

情報伝達蛋白質 Ras, Raf1 相互作用のダイナミクスとキネティクス

大阪大学生命機能研究科ナノ生体科学 日比野佳代、佐甲靖志

人工的な情報処理回路と較べた細胞内情報処理回路の著しい特徴は、構成素子である蛋白質分子が単純な On/Off 2 状態でなく多状態を取り得ること、素子間の結合がゆるく各々の素子が常に細胞内を動的に動き回りながら相互作用すること、状態遷移や相互作用が確率的に起こること、細胞内構造・環境が不均一であるために素子の動きに連れて反応条件が様々に変わり得ることなどであろう。本稿では、細胞内で分子スイッチとして働くといわれる低分子量 GTPase Ras と、その相互作用相手（効果器: effector と呼ばれる）Raf1 の反応を例として、細胞内情報蛋白質間の反応ダイナミクスとキネティクスを見てゆく。

Ras と Raf1

Ras は低分子量 GTPase と呼ばれる一群の蛋白質のひとつであり、その名の通り GTP 加水分解酵素であるが、自律的な加水分解反応の回転は非常に遅く、GTP 結合時と GDP 結合時の構造の違いを利用して様々な分子との相互作用を On/Off し、それらの活性を制御するのが役割であると考えられている。C 端近くの修飾により、もっぱら細胞膜に局在している。GDP 結合時が不活性型 (effector と結合しない) GTP 結合時が活性型で、GDP/GTP の交換は GEF (Guanine nucleotide exchange factor) で加速され、GTPase 活性は GAP (GTPase activating protein) で加速されるという活性制御を受ける。(細胞内濃度は GTP が GDP よりも遙かに大きい。)

上皮成長因子 (EGF) 受容体の活性化は Ras の活性化を起こす反応のひとつである。細胞膜で活性化した受容体に細胞質から Grb2/Sos 複合体が結合してくる。Sos は Ras の GEF であり、Sos が膜に濃縮することによって Ras との衝突頻度が上がり Ras が活性化されると考えられている。細胞内で蛋白質局在を変化させて局所濃度を調節し、反応制御を行っている訳であり、細胞内分子ダイナミクスが生理的に重要であることを示す例と言える。

GTP 結合型 Ras (Ras-GTP) の効果器は多数存在するが、セリン・スレオニンリン酸化酵素 Raf1 はその一つである (図 1)。Raf1 は可溶性の蛋白質で通常細胞質に存在しているが、Ras-GTP が細胞膜に多数現れると、そこに結合するために細胞膜に局在変化する。Raf1 はそれ自身のセリン・チロシンリン酸化によって活性化される。その反応の詳細はいまだ明らかでないが、リン酸化酵素は細胞膜に存在すると言われており、ここでも局在変化による活性制御が行われている。Raf1 は MAPK カスケードの最初のリン酸化酵

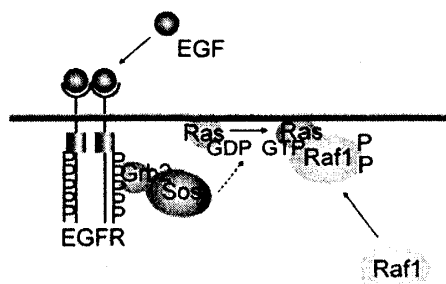


図 1 EGF から Raf1 への情報伝達経路
EGF 刺激により細胞膜の Ras が活性化されると、Raf1 の細胞質から細胞膜への局在変化が起こる。

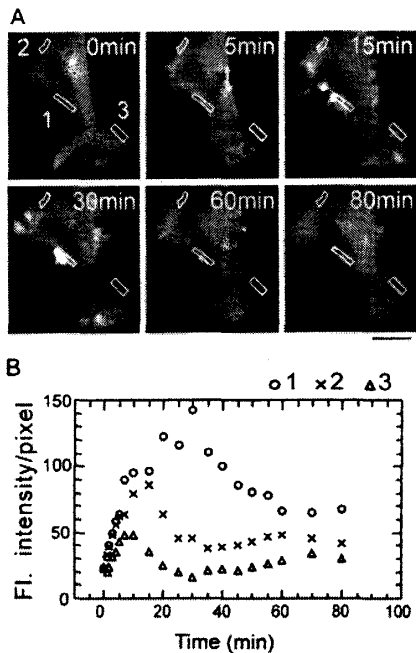


図2 Raf1の局在変化

A. GFP-Raf1の蛍光画像。EGF刺激後の時間を示す。
B. Aの細胞の1-3の細胞膜部位における蛍光強度変化。部位1からは15-30分の間、盛んに仮足が形成された。Aのスケールは10 μ m

し渡し数ミクロンの範囲で数カ所、さらに顕著な集積が見られるのに対し、他の細胞膜部位の Raf1 密度は減少していく。Raf1 の顕著な集積部位からは仮足の形成があり、一方で Raf1 が集積してこない部位は退縮する。

細胞骨格系の破壊により仮足形成を阻害しても、Raf1 の分布は不均一になる。従って、不均一分布は細胞の変形の結果ではなく、むしろ Ras の活性部位の偏りが細胞変形を誘導している可能性が高い。均一な入力刺激あるいは初期分布から、不均一な活性化部位の分布が形成されてくるメカニズムは不明である。

生化学実験で示されていたとおり、多数の細胞の平均で見ると 60 分後には Raf1 の多くは細胞質に戻っており、数%が細胞膜に残っているだけである。しかし、一部の細胞では少数の Raf1 が細胞膜局所に濃縮されており、濃縮部位では長期間にわたる細胞変形が観察される。YFP (GFP の変異体である黄色の蛍光蛋白質) -Ras と GFP-Raf1 の間の蛍光共鳴エネルギー移動の可視化実験から、どの時間帯においても、細胞膜上の Raf1 は Ras と直接相互作用することが分かった。

Ras, Raf1 の 1 分子動態

GFP, YFP で標識された Ras や Raf1 を、全反射蛍光顕微鏡を使って 1 分子観察すると、発現量の少ない細胞では (あるいは多くの分子が光褪色した後に) 細胞膜上を動き回る輝点を見ることができる (図 3)。多くの輝点の明るさは時間的に一定で、突然消失する。細胞をメタノール処理して蛋白質分子を細胞膜に固定すると輝点の運動は消失し、個々の輝点は 1 段 (まれに 2 段) の階段状

素であり、その活性化は細胞増殖や癌化に関係した新規遺伝子発現の誘導などを起こす。

生化学的な解析から、EGF で刺激された細胞は、数分後にピークを迎える一過性の Ras の活性化と Raf1 の細胞膜移行が起こし、数十分後には刺激前の状態に戻ると言われていた。

Raf1 の細胞内局在変化

Raf1 の細胞内局在変化を可視化するために、緑色蛍光蛋白質 (Green fluorescent protein, GFP) と Raf1 の融合遺伝子を作成し、細胞に発現させた。

細胞を EGF で刺激すると、数分後に細胞膜の広い範囲で GFP-Raf1 の密度上昇が起こる (図 2)。EGF は細胞全体にほぼ均一に結合し、Ras の活性化を表す Raf1 の局在変化も反応初期は細胞膜一面でほぼ同様に起こる。その後 Raf1 の集積部位の分布は不均一になり、差

し渡し数ミクロンの範囲で数カ所、さらに顕著な集積が見られるのに対し、他の細胞膜部位の Raf1 密度は減少していく。Raf1 の顕著な集積部位からは仮足の形成があり、一方で Raf1 が集積してこ

ない部位は退縮する。

細胞骨格系の破壊により仮足形成を阻害しても、Raf1 の分布は不均一になる。従って、不均一分布は細胞の変形の結果ではなく、むしろ Ras の活性部位の偏りが細胞変形を誘導している可能性が高い。均一な入力刺激あるいは初期分布から、不均一な活性化部位の分布が形成されてくるメカニズムは不明である。

生化学実験で示されていたとおり、多数の細胞の平均で見ると 60 分後には Raf1 の多くは細胞質に戻っており、数%が細胞膜に残っているだけである。しかし、一部の細胞では少数の Raf1 が細胞膜局所に濃縮されており、濃縮部位では長期間にわたる細胞変形が観察される。YFP (GFP の変異体である黄色の蛍光蛋白質) -Ras と GFP-Raf1 の間の蛍光共鳴エネルギー移動の可視化実験から、どの時間帯においても、細胞膜上の Raf1 は Ras と直接相互作用することが分かった。

Ras, Raf1 の 1 分子動態

GFP, YFP で標識された Ras や Raf1 を、全反射蛍光顕微鏡を使って 1 分子観察すると、発現量の少ない細胞では (あるいは多くの分子が光褪色した後に) 細胞膜上を動き回る輝点を見ることができる (図 3)。多くの輝点の明るさは時間的に一定で、突然消失する。細胞をメタノール処理して蛋白質分子を細胞膜に固定すると輝点の運動は消失し、個々の輝点は 1 段 (まれに 2 段) の階段状

に褪色する。階段の幅はほぼ一定しており、この幅が1分子の蛍光強度であると考えられる。生きている細胞で動き回っている輝点の蛍光強度もほぼ同様の値で、1分子のRas, Raf1であることがわかる。

Ras, Raf1とも輝点の運動は150msまでの短時間領域では自由拡散と見分けがつかず、拡散係数は $0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 程度である(図4)。この値は細胞膜蛋白質としては標準的なものであり、Rasが末端のイソプレニル化、パルミチル化で細胞膜の半分に埋まっているに過ぎないことを考えると、むしろ小さいとも言える。ただし、ほとんどの膜貫通蛋白質で見つかる不動成分は存在しない。また、Raf1の拡散運動がRasと同様であることは、Raf1がRasに結合して膜局在していることと矛盾しない。

もっと長い(秒以上)時間領域では、Ras, Raf1とも運動範囲に制限がある軌跡がしばしば見られる(図3)。これはRas活性化部位の空間情報を下流に伝えるのに一役買っているのかもしれない。もっとも、後で見るように、Ras/Raf1の一回の相互作用は1秒程度で終わるので、上の拡散係数では相互作用中にRaf1が遠くに行ってしまうことはないが、Rasの活性化部位を局在させるためには有効である。多分子平均としてみたRaf1の数 μm^2 に局在化した集積が、数10分も持続するのに対し(図2)、拡散領域に制限がなければRasは1,2分で集積部位の外側に出てしまうことになる。

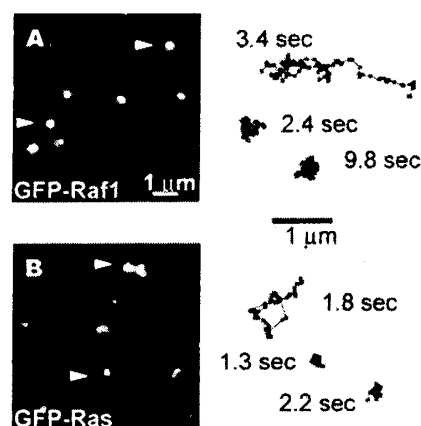


図3 Ras, Raf1の1分子動態
いずれもEGF添加後の画像(左)と運動軌跡の例(右)を示す。軌跡の横は観察時間。

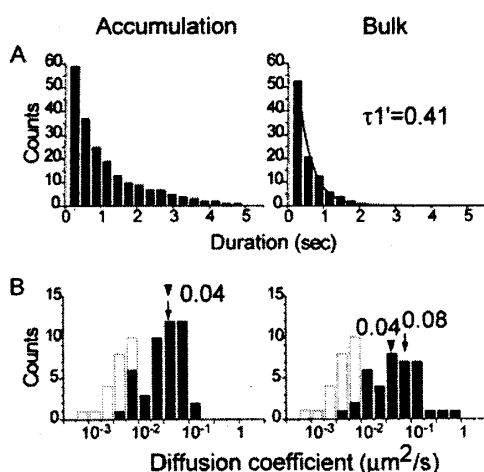


図4 Raf1の細胞膜滞在時間と拡散係数
GFP-Raf1の濃縮部位(Accumulation)とそれ以外(Bulk)における膜滞在時間(A)と拡散係数(B)。A. 線は指数関数近似の結果。時定数は光褪色の効果の補正後。B. 150ms間の平均自乗変位を直線近似して求めた拡散係数の分布。矢印、罫はそれぞれ平均値、中央値を示す。白抜きは基盤に固定された分子の見かけの拡散係数の分布。

Ras, Raf1の相互作用時間

GFP-Raf1の輝点は突然細胞膜上に現れ、突然消失する。消失までの膜滞在時間は同条件下におけるGFPの褪色の時定数9.6秒に較べて遙かに速く、ほとんどは膜からの解離によるものと考えられる。つまり、数十分にわたってRaf1が集積し続けているように見える部位でも、個々のRaf1分子は常に細胞質と細胞膜を循環しており、図2に見た長期的なRaf1の局在化は、動的な(準)定常状態として実現されていることがわかる。

個々のGFP-Raf1の膜滞在時間と拡散係数を、GFP-Raf1が特に集積している所とそれ以外の所で比較した(図4)。細胞膜滞在時間のヒスト

グラムを指数関数で近似すると、普通の細胞膜上では時定数 0.41 秒の 1 成分であったが、集積部においては、より長時間の結合が存在することがわかった（2 成分近似した見かけの時定数は 0.4 秒と 1.6 秒）。Raf1 の短期的拡散係数は集積部位とその他の膜上で、ともに平均 $0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、拡散係数と滞在時間間に相関は見られなかった。

Raf1 の構造変化

図 4 の実験は、EGF 添加後 30 分経過して Raf1 の不均一な集積がはっきりしてきた時点のものである。反応初期(1-5 分)において膜滞在時間を計測すると、一山型の分布に見える(図 5)。これは Raf1 と Ras の結合中に相互作用の変化があることを示唆している。

Raf1 は、Ras 結合ドメイン(Ras binding domain; RBD)と呼ばれる部位と Cystein rich domain (CRD) という部位の 2 カ所で Ras と相互作用すると考えられている。N 端側から RBD, CRD に続いてリン酸化酵素ドメインが存在する。RBD もしくは RBD-CRD に GFP を融合させて膜滞在時間を計測すると、RBD は指数関数、RBD-CRD は一山型の分布を示した(図 5)。Ras との相互作用変化には RBD と CRD 両方が関与するらしい。

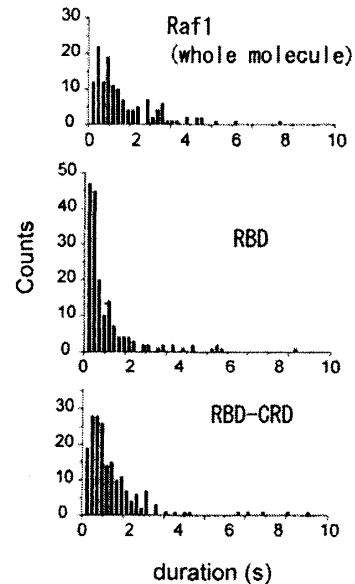


図 5 反応初期のRaf1, またRBD, RBD-CRDの膜滞在時間分布

驚いたことに RBD, RBD-CRD は細胞内ではどちらも Ras-GTP と Ras-GDP を見分けることができない。(細胞膜結合密度が EGF に依存しない。ちなみに生化学では見分けられることになっている。pull-down assay といってミクロンサイズのビーズに高密度に RBD や RBD-CRD を結合させ、試料と混合・沈澱させると、Ras-GTP は共沈するが GDP はしない。反応速度に密度依存性があるのだろうか。) EGF の有無に関わらず RBD は Ras 親和性(膜結合密度)が低く、RBD-CRD は高い。また、最近 Raf1 の酵素ドメインと RBD-CRD の相互作用で分子が開閉し、酵素活性が調節されるというモデルが提唱されている。全長の Raf1 は細胞内でも Ras-GTP と Ras-GDP を見分けることができるから、Ras-GTP の役割は単なる膜結合部位の供給ではなく、閉じた Raf1 を開くことかもしれない(図 6)。閉状態の Raf1 は Ras-GDP に結合しにくい、ひとたび開状態になって Ras-GTP に結合すれば、RBD-CRD でも相互作用変化が起こることから、その後の相互作用変化は Ras の GTP/GDP 状態には依存しないと思われる。

30 分後のヒストグラムにピークが見られなかった(図 4)のはどうしてだろう。図 4 は一山型と指数関数型のヒストグラムが重なったものであり、EGF 刺激後に蓄積してくるリン酸化型の Raf1 が指数関数型の解離曲線をもっているというのが我々の予想である。そうするとリン酸化型は RBD 類似の挙動を示しており、Ras に対する親和性は低いかもしれない。

Ras/Raf1 の情報伝達モデル

図6に我々の考えている Ras/Raf1 の情報伝達モデルを示す。このモデルはまだ予備的なものであることをお断りしておく。

不活性型の Raf1 は閉状態であり、Ras-GTP によって構造変化を誘発されて開状態1として RasGTP に結合する。その後、RBD と CRD の間で開状態2への構造変化が起こる。開状態全体として RasGT(D)P への親和性は高く結合時間は長い。結合中に未知のリン酸化酵素(X)によってリン酸化状態となり、

膜から解離する。X は細胞膜に存在すると考えられているが、構造変化を見分けるのであれば可溶性であっても良い。膜に来ればなんでもリン酸化するというよりも、構造をきちんと見分ける方が反応制御の精度は上がるだろう。RasGTP は閉状態から開状態1への構造変化を加速することによって、Raf1 と X の相互作用を制御していることになる。RBD-CRD は開状態1, 2に擬態していると考えられる。

Raf1 のリン酸化状態は活性化型であり、MEK などの標的分子をリン酸化する。リン酸化状態と RasGT(D)P の親和性は低く、解離は速い。これは、リン酸化状態が開状態の活性化に対する拮抗阻害を行う可能性を低くしており、細胞全体での Raf1 の活性化効率を上げるために合目的である。RBD はリン酸化状態に擬態している。脱リン酸化された Raf1 は閉状態に戻る。

全体として、Raf1 は、閉→開1→開2→リン酸化→(閉)というサイクルを回っていることになり、RasGTP と Raf1 の結合解離平衡の調節という従来の?モデルとは全く異なっている。サイクルを回すエネルギーは Ras の GTP 加水分解もしくは Raf1 のリン酸化にともなう ATP の加水分解、あるいはその両者から供給されると考えられる。サイクルを回すだけなら開状態が2種存在する必然性はないので、Ras への結合によるスイッチの他に、構造変化がもう一つのスイッチとして、間違っただけのリン酸化を防ぐために機能しているのかもしれない。

以上まだ想像の段階を出ないが、Ras, Raf1 の多状態性を利用した情報伝達の制御機構が見え始めているのではないかと思う。今後様々な検証実験が必要である。

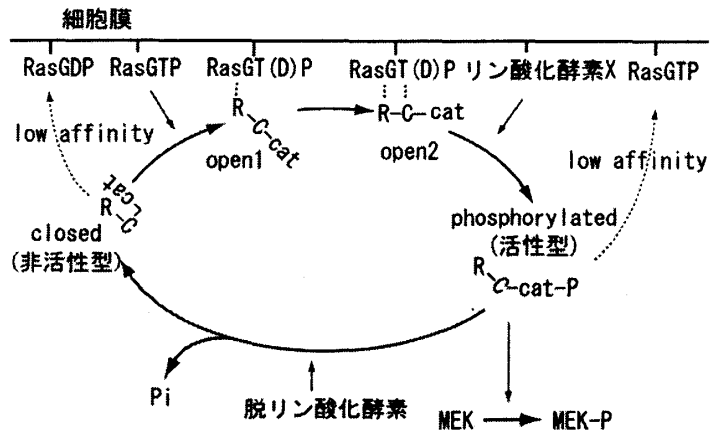


図6 Raf1の活性化サイクルモデル
R, C, catはそれぞれRBD, CRD, catalytic domainを、Piはリン酸化を示す。実際にはRaf1のリン酸化部位は多数存在する。

Rasの動的多型性

図2に示したRaf1の局所的集積、図4の膜滞在時間と図6のモデルを合わせてみると、EGF刺激数十分後には、Ras-GTPはRaf1集積部位に多く局在し、外側はほとんどGDP型であるように思われる。しかし、実際はそんなに単純ではないかもしれない。たとえばRaf1刺激30分後、長い結合はすでに集積部位にしか見られないが(図4)、集積部位の外側でもRaf1の密度は刺激前より依然として上昇している。これは、外側がすべてRas-GDPだとしても、Ras-GDPに対して、リン酸化状態のRaf1が閉状態よりも大きな親和性を持っているとすれば定性的には説明できるのだが、もっと危うい(魅力的な)仮説もある。

横山らはNMRのデータにもとづき、Ras-GTPにはいくつかの準安定な構造の間をゆっくり遷移しているという説(動的多型説)を唱えている。彼らはさらに、Ras-GTPが異なった構造を利用して、異なった効果器を見分けているのではないかと想像している(図7)。動的多型をうまく利用すれば、様々な反応特異性を生み出すことができるかもしれない。Rasに限らず、色々な蛋白質が秒オーダーで遷移する複数の状態を持っているらしいことは、1分子計測からも示唆されている。

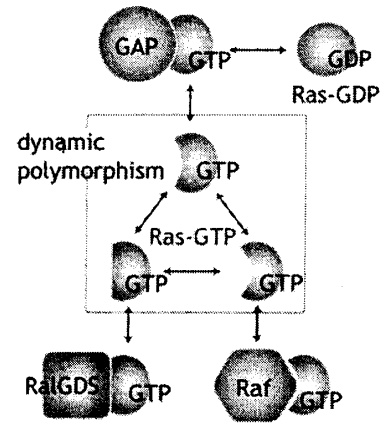


図7 Rasの動的多型性仮説

Ras-GTPに多型性があり、各々がRaf1と異なった相互作用をするとすれば、どうであろうか。たとえばRaf1の濃縮部位にはある構造のRas-GTPが(理由は分からないが)局在していて、その構造に対しては図6のような相互作用が起こるが、外側のRas-GTPは違う構造で、Raf1(閉状態)はこの構造に結合はするが、開状態1から2への構造変化が抑制され、そのためにRBDと同様の速度で解離するという可能性が考えられる。この場合Ras-GTPの多型性が反応の空間制御に使われていることになる。

いずれにせよ、どうしてRas-GTPなり、特定の準安定構造のRas-GTPなりが、細胞膜のある部位に局在してくるかという問題があるのだが、全く未解決である。

Rasの活性は共にEGFで活性化されるGEFとGAPで正・負に調節されているが、EGF受容体の多くはEGF結合後数分の時定数で細胞に取り込まれて分解されてしまう。数十分もRasの活性化が続く理由は明らかでない。最近Sosが、GTP/GDP交換に使うのとは別の相互作用面でRas-GTPと結合するとGEF活性が上昇するという説が発表された。反対にRaf1の下流(MAPK)からSosへのおそらく大域的な不活性化経路もある。Rasの拡散運動範囲は制限されている。うまいモデルがあるだろうか？