

氏名	鬼 頭 稻 穂
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第138号
学位授与の日付	平成7年3月23日
学位授与の要件	生命科学研究科 遺伝学専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	分裂酵母 ras蛋白質の生化学的解析及び ras蛋白質の 翻訳後修飾に関する酵素の生化学的解析
論文審査委員	主 査 教 授 桂 勲 教 授 石 濱 明 教 授 堀 内 賢 介 助教授 嶋 本 伸 雄 教 授 山 本 正 幸（東京大学）

## 論文内容の要旨

*ras*癌遺伝子産物 (*ras*蛋白質) は、GTP加水分解活性を持つGTP結合蛋白質であり、シグナル伝達に重要な役割を担っている。*ras*蛋白質はGTPと結合することで活性化し、GTPの加水分解の結果、不活性なGDP結合型となると考えられている。*ras*蛋白質がシグナル分子として機能するためには、(1)C末端から4番目のシステイン残基のファルネシル化、(2)C末端の3つのアミノ酸残基の除去、(3)新たにC末端となったファルネシルシステインのメチルエステル化、(4)部位は同定されていないがパルミチル化 (哺乳類*K-ras*等、分子種によってはパルミチル化を受けないものも存在する) の4段階の翻訳後修飾を受け、形質膜に局在化しなければならない。これらの翻訳後修飾の各反応は同定されているものの、反応を触媒する酵素・反応の詳細・修飾基の機能については未だ解明されていない。

*ras*蛋白質に付加されるファルネシルは、イソプレノイドと呼ばれる化合物の1種である。蛋白質に付加されたイソプレニル基は、蛋白質の細胞内局在化・蛋白質の相互作用に重要な役割を担うと考えられている。現時点で、哺乳類及び出芽酵母より*ras*蛋白質のファルネシル化を触媒する酵素 (ファルネシル基転移酵素; Ras proteins prenyl transferase; EC2.5.1.-) が、1種類ずつ精製され解析されている。これらの酵素はいずれも分子量90,000ダルトンで、分子量45,000-50,000ダルトンの2種類のサブユニットから構成されている。また、これらはC末端アミノ酸をロイシンに置換した変異型基質蛋白質と反応しないことが示されている。しかしながら、変異型基質のファルネシル化も報告されており、ファルネシル基転移酵素の基質認識機構には疑問が残っている。

筆者は、*ras*蛋白質ファルネシル化反応機構の解明を目的として、ファルネシル基転移酵素の精製と性状解析を行った。*ras*蛋白質がMAP kinaseカスケード系の活性化に関与している点で多細胞真核生物との類似性が高く、遺伝学的手法を用いることが可能であるという利点から、分裂酵母を実験材料として用いた。

ファルネシル基転移酵素の解析に先立ち、分裂酵母*Ras1*蛋白質の翻訳後修飾を確認した。分裂酵母細胞内で*Ras1*蛋白質を大量発現させ、 $[^3\text{H}]$ -メバロン酸及び $[^3\text{H}]$ -パルミチン酸にて代謝標識した結果、これらの化合物の*Ras1*蛋白質への取り込みが認められた。代謝標識した際メバロン酸はイソプレノイドに代謝されて蛋白質に取り込まれることから、*Ras1*蛋白質に取り込まれたメバロン酸由来の放射能はイソプレノイドであると結論した。以上の結果から、*Ras1*蛋白質は他の生物種の*ras*蛋白質と同様イソプレニル基の付加・パルミチン酸付加を受けることが明らかとなった。

代謝標識実験より*Ras1*蛋白質のイソプレニル基付加が確認できたことから、ファルネシル基転移酵素の解析を開始したが、筆者が研究を始めた時点では酵素の活性測定法が確立されていなかった。そこで種々の測定法について検討し、ビオチン化基質とアビジン結合アガロースを用いた高感度な活性測定法を確立し、この方法を用いてファルネシル基転移酵素の解析を進めた。

まず、分裂酵母の生活環におけるファルネシル基転移酵素活性の変動を調べた。栄養増殖期・窒素飢餓状態にある各種接合型の分裂酵母細胞において酵素活性を測定した結果、培養条件・接合型の違いによる酵素活性の差は認められなかった。

*In vivo*においてファルネシル化を受ける蛋白質は*ras*蛋白質以外に数種存在し、それらの間には構造的・機能的な類似点のないことが知られている。そこで次の実験として、ファルネシル基転移酵素が複数存在する可能性について検討した。各種基質蛋白質のC末端10 merに相当するペプチドを合成し、これらを基質としてファルネシル基転移酵素活性測定を行った結果、各基質に特異的な酵素活性を認めた。

これらのうち*Ras1*ペプチドに反応性を示す酵素のうちの1種について、ゲル濾過により分子量を測定したところ130,000ダルトンであった。また、精製の過程でファルネシル基転移酵素と挙動を共にする数種の蛋白質が認められた。これらの蛋白質とファルネシル基転移酵素を分離すると数日以内に酵素活性は失活した。

さらに、*Ras1*ペプチドに反応性を示す2種類のファルネシル基転移酵素について、精製を進め基質特異性を調べた。基質として、*Ras1*ペプチド及びC末端アミノ酸をロイシンに置換したLeu-*Ras1*ペプチドを用いた。また、我々の研究グループにおいて、分裂酵母粗抽出液を酵素溶液として用いた際に出芽酵母*RAS2*蛋白質に対して強い反応性が認められたことから、前述の2種類のペプチドに加え、*RAS2*ペプチドに対する反応性についても同様に調べた。その結果、いずれの酵素溶液においても変異型基質に対する反応性は正常型基質とほぼ同程度であることが明らかとなった。一方、これらの酵素は*RAS2*ペプチドに対し異なる反応性を示した。一方の酵素は*RAS2*ペプチドに対して*Ras1*ペプチドよりも強く反応したが、他方は*Ras1*ペプチドと同程度の反応性であった。

筆者が行った研究から明らかになった事項は以下の4点である。1) 分裂酵母生活環におけるファルネシル基転移酵素活性の変動は認められない。2) 分裂酵母は複数のファルネシル基転移酵素活性を保持している。3) 分裂酵母ファルネシル基転移酵素の分子量は現時点で解析されている他の生物種のものよりも大きい。4) 哺乳類・出芽酵母の相同蛋白質とは異なり、分裂酵母ファルネシル基転移酵素はC末端にロイシン残基をもつ変異型基質蛋白質に対して正常型基質と同程度に反応する。

これらの結果より、分裂酵母において*Ras1*蛋白質は恒常的にファルネシル化されると考えられる。また、精製の過程でファルネシル基転移酵素と挙動を共にする蛋白質は、ファルネシル基転移酵素の安定性または反応性に関与している可能性が考えられる。さらに、哺乳類・出芽酵母においては、イソプレニル化される蛋白質の中でC末端アミノ酸にロイシンを持つものはゲラニルゲラニル基が、ロイシン以外のアミノ酸を持つものはファルネシル基が付加されると考えられてきた。しかし、筆者の得た結果は、分裂酵母ファルネシル基転移酵素が基質蛋白質のC末端アミノ酸のみを認識するのではないことを示している。この結果は、分裂酵母ファルネシル基転移酵素の基質認識機構が他の生物種の酵素よりも厳密であるか、または、基質蛋白質のC末端アミノ酸認識を制御する因子が存在することを示唆すると筆者は考えている。

## 論文の審査結果の要旨

rasタンパク質はGTP加水分解活性をもつGTP/GDP結合タンパク質で、シグナル伝達に重要な役割を果している。鬼頭稲穂さんは、分裂酵母を材料として使い、rasタンパク質の翻訳後修飾に関する酵素、特にC末端から4番目のシステイン残基をファルネシル化する酵素(FTase)について研究した。rasタンパク質は細胞膜に結合して機能するため、この結合に関係する種々の翻訳後修飾、特にその最初のステップであるファルネシル化は生物学的に重要な意味を持つと考えられる。

博士論文で鬼頭さんは、(1)分裂酵母でもrasタンパク質はイソプレニル基の付加とパルミチン酸の付加という翻訳後修飾をうけることを示した。また、合成ペプチドを基質とするFTase活性測定法を開発し、(2)分裂酵母は基質特異性の異なる種々のFTaseをもつこと、(3)rasタンパク質に対するFTase活性は、培養時の窒素源枯渇や細胞の接合型にあまり依存しないこと、(4)それは少なくとも2種類あって、どちらもゲラニルゲラニル化酵素とは異なること、(5)分裂酵母rasタンパク質のC末端側10残基に相当するペプチドだけでなく、そのC末端をLeuに変えたペプチドもファルネシル化することを発見した。rasのC末端がLeuだとファルネシル化ではなくゲラニルゲラニル化を受けることが知られているので、この結果は、rasのファルネシル化の特異性がC末端以外の部分にもよることを示している。

精製が進むと酵素が不安定になることからFTaseの完全精製には至らなかったが、本論文は分裂酵母のrasおよび翻訳後修飾の基礎に関して一定の寄与をしたと判断し、博士論文に値すると結論した。

公開発表およびそれに続く質疑応答から、鬼頭さんは専門分野の知識とその理解に関して、博士の学位を得るのに十分なものと審査委員会は結論した。英語の実力に関しては、現在、鬼頭さんが書いている英語の投稿論文の草稿を審査委員全員が読んだ結果、十分なものと判断した。