



Title	Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding Protein
Author(s)	大塚, 稔久
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40722">https://hdl.handle.net/11094/40722</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	大塚 穎久
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13686 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein (低分子量 GTP結合蛋白質 Rap1Bによるウシ大脳 B-Rafの活性化)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美
	(副査) 教授 谷口 直之 教授 中村 敏一

## 論文内容の要旨

## 【目的】

Ras ファミリーに属する Rap1 は、そのN末端に Ras と共通のエフェクタードメインを有することから、Ras に対して阻害的に働く機能と、Ras と同様の機能を持つことが提唱されている。阻害的な機能としては、Ras による NIH3T3 細胞のトランスフォーメーションや c-Raf-1 による Mitogen Activated Protein (MAP) キナーゼカスケードの活性化を阻害することが知られている。同様の機能として、私共はマイクロインジェクション法を用いることにより、Swiss3T3 細胞において Rap1B が DNA 合成を促進することを明らかにしている。しかし、どのような作用機構で Rap1B がその機能を発現しているのかは不明であった。

一方、これまでに私共は、Ras の標的蛋白質を同定する目的で、活性型である GTP  $\gamma$ S 結合型 Ki-Ras が MAP キナーゼキナーゼ (MEK) を介して MAP キナーゼ (ERK2) を活性化する cell-free assay 系を開発し、これを用いてウシ大脳細胞質画分から Ki-Ras 依存性に活性化される MEK キナーゼをほぼ均一にまで精製し、それが B-Raf と 14-3-3 蛋白質との複合体であることを明らかにしている。

本研究では、この cell-free assay 系を用いて RaP1B の B-Raf 活性に対する影響を解析することを目標とした。

## 【方法ならびに成績】

1) 材料の調製と cell-free assay

B-Raf は、ウシ大脳細胞質画分を、MonoS 陽イオン交換カラム、MonoQ 陰イオン交換カラムを用いて分画した部分精製標品を用いた。脂質による翻訳後修飾を受けた Rap1B および Ki-Ras は、これらのリコンビナント蛋白質を各々高発現している昆虫細胞 (Sf9cell) の細胞膜画分より精製した。翻訳後修飾を受けていない各々の蛋白質については細胞質画分より精製した。MEK と ERK2 はグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として、*E.coli* で発現させて精製した。cell-free assay は、活性型である GTP  $\gamma$ S 結合型 Rap1B と Ki-Ras あるいは不活性型である GDP 結合型 Rap1B と Ki-Ras の存在下で、B-Raf に、GST-MEK と GTS-ERK2 を加えてインキュベーションした後、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) と  $[\gamma-32P]$  ATP を加え、最終的に、B-Raf により MEK を介して活性化された ERK2 による MBP のリン酸化を B-Raf 活性として測定した。

2) RaP1B による B-Raf の活性化

まず、このcell-free assayを用いてRap1BがB-Rafを活性化するか否かを検討した。活性化のコントロールとしてはKi-Rasを用いた。GTP $\gamma$ S結合型Rap1BはKi-Rasと同様に、濃度依存的にB-Rafを活性化した。しかし、GDP結合型Rap1BはKi-Rasと同様にB-Rafを活性化しなかった。したがって、Rap1BがGTP依存性にB-Rafを活性化することが明らかとなった。

### 3) GTP $\gamma$ S結合型Rap1BによるMEKのリン酸化

次に、実際にassayに加えたMEKが、Rap1B依存性にリン酸化されているか否かを検討した。まず、Ki-RasもしくはRap1BをB-Rafとインキュベーションし、次にMEKと[ $\gamma$ -32P]ATPを加えさらにインキュベーションし、SDS-PAGEにて電気泳動後、MEKのリン酸化の程度をイメージアナライザーで解析した。コントロールに用いたKi-Rasと同様に、GTP $\gamma$ S結合型Rap1Bが存在するときにMEKがリン酸化された。また、このMEKのリン酸化がB-Rafによる直接の影響であることを確かめるために、上述のB-Raf部分精製標品を抗B-Raf抗体で免疫沈降した標品を用いて同様の解析を行ったところ、GTP $\gamma$ S結合型Rap1B依存性にB-RafによりMEKがリン酸化された。このことから、Rap1BがKi-Rasと同様にB-Raf依存性にMAPキナーゼカスケードを活性化することが明らかとなった。

### 4) B-Raf活性化におけるRap1Bの脂質による翻訳後修飾の重要性

すでに私共は、Ki-Rasの脂質による翻訳後修飾がB-Rafの活性化にとって必須であることを報告している。そこで、Rap1Bについても脂質による翻訳後修飾がB-Rafの活性化にとって必須であるか否かを検討した。cell-free assayを用いて検討した結果、翻訳後修飾を受けたGTP $\gamma$ S結合型Rap1BはKi-Rasと同様にB-Rafを活性化した。翻訳後修飾を受けていないものは、いずれもB-Rafを活性化しなかった。したがって、少なくともcell-free assay系においてはKi-Rasと同様、Rap1Bの翻訳後修飾がその機能発現にとって必須であることが明らかとなった。

### 5) Ki-RasによるB-Raf活性化に対するRap1Bの影響

Rap1Bは、細胞レベルにおいて、Rasの機能を阻害することも報告されている。そこで、Ki-RasによるB-Rafの活性化をRap1Bがcell-free assay系においても阻害するか否かを検討した。B-Raf活性はGTP $\gamma$ S結合型Ki-Ras(50nM)の存在下で最大となったが、GTP $\gamma$ S結合型Ki-Ras(10nM)の存在下で活性化されたB-Raf活性をGTP $\gamma$ S結合型Rap1Bは相加的に促進した。したがって、Rap1Bは、少なくともcell-free assay系においてはKi-RasによるB-Rafの活性化を阻害しないことが明らかとなった。

## 【結語】

本研究において、私は、Rap1BがKi-Rasと同様にB-Rafを活性化することを明らかにした。さらに、脂質による翻訳後修飾がB-Rafの活性化に必須であることを示した。また、Rap1BがKi-RasによるB-Raf活性化を阻害せず、相加的にB-Rafを活性化することを明らかにした。これらの結果から、Rap1BはB-Raf依存性にMAPキナーゼカスケードを活性化することが示された。今後は、cell-free assay系や細胞生物学的手法を用いることで、RasファミリーによるRafファミリーの活性化機構の詳細なメカニズムが分子のレベルで解明されていくと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、Rasの標的蛋白質であるB-Rafに対するRap1Bの影響をcell-free assay系を用いて解析した。その結果、Rap1BがRasと同様にB-Rafを活性化し、さらに、Rasによって活性化されたB-Raf活性をRap1Bが阻害しないことを示した。また、Rap1Bの脂質による翻訳後修飾がB-Rafの活性化に必須であることを明らかにした。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。