酸化等を受けて活性化されると考えられていた。

従来Rasはそのエフェクター領域（アミノ酸残基32-40）のみで標的蛋白質と結合すると考えられていたが、最近本研究室の研究により、エフェクター領域の周辺でGDP結合型とGTP結合型で構造が変わらないアクチベーター領域（アミノ酸残基26-31と42-49）もまたRasの機能に必須である事が分かってきており、この領域の変異体はRaf-1に結合するが細胞の分化、増殖を起こす能力を喪失している。Raf-1に関しても、従来から同定されているRas結合領域（以下RBD、アミノ酸残基51-131）以外に、ジンクフィンガー構造を持つシステインリッチ領域（以下CRR、アミノ酸残基152-184）でもRasに結合していることが申請者らによって明らかにされ、さらに、翻訳後修飾を受けていないRasや、アクチベーター領域の変異体は、このCRRに結合できないことがわかっている。

以上より、RasはRaf-1の活性化において、単にRaf-1を細胞膜へ移行すること以外に重要な機能を有する可能性が強く示唆される。申請者はアクチベーター領域の変異体Ha-Ras^{V45E}を用いてこのことを明確にすべく研究を行い、以下の成果を得た。

1. 野生型Ha-Ras^{WT}、エフェクター領域変異体Ha-Ras^{D38N}とアクチベーター領域変異体Ha-Ras^{V45E}を用い、試験管内でのRaf-1との結合反応を解析した。Sf 9細胞で発現・精製したHa-Ras変異体蛋白質をGTP、GDP化して、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Raf-1（アミノ酸残基1-206）とインキュベートし、結合したHa-Rasを定量した。Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}と同様に、GTP依存性にMBP-Raf-1に結合したが、Ha-Ras^{D38N}は結合しなかった。

2. 上記Ha-Ras変異体について、Raf-1を膜に移行させる能力を調べた。COS7細胞にRaf-1と各Ha-Ras変異体の発現ベクターをコトランスフェクションして16時間無血清培地で培養した後に、細胞を集めて破碎して核を除き100,000gで遠心した上澄みを細胞質画分、沈殿物を1%Nonidet-P40で抽出したものを膜抽出画分とし、各画分に存在するRaf-1を定量した。Raf-1のみ、もしくはRaf-1とHa-Ras^{D38N}を発現した時には、Raf-1は細胞質画分のみ存在したが、Raf-1とHa-Ras^{WT}やHa-Ras^{V45E}を同時に発現したときには、Raf-1は細胞質画分と膜抽出画分両方にほぼ等量ずつ存在した。よって、Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}と同様にRaf-1を膜に移行できることが明らかになった。

3. 各Ha-Ras変異体により膜に移行したRaf-1の活性を測定した。Raf-1とそれぞれのHa-Ras変異体を共発現したCOS7細胞の膜抽出画分をRaf-1の抗体で免疫沈降したものに、大腸菌で発現・精製したMEKとERK2を加えERK2のリン酸化をオートラジオグラフィーで定量しRaf-1の活性とした。Ha-Ras^{V45E}を発現したものではHa-Ras^{WT}とほぼ等量のRaf-1が免疫沈降されたが、その活性はHa-Ras^{WT}に比較して約30%であった。

また細胞膜上でHa-Ras^{WT}、Ha-Ras^{V45E}がRaf-1との複合体を安定して作っているかを調べるために、COS7細胞にRaf-1とHA（インフルエンザ・ヘマグルチニン）のエピトープ・タグをつけたHa-Ras変異体を共発現し、その膜抽出画分を抗HA抗体で免疫沈降し、Raf-1がHa-Rasと共に免疫沈降されるかを調べた。Ha-Ras^{WT}、Ha-Ras^{D38N}、Ha-Ras^{V45E}ともにHa-Rasはほぼ等量免疫沈降されたが、Ha-Ras^{D38N}にはRaf-1は全く結合していなかった。Ha-Ras^{V45E}にはHa-Ras^{WT}とほぼ等量のRaf-1が結合していたが、その活性をERK2のリン酸化でみたところ、やはりHa-Ras^{WT}の約30%であった。

4. 上記Ha-Ras変異体によるin vivoでのMAPキナーゼカスケードの活性化を調べた。COS7細胞にそれぞれのHa-Ras変異体と共にFLAGエピトープ・タグをつけたERK2を発現し、その総細胞抽出液から、抗FLAG抗体を用いてERK2を免疫沈降し、ミエリン塩基性蛋白質を基質として加えてそのリン酸化を定量しERK2の活性とした。Ha-Ras^{D38N}はERK2をほとんど活性化せず、Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}の約30%活性化した。これはHa-Ras^{V45E}に結合し膜に移行したRaf-1の活性がHa-Ras^{WT}によるものの30%であることを反映していると考えられた。

本研究により、アクチベーター領域変異体Ha-Ras^{V45E}はHa-Ras^{WT}と同様にRaf-1に結合しそれを膜に移行させるが、Raf-1やその下流のMAPキナーゼカスケードをHa-Ras^{WT}に比較して、わずか30%しか活性化できないことが判明した。C末端にKi-Rasのポリベーシック領域とCAAXモチーフを付けて、Rasに非依存性に強制的に膜に移行させたRaf-1が活性を有しているという報告以来、Rasの役割はRaf-1を細胞膜に運ぶだけであると考えられてきたが、本研究結果により、RasによるRaf-1の活性化において、RasがRaf-1の膜への移行以外に重要な機能を有することが明確に示された。Ha-Ras^{V45E}を含めたアクチベーター領域変異体はRaf-1のCRRと結合する能力を失っていることから、RasのRaf-1膜移行以外の機能にはCRRとの相互作用が関係している可能性が考えられた。

本研究は、Ras癌遺伝子産物について、そのRaf-1活性化の分子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Raf-1細胞膜移行作用以外の機能の存在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。