

| | |
|--------------|--|
| 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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|------------|--|
| 氏名 | し　　み　　か　　ち 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蛋白質はラット大脳より精製した。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GTPγS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REKS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GTP 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GST-MEK依存性であることから、二番目のピークがREKS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MEKとERK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REKSの活性化

MonoSカラムで精製したREKSをGTP 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、REKS活性を測定した。REKS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、GTP 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、GTP γ S結合型Ki-RasによるREKS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REKS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MBPまたは、MEK、ERK、活性型MEKに直接作用するか否かを検討した。14-3-3蛋白質は、GTP γ S結合型Ki-Rasの存在に関わらず、MBPと、MEK、ERK、活性型MEK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REKSが必要であることが明らかとなった。

5) 14-3-3蛋白質とREKSの相互作用

RasのGTPase活性化蛋白質の一つとしてNF1がある。c-Raf-1は、Rasと結合することにより、NF1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GTP γ S結合型GST-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、REKS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、GTP 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REKS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、REKS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、REKSを介するRas-MEK-ERK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REKS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REKS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、REKS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、REKSを介するRas-MEK-ERK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思われる。