Osaka University Knowledge Archive

Title	The post-translational processing of ras p21 is critical for its stimulation of mitogen-activated protein kinase
Author(s)	伊藤, 孝仁
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38628
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 47 】

氏　　名	伊　藤　孝　仁（いとう たかひと）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　10908　号
学位授与年月日	平成5年9月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	The post-translational processing of *ras* p21 is critical for its stimulation of mitogen-activated protein kinase (mitogen-activated protein kinase の活性化における *ras* p21の翻訳後修飾の重要性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授　鎌田　武信 (副査) 教 授　松沢　佑次　　教 授　田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

「目　的」

ras p21は tyrosine kinase や protein kinase C の下流に存在し，細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしている低分子量 GTP 結合蛋白質である。GDP 結合型より GTP結合型に変換されることにより活性化される。*ras* p21はその C 末端に Cysteine-A-A-X（A は脂肪族アミノ酸，X は任意のアミノ酸）という特徴的な構造を有し，細胞内においてはこの Cysteine 残基への Farnesyl 基の付加，A-A-X 部分の切断，露出した Cysteine への Methyl 基の付加という一連の翻訳後修飾を受ける。これらの翻訳後修飾は活性型 *ras* p21の transformation 活性に必須であることがわかっており，*ras* p21が下流にそのシグナルを伝達するうえで重要な役割を果たしていると考えられる。

一方，最近の細胞レベルでの研究により種々の増殖因子により活性化される mitogen-activated protein kinase（MAP kinase）が *ras* p21の下流に存在し，*ras* p21を介したシグナルの少なくとも一部を伝達していることが明らかになっている。しかし，現在もなお高等真核生物における *ras* p21の直接の標的蛋白質は明らかにされておらず，今後解明されるべき課題である。

以上の点より本研究では，(1) MAP kinase の活性化を指標に，*ras* p21の活性を評価しうる cell -free system を確立すること，(2) その系を用いて，MAP kinase の活性化における *ras* p21の翻訳後修飾の役割を検討すること，を目的とした。

「方法ならびに成績」

(1) 材料の調製：*ras* p21が MAP kinase を活性化する cell-free system のsource としては，細胞周期の同調した sample を容易に確保できることからアフリカツメガエル卵を用いた。遠心により未成熟卵母細胞（stage Ⅵ）から可溶性画分を調製した。未成熟卵母細胞では MAP kinase が不活性型で存在していることがわかっている。次に，*ras* p21を調製した。Ki-*ras* 4B p21の cDNA を baculovirus vector（pAcYM1）に組み込み昆虫細胞（Sf-9）に感染させ，Farnesyl 基の供給源として Mevalonic acid を加えて接着条件下に培養した。感染後 3 日目の細胞を低張緩衝液によりホモジネートし，超音波処理後に細胞質画分と膜画分とに分離した後，それぞれに含まれ

るKi-*ras* p21をMono Q陰イオン交換カラムにより精製した。[^{3}H] Mevalonic acidを用いた細胞ラベル実験とC末端のアミノ酸配列決定により，可溶性画分から精製したKi-*ras* p21は翻訳後修飾を受けておらず（Unprocessed Form），膜画分から精製したKi-*ras* p21は翻訳後修飾を受けている（Processed Form）ことが明らかになった。さらに，MAP kinaseの上流にあってMAP kinaseの活性化を制御しているMAP kinase-kinaseが*ras* p21によって活性化されるか否かについても検討するために，recombinant MAP kinaseを調製した。アフリカツメガエルのMAP kinaseと一次構造上97%相同であるラットのMAP kinase, ERK2（extracellular-signal regulated kinase 2）のcDNAをラットcDNAライブラリーよりPCR法によりクローニングし，大腸菌を用いてglutathione S-transferase（GST）とのfusion protein，すなわちGST-ERK2として発現させ均一に精製した。

(2) cell-free systemにおける*ras* p21によるMAP kinaseの活性化：Processed Ki-*ras* p21 300 nMの存在下に，アフリカツメガエルの可溶性画分をincubationしゲル内リン酸化法によりMAP kinaseの活性を測定した。その結果，GTPγS結合型Processed Ki-*ras* p21が存在する場合のみMAP kinaseの活性化が認められた。次に，この*ras* p21によるMAP kinaseの活性化がMAP kinase-kinaseを介したものであかどうかを検討した。まず，GST-ERK2が部分精製したアフリカツメガエルの活性型MAP kinase-kinaseによりリン酸化され活性化されることを確認した。さらに，500ngのGST-ERK2をアフリカツメガエル卵の可溶性画分およびProcessed Ki-*ras* p21と共にincubationするとGTPγS結合型Processed Ki-*ras* p21が存在する場合のみアフリカツメガエルのMAP kinaseとGST-ERK2が活性化された。したがって，このcell-free systemではGTPγS結合型Processed Ki-*ras* p21が，MAP kinase-kinaseを介してMAP kinaseを活性化しているものと考えられた。

(3) *ras* p21の翻訳後修飾の役割：そこでUnprocessed Form, Processed FormのKi-*ras* p21を用いてassayを行なったところ，GTPγS結合型Processed FormのKi-*ras* p21は濃度依存性にアフリカツメガエルのMAP kinaseおよびGST-ERK2を活性化し，その見かけ上のKmは約150nMであった。しかし，GDP結合型のUnprocessedおよびProcessed Ki-*ras* p21，GTPγS結合型Unprocessed Ki-*ras* p21では1.5μMの濃度においてもほとんど活性化されなかった。したがって，*ras* p21がMAP kinase-kinase, MAP kinaseを活性化する際には*ras* p21の翻訳後修飾が重要な役割を果たしていると考えられた。

「総　括」

本研究ではMAP kinaseの活性化を指標に用いることにより，高等真核生物において*ras* p21の機能を生化学的に検討できる系を初めて確立した。本研究の結果から，*ras* p21がMAP kinase-kinaseおよびMAP kinaseを活性化する際には，そのC末端の翻訳後修飾が重要であることが明らかになった。また，この系を用いることにより*ras* p21の蛋白レベルでの活性制御機構の検討や標的蛋白質の同定，精製が可能になることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究により，癌遺伝子である*ras*の機能を生化学的に検討しうる系が初めて確立された。今回樹立された系により*ras*の濃度や翻訳後修飾による情報伝達系への影響を直接的に検定することが可能となった。さらに，この系により*ras*とMAP kinase-kinase, MAP kinaseを結び付ける因子の存在が示されたわけであり，*ras*の翻訳後修飾がその因子との結合に重要な働きをしている可能性が示された。この実験系を利用することにより，*ras*の標的蛋白質を精製する，あるいは*ras*を含めた情報伝達経路を薬理学的に阻害する薬剤を設計することが可能となることが期待される。実験結果自体の意義もさることながら，今後の発展性にも期待できるものがあり，生命科学への貢献度が極めて高い研究といえる。学位授与に十分値すると考える。