



Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations

野村, 和弘

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2005-03-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2817

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002817>

※ 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。



【 150 】

氏 名・(本 籍) 野村 和弘 (高知県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1942号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月22日

【 学位論文題目 】

Identification of a novel domain of Ras and
Rap1 that directs their differential subcellular
localizations

(Ha-Ras と Rap1A の細胞内局在を決定する
新規ドメインの同定)

審 査 委 員

主 査 教 授 久野 高義
教 授 寺島 俊雄
教 授 林 祥剛

【緒言】

Ras は、低分子量 GTP 結合タンパク質に属し、GDP 結合型 Ras は不活性型で、GTP 結合型 Ras は活性型となってエフェクター分子と相互作用し、下流の分子にシグナルを伝達することで細胞の増殖や分化機能を制御することが知られている。

Rap1A もまた、Ha-Ras と構造が類似した低分子量 GTP 結合タンパク質であり、それらのエフェクター結合領域のアミノ酸配列は同一で、Ras と同様の複数のエフェクター分子を共有することが知られている。しかし、Ha-Ras と Rap1A の細胞内局在は大きく異なり、即ち Ha-Ras の大部分は細胞膜内側に局在化するのに対し、Rap1A は主にゴルジ装置に局在化し、それぞれ固有の生理的機能を担っていると考えられている。

これまでに、Ha-Ras と Rap1A の細胞内局在を決定する分子機構はほとんど明らかにされておらず、これらの分子の局在化メカニズムを解析することが、Ras/Rap1A の各オルガネラにおいて果たす役割の解明につながると考え、本研究では Ha-Ras と Rap1A の種々のキメラ分子の細胞内局在を解析することにより、細胞内局在の決定に関与するアミノ酸残基の同定を試みた。

【方法・結果】

Rap1A の 60-90 (特に 83-89) 番目のアミノ酸領域は、Rap1A のゴルジ装置への局在化に重要である。Ras と Rap1A の種々のキメラ分子を作製し、その N 末端に EGFP を融合させたタンパク質を COS-7 細胞に一過性に発現させたものの細胞内局在を観察したところ、Rap1A-Ha-Ras キメラ変異体 (Ha-Ras の 1 番目から 101 番目のアミノ酸を Rap1A の配列にしたもの)、および Ha-Ras-Rap1A-Ha-Ras キメラ変異体 (Ha-Ras の 47 番目から 101 番目のアミノ酸を Rap1A の配列にしたもの) が、核周辺領域に局在することを見出した。

また、Rap1A の N 末端欠失変異体の細胞内局在を解析したところ、1-30 あるいは 1-60 番目のアミノ酸を欠いた変異体では核周辺領域に局在が観察されたが、1-90 番目のアミノ酸を欠いた変異体では細胞膜への局在が観察された。

さらに、60-90 番目のアミノ酸領域の詳細な検討を進めていくと、Ha-Ras の 85-89 番目のアミノ酸を Rap1A の配列に置き換えた変異体 (Ha-Ras 85-89 変異体) が核周辺領域に局在化することを見出し、しかもゴルジ装置のマーカーとよく一致することが明らかとなった。

以上の結果より、Rap1A の 60-90 番目のアミノ酸領域、特に 85-89 番目のアミノ酸が Rap1A のゴルジ装置への局在化に重要であることが示唆された。

Ha-Ras のゴルジ装置局在化変異体は生化学的性質を保ち、細胞内 GTP 結合型変異体も存在する

次に、これらの変異体を用いてさらに詳細な検討を行った。まず、Ha-Ras 85-89 変異体の生化学的性質に変化がないかどうか GDP の解離速度定数を検討した。大腸菌から精製した Ha-Ras に蛍光標識した GDP を結合させ、解離速度定数を求めたところ、野性型 Ha-Ras では 3.4×10^{-3} であるのに対し、Ha-Ras 85-89 変異体では 3.8×10^{-3} であり、有意な差は見られず、変異を導入したことによる生化学的性質に対する影響は見られないと考えられた。

また、この変異体のエフェクターとの結合能を調べるために、エフェクター分子である Raf-1 の RBD (Ras-binding domain) との相互作用を *in vitro* と *in situ* で検討した。Ha-Ras を COS-7 細胞で発現させ、そのライセートと、大腸菌から精製した RBD を用いて pull down assay を行い、RBD にトラップされた GTP 結合型 Ha-Ras を、抗体を用いて検出したところ、野生型ではエフェクターとの結合は少なく、活性型変異体 (G12V) では結合が見られ、アミノ酸 85-89 の変異を導入してもその量は変わらず、この変異がエフェクターとの結合能には影響を与えないということが示唆された。さらに、EGFP で標識した RBD と Ha-Ras とを COS-7 細胞に共発現させ、その細胞内局在を観察したところ、RBD 単独発現では細胞質に存在するのに対して、活性型 Ha-Ras との共発現では細胞膜で共局在が観察され、また、ゴルジ装置に局在が見られる Ha-Ras 85-89 変異体では、RBD もゴルジ装置に局在化した。

これらの結果より、変異を導入してゴルジ装置に局在化するようになった Ha-Ras 変異体も細胞内で GTP 結合型として存在でき、エフェクター分子 RBD と相互作用しうるということが確認された。

Rap1A の 85-89 番目のアミノ酸領域は、ゴルジ装置への局在化に必須

次に、Rap1A の C 末端約 50 アミノ酸を Ha-Ras に置き換えたキメラ変異体はゴルジ装置に局在が観察されることを確認したうえで、このキメラ変異体の 85-89 番目のアミノ酸を Ha-Ras の配列に置き換えた変異体を作製し、細胞内局在への影響を検討した。その結果、この変異体の局在は細胞膜領域に観察され、Rap1A の 5 アミノ酸がゴルジ装置への局在化に必須であることが示唆された。

【考察】

通常、Ha-Ras は大部分が細胞膜に、Rap1A はゴルジ装置に局在化するが、本研究では Ha-Ras の 85-89 番目のアミノ酸を Rap1A の配列に置き換えた変異体がゴルジ装置に局在化することを見出した。さらに、この変異体の生化学的性質を検討し、実際に細胞内において GTP 結合型として存在しうることを示した。

構造解析によると、この Rap1A の 85-89 番目のアミノ酸領域は分子表面に位置しており、相互作用できるなんらかのターゲット分子の存在が示唆される。今後、その分子の検索および同定を試みる予定である。

最近の研究では、Ha-Ras あるいは Rap1A は、主要局在部位以外のオルガネラにも存在することが明らかとなり、その機能が注目されている。従って、本研究で明らかにした変異体を用いて Ha-Ras および Rap1A の細胞内局在化のメカニズムを明らかにすることは、これらの分子の各オルガネラにおいて果たす役割の解明に重要な手がかりを与えると考えている。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1944 号	氏名	野村和弘
論文題目 Title of Dissertation	Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations (Ha-Ras と Rap1A の細胞内局在を決定する新規ドメインの同定)		
審査委員 Examiner	主査 久野高義 Chief Examiner 副査 寺島俊雄 Vice-examiner 副査 林祥剛 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 3 月 2 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

Ras は低分子量 GTP 結合タンパク質に属し、活性化されてエフェクター分子と相互作用し、下流の分子にシグナルを伝達することで細胞の増殖や分化を制御する機能を担っている。Rap1A も Ha-Ras と同じファミリーに属し、複数のエフェクター分子を Ha-Ras と共にして機能を発揮するが、これら 2 つの分子はそれぞれ固有の生理的機能を担っており、また細胞内局在が大きく異なることが知られている。これまでに、Ha-Ras と Rap1A の細胞内局在を決定する分子機構はほとんど明らかにされておらず、これらの分子の局在化のメカニズムを解析することが、Ras/Rap1A の各オルガネラにおいて果たす役割の解明につながると考え、細胞内局在の決定に関与するアミノ酸残基の同定を試みた。

まず、Ha-Ras と Rap1A の種々のキメラ分子を作製し、その細胞内局在を観察したところ、Rap1A-Ha-Ras キメラ変異体 (Ha-Ras の 1 番目から 101 番目のアミノ酸を Rap1A の配列にしたもの)、および Ha-Ras-Rap1A-Ha-Ras キメラ変異体 (Ha-Ras の 47 番目から 101 番目のアミノ酸を Rap1A の配列にしたもの) が、核周辺領域に局在することを見出した。また、Rap1A の N 末端欠失変異体の細胞内局在を解析したところ、1-30 あるいは 1-60 番目のアミノ酸を欠いた変異体では核周辺領域に局在が観察されたが、1-90 番目のアミノ酸を欠いた変異体では細胞膜への局在が観察された。さらに、60-90 番目のアミノ酸領域の詳細な検討を進めていくと、Ha-Ras の 85-89 番目のアミノ酸を Rap1A の配列に置き換えた変異体 (Ha-Ras 85-89 変異体) が核周辺領域に局在することを見出し、しかもゴルジ装置のマーカーとよく一致することが明らかとなった。以上の結果より、Rap1A の 60-90 番目のアミノ酸領域、特に 85-89 番目のアミノ酸が Rap1A のゴルジ装置への局在化に重要であることが示唆された。

次に、Ha-Ras 85-89 変異体の生化学的性質に変化がないかどうか検討した。精製した Ha-Ras に蛍光標識した GDP を結合させ、解離速度定数を求めたところ、野生型 Ha-Ras では 3.4×10^{-3} であるのに対し、Ha-Ras 85-89 変異体では 3.8×10^{-3} であり、有意な差は見られず、変異を導入したことによる解離速度定数に対する影響は見られないと考えられた。また、この変異体とエフェクター分子である Raf-1 の RBD (Ras-binding domain) との相互作用を検討した。Ha-Ras を COS-7 細胞で発現させ、そのライセートと大腸菌から精製した RBD を用いて pull down assay をを行い、RBD にトラップされた GTP 結合型 Ha-Ras を、抗体を用いて検出したところ、アミノ酸 85-89 の変異を導入しても結合量は変わらず、この変異がエフェクターとの結合能には影響を与えないということが示唆された。さらに、EGFP で標識した RBD と Ha-Ras を COS-7 細胞に共発現させ、その細胞内局在を観察したところ、RBD 単独発現では細胞質に存在するのに対して、活性型 Ha-Ras との共発現では細胞膜で共局在が観察され、また、ゴルジ装置に局在が見られる Ha-Ras 85-89 変異体では、RBD もゴルジ装置に局在化した。これらの結果より、ゴルジ装置に局在化するようになった Ha-Ras 変異体も細胞内で GTP 結合型として存在でき、エフェクター分子 RBD と相互作用しうるということが確認された。

本研究は、Ha-Ras と Rap1A について、それらの細胞内局在メカニズムを研究したものであるが、Ha-Ras の 85-89 番目のアミノ酸を Rap1A の配列に置き換えた変異体がゴルジ装置に局在化することを見出し、またこの変異体の生化学的性質を検討し、細胞内においても GTP 結合型として存在しうることを示した画期的な発見であり、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。