

学 位 論 文 題 名

A novel human RasGAP-like gene that
maps within the prostate cancer
susceptibility locus at chromosome 1q25

（1 番染色体長腕上の前立腺癌の発症に関わると予想される
部位に存在する新規ヒト RasGAP 様遺伝子の解析）

学位論文内容の要旨

近年の発癌に関する研究により、Ras は細胞の分化と増殖において重要な役割を果たすことが明らかにされてきている。Ras は GTP と結合すると活性型となり、GDP と結合していると不活性型となるが、これらの活性化の状態は、通常、生体内では Ras guanine nucleotide releasing protein による活性化と、Ras に内在する GTPase 活性を活性化する Ras GTPase-activating protein (RasGAP)による不活化により制御されている。

現在まで哺乳類において p120GAP、neurofibromin(NF1)、Gap1^m、Gap1^{IRAP} の4種類が単離・同定されている。また、酵母では、IRA1、IRA2 が、線虫では GAP-2 が同定され、Ras の negative regulator として機能することが証明されている。

一方、前立腺癌の家系の追跡調査から前立腺癌の発症に関わる遺伝子が1番染色体長腕上(1q25)に存在することが示唆されている。

この論文において筆者らは1番染色体上の前立腺癌の発症に関わる遺伝子が存在すると予想される部位に存在する、既存の RasGAP に類似する配列を持った遺伝子を単離・同定し、その機能を解析した。

【方法と結果】

ヒト ELL2 蛋白を単離する目的で 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE)を施行し得られた入ファージから cDNA を作成し、ヒト心筋由来 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、1,139 アミノ酸からなる約 129kDa の蛋白をコードすると考えられる cDNA を得た。ホモロジー検索からこの蛋白は、既存の RasGAP に高い相同性を示し、特に 290 から 621 アミノ酸残基において RasGAP に共通して高度に保存され、GAP 活性に重要であるとされている GAP-related domain (GRD)に高い相同性を持つことが判った。さらに、構造解析上、蛋白の重合に関わるとされる coiled-coil 構造を持つことが予想され、既存の RasGAP の中では線虫の RasGAP である GAP-2 に全長において高い相同性を示した（相同性 40%、同一性 31%）。この新規ヒト蛋白を nGAP と名付けた。

次に nGAP の生体内での発現を検討した。初めに様々な臓器より抽出した mRNA を用いて Northern blot 法で検討したが、いずれも低いレベルの発現であったため、マウスの nGAP を同定し、マウスの各臓器由来の mRNA に対し RT-PCR を施行した。その結果、脳・肺・心臓・

肝臓・精巣・骨格筋と検討した全ての臓器での発現を確認した。

nGAP の機能を解析した。最初に、酵母の RasGAP である IRA2 の相補試験である Heat shock sensitivity assay を行った。Heat shock sensitivity assay は IRA2 を欠如した酵母に対して vector、既存の RasGAP である NFI、IRA2、さらに nGAP の全体または一部を組み込み、55℃で 15 分から 45 分放置し、30℃で 3-4 日間培養し、IRA2 への相補性を判定した。その結果、nGAP の全長、1-646 アミノ酸残基、150-646 アミノ酸残基が IRA2 を機能的に相補することが確認された。

さらに、*in vitro* における nGAP の GAP 活性を *in vitro* GAP assay で検討した。nGAP の 1-646 アミノ酸残基を GST 融合蛋白として酵母内に多量に発現し、これをグルタチオンセファロースビーズを用いて精製した。*in vitro* GAP assay は前川らが報告した方法に従い、大腸菌を用いて精製した small GTP 蛋白を [γ -³²P]GTP と結合させ、37℃において既存のヒト RasGAP である GAP1^m または GST-nGAP(1-646)結合蛋白と反応させ、反応後の残存放射線活性を測定した。その結果、既存のヒト RasGAP である GAP1^m は H-Ras、R-Ras の GTPase 活性を刺激し残存放射線活性を低下させたのに対し、nGAP この実験条件では H-Ras、R-Ras、Rap1、Ral のいずれに対しても GTPase 活性に影響を与えなかった。

最後に、nGAP の全長をコードする cDNA をプローベとして fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法を行った。その結果、nGAP は 1 番染色体長腕上(1q25)に存在することが確認された。

【考案】

筆者らはこの論文で Ras の negative regulator である既存の RasGAP と、特に Ras の GTPase 活性を刺激する機能を持つとされている GRD 内において高い相同性を示す、新規ヒト遺伝子を単離・同定した。様々な変異蛋白を用いた研究により、GRD 内における各アミノ酸の GAP 活性に与える影響が検討されている。特に、Phe-Leu-Arg-Phe-x-x-Pro-Ala-Ile-x-x-Pro (x は任意のアミノ酸)配列は RasGAP に共通して保存されているが、nGAP は 478-489 においてこの配列を有する。また、p120GAP における Arg⁷⁸⁹、Lys⁸³⁴、Arg⁹²⁸ がそれぞれ変異すると、p120GAP の GAP 活性は著明に低下すると報告されており、GAP 活性に必須のアミノ酸と考えられているが、これらのアミノ酸は nGAP でも保存されている (Arg⁷⁸⁶、Lys⁸³¹、Arg⁹²⁵)。また、von Recklinghausen neurofibromatosis type 1 の原因遺伝子として同定された癌抑制遺伝子 NFI も既存の RasGAP の一つであるが、同病の患者から発症した大腸癌、星状細胞腫の組織から Lys¹⁴²³ の Glu または Gln への変異が報告されており、RasGAP の異常による Ras の恒常活性化が発癌に関わることが想定されている。この Lys は nGAP においても保存されている (Lys⁵¹²)。また、nGAP は全長において、線虫の RasGAP である GAP-2 と高い相同性を持つことが確認された。これらのことから nGAP は RasGAP であることが予想されたが、今回の研究では nGAP における GAP 活性は確認されなかった。今回、H-Ras、R-Ras、Rap1、Ral に対する GAP 活性を検討したが、nGAP はこれら以外の Ras ファミリーの分子、あるいは、Ras に類似した effector domain を持つ、他の低分子蛋白をターゲットとすることを示唆している可能性がある。

また、FISH 法による nGAP の遺伝子マッピングでは 1 番染色体長腕上(1q25)の DIS218 と DIS466 のマーカーの間に位置することが確認された。1q25 のこの部位には、前立腺癌の家族発症例の検討により前立腺癌発症に関わることが予想されている hereditary prostate cancer susceptible gene (HPC1)が存在する。RasGAP 様の蛋白である nGAP も癌抑制遺伝子 NFI と同様に、発癌、殊に前立腺癌の発症に関わる可能性があると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

A novel human RasGAP-like gene that maps within the prostate cancer susceptibility locus at chromosome 1q25

(1 番染色体長腕上の前立腺癌の発症に関わると予想される
部位に存在する新規ヒト RasGAP 様遺伝子の解析)

Ras の活性化と発癌との関係が明らかにされつつあるが、申請者は Ras の negative regulator とされている Ras GTPase-activating protein (RasGAP) に高い相同性を持つ新規蛋白について、その単離・同定および機能について解析を行った。PCR 産物として得られた cDNA は 1,139 アミノ酸からなる、推定分子量約 129kDa の蛋白をコードし、そのアミノ酸一次構造は既知の RasGAP に GTPase related domain (GRD) において高い相同性を示した。特に、線虫の RasGAP である GAP-2 とは GRD 以外の部分でも構造上類似しており、nematode の n をとって、nGAP と名付けた。nGAP では GRD 内で既知の RasGAP で重要とされているアミノ酸が高度に保存されており、RasGAP として機能することが予想された。nGAP の発現をマウスを用いた RT-PCR で検討したが、検討した臓器全てに発現を認めた。酵母を用いた Heat shock sensitivity assay で、nGAP は酵母の RasGAP である IRA2 を機能的に相補した。この現象が nGAP の GAP 活性の結果であることを確かめるため恒常活性型の Ras を発現した酵母の Heat shock response を検討したが、nGAP は既知の RasGAP 同様、酵母の heat shock response を回復させなかった。さらに、*in vitro* GAP assay を用いて nGAP の GTPase 活性への影響を検討したが、nGAP は実験に用いた低分子 GTPase である H-Ras、R-Ras、Rap1B、Ral の GTPase 活性に影響を与えなかった。nGAP は Ras に結合し、RasGAP の機能を阻害する分子である可能性を考え、既知の RasGAP である GAP1^m とともに *in vitro* GAP assay を試みたが、nGAP は GAP1^m の機能に影響を与えなかった。nGAP の染色体マッピングを FISH 法で検討したところ、nGAP は一番染色体長腕上の 1q25 に存在した。1q25 には

前立腺癌好発家系の検討から、前立腺癌発症に関わると考えられている HPC1 が存在することが知られている。

公開発表に際し、副査の加齢制御医学今村教授より、既知の RasGAP の異常が発癌に結びつくかどうかについて、その上で、nGAP の発癌とのかかわりがある可能性があるかという質問があった。申請者は文献での報告をもとに neurofibromatosis type1 患者の悪性腫瘍合併時の neurofibromin の GRD 内での変異の報告例があると答え、さらに、未発表である前立腺癌組織における nGAP の発現を検討した結果から、nGAP の発癌との関係の可能性を示した。続いて副査の癌研細胞制御守内教授より nGAP と既知の RasGAP である IRA2 の構造の違いから Heat shock sensitivity assay の妥当性、また RT-PCR で脳に認められた alternative band からラットの synGAP との異同に関する質問があった。申請者は RasGAP としての機能については GRD 内での重要とされるアミノ酸の保存が重要であり、nGAP ではこれらの重要とされているアミノ酸は全て保存されていると答えた。また、synGAP とはアミノ酸配列が類似しているがその比較から、同一のものではないとの印象を持っていると答えた。続いて、nGAP の機能と発癌との関係について質問があった。申請者は機能については、in vitro の検討では活性は検出されなかったが、同様の報告から、のちに Rac を標的にすることが判明した IQGAP の例を挙げ、他の Ras family の分子を標的とする可能性も考えられると答えた。発癌との関係に関しては前立腺癌組織の検討の結果を再度説明した。最後に主査の癌研生化学田中教授より過量の蛋白を用いた実験など、活性を検出するための他の実験内容について質問があったが、申請者はリコンビナント蛋白の精製について、実験に用いた精製方法では assay に必要な最小限の濃度の蛋白しか得られなかったため過量の蛋白を用いた実験ができなかったこと、nGAP のリコンビナント蛋白の活性については検討の余地があることを説明した。また、線虫の RasGAP についての機能がはっきり示されてるかとの質問に対しては、GAP-2 のクローニングの論文の内容を説明した。

本研究で単離・同定した蛋白は、発癌、ことに前立腺癌の発症と関連する新しい癌抑制遺伝子である可能性も期待されることより、審査員一同はこの研究を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。