

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap 2 の機能解析

学位論文内容の要旨

Rap2 は Ras ファミリーに属する低分子量 GTP 結合蛋白質である。Ras は細胞増殖や分化において枢軸を担う蛋白であると言う報告が多数あるのに対し、他の Ras ファミリー蛋白に関しては未知な点が多い。Rap1 は Ras と標的分子結合部位がアミノ酸レベルで同一であるが、多くの点で Ras と競合的に働き、Ras 依存性の Raf セリン/スレオニンキナーゼおよび MAP キナーゼカスケードを抑制することに起因すると考えられている。一方で Rap1 が MAP キナーゼを活性化する環境も存在するらしい。神経細胞では Rap1 は B-Raf の活性化を介し MAP キナーゼを活性化する。

Rap1 には GTP に結合した活性化型と GDP に結合した不活性化型とが存在する。Rap1 の活性化はグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)により誘導される。Rap1 の GEF としては、チロシンキナーゼにより活性化される C3G、カルシウムとジアシルグリセロールにより活性化される CalDAG-GEFI、サイクリック AMP により活性化される Epac/cAMP-GEF がある。これらの GEF 蛋白の発見は多くの情報が Rap1 に集約することを示している。一方、Rap1 の不活性化因子である GTP 水解促進因子(GAP)は rap1GAP, SPA-1 および TSC2 の三つが報告されている。rap1GAP のイソ型変異体である rap1GAPII が三量体 G 蛋白質 G_i のアルファサブユニットに結合しその情報を伝達するという報告を除けば、他の GAP の活性制御についてはほとんどわかっていない。

Rap2 は Rap1 とアミノ酸レベルで 60%以上の同一性を有しているが、その機能や活性制御はほとんど未知である。Rap2 は大部分の標的分子を Ras, Rap1 と共用するので、これら 3 つの G 蛋白質間で情報伝達のクロストークが存在することが示唆される。本研究では Rap2 の機能と制御機構について、Rap1 と比較しながら解析した。

Rap2 蛋白の発現をマウスの臓器と培養細胞を用いウエスタンブロッティングで解析したところ、大脳に多く発現していたが、調べた限りのすべての臓器及び細胞に発現が確認された。ヒト胎児腎臓由来の 293T 細胞に Flag タグ付きの Rap2 を発現させ、免疫蛍光染色と、免疫電子顕微鏡で観察したところ Rap2 は主に細胞膜に存在しており、細胞質内にも観察された。

Rap2 は GEF を発現しない状態でも GTP 結合型が 60%程度存在し、Rap1 の活性化因子として報告されている Epac、CalDAG-GEFI、C3G はいずれも Rap2 を活性化した。一方、

Rap1の不活性化因子である rap1GAPII は細胞内及び試験管内で Rap2 および Rap1 の GTP 加水分解を促進するが、Rap2 は GAP に対する感受性が Rap1 に比べ優位に低かった。GAP に対する感受性の低さが Rap2 の高い GTP/GDP 比を維持しているものと考えられた。

Rap2 も Rap1 と同様に Ras の情報伝達経路に関与するかどうかを、転写因子 Elk1 の活性をルシフェラーゼ活性でモニターし解析した。293T 細胞において活性化型変異体 Ras による Elk1 の活性化を 15% まで抑制した。この抑制は野生型と活性化型変異体で同程度であった。Rap2 を単独で発現させても、Elk1 の活性化は見られなかった。また、Rap2 は Raf と野生型と活性化型で同程度の効率で結合した。Rap2 は Ras と Raf の結合を競合するために Ras の作用を抑制すると推測され、また、高い GTP/GDP 比で存在するため、野生型も活性化型変異体と同程度の作用を有すると考えられる。

Rap2 の活性が細胞外刺激によりどのような変化を示すかを検索したところ、リソホスファチジン酸刺激によって Rap2 の一過性の上昇、rap1GAPII 依存性に一過性の減少を認めた。

本研究で Rap2 が、1) 各臓器にほぼ普遍的に存在し、細胞内では主として細胞膜に局在すること、2) Rap1 と共通の分子により活性を制御され、共通の標的分子に結合すること、3) 他の Ras ファミリーとは異なり 60% 程度が活性化型である GTP 結合型で存在すること、4) Ras 依存性の細胞増殖シグナルを抑制することを明らかにした。

Rap2 と Rap1 は、Ras が細胞膜に存在するのとは異なり、細胞質内の膜分画、すなわちゴルジ装置や小胞体に存在するという報告がある。生化学的では膜分画をさらに細分することは時に困難であり、また、固定する試薬によって染色像が変化する場合もある（未発表）。

細胞内で Ras あるいは Rap が標的分子と結合し情報を伝達するのは、活性化型である GTP 結合型のみである。したがって、GEF が膜で活性化された場合は細胞膜にある Rap が活性化される。Rap2 が Ras 依存性の増殖シグナルを抑制するのは Rap2 が細胞膜において、Raf の活性化を Ras と競合し阻害すると考えられる。

Rap2 は現在までに報告のある Rap1 の制御分子により、その活性を制御されている。また、標的分子の大部分を Ras や Rap1 と共用する。さらに、Rap2 は Rap1 同様に Ras 依存性の転写因子 Elk1 の活性化を抑制した。これらの結果は Rap2 と Rap1 が同じ情報伝達経路上で機能していることを示唆する。Rap2 は非刺激時にも GTP 結合型の比率が高く、GAP に対する感受性が低いことから、シグナルの定常レベルの決定や、より緩徐で持続する伝達様式を取るものと推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 菊 池 九 二 三

副 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap 2 の機能解析

Rap2 は Ras ファミリーに属する低分子量 GTP 結合蛋白質である。Ras は細胞増殖や分化において枢軸を担う蛋白であるという報告が多数あるのに対し、他の Ras ファミリー蛋白に関しては未知な点が多く、特に Rap2 の活性制御機構、生理的機能はともにまったく不明である。本研究では Rap2 の機能と制御機構を明らかにする事を目的として、最も近縁の蛋白質である Rap1 と比較しながら以下の解析を行った。

Rap2 は GEF を発現しない状態でも GTP 結合型が 60%程度存在し、Rap1 の活性化因子である Epac、CalDAG-GEFI、C3G はいずれも Rap2 を活性化した。一方、Rap1 の不活性化因子である rap1GAPII は細胞内及び試験管内で Rap2 および Rap1 の GTP 加水分解を促進するが、Rap2 は GAP に対する感受性が Rap1 に比べ優位に低かった。GAP に対する感受性の低さが Rap2 の高い GTP/GDP 比を維持しているものと考えられた。

Rap2 は Ras と Rap1 の標的分子である Raf および RalGDS と結合するが、Rap2 は MAP キナーゼを活性化せず、Rap1 と同様に Ras の依存性の転写因子活性化を阻害した。また高い GTP/GDP 比で存在するため、野生型も活性化型変異体と同程度の効率で標的分子に結合し、同程度の転写因子抑制作用を有すると考えられた。

レトロウイルスのコードする癌遺伝子 v-src で形質転換した繊維芽細胞において、GTP 結合型 Rap2 が著しく減少しており、この Rap2 の不活性化は v-Src の活性化に誘導される rap1GAP の蛋白量の増加に依存することを示した。また、この細胞に Rap2 の GAP 非感受性変異体を導入することにより、v-Src に形質転換が形態的に正常復帰した。

副査の北畠教授から、Rap 2 と Rap1 の差について質問があり、Rap2 は Rap1 と異なり、生化学的にはその大部分が GTP 結合型で存在することが最大の差であると回答した。腫瘍治療への応用の可能性について質問があり、ウイルスベクター等を用いた遺伝子治療に応

用したいと回答した。腫瘍のない心筋細胞における Ras や Rap の機能について質問があり、Ras の活性化によって心筋細胞の増殖が起こる事例をあげ肥大型心筋症など病因に關与する可能性があるとして回答した。続いて副査の田中教授から Rap1 と Rap2 の内在性の GTPase 活性について質問があり、Rap2 と Rap1 では内因性 GTPase 活性がほぼ等しく、Ras に比べ 10 分の 1 であると回答した。Rap1 のノックアウトマウスを作成した場合易腫瘍形成が見られるか、またそのような実験を行っているかについて質問があり、他のグループで実験を行っているが自分では実験を開始していないと回答した。Rap2 の優勢不活性化型の導入が Ras からのシグナルが増強するかどうかについて質問があり、Ras の優勢不活性化型は確立しているのに対し、Rap1 や Rap2 の優勢不活性化型はいまだ確立していないと回答した。Rap1 が Raf に結合するにもかかわらず、Raf を活性化しない機序について質問があり、Raf の 2 つの結合部位に対する Ras と Rap1 の親和性の違いにより、結果として活性化するか否かの差が生じると回答した。副査の菊池教授から、ウエスタンブロッティングにおいて Rap2 のバンドが 2 本存在する理由について質問があり、Rap2 はその C 末が脂質修飾を受けたものと受け取れないもので 2 本検出される可能性があるとして回答した。Ras と Rap1 の活性化機構が、Ras は細胞外の刺激に対して比較的直接的に活性化されるのに対して、Rap1 はセカンドメッセンジャーによって活性化される。この違いの意義について質問があり、Rap1 にもアダプター分子によって活性化される点、Ras にもセカンドメッセンジャーを介して活性化される経路があり、両者の活性制御には類似点があると回答した。Rap1 や Rap2 が MAP キナーゼカスケードに対する抑制機能のほかに、生理的な機能を有しているか、過剰発現系以外に Rap2 の生理機能が見られるかという質問があり、細胞接着に対し Rap1 や Rap2 が關与している可能性があり、GTP 結合型の多い Rap2 は形態を維持するのに關与している可能性、また、Src によって形質転換している細胞では内在性の GTP 結合型 Rap2 が減少しており、間接的ではあるが Rap2 の減少が腫瘍形成の一つの経路となっている可能性があるとして回答した。

この論文はその活性機序が未知であった低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap2 に対する詳細な生化学検討とモデルを用いた Rap2 の抗腫瘍効果に關する機序の解明点で高く評価され、今後 Ras を介するシグナル伝達の關与する疾患の遺伝子治療等への効用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。