

## 113. 細胞膜上で二量体化した Ras の新規情報伝達メカニズム

梅木 伸久

Key words : Ras, 低分子量 G 蛋白質, 光制御

理化学研究所 佐甲細胞情報研究室

### 緒 言

Ras は、細胞増殖や分化を制御する経路の中間に位置し、細胞外からの刺激により活性化される。活性化した Ras は、その標的タンパク質である Raf キナーゼなどいくつかの標的タンパク質を時空間的に適切に選択し、下流へと情報を伝達する。つまり Ras は情報伝達の ON/OFF を行うスイッチの様な役割をしており、それと同時にシグナルの強弱を調節する役割も担っている。この調節機構の欠如は癌や様々な疾病を引き起こす事が知られている。例えば 12 番目のグリシンの変異により、Ras は常に活性型となり (G12V-Ras) シグナル伝達が常に ON 状態になる事によって細胞が癌化する。この様に Ras によるシグナル強度あるいは持続時間の調節は、細胞が刺激に応じて正しく反応する為に重要である。では Ras によるシグナル強度の調節はいったいどのようにして成し遂げられているのだろうか。一般的には活性型である GTP 結合型の Ras (GTP-Ras) と不活性型である GDP 結合型の Ras (GDP-Ras) の存在比で決定づけられると考えられている。しかしその存在比のみでシグナル強度が決定づけられているかは定かではなく、Ras による細胞内情報伝達メカニズムの全体像は未解明のままである。

近年、Ras は細胞膜上で二量体構造をとる事が明らかとなり<sup>1)</sup>、さらに Raf キナーゼの活性化にはこの二量体構造が必要であるとの報告がなされた<sup>1)</sup>。つまり、Ras の二量体形成が促進されればより多くの Raf キナーゼを活性化する事ができ、逆に癌細胞において Ras の二量体形成を阻害する事ができれば、Raf キナーゼの活性を負に制御する事で癌化を抑制する事が出来るものと期待される。Ras が脂質膜上で二量体化する為には Ras が C 末端領域において脂質化される必要がある<sup>2)</sup>。この脂質化が Ras の構造変化を引き起こす事<sup>3)</sup>、さらにこの構造変化と二量体化との関連性がこれまで議論されている。本研究において、脂質化に伴う Ras の構造変化と Raf キナーゼとの相互作用との関連性を調べる過程で、Ras の C 末システイン残基を光応答性の疎水的試薬で化学修飾すると、二量体構造が促進される事を発見した。さらに単量体・二量体構造を光で制御する事が出来たのでここに報告する。

### 方法、結果および考察

これまで K-Ras が脂質膜上で二量体構造をとると報告されている。まず始めに他の Ras アイソフォームにおいても人工脂質膜上で二量体構造をとるか解析を行った。POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) と DOGS-Ni-NTA (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl],nickel salt) を混合して作製したりポソームに、His タグを介して全長の H-Ras または R-Ras を取り込ませた。その後、架橋試薬である EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) を作用させ SDS-PAGE によって二量体構造の有無の確認を行った (図 1A)。

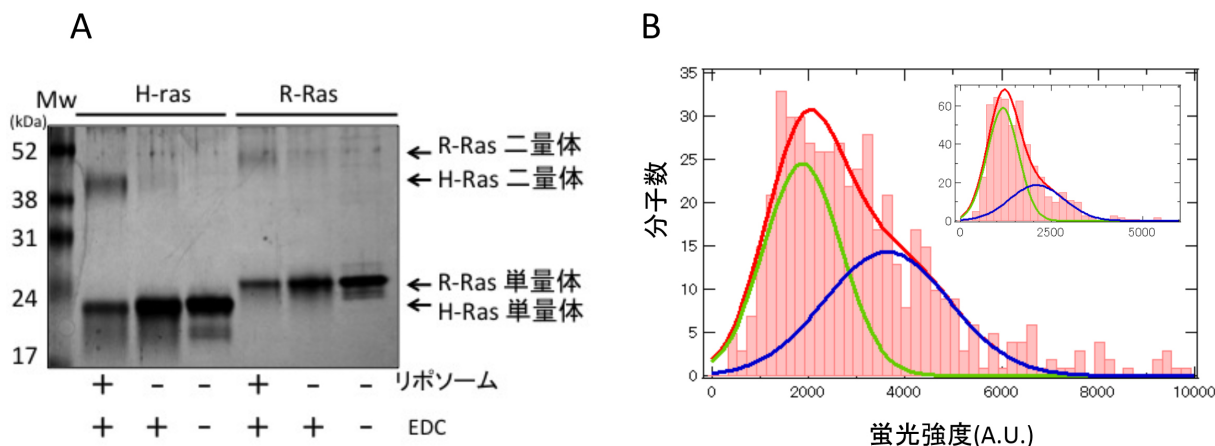


図1. H-Ras, R-Ras の二量体構造の検出.

A) 化学架橋法による Ras 二量体の検出. POPC/GODS-Ni-NTA リポソームに His タグ付き全長 H-Ras または R-Ras をインキュベートし, その後 EDC 架橋試薬を作用させた. その後 SDS-PAGE により架橋産物の有無を検証した. Mw: 分子量マーカー. B) HeLa 細胞膜上における蛍光標識 Ras の蛍光強度分布. Halo タグ付き H-Ras または R-Ras (挿入図) を HeLa 細胞で発現させ TMR 染色した. ヒストグラムは, それぞれ緑線と青線の二つのガウス分布の和 (赤線) でフィットできた. 緑線でフィットされる蛍光分子の多くは一段階の蛍光退色を示す事から, それらは単量体であると思われる.

その結果, リポソーム非存在下では二量体構造を示すバンドは検出されなかったが, H-Ras, R-Ras ともにリポソーム存在下において検出された. この事から H-Ras, R-Ras においても人工脂質膜上で二量体構造をとる事が明らかとなった. さらに生細胞膜上においてもこれらの Ras が二量体構造をとりうるか調べる為に, 全反射照明蛍光顕微鏡法による 1 分子蛍光観察を行った. Halo タグ付きの H-Ras または R-Ras を HeLa 細胞中に発現させ, それらを TMR (tetramethylrhodamine) で蛍光標識した. 蛍光輝度分布のヒストグラムはいくつかのガウス分布の和でフィットできる事から, 生細胞膜上においても Ras が二量体構造 (あるいは多量体構造) をとっている事が示された (図 1B).

Ras が脂質膜上に局在する為には, 翻訳後修飾により C 末のシステイン残基がファルネシル化およびパルミトイル化される必要がある<sup>2)</sup>, またこれにより Ras が膜上で多量体化できると考えられている. 近年, この脂質化が Ras の構造変化を引き起こす事<sup>3)</sup>, さらにこの構造変化と二量体化との関連性が議論されていることから, Ras の脂質化に伴う Ras の構造変化と Raf キナーゼとの相互作用との関連性を調べる事とした. しかしその過程で, 偶然にも次の様な興味深い発見をした. H-Ras の C 末システイン残基を, 疎水性のシステイン特異的反応性試薬 PAM (4-Phenylazomaleinaniil: フォロクロミック分子の一種で照射により可逆的に構造が変化する化合物) で修飾すると, H-Ras の二量体構造が促進された (多量体構造の存在も確認された) (図 2A, B).

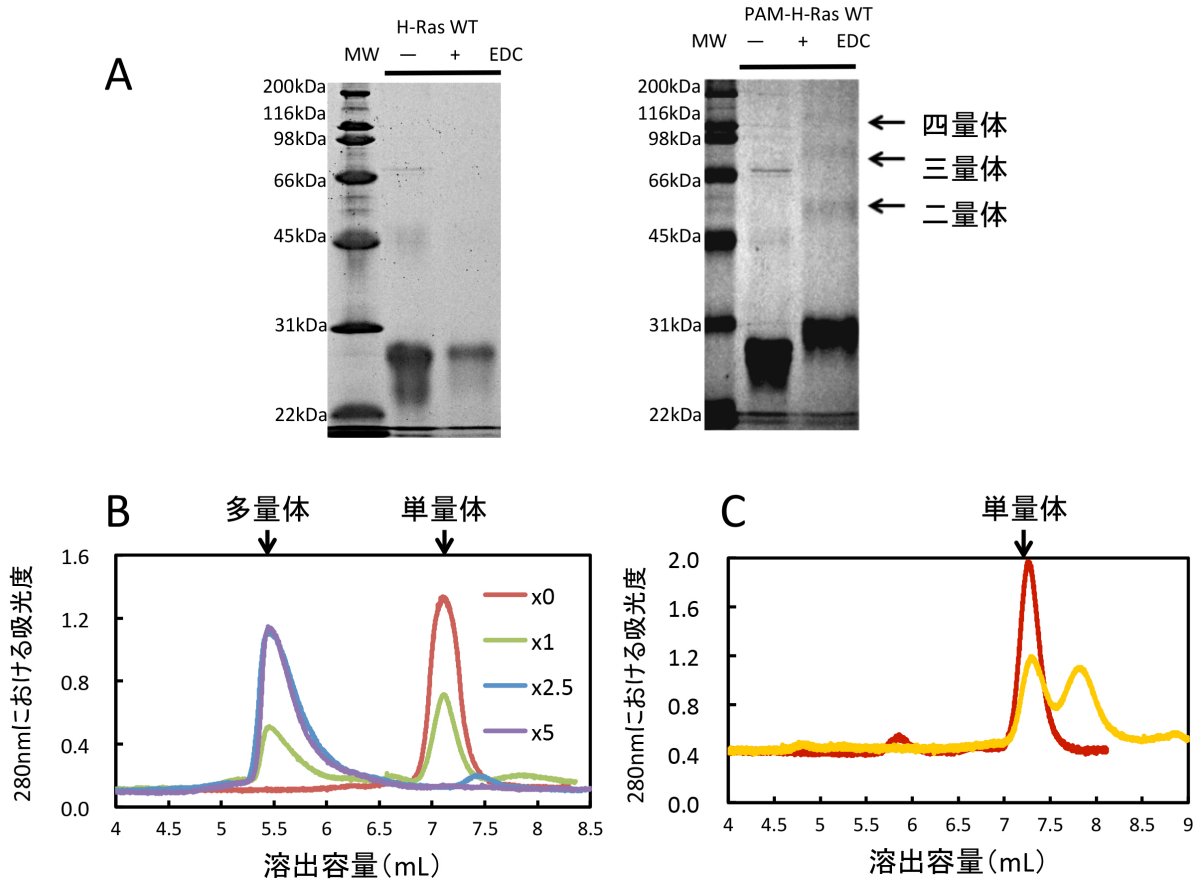


図2. PAM 修飾された H-Ras の単量体・多量体構造の検出.

A) PAM 修飾前の H-Ras に対する EDC 架橋実験 (左) と PAM 修飾後の H-Ras に対する EDC 架橋実験 (右). PAM 修飾前の H-Ras に架橋試薬と反応させても二量体構造の存在を示すバンドは検出されなかったが, 修飾後の H-Ras に作用させると二量体構造の存在を示すバンドが検出された. さらに三量体および四量体も検出された. B) ゲル濾過法による PAM 修飾 H-Ras の単量体・多量体の分離. 30 $\mu$ M の H-Ras に対し 30 $\mu$ M (X1), 75 $\mu$ M (X2.5), 150 $\mu$ M (X5) の PAM を反応させ, 反応停止後にゲル濾過カラムに展開した. 未反応の H-Ras (X0) では多量体のピークは検出されなかったが, PAM の濃度に依存して多量体画分のピークが増大した. なお使用したカラムでは二量体・三量体を分画する事はできない. C) C 末端 13 アミノ酸残基を削除した H-Ras に対する PAM 修飾後のゲル濾過溶出曲線 (黄色線) と未修飾の全長 H-Ras の溶出曲線 (赤線). C 末端側 13 アミノ酸残基には, 脂質化される 3 つのシステイン残基 (Cys181, Cys184, Cys186) が含まれている. これを削除した H-Ras に対し PAM 試薬を作用させても Ras は多量化しなかった.

全長 H-Ras にはシステイン残基が 6 個存在しているがこのうち 3 つは C 末領域に集中している (Cys181, Cys184, Cys186). PAM 修飾による Ras の二量体化は, どのシステイン残基が修飾されることで引き起こされるかを調べた.

C 末領域の 3 つのシステイン残基を全て除去した Ras を大腸菌の系を用いて調製し PAM で修飾した. その結果, PAM で修飾しても Ras が二量体構造をとらない事が明らかとなった (C 末領域以外のシステイン残基は修飾されている可能性はある) (図 2C). このことから Ras の C 末領域のいずれかあるいはそれら全てのシステイン残基が修飾されることで多量体化する事がわかった. さらに他の光反応性のシステイン特異的試薬 NBB (2-nitrobenzyl bromide: ケージド化合物の一種) によっても多量体構造が促進されたことから, この現象は PAM 修飾特異的なものではない事が明らかとなった (図 3A).

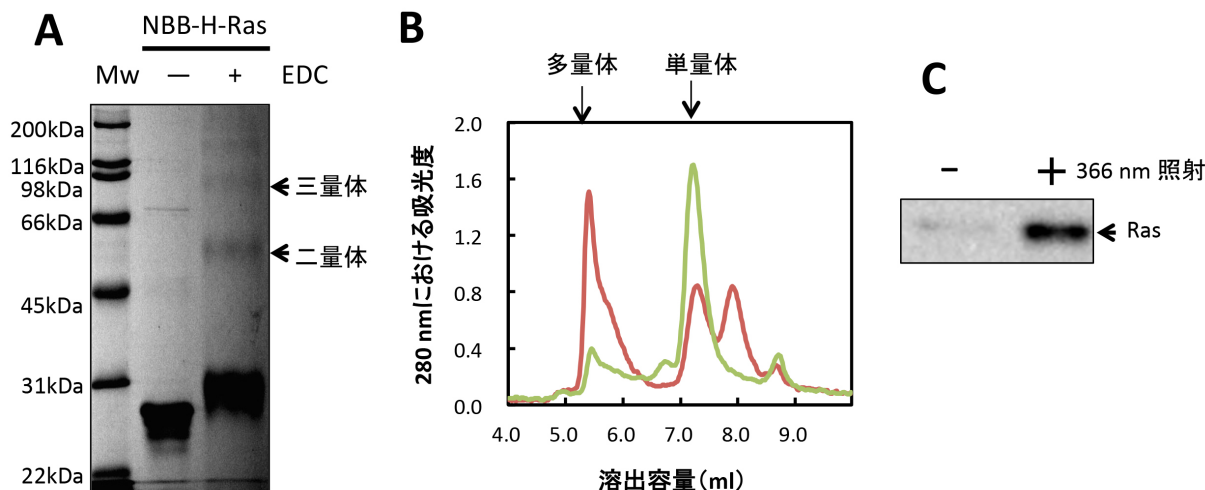


図3. NBB-H-Ras/Raf キナーゼ間相互作用の光制御.

A) NBB-H-Ras の多量体構造を化学架橋法によって検出した. NBB 修飾によっても PAM 修飾時と同様に多量体構造をとる事がわかった. B) NBB-H-Ras をゲル濾過カラムに展開したところ, 多量体の存在を示す溶出ピークが観察されたが (赤線), NBB-H-Ras に 366 nm の光を照射したサンプルではそのピークが減少していた (緑線). この事は光照射により Ras が多量体構造から単量体構造へと変化した事を示している. C) Raf キナーゼ (RBD) との相互作用を pull-down 法によって検出した. GST タグ付き RBD を NBB-H-Ras と混合し 366 nm の光を照射した. その後グルタチオンアガロースレジンを用いて GST-RBD を pull-down し, GST-RBD に結合した Ras をウエスタンブロッティング法によって検出した. 光照射によって Ras-RBD 間相互作用が強まっていた.

NBB で修飾した Ras に 366 nm の光を照射し, それに伴う単量体-多量体構造を調べた. その結果, NBB が Ras から解離することで二量体構造が解消され, 修飾前と同様の単量体構造へと変化する事が明らかとなった (図 3B). 単量体・二量体 (多量体) 構造を光で制御できたので, Raf キナーゼとの相互作用を pull-down assay により調べた. その結果, 366 nm の光照射により Ras と RBD との相互作用が予想に反し増加している事がわかった (図 3C). Raf キナーゼの Ras 結合には RBD の他に CRR も関与する事が先行研究により示されている. さらに CRR との相互作用には Ras の C 末領域における脂質化修飾が必要であると報告されている<sup>4)</sup>. したがって今後は, 光照射前後の NBB-Ras と CRR との相互作用, あるいは全長 Raf との相互作用も調べる必要がある.

今回, Ras と RBD との相互作用を光で制御する事ができた. 今後光照射により全長の Raf キナーゼと Ras との相互作用も制御する事ができれば, 細胞内情報伝達メカニズムの解明に向けた新たなツールとして利用できるものと期待される. さらには将来, 癌細胞に対する新たな治療法としても応用できる様になるかもしれない.

### 共同研究者

本研究は創価大学大学院工学研究科の丸田晋策教授, 同研究科の岩田聖悟氏との共同研究である. また本研究の遂行に当たりご支援頂いた上原記念生命科学財団に深くお礼申し上げます.

### 文献

- 1) Inouye, K., Mizutani, S., Koide, H. & Kaziro, Y. : Formation of the Ras dimer is essential for Raf-1 activation. *J. Biol. Chem.*, **275** : 3737-3740, 2000.
- 2) Eisenberg, S., Laude, A. J., Beckett, A. J., Mageean, C. J., Aran, V., Hernandez-Valladares, M., Henis, I. Y. & Prior, I. A. : The role of palmitoylation in regulating Ras localization and function. *Biochem. Soc. Trans.*, **41** : 79-83, 2013.
- 3) Thapar, R., Williams, J. G. & Campbell, S. L. : NMR Characterization of full-length farnesylated and non-farnesylated H-Ras and its implications for Raf activation. *J. Mol. Biol.*, **343** : 1391-1408, 2004.

- 4) Hu, C. D., Kariya, K., Tamada, M., Akasaka, K., Shirouzu, M., Yokoyama, S. & Kataoka, T. : Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras. *J. Biol. Chem.*, **270** : 30274-30277, 1995.