

氏 名	施 樹 良
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2792 号
学位授与の日付	平 成 16 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Rap1 mutants with increased affinity for the guanine - nucleotide exchange factor C3G (グアニンヌクレオチド交換因子 C3G に対して強い結合活性を示す Rap1 変異体)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 章 教 授 湊 長 博 教 授 武 藤 誠

論 文 内 容 の 要 旨

低分子量 G タンパク質をコードする Rap1 遺伝子は、がん遺伝子 K-Ras によるトランスフォーメーション活性を抑制する因子として最初に同定された。最近の研究により、Rap1 はいろいろな細胞外刺激により活性化されること、また、PC12 細胞における分化、リンパ系細胞における細胞の極性化、インテグリンを介する細胞接着や運動など様々なシグナル伝達経路上で重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。Rap1 の不活性化型である GDP 結合型から活性化型である GTP 結合型への移行はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) により行われる。GEF の 1 つである C3G はその N 末端側に Crk 結合領域、C 末端側に触媒領域 (CDC25 相同領域) を持ち Rap1 の活性化を促進する。C3G ノックアウトマウスは胎生致死形質を示すことから、C3G-Rap1 シグナル伝達経路はマウス発生においても重要な役割を演じていると考えられる。Rap1 上流には多くの GEF が存在するため、C3G-Rap1 経路の細胞内での働きを解明するための 1 つの方法として、C3G-Rap1 経路を特異的に阻害する分子を探索し利用することが考えられる。

そこで、本研究では、C3G の触媒領域に強く結合し、その機能を阻害する Rap1 変異体を作製することを目的として研究を行った。最初に、Rap1 cDNA にランダムな変異を導入した Rap1 変異体ライブラリーを作製後、C3G 触媒領域を bait として酵母 two-hybrid 法を用いて C3G の触媒領域に結合する変異体をスクリーニングした。得られた 13 個の Rap1 変異体の置換されたアミノ酸残基のパターンに基づき、より強い結合能力を示す Rap1 変異体の作製を試みたところ、Rap1-17A/29G/117E 変異体 (Rap1-AGE) が得られた。そこで Rap1-AGE の性質を明らかにすべく研究を進め、以下の知見を得た。

- 1) 酵母 two-hybrid 法を用いて、Rap1-AGE と C3G 以外の GEF との結合活性を調べたところ、Epac, smgGDS, PLC ϵ などの触媒領域との結合は検出されなかった。
- 2) 培養細胞内での結合を免疫共沈降法により検討したところ、Rap1-AGE は C3G 触媒領域のみならず、全長 C3G とも結合することがわかった。
- 3) C3G の触媒活性に対する Rap1-AGE の影響を調べるために、C3G-CAAX (活性化型 C3G) を発現する HEK293 細胞に Rap1-AGE を導入すると、C3G-CAAX による内在性 Rap1 の活性化が抑制された。しかし、他の GEF の触媒活性は阻害しなかった。
- 4) C3G-CAAX を HEK293 細胞に導入し、コラーゲンコートしたディッシュにプレーティングすると、細胞の spreading が観察されるが、この際 Rap1-AGE を共発現させると、細胞の spreading は抑制された。
- 5) HEK293 細胞ではイソプロテレノールを加えることにより Rap1 が活性化されることが知られているが、この系に Rap1-AGE を導入すると、内在性 Rap1 の活性化が抑制された。

以上のことから、Rap1-AGE 変異体は、選択的に C3G に結合し、C3G の活性を抑制することが明らかとなり、今後 C3G-Rap1 シグナル伝達経路の機能を研究する上で有用と考えられた。

論文審査の結果の要旨

がん遺伝子 *v-K-ras* によるトランスフォーメーションを抑制する因子として同定された低分子量 G タンパク質 Rap1 は、C3G を含む幾つかのグアニンヌクレオチド交換因子によって活性化され、細胞接着など様々な細胞機能に関与することが示されている。C3G-Rap1 経路は、マウス発生においても重要な役割を演じていることが C3G ノックアウトマウスの致死的な形質から示唆されたが、細胞レベルでの機能についてはまだ不明の点も多い。

申請者らは C3G の触媒領域に強く結合し、その機能を阻害する一連の Rap1 変異体を、low fidelity PCR と yeast two hybrid screening を組み合わせた新たな手法を用いて単離した。最も結合活性の強い変異体 Rap1-AGE は、培養細胞内から C3G と共免疫沈降され、活性化 C3G (C3G-CAAX) による Rap1 の活性化を阻害するが、他の 2 種の GEF による Rap1 の活性化は阻害しなかった。また、活性化 C3G による細胞 spreading 誘導を阻害するという生物活性も示された。

以上の研究は、Rap1-AGE が C3G 選択的な dominant negative 変異体として、C3G-Rap1 経路の機能解明に役立つ可能性を示すと共に、新たな機能阻害変異タンパク質の単離法を提示したものであり、分子細胞生物学の今後の発展に寄与するところが大きい。

したがって、本研究は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年10月12日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。