

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 : A CalDAG-GEFI/Rap1/B-Raf cassette couples M₁ muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2

和訳 : M₁ ムスカリン性アセチルコリン受容体による ERK 1 / 2 の活性化における CalDAG-GEFI/Rap1//B-Raf 複合体の役割

指導教官 : デビッド サーフエン 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

氏名 : 郭 非凡

概要

本論文では、ムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)の M₁ サブタイプと Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK)1/2 を結び付ける、新しい細胞内伝達経路について述べる。PC12D 細胞を用いた実験より、M₁ mAChR の刺激による ERK1/2 の活性化は、グアニンヌクレオチド交換因子である CalDAG-GEFI、低分子量 GTP 結合タンパク質である Rap1 とセリナーレオニンキナーゼである B-Raf からなる複合体を介して起こることを初めて明らかにすることができた。この事実より内在性の CalDAG GEFI の機能についての最初の知見を得ることができた。

序論

M₁ mAChR が制御する細胞内シグナル伝達経路を調べるために、私が所属する実験室では PC12D 細胞を用いて実験を行っている。PC12D 細胞は、

広く研究されている PC12 細胞の亜種で、mAChR の M_4 サブタイプだけを発現する親株と違って mAChR の M_1 と M_4 の両サブタイプを発現する。PC12D 細胞をアセチルコリンのアナログであるカルバコール(carbachol)で処理すると、 M_1 mAChR を介して前初期遺伝子である *zif268* (*egr-1*, *NGF1-A*, *krox-24*) の発現が誘導されることは、以前の研究より明らかになっていた。更に、その発現誘導には細胞外の Ca^{2+} の流入、PKC の活性化および ERK1/2 の活性化が必要であることも分かっていた。しかし、PC12D 細胞においては、 Ca^{2+} の流入と PKC の活性化と、それらの下流で機能する ERK1/2 の活性化を結び付ける経路は未だ明らかにされていなかった。

ERK1/2 の活性化に関する研究の中で、成長因子の刺激による ERK1/2 の活性化機構の解析が一番進んでいる。多くの細胞と体内組織では、成長因子の刺激後、最初に Ras が活性化され、その結果、Raf1, MEK, ERK1/2 からなるキナーゼカスケードが活性化されることが、およそ 10 年前からの研究より明らかになっている。一方、最近の研究より、B-Raf を発現する細胞では、成長因子の刺激後、Ras の代わりに Rap1 が活性化され、その結果、B-Raf, MEK, ERK1/2 が順々に活性化されることを示唆するデータが得られている。例えば、PC12 細胞では、神経成長因子(NGF)の処理による、ERK1/2 の持続的な活性化に Rap1 と B-Raf が必要である報告がある。しかし、Ras に高い相同性を持つ Rap1 は、もともと Ras を阻害するタンパク質として同定されたことや、細胞によって Rap1 による B-Raf の活性化が観察されない事実などからは、ERK1/2 の活性化における Rap1 の役割に関して議論の余地がある。

最近、特定のシグナルに応答し、Rap1 を活性化する GEF がいくつか発見された。これらの中で、 Ca^{2+} と DAG の結合部位をもつ CalDAG-GEFI が我々の興味を引いた。 Ca^{2+} と DAG の結合により活性化される CalDAG-GEFI は、 M_1 mAChR の活性化により産生される IP_3 や DAG と、ERK1/2 の活性化をリンクするための有力な候補と思われたからである。(PC12D 細胞では、 IP_3 が産生されると細胞内 Ca^{2+} ストアが枯渇し、その結果で細胞外からの Ca^{2+} 流入が促進されることが以前に分かっていた。)しかし、現在までは、細胞内シグナル伝達における CalDAG-GEFI の役割についての報告はなかった。それで、私は、PC12D 細胞での M_1 mAChR による ERK1/2 の活性化に、CalDAG-GEFI

が機能するかどうかを調べることを本研究の目的とした。

方法

dominant-negative(dn) Rap1 の発現ベクターを作るために、site-directed mutagenesis 法を用いて、マウス由来の野生型 Rap1 の 17 セリンをアスパラギンに変えることにより作製し、それを Stratagene 社の LacSwitch ベクターの [(isopropyl thiogalactoside (IPTG)で誘導可能] lac プロモーターの下流に組み込んだ。そのベクターを、dexamethasone の前処理により dn Ras の発現を誘導することができる PC12D-37 株に安定した形で導入することにより、dn Ras または、dn Rap1 を選択的に発現させることができる PC12D-37-19 を作製した。

マウス CalDAG-GEFI に基づいたプライマーと PC12D 細胞の RNA を用いて PCR 産物を増やし、それをクローニングした後、その全長の DNA シーケンスを確かめた。そのシーケンスをもとにラット CalDAG-GEFI のアミノ酸の配列を同定した。次、ラット CalDAG-GEFI の C 末端の最後の 18-アミノ酸を含んでいる 20 残基のアミノ酸オリゴペプチド(592-GCIREEEVQV-EDGVFDIHL-609)を抗原としてウサギに注射し、CalDAG-GEFI に対する抗体を作製した。抗原ペプチドでアフィニティー精製をした抗体を用いて PC12D 細胞およびラット脳での CalDAG-GEFI の発現を検出した。また、同抗体を免疫沈降実験にも使用した。

結果と考察

PC12D 細胞をカルバコールで処理すると、ERK1/2 が速やかに活性化されることを anti-phospho-ERK1/2 抗体を用いて、ウェスタンブロット法で確認した。ERK1/2 の活性化は、mAChR の拮抗薬であるアトロピン (atropine) または、MEK の阻害剤である PD098059 と U0126 の前処理により抑制された。これらの結果から、カルバコールによる ERK1/2 の活性化は、mAChR と MEK を介して起こることを確認することができた。

PC12D-37-19 細胞を用いた実験より、カルバコール刺激による ERK1/2 の活性化は、主に Rap1 依存性の細胞内シグナル伝達経路を介して起

ることが明らかになった。一方、NGF 刺激による ERK1/2 の活性化は、主に Ras 依存性の経路を介して起こした。GTP-Ras と選択的に結合する GST-Raf-RBD と、GTP-Rap1 と選択的に結合する GST-RalGDS-RBD を用いた実験より、カルバコールは、Rap1 を比較的強く活性化することと、NGF は Ras を比較的強く活性化することが分かった。なお、GST-Raf-RBD と GST-RalGDS-RBD を用いることにより、dnRas は主に Ras の活性化を抑制することと、dnRap1 は主に Rap1 の活性化を抑制することを確かめることもできた。

NGF 受容体キナーゼの阻害剤である K252a と上皮増殖因子(EGF)受容体キナーゼの阻害剤である AG1478 を用いた実験より、カルバコール刺激による Rap1 の活性化は、NGF や EGF 受容体キナーゼに非依存的であることを確認した。また、Ca²⁺をキレートする EGTA と C-キナーゼの阻害剤である GF109203X の前処理によりカルバコール刺激による Rap1 の活性化は、主に Ca²⁺の流入に依存することが分かった。

カルバコールによる Rap1 の活性化の機構を明らかにするため、CalDAG-GEFI が Rap1 の上流で機能するかどうか調べた。まず、RT-PCR 法と DNA シークエンシング法を用いて、PC12D-37-19 細胞では、CalDAG-GEFI の mRNA が発現していることを確認した。次に CalDAG-GEFI の C 末端を認識する抗体を用いて、PC12D-37-19 細胞での CalDAG-GEFI の発現も確かめた。CalDAG-GEFI がカルバコールの刺激に対して応答するかどうかを調べるため、免疫沈降実験を行った。その結果、細胞をカルバコールで処理すると、CalDAG-GEFI、Rap1 と B-Raf を含む複合体が形成されることが分かった。MEK を基質とするキナーゼアッセイを行うことにより、その複合体に入っている B-Raf が活性型であることも確認することができた。

カルバコールによる B-Raf の活性化には、CalDAG-GEFI が必要であるかどうかを調べるため、PC12D-37-19 細胞に CalDAG-GEFI のアンチセンス RNA を発現させ、HA 抗原のタグが付いている B-Raf の活性化への効果を検討した。その結果、カルバコールによる B-Raf の活性化は、アンチセンス RNA の発現により部分的に抑制されることが判明した。同様な実験により、カルバコール刺激による複合体の形成も、CalDAG-GEFI のアンチセンス RNA

の発現により部分的に抑制された。これらの実験結果から、CalDAG-GEFIは、カルバコール刺激による ERK1/2 の活性化に機能することが明らかになった。

結論

PC12D 細胞においては、M₁ mAChR による ERK1/2 の活性化は、CalDAG GEF1/Rap1/B-Raf からなる複合体を介して起こることが、本研究により始めて明らかにされた。この結果より、B-Raf を発現する細胞や体内組織では、他の G タンパク質共役型受容体も CalDAG-GEFI と Rap1 を介して ERK1/2 を活性化することも十分考えられる。その可能性を調べるのは、今度の研究の課題の一つにしたいと思っている。