



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	https://hdl.handle.net/11094/40722
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	おお つか とし ひさ 大 塚 稔 久
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 6 8 6 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 γ 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指した。

【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 γ 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 GST-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 [γ -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 γ 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 γ 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 [γ -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 γ 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 γ 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 γ 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 γ S 結合型 Ki-Ras (50nM) の存在下で最大となったが、GTP γ S 結合型 Ki-Ras (10nM) の存在下で活性化された B-Raf 活性を GTP γ 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。