

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38123">https://hdl.handle.net/11094/38123</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

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-IL6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-IL6はリン酸化タンパクであり、核への局在、DNAへの結合能、転写活性化能はいずれも、リン酸化により制御されている。従ってNF-IL6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-IL6を活性化するの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-IL6を活性化する。しかし、RasとNF-IL6との間の経路は不明である。そこで、本研究はRasによるNF-IL6の活性化機構について検討した。

#### (方法と結果)

まず、NF-IL6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NIH3T3と胎児性癌細胞株P19に、NF-IL6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-IL6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-IL6の転写活性は、Rasにより10~20倍増強されることが明らかとなった。次に、NF-IL6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-IL6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NIH3T3細胞を、放射性正リン酸により標識した。そして、それぞれの細胞よりNF-IL6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-IL6の1ヶ所のアミノ酸残基のリン酸化が、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-IL6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-IL6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-IL6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-IL6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-IL6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、Thr235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-IL6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-IL6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-IL6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-IL6の転写活性をルン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-IL6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-IL6のThr235をリン酸化すること、そして、Thr235のリン酸化が、NF-IL6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-IL6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-IL6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-IL6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-IL6のThr235をリン酸化し、NF-IL6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-IL6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-IL6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。