



Title	Synergistic Activation by Ras and 14-3-3 protein of a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Named Ras-dependent Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase Stimulator
Author(s)	清水, 一也
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39893
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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	し 清 水 一 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 6 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Synergistic Activation by Ras and 14-3-3 protein of a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Named Ras-dependent Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase Stimulator (Ras と 14-3-3 蛋白質による Ras 依存性 MAP キナーゼ キナーゼ (REKS) の相乗的活性化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高 井 義 美 (副査) 教 授 谷 口 直 之 教 授 平 野 俊 夫

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

14-3-3 蛋白質は、チロシンやトリプトファンの水酸化酵素の活性化作用や、プロテインキナーゼCの制御作用、分泌促進作用、ホスホリパーゼ A₂ 作用を有しており、細胞内シグナル伝達の制御因子として働いている。一方、Ras は、MAP キナーゼ (ERK) キナーゼ (MEK) - ERK カスケードの上流に位置し、このカスケードを制御している。Ras には GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型があり、GTP 結合型がその標的蛋白質に作用する。MEK キナーゼの一つである c-Raf-1 が Ras の標的蛋白質として報告されているが、cell-free assay において、GTP 結合型 Ras が直接 c-Raf-1 を活性化することはいまだ報告されていない。そこで、私は、Ras の標的蛋白質を同定する目的で、GTP 結合型 Ras が MEK を活性化する cell-free assay 系をすでに開発し、この cell-free assay 系を用いて、アフリカツメガエル卵の細胞質画分から、GTP 結合型 Ras 依存性に MEK を活性化するのに必要な蛋白質因子 (REKS: Ras-dependent ERK Kinase Stimulator) を同定し、部分精製している。

最近、酵母で c-Raf-1 の活性促進因子として 14-3-3 蛋白質が単離されている。本研究では、この cell-free assay 系を用いて、14-3-3 蛋白質の REKS 活性に対する影響を解析することを目的とした。

[方法ならびに成績]

1) 材料の調製と cell-free assay

REKS の source としては、アフリカツメガエル卵を電気ショックにより interphase に導入し、内在性の ERK を不活性型にした後、遠心して得られた細胞質画分を用いた。cell-free assay に用いる Ki-Ras は、Ki-Ras を高発現している昆虫細胞 (Sf9 cell) の細胞膜画分より精製した。14-3-3 蛋白質はラット脳より精製した。MEK と、ERK2、NF1、Ha-Ras はグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として、また、c-Raf-1 はマルトース結合蛋白質との融合蛋白質として、*E. coli* で発現させ精製した。cell-free assay は、REKS 標品を GTP γ S 結合型 Ki-Ras および GDP 結合型 Ki-Ras 存在下で、GST-MEK と GST-ERK2 を加えてインキュベートした後、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) と [γ -³²P] ATP を加え、REKS により MEK を介して活性化された ERK2 による MBP のリン酸化を REKS 活性として測定した。

2) アフリカツメガエル卵からの REKS の精製

上述の方法により得たツメガエル卵の細胞質画分を MonoS 陽イオン交換カラムを用いて分画した後、cell-free

assay により R E K S 活性を測定した。その結果、二つのピークが得られた。このうち、二番目のピークのみが G T P γ S 結合型 Ki-Ras により特異的に活性化され、しかも、このピークのみが G S T-M E K 依存性であることから、二番目のピークが R E K S であると考えられた。さらに、Western blot 法による解析から、一番目のピークは M E K と E R K であることが、また、14-3-3 蛋白質は Pass 画分に、c-Raf-1 は二番目のピークの後に存在することが、それぞれ明らかとなった。

3) 14-3-3 蛋白質による R E K S の活性化

MonoS カラムで精製した R E K S を G T P γ S 結合型 Ki-Ras あるいは 14-3-3 蛋白質とインキュベーションし、R E K S 活性を測定した。R E K S は、14-3-3 蛋白質のみではわずかに活性化されるだけであったが、G T P γ S 結合型 Ki-Ras が共存すると著明に活性化された。さらに、14-3-3 蛋白質は、G T P γ S 結合型 Ki-Ras による R E K S の maximum activity を促進した。したがって、14-3-3 蛋白質と Ras は、相乗的に R E K S を活性化することが明らかとなった。

4) 14-3-3 蛋白質の作用点

cell-free assay を用いて、14-3-3 蛋白質が M B P または、M E K, E R K, 活性型 M E K に直接作用するか否かを検討した。14-3-3 蛋白質は、G T P γ S 結合型 Ki-Ras の存在に関わらず、M B P と、M E K, E R K, 活性型 M E K に作用しなかった。したがって、14-3-3 蛋白質の作用には少なくとも R E K S が必要であることが明らかとなった。

5) 14-3-3 蛋白質と R E K S の相互作用

Ras の G T P a s e 活性化蛋白質の一つとして N F 1 がある。c-Raf-1 は、Ras と結合することにより、N F 1 の活性を阻害する。そこで、この阻害反応系を用いて、14-3-3 蛋白質が Ras と相互作用するか否かを検討した。その結果、14-3-3 蛋白質はこの阻害反応に影響を与えなかった。さらに、14-3-3 蛋白質は G T P γ S 結合型 G S T-Ha-Ras アフィニティカラムにも結合しなかった。したがって、14-3-3 蛋白質は Ras とではなく、R E K S と相互作用すると考えられた。

6) 14-3-3 蛋白質と c-Raf-1 の相互作用

cell-free assay を用いて、14-3-3 蛋白質が c-Raf-1 の活性化に作用するか否かを検討した。その結果、14-3-3 蛋白質は、G T P γ S 結合型 Ki-Ras の存在に関わらず、c-Raf-1 を活性化しなかった。したがって、Ras と 14-3-3 蛋白質だけでは c-Raf-1 の活性化には十分ではないため、活性化には他の因子の存在や c-Raf-1 の修飾が必要であると考えられた。

[総括]

本研究では、cell-free assay 系を用いて、14-3-3 蛋白質が Ras と相乗的に R E K S を活性化することを明らかにした。さらに、14-3-3 蛋白質が Ras とではなく、R E K S と相互作用することも明らかにした。本研究により、14-3-3 蛋白質が、従来報告されていた様々な作用に加えて、R E K S を介する Ras-M E K-E R K カスケードの制御因子としての作用をも有していることが示された。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、14-3-3 蛋白質の Ras の標的蛋白質である R E K S に対する影響を cell-free assay 系を用いて解析した。その結果、14-3-3 蛋白質が Ras と相乗的に R E K S を活性化することを明らかにした。さらに、14-3-3 蛋白質が、R E K S と相互作用することにより、従来報告されていた様々な作用に加え、R E K S を介する Ras-M E K-E R K カスケードの制御因子としての作用をも有していることを明らかにした。

本研究は、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。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。