



# 出芽酵母アデニル酸シクラーゼとRas蛋白質の相互作用におけるシクラーゼ結合蛋白質CAPとの結合の意義

島, 扶美

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1727

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001727>

※ 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)	しま 扶 美 (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1124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10年3月31日
学位論文題目	Effect of Association with Adenylyl Cyclase-Associated Protein on the Interaction of Yeast Adenylyl Cyclase with Ras Protein (出芽酵母アデニル酸シクラーゼとR a s蛋白質の相互作用におけるシクラーゼ結合蛋白質CAPとの結合の意義)
審査委員	主査 教授 片岡 徹 教授 久野 高義 教授 春日 雅人

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

ras遺伝子は、真核細胞に広く存在し、細胞の増殖や分化において重要な働きをしている。Ras蛋白質が、細胞内で生物活性を示すためには、細胞膜に局在することが必要であると考えられてきた。膜への局在には、そのカルボキシン末端側に存在するCAAX配列(C:システイン, A:脂肪族アミノ酸, X:不特定のアミノ酸)において次のような3段階の翻訳後修飾が必要となる。(1)システイン残基のファルネシル化, (2)CAAXの蛋白質分解酵素による除去, (3)新しいカルボキシン末端のシステイン残基のカルボキシメチル化である。哺乳動物のH-Ras及び酵母のRas2では、さらにCAAXの上流に存在するシステイン残基にパルミトイル化を受け、一連の翻訳後修飾が終了する。さらに、Rasの翻訳後修飾は、標的蛋白質(エフェクター)の活性化に必要であることが本研究室により証明されたが、その作用機構としては2つの可能性が考えられている。1つは間接的な関与で、エフェクターの存在する細胞膜へRasを移動させるために、翻訳後修飾が必要であるという可能性である。もう1つは、直接的な関与で、Rasがエフェクターを活性化するのに必要な特定の結合様式があり、その達成のために翻訳後修飾が必要であるという可能性である。

出芽酵母においては、アデニル酸シクラーゼ(AC)が酵母Ras蛋白質の直接のエフェクターであり、ACは細胞内では、ACの唯一の結合蛋白質として同定された分子量約7万のシクラーゼ結合蛋白質(CAP)と複合体を形成している。CAPとACの結合にはCAPのアミノ末端領域が必須であることが、これまでの研究結果より明らかになっている。また、活性型変異を持つras遺伝子(ras2<sup>Val-19</sup>)を有する出芽酵母は熱ショック感受性という表現型を示すが、CAPのアミノ末端領域はその発現に必須である。このように、CAPはそのアミノ末端領域においてACと結合して細胞内でのRas-cAMP系のシグナル伝達に重要な役割をはたしていると考えられてきたが、その分子作用機構は不明であった。

今回我々は、試験管内無細胞系を用いて、RasがそのエフェクターであるACを活性化する分子作用機構を解析し、Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果には、ACとCAPの結合が必要であ

ることを証明した。この結果は、Ras の翻訳後修飾基の受容体がCAP上に存在し、翻訳後修飾基とCAP上の受容体の相互作用がACの活性化過程において非常に重要な役割をはたしている可能性を強く示唆している。

## 【方法】

RasがACを活性化する過程で、Rasの翻訳後修飾及びCAPのACへの結合が、RasとACの結合及びACの活性化にどのような影響を及ぼすかを調べるために、試験管内無細胞系を用いて以下のことを行った。翻訳後修飾を受けたH-Rasと未修飾のものを、バキュロウィルスベクターを用いて発現、生成した。グタチオン-S-転移酵素(GST)との融合蛋白質として出芽酵母でシクラゼ(GST-CYR1)を発現、生成した。試験管内での両者の結合反応及びRasによるACの活性化を測定することにより、両者の結合及びACの活性化促進効果にRasの翻訳後修飾が必要であるかどうかを調べた。またRasがそのエフェクター結合領域を介してACのどの領域と結合するかを、ACの種々の欠損変異体を用いて調べた。

RasによるAC活性化にはRasの翻訳後修飾が必要であるが、翻訳後修飾によるAC活性化促進効果を仲介するCAPの領域を同定するため、以下のことを行った。CAP欠失変異を持つ出芽酵母株でGST-CYR1と種々のCAP欠損変異体を同時に発現した。精製したGST-CYR1とCAP変異体の複合体に種々のRas(翻訳後修飾を受けたもの、未修飾のもの)を加え、ACの活性を測定した。

また、別々に精製した蛋白質を用いて、試験管内無細胞系でACとCAPの複合体を再構成することで、RasによるAC活性化促進効果も同時に再構成されるかを調べた。

## 【結果】

### 1. RasとACの試験管内での結合反応に及ぼすRasの翻訳後修飾の影響

ACはアミノ末端領域、中央のロイシンの豊富な反復領域(ロイシンリッチリピート(LRR)ドメイン)、活性部位、カルボキシン末端領域の4つの領域からなる蛋白質で、これまでの遺伝学的、分子生化学的な研究で、LRRドメインにRasの結合部位が存在することが示唆されてきた。しかし、このドメインとRasの試験管内での直接的な結合反応は解析されていなかった。

今回我々は、AC全長、あるいはLRRドメインを出芽酵母でGSTとの融合蛋白質として発現し、グルタチオン・セファロースに固定したのち、種々のRas蛋白質(翻訳後修飾をうけたもの、未修飾のもの、翻訳後修飾を受けているがエフェクター結合領域に点突然変異を導入したもの)と試験管内で結合反応を測定した。その結果、Ras蛋白質はそのエフェクター結合領域を介してGTP依存性にACのLRRドメインに結合することが証明された。この際、Rasの翻訳後修飾は、ACとの結合親和力には影響がなかった。しかし、ACの活性化能力を調べたところ、Rasの翻訳後修飾は、ACの活性化に必須であることが判明した。また、Rasの種々の段階の翻訳後修飾中間体を精製し、ACの活性化能力を調べたところ、AC活性化促進効果には翻訳後修飾のうち、ファルネシル化の段階が重要であることがわかった。

### 2. AC活性化過程におけるCAPの効果

Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果において、ACとCAPの結合がどのような影響を及ぼすかを解析するために以下のことを行った。内在性cap遺伝子を破壊し、CAP欠失変異を有する

出芽酵母株で、GST-CYR1のみ、あるいはGST-CYR1とCAPを同時に発現し、CAPを結合しないACと、CAPを結合したACとを精製した。精製したAC及びACとCAPの複合体にRasを加え、Rasの翻訳後修飾によるACの活性化促進効果の違いを比較した。CAPを結合しないACでは、CAPの結合したACと比較して、Rasのファルネシル化によるAC活性化促進効果が著明に喪なわれていた。これは、Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果には、ACとCAPが複合体を形成していることが必須であることを示していた。

### 3. Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果に必要なCAPの領域の同定

Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果を仲介するCAPの領域を同定するために、CAP欠失変異を持つ出芽酵母株において、GST-CYR1と種々のCAP欠損変異体を同時に発現した。ACとCAP欠損変異体の複合体を精製し、さらに翻訳後修飾を受けたRasを加え、ACの活性を測定した。その結果、CAPのアミノ末端168アミノ酸の部分で、Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果を仲介するのに十分である事が証明された。*ras2<sup>Val-19</sup>*を有する出芽酵母株は熱ショック感受性という表現型を示すが、この機能にはCAPのアミノ末端の同じ168アミノ酸の領域が必須であることが明らかになっており、今回の結果は、それと一致していた。

### 4. AC活性化促進過程におけるCAPの効果の試験管内無細胞系での再構築

CAP欠失変異を持つ出芽酵母株でGST-CYR1を発現し、CAPを全く結合しないACをグルタチオン・セファロースに固定した。別の酵母株でCAPを過剰発現して、CAPを含む細胞質画分を分離し、グルタチオン・セファロースに固定したACと試験管内で結合反応を調べたところ、CAPとACの結合が再構成された。また、2者の結合の再構成と同時に、Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果も再構築された。

#### 【考 察】

RasによるAC活性化の分子作用機構を試験管内無細胞系を用いて詳細に解析した。RasによるACの活性化過程において、Rasはそのエフェクター結合領域を介してACのLRRドメインにGTP依存性に結合することが不可欠であるが、RasとACの結合にRasの翻訳後修飾は必要でなかった。しかし、Rasの翻訳後修飾はACの活性化を強く促進した。さらに、翻訳後修飾、特にファルネシル化によるAC活性化促進効果の発現には、CAPがそのアミノ末端領域を介してACと結合し複合体を形成することが必須であった。また、Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果は、試験管内無細胞系でACとCAPの結合を再構成すると同時に再構築された。

従来Rasの翻訳後修飾は、Rasの膜局在のみに必要と考えられてきた。しかし、本研究より、Rasの翻訳後修飾は、膜局在のみならず、エフェクター活性化の過程そのものに必須であることが、出芽酵母アデニル酸シクラーゼの系を用いて明らかになった。さらに、CAPのACに対する効果が試験管内で再構築できたことから、CAP自体、あるいはCAPとACのカルボキシン末端の複合体上に、Rasの脂質修飾基の受容体が存在し、この受容体を介して、ACの活性化過程におけるRasの翻訳後修飾の影響が仲介される可能性も強く示唆された。最近、哺乳動物の系においても、Rasの翻訳後修飾がそのエフェクターであるRaf-1の主要Ras結合領域(RBD)との結合には必要ないが、第2のRas結合部位であるシステインリッチ領域との結合に必要であるという事実が本研究室の研究結果で明らかになっている。今回の研究結果は、Rasの翻訳後修飾がエフェクター活性化過程に直接的に関

与する事が、Rasのエフェクターの種類にかかわらず共通である可能性を示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

ras遺伝子は、真核細胞に広く存在し細胞の増殖や分化において重要な働きをしている。Ras蛋白質は翻訳後にそのカルボキシ末端CAA X配列（C：システイン，A：脂肪族アミノ酸，X：不特定アミノ酸）において、1システイン残基のファルネシル化，2AA Xの蛋白質分解酵素による除去，3新しいカルボキシン末端のシステイン残基のカルボキシメチル化より成る脂質修飾を受ける。哺乳動物H-Ras及び酵母Ras2では、さらにCAA X上流のシステイン残基にパルミトイル化を受け、一連の翻訳後修飾が終了する。これらの翻訳後修飾は、Rasが細胞膜に局在するために必要である。さらに、Rasの翻訳後修飾がその標的蛋白質（エフェクター）の活性化に必要であることが本研究室により証明されたが、その作用機構としては2つの可能性が存在する。1つは間接的な関与で、エフェクターの存在する細胞膜へRasを移動させるために、翻訳後修飾が必要であるというものであり、いま1つは、直接的な関与で、エフェクター活性化に必要な特定の結合様式があり、その達成のために翻訳後修飾が必要であるというものである。

出芽酵母においては、アデニル酸シクラーゼ（AC）が酵母Ras蛋白質のエフェクターであり、ACは細胞内では分子量約7万のシクラーゼ結合蛋白質（CAP）と複合体を形成している。CAPとACの結合にはCAPのアミノ末端領域が必須であることが判明している。また、活性型変異を持つras遺伝子（RAS2Val-19）を有する出芽酵母は熱ショック感受性の表現型を示すが、CAPのアミノ末端領域はその発現に必須である。このように、CAPはそのアミノ末端領域においてACと結合して細胞内でのRas-cAMP系のシグナル伝達に重要な役割を果していると考えられてきたが、その分子作用機構は不明であった。

申請者は、試験管内無細胞系を用いて、RasがACを活性化する分子作用機構を解析して以下の結果を得、上記課題を解決した。

1. ACはアミノ末端領域、中央のロイシンの豊富な反復領域 [ロイシンリッチリピート（LRR）ドメイン]、活性部位、カルボキシン末端領域の4つの領域からなる。申請者は、AC全長、あるいはLRRドメインを出芽酵母でGST融合蛋白質として発現し、グルタチオン・セファロースに固定したのち、種々のRas蛋白質（翻訳後修飾をうけたもの、未修飾のもの、エフェクター結合領域に点突然変異を持つもの）と試験管内結合反応を測定した。その結果、Ras蛋白質はそのエフェクター結合領域を介してGTP依存性にACのLRRドメインに結合することが証明された。この際、Rasの翻訳後修飾は、ACとの結合親和力には影響がなかった。しかし、ACの活性化能力を調べたところ、Rasの翻訳後修飾は、ACの活性化に必須であることが判明した。また、Rasの種々の翻訳後修飾中間体を精製し、ACの活性化能力を調べたところ、AC活性化促進効果にはファルネシル化の段階が重要であることがわかった。

2. CAP欠失変異を有する出芽酵母株で、GST-CYR1のみ、あるいはGST-CYR1とCAPを共発現し、CAPを結合しないACと、CAPを結合したACとを精製した。精製したAC及びACとCAPの複合体にRasの翻訳後修飾によるACの活性化促進効果の違いを調べた。CAP非結合ACでは、CAP結合ACと比べて、Rasファルネシル化によるAC活性化促進効果が失われ

ていた。それは、Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果発現には、ACとCAPの複合体形成が必須であることを示していた。

3. Ras の翻訳後修飾によるAC活性化促進効果を仲介するCAPの領域をマップするために、CAP欠失変異を持つ出芽酵母株において、GST-CYR1と種々のCAP欠損変異体を共発現した。ACとCAP欠損変異体の複合体を精製し、翻訳後修飾を受けたRasによる活性化を測定した。その結果、CAPのアミノ末端168アミノ酸の部分で翻訳後修飾によるAC活性化促進効果を仲介するのに十分である事がわかった。この領域は、RAS2 Val-19を持つ出芽酵母株が熱ショック感受性を示すのに必要な領域と一致していた。

4. CAP欠失変異を持つ出芽酵母株でGST-CYR1を発現し、CAPを全く結合しないACをグルタチオン・セファロースに固定した。別の酵母株でCAPを過剰発現して、CAPを含む細胞質画分を分離し、グルタチオン・セファロースに固定したACと試験管内での結合反応を調べたところ、CAPとACの結合が再構成された。また、2者の結合の再構成と同時に、Rasの翻訳後修飾によるAC活性化促進効果も再構成された。

従来、Rasの翻訳後修飾は、Rasの膜局在のみに必要と考えられてきた。しかし、本研究の結果より、Rasの翻訳後修飾は、膜局在のみならず、エフェクター活性化の過程そのものに必須であることが明らかになった。また、この効果の発現には、CAPがAC分子に結合していることが必要であった。さらに、CAPのACに対する効果が試験管内で再構成できたことから、CAP自体、あるいはCAPとACのカルボキシ末端の複合体上にRasの脂質修飾基の受容体が存在し、この受容体を介して、ACの活性化過程におけるRasの翻訳後修飾の影響が仲介される可能性が強く示唆された。最近、哺乳動物の系においても、Rasの翻訳後修飾がそのエフェクターRaf-1の第2のRas結合部位であるシステインリッチ領域との結合に必要な事実が本研究室によって明らかにされており、本研究結果は、Rasの翻訳後修飾がエフェクター活性化過程に直接的に関与する事が、Rasのエフェクターの種類にかかわらず共通である可能性を示唆している。

本研究は、Ras蛋白質によるそのエフェクター活性化について、そ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Ras翻訳後修飾の意義とシクラーゼ結合蛋白質CAPの機能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。