



Critical Function of the Ras-associating Domain as a Primary Ras-binding Site for Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Adenylyl Cyclase

Kido, Masahiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-06-19

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2436

(Rights)

This research was originally published in Journal of Biological Chemistry. Masahiro Kido; Fumi Shima ; Takaya Satoh; Tsuyoshi Asato ; Ken-ichi Kariya; Tohru Kataoka. Critical Function of the Ras-associating Domain as a Primary Ras-binding Site for Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Adenylyl Cyclase. Journal of Biological...

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002436>

※ 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。



【77】

氏名・(本籍) 木戸 正浩 (韓国)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 博い第1399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14年3月31日

【学位論文題目】

**Critical Function of the Ras-associating Domain as a Primary
Ras-binding Site for Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Adenylyl
Cyclase**

(Ras-associating ドメインの出芽酵母アデニル酸シクラーゼ
の活性調節のための主要 Ras 結合部位としての重要な機能)

審査委員

主査 教授 片岡 徹

教授 黒田 嘉和

教授 山村 博平

序 論

Ras 蛋白質は、低分子量 GTP 結合蛋白質の一員であり、出芽酵母から哺乳動物に至るまで保存され、種々の生理現象を制御するシグナル伝達に係っている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Ras 蛋白質 Ras1 と Ras2 は、哺乳動物 Ras と構造上かつ機能的に非常に類似しており、cAMP 産生を触媒するアデニル酸シクラーゼ (CYR1) の主要な調節因子である。活性型変異体である *RAS2^{Val-19}* 遺伝子を有する酵母株は、高い細胞内 cAMP 濃度を示し、熱ショックに対する高感受性等の異常な表現型を示す。

CYR1 は 2026 アミノ酸残基の蛋白質で、N 末端、ロイシンリッチリピート (LRR)、シクラーゼ触媒、C 末端の 4 つのドメインからなる。当研究室による人為的突然変異導入実験より、23 アミノ酸残基の単位配列の反復より構成される LRR ドメインが、Ras による CYR1 活性化に必須であり、主要 Ras 結合部位であることが判明していた。さらに、Ras による CYR1 活性化には、上記の GTP 依存性の第一の結合だけでなく、CYR1 とその結合蛋白質 CAP の複合体との GTP 非依存性の第二の結合が必要であることも示されていた。

最近のコンピューターを用いた蛋白質構造予測により、高等動物における Ras およびそのホモログ Rap1 のエフェクター (候補); RalGDS, Rin1, afadin/AF-6, ホスホリパーゼ C ϵ (PLC ϵ), RA-GEF-1 の Ras 結合部位は、Ras-associating ドメイン (RAD) という約 100 アミノ酸残基の構造を共有することが判明した。また、他のエフェクター-Raf-1 と PI-3 キナーゼ γ の Ras 結合ドメイン (RBD) も RAD と類似した高次構造を持つこともわかった。この状況の中で、CYR1 の Ras 結合部位 LRR ドメインは、一見 RAD と全く類似性をもたず唯一の例外であった。本研究では、LRR ドメインの中に RAD が存在することを発見し、その機能について解析した。

実験方法と結果

1. Ras との相互作用における LRR 構造の役割の解析

LRR ドメイン (アミノ酸番号 674-1300) の反復単位のコンセンサス配列は PXX α XXLXXLXXLXXNX α XX α (P:プロリン, L:ロイシン, N:アスパラギン, α :脂肪族アミノ酸, X:アミノ酸不特定) である。以前、LRR ドメインの何れの部位に欠失変異や 2 アミノ酸挿入変異を導入しても、CYR1 の Ras による活性化が失われることを報告した。LRR 単位配列の 1 つの中の P1080 の L への置換 (P1080L), L1092P, L1099Q 等の変異も同様であった。本研究では、上記 1 アミノ酸置換変異の Ras 結合能力に対する影響を調べた。

CYR1 の Ras 結合部位のみを酵母細胞内で過剰に発現させると、内因性シクラーゼと Ras2 との結合を競合的に阻害するため、*RAS2^{Val-19}* 依存性熱ショック感受性が抑制される。*RAS2^{Val-19}* 遺伝子を有する TK161-R2V 細胞内で、上記 1 アミノ酸置換変異を持つ LRR ドメインを過剰発現させて熱ショック感受性が抑制されるかどうか調べたところ、野生型と同様に抑制した。この結果は、LRR 構造自体は Ras との結合には関係なく、LRR ドメイン (アミノ酸番号 674-1300) 内に存在する他の構造が Ras との結合に必要なことを示唆した。

上記研究の途上に、LRR ドメインの中のアミノ酸番号 676-756 の領域に RAD が存在することが、コンピューターを用いた蛋白質構造予測により判明した。RAD を含む領域を TK161-R2V 細胞内で過剰発現すると、熱ショック感受性の抑制が観察された。

2. RAD と Ras の直接的結合の証明

RAD を含む領域 (アミノ酸番号 640-809 および 640-925) をグルタチオン *S*-転移酵素 (GST) との融合蛋白質として大腸菌で発現・精製し、GTP γ S または GDP β S 結合型のヒト Ha-Ras との結合を試験管内で調べたところ、GTP 依存性の結合が観察された。また、種々の Ras エフェクター結合領域 1 アミノ酸置換変異体との結合を調べたところ、D38N および P34G 変異により RAD との結合が消失した。この結合特異性は、全長 CYR1 にて観察されるものと同一であった。

さらに、RAD の Ha-Ras に対する結合解離定数を CYR1 活性競合阻害法により求めた。GTP 結合型 Ha-Ras 依存性に CYR1 を活性化する試験管内アッセイ系に、精製した GST-CYR1(640-809) を加えると容量依存性の CYR1 活性阻害が観察された。これは、GST-CYR1(640-809) が内在性 CYR1 と Ha-Ras を競合するために起こる。この阻害パターンを定常状態反応速度論的に解析することにより、GST-CYR1(640-809) は Ha-Ras に対して 80 nM の解離定数にて結合することがわかった。この値は、全長 LRR ドメインの値 (10 nM) に比較して少し高いが、全長 LRR ドメインの Ras に対する親和力の大部分を RAD が担っていることを示した。

3. RAD への変異導入の Ras 依存性 CYR1 活性化への影響

RAD の Ras 依存性 CYR1 活性化における役割を人為的変異導入実験により解析した。RAD の近傍 (アミノ酸番号 658) および RAD 内部 (アミノ酸番号 700 と 736) に 2 あるいは 4 アミノ酸挿入変異 (各々 V658, V700, V736)、ならびに、RAD 内部に 41 アミノ酸欠失変異 (Δ 659-700) を導入した。RAD 内に変異をもつ CYR1 は、いずれも Ras による活性化を全く受けなくなった。一方、RAD 外近傍の V658 変異は、Ras 依存性最大 CYR1 活性を低下させる以外は、活性化に影響しなかった。

さらに、RAD の Ras 結合能力に対する上記変異の影響を試験管内結合測定法ならびに CYR1 活性競合阻害法で調べたところ、RAD 内の変異はいずれも Ras 結合能力を喪失させたが、V658 変異は影響がなかった。以上の結果は、RAD が Ras 依存性 CYR1 活性化に必要な主要 Ras 結合部位であることを証明した。

考 察

本研究により、Ras 依存性活性化に必要な CYR1 の主要 Ras 結合部位が従来から提唱されていた LRR 構造ではなく RAD であることが証明された。LRR 構造が CYR1 活性化に必要であった理由は、RAD における Ras 結合シグナルをシ

クラーゼ触媒ドメインにアロステリックに伝達するのに必要なためと推測される。

RAD は、Ponting と Benjamin によって哺乳動物 Ras/Rap1 エフェクター RalGDS およびそのホモログ Rlf と Rgl, Rin1, afadin/AF-6 などの Ras/Rap1 結合部位に共通な構造として見い出されたものである。本研究では、RAD を有する新規蛋白質 PLC ϵ , RA-GEF-1 を発見し、Ras/Rap1 のエフェクターであることを証明した。さらに、Ras エフェクター Raf-1 と PI-3 キナーゼ γ の RBD の三次構造が X 線解析により解明され、RalGDS の RAD と非常に類似した構造を持つことが判明した。本研究により、唯一の例外と考えられた出芽酵母 CYR1 においても RAD が Ras 結合部位であることが証明され、出芽酵母から哺乳動物に至るまで Ras 結合認識機構に共通性があることがわかった。

CYR1 の RAD のアミノ酸配列を他のエフェクターの RAD と比較したところ、RAD N 末端部の最初の 2 つの β -strand (β 1 と β 2) および次の α -helix (α 1) と loop に存在する Ras との結合に重要な 3 個の塩基性アミノ酸の保存状態などから考えて、哺乳動物 Raf-1 の RBD に最も類似していると結論された。RAD の一次および二次構造には非常に多様性があるが、その結合特異性も多様性に富んでいる。Ras, Rap1 を識別して結合するもの (RA-GEF-1) があり、M-Ras (R-Ras3) などの他の低分子量 GTP 結合蛋白質と結合するもの (RA-GEF-2 と MR-GEF) も存在する。データベース検索によると、RAD を持つ蛋白質は 148 個にものぼるが、その殆どのもので結合相手が判明していない。現在のところ、RAD のアミノ酸配列からその結合相手の低分子量 GTP 結合蛋白質の種類を予測することは不可能である。これを可能にするためには、多様な結合特異性を有する RAD の三次構造を出来るだけ多数決定して、結合認識の基本的分子機構を解明することが重要であると思われる。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|------------|--|----|-------|
| 受付番号 | 甲第 1402 号 | 氏名 | 木戸 正浩 |
| 論文題目 | Critical Function of the Ras-associating Domain as a Primary Ras-binding Site for Regulation of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Adenylyl Cyclase (Ras-associating ドメインの出芽酵母アデニル酸シクラーゼの活性調節のための主要 Ras 結合部位としての重要な機能) | | |
| 審査委員 | 主 査 片岡 徹 副 査 黒田嘉和 副 査 山下 博平 | | |
| 審査終了日 | 平成 14 年 2 月 1 日 | | |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras は、出芽酵母から哺乳動物に至るまで保存され細胞内シグナル伝達に係っている。出芽酵母の Ras, Ras1 と Ras2 は、哺乳動物 Ras と構造上かつ機能的に非常に類似しており、アデニル酸シクラーゼ (CYR1) の主要調節因子である。活性型変異体 $RAS2^{Val-19}$ 遺伝子を有する酵母株は、高い細胞内 cAMP 濃度を示し、熱ショックに対する高感受性を示す。CYR1 は 2026 アミノ酸残基の蛋白質で、N 末端、ロイシンリッチリピート (LRR)、シクラーゼ触媒、C 末端の4つのドメインからなる。人為的突然変異導入実験より、23 アミノ酸残基の単位配列の反復より構成される LRR ドメインが、Ras による CYR1 活性化に必須であり、主要 Ras 結合部位である事が判明していた。高等動物 Ras エフェクター蛋白質の Ras 結合部位は、Ras-associating ドメイン (RAD) という約 100 アミノ酸残基の構造を共有する。しかし、CYR1 の Ras 結合部位 LRR ドメインは一見 RAD と全く類似性をもたず唯一の例外であった。本研究者は、LRR ドメインの中に RAD が存在することを発見し、その機能について解析した。

本研究者は、まず Ras との相互作用における LRR 構造の役割について解析した。LRR ドメイン (アミノ酸番号 674-1300) の反復単位のコンセンサス配列は $PXX\alpha XXLXLXLXLXNX\alpha XX\alpha$ (α : 脂肪族アミノ酸、X: アミノ酸不特定) である。以前、LRR 単位配列中の P1080 の L への置換 (P1080L), L1092P, L1099Q 等の変異導入により CYR1 の Ras による活性化が失われることを報告した。CYR1 の Ras 結合部位のみを $RAS2^{Val-19}$ を持つ酵母細胞内で過剰に発現させると、内在性 CYR1 と Ras2 との結合を競合的に阻害するため、 $RAS2^{Val-19}$ 依存性熱ショック感受性が抑制される。上記 1 アミノ酸置換変異を持つ LRR ドメインを過剰発現させたところ、野生型と同様に熱ショック感受性を抑制した。この結果は、LRR 構造自体は Ras との結合には関係ないことを示唆した。この研究の途中に、LRR ドメイン内のアミノ酸番号 676-756 の領域に RAD が存在することが、コンピューター解析により予測された。RAD を含む領域を $RAS2^{Val-19}$ を持つ酵母細胞内で過剰発現すると、熱ショック感受性が抑制された。

次に、RAD を大腸菌で発現・精製してヒト Ha-Ras との結合を試験管内で調べたところ、GTP 依存性の結合が観察された。また、種々の Ras エフェクター結合領域 1 アミノ酸置換変異体との結合を調べたところ、D38N および P34G 変異により RAD との結合が

消失した。この結合特異性は全長 CYR1 と同じであった。さらに、RAD の Ha-Ras に対する結合解離定数を、Ha-Ras 依存性 CYR1 活性化の競合阻害パターン¹の反応速度論的解析により求めたところ、80 nM であった。この結果は、全長 LRR ドメインの Ras に対する親和力の大部分を RAD が担っていることを示した。

次に、RAD の役割を人為的変異導入実験により解析した。RAD の近傍 (アミノ酸番号 658) および内部 (700 と 736) に 2 あるいは 4 アミノ酸挿入変異 (各々 V658, V700, V736)、ならびに、RAD 内部に 41 アミノ酸欠失変異 (Δ 659-700) を導入した。RAD 内に変異をもつ CYR1 は、いずれも Ras による活性化を全く受けなくなった。一方、V658 変異は活性化に影響しなかった。さらに、RAD の Ras 結合能力に対する上記変異の影響を試験管内結合測定法ならびに CYR1 活性競合阻害法で調べたところ、RAD 内の変異はいずれも Ras 結合能力を喪失させたが、V658 変異は影響がなかった。以上の結果は、RAD が Ras 依存性 CYR1 活性化に必要な主要 Ras 結合部位であることを証明した。

本研究により、Ras 依存性活性化に必要な CYR1 の主要 Ras 結合部位が LRR 構造ではなく RAD であることが証明された。LRR 構造が CYR1 活性化に必要な理由²は、RAD における Ras 結合シグナルをシクラーゼ触媒ドメインにアロステリックに伝達するのに必要なためと推測された。RAD は、哺乳動物 Ras エフェクター RalGDS, Rin1, afadin/AF-6, PLC ϵ , RA-GEF-1 の Ras 結合部位に共通に存在する構造である。さらに、Ras エフェクター Raf-1 と PI-3 キナーゼ γ の Ras 結合ドメインの三次構造が解明され、RAD と非常に類似した構造を持つことが判明した。本研究により、唯一の例外と考えられた出芽酵母 CYR1 においても RAD が Ras 結合部位であることが証明され、出芽酵母から哺乳動物に至るまで Ras 結合認識機構に共通性があることがわかった。

本研究は、出芽酵母アデニル酸シクラーゼについて、その Ras との相互作用機構を研究したものであるが、RA ドメインが主要 Ras 結合部位である事を発見して酵母から哺乳動物における Ras の結合認識機構の共通性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。