



Title	Phosphorylation at threonine 235 by a ras-dependent MAP kinase cascade is essential for transcriptional activation of NF-IL6
Author(s)	中島, 俊洋
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38123
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	中島俊洋
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10638号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Phosphorylation at threonine 235 by a ras-dependent MAP kinase cascade is essential for transcriptional activation of NF-IL 6 (Ras-MAP キナーゼを介するシグナル伝達系による NF-IL 6 活性化機構の解明)
論文審査委員	(主査) 教授 平野俊夫 (副査) 教授 岸本忠三 教授 谷口維紹

論文内容の要旨

(目的)

NF-IL 6 は、IL-6, IL-1, IL-8, 急性期蛋白, c-fos など種々の遺伝子の発現にかかわる転写因子である。NF-IL 6 はリン酸化タンパクであり、核への局在、DNAへの結合能、転写活性化能はいづれも、リン酸化により制御されている。従って NF-IL 6 は、タンパクのリン酸化を介するシグナル伝達系の核内ターゲットであると考えられる。しかし、細胞外シグナルが、どのようなシグナル伝達系を介し NF-IL 6 を活性化するのかは依然として不明である。例えば、IL-6 のシグナルは細胞内のチロシンキナーゼを介し Ras を活性化し、最終的に NF-IL 6 を活性化する。しかし、Ras と NF-IL 6 との間の経路は不明である。そこで、本研究は Ras による NF-IL 6 の活性化機構について検討した。

(方法と結果)

まず、NF-IL 6 が、Ras により活性化されるかを検討するため、線維芽細胞株 NIH 3T3 と胎児性癌細胞株 P19 に、NF-IL 6 の発現ベクターをコントロールベクター或いは、活性型 Ras 発現ベクターと共に導入した。そして、それぞれの細胞の NF-IL 6 の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、NF-IL 6 の転写活性は、Ras により 10~20 倍増強されたことが明らかとなった。次に、NF-IL 6 のリン酸化が Ras による活性化に関与するかを検討するため、NF-IL 6 の発現ベクターをコントロールベクター或いは、活性型 Ras 発現ベクターと共に導入した NIH 3T3 細胞を、放射性正磷酸により標識した。そして、それぞれの細胞より NF-IL 6 タンパクを免疫沈降法により精製し、2 次元ペプチドマップにより解析した。その結果、NF-IL 6 の 1 ヶ所のアミノ酸残基のリシン酸化が、活性型 Ras により特異的に増強されることが明らかとなった。そこで、NF-IL 6 のリン酸化部位を明らかにするため、Ser 或いは Thr を Ala に置換したポイントミュータントを作製し、同様に 2 次元ペプチドマップにより解析した。その結果、NF-IL 6 の Thr235 が、活性型 Ras 依存性にリン酸化されることが明らかとなった。次に、活性型 Ras がどのようなキナーゼを介し、NF-IL 6 の Thr235 をリン酸化するのかを明らかにするため、Thr235 を含む部分のアミノ酸配列を既知のキナーゼのリン酸化モチーフと比較した。その結果、Thr235 を含む部分は、MAP キナーゼのリン酸化モチーフであることが明らかとなった。MAP キナーゼは、Ras 依存性に活性化されることから、NF-IL 6 の Thr235 のリン酸化は、MAP キナーゼを介することが示唆された。そこで、NF-IL 6 の Thr235 が実際に MAP キナーゼによりリン酸化されるかを検討するため、Thr235 を含む部分のペプチドを合成し、in vitro にお

いて MAP キナーゼによりリン酸化した。その結果、このペプチドに含まれる、Ser 残基或いは Thr 残基のうち、Thr 235 に相当するアミノ酸残基のみが、MAP キナーゼにより特異的にリン酸化されることが明らかとなった。以上の結果から、活性型 Ras は、MAP キナーゼを介して NF-IL 6 の Thr235 をリン酸化することが示唆された。そこで、Thr235 のリン酸化が、Ras による NF-IL 6 の活性化に必須であるかを検討するため、Thr235 を Ala に置換した変異型 NF-IL 6 の発現ベクターをコントロールベクター或いは、活性型 Ras 発現ベクターと共に、P19 細胞に導入した。そして、細胞内の NF-IL 6 の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、活性型 Ras による NF-IL 6 の転写活性の増強は、Thr235 を Ala に置換することで阻害されることが明らかとなった。

(総括)

本研究の結果から、Ras は MAP キナーゼを介し、NF-IL 6 の Thr235 をリン酸化すること、そして、Thr235 のリン酸化が、NF-IL 6 の転写活性を増強することが明らかとなった。従って、IL-6 のシグナルは、Ras → MAP キナーゼを介して NF-IL 6 を活性化することが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、癌遺伝子である Ras が、どのような機構で転写因子である NF-IL 6 を活性化するのかを明らかにした論文である。これまでに Ras は、MAP キナーゼなど種々のキナーゼを活性化することが明らかとなっていたが、それらの活性化されたキナーゼのターゲットは、依然不明であった。また、NF-IL 6 は、種々のシグナルのターゲットであることが明らかとなっていたが、その活性化機構についての詳細は不明であった。本論文では、Ras が、MAP キナーゼを介し NF-IL 6 の Thr235 をリン酸化し、NF-IL 6 の活性化を引き起こすことを明らかにしている。

この結果は、NF-IL 6 が、特定部位のリン酸化により活性化されること、Ras → MAP キナーゼ → NF-IL 6 というシグナル伝達系が存在することを示唆するが、これらは転写因子の活性化機構、ならびにシグナル伝達機構を解明するうえで重要な知見である。

従って、この論文は、学位論文としての価値が十分あるものと認められる。