OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	いつ，どこで？：生きている細胞内の蛋白質活性が見えた!
Author(s)	黒川，量雄
Citation	癌と人. 2003, 30, p. 34-35
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/23756
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

いつ，どこで？　—生きている細胞内の蛋白質活性が見えた！

黒　川　量　雄*

我々の体を構成している細胞たったひとつのなかで，数万もの蛋白質をはじめとする分子群が秩序を保ち，相互に関係しながらそれぞれの役割を果たしています。癌は，癌遺伝子産物などの細胞増殖に関わる分子群がその秩序を失うことによって引き起こされます。過去数十年にわたって細胞内の複雑な分子群の役割，そしてそれら分子群の相互作用の研究が精力的に行われてきました。その牽引車となってきたのがほかならぬ癌遺伝子産物の研究でありました。癌遺伝子の研究は，Rous Sarcoma virus発見にはじまる癌ウィルスハンターの時代，1978年のSrc遺伝子発見を転機とする癌遺伝子ハンターの時代，そしてSH2ドメイン（多くの蛋白質に保存されている領域）-リン酸化チロシンの結合の発見を転機とする癌遺伝子産物間の相互作用の時代と続き，現在は個々の癌遺伝子産物という点と点が多くの線として結ばれた時代であります。そして今もなお新たな相互作用の研究が精力的に進められています。このようにして細胞内分子群に関する膨大な量の情報が蓄積されてきましたが，そのほとんどは生化学的な手法によって細胞をすりつぶした溶液を使って得られた情報か，あるいは固定した標本を使ってそれらの分子の局在を観察した情報でありました。従って，生きた細胞の中で「いつ，どこで，癌遺伝子産物が活性化し相互作用しているのか？」という疑問にはほとんど答えることが出来ませんでした。ひとつのチューブのなかで，あるいは固定された細胞の中で癌遺伝子産物の点と線は複雑に絡み合ったままなのです。

私たちの研究室では数年前よりこの重要な問題に答えるため，そして絡み合った点と線を解きほぐしていくための細胞内分子の時空間情報を得る研究を開始いたしました。では，どのような方法によって生きた細胞の中のいつ，どこで，蛋白質が活性化し，相互作用しているかを調べられるのでしょうか？その方法のひとつにFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を利用した蛍光プローブ-FRETモニター分子-が挙げられます。FRETはある2つの蛍光物質A，Bが極近傍に存在したとき，A（エネルギー供与体—ドナー）を励起するとその物質の蛍光エネルギーがB（エネルギー受容体—アクセプター）に無放射遷移してBから蛍光が生じる現象です。この現象をうまく利用すると蛋白質構造変化，蛋白質間相互作用を解析することができます。私たちは緑色蛍光蛋白質（GFP）の2つの変異体

(CFP, YFP)をそれぞれドナー，アクセプターとして用いて細胞内情報伝達の鍵である低分子量G蛋白質活性変化とリン酸化反応をモニターできる分子の作製,改良に取り組んでおります。

RasファミリーG蛋白質は，Ras, R-Ras, Rap, Ral，その他の5サブファミリーに分かれており，哺乳動物では10数種類が知られている蛋白質ファミリーです。Ras遺伝子は1981年にラットの肉腫ウィルスの癌遺伝子として発見され，1982年にはヒトの多くの腫瘍組織より点突然変異を受けて活性化された形で検出され，膵臓癌の約80%，大腸癌の約50%でRasの活性型変異がみられます。Rasの機能は多様であり，細胞の増殖，分化，形態調節，アポトーシスなどに関与していることが知られています。一方，RasファミリーG蛋白質の別のメンバーであるRap1は，Rasの機能抑制分子として単離された遺伝子であり，Ras依存性のc-Rafの活性化を抑制する作用が知られています。しかしながら，EGFやPDGFなどの増殖因子は，Ras 1とRap1をともに活性化させ，今まではRasとRap1の違いを理解することは困難でありました。そこでRasとRap1のFRETモニター分子Raichu (Ras and interacting protein chimeric unit) -Ras, Raichu-Rap1を用いて，EGFによるRas，Rap1の活性化の局在を解析しました。その結果，Rasは細胞辺縁部，特にメンブレンラッフリング部位で強く活性化され，一方Rap1はRasとは全く逆で，細胞の中心部で強く活性化されることがわかりました。Raichu-Ras, Raichu-Rap1を利用することにより，RasとRap1が細胞内の異なる領域で活性化されることが初めて明らかになりました。

これらFRETプローブに続き，アダプター型癌遺伝子産物Crkのチロシンリン酸化をモニターできるFRETプローブを利用して，EGF刺激による蛋白質リン酸化の広がりを生きた細胞で可視化することが出来ました。さらにRhoファミリーG蛋白質の活性をモニターできるFRETプローブも作製し，生きた細胞でのRhoファミリーG蛋白質活性変化も可視化出来ました。RhoファミリーG蛋白質はアクチン細胞骨格系を制御し，細胞の運動，増殖，分裂などに働くことから，その詳細な機能解析が癌細胞の浸潤機構解明もつながると期待し，現在精力的に研究しております。理化学研究所の宮脇博士がカルシウム濃度をモニターするFRETプローブcameleonを発表した1997年にはFRETをキーワードに文献検索すると年間10本ほどでしたが，その後この分野の論文は爆発的に増え，現在までに400以上の論文でFRETが利用され，更なる広がりを見せることが予想されます。私たちのFRETモニター分子を用いた研究が，生きた細胞内での癌遺伝子産物に関する新たな知見をもたらし，癌研究の進展に貢献することを願っております。

最後に，(財) 大阪癌研究会より平成13年度一般学術研究助成を頂きましたことを心から感謝いたします。

*大阪大学微生物病研究所　腫瘍ウイルス分野
平成13年度一般学術研究助成金交付者