



Title	H-RasからcRaf1への情報伝達反応の細胞内可視化解析
Author(s)	日比野, 佳代
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44339
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	日比野佳代
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第17947号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科システム人間系専攻
学位論文名	H-RasからcRaf1への情報伝達反応の細胞内可視化解析
論文審査委員	(主査) 教授 柳田敏雄 (副査) 教授 村上富士夫 教授 山本直彦

論文内容の要旨

低分子量G蛋白質Rasとその標的タンパク質セリン/スレオニンキナーゼRaf1の相互作用は、細胞増殖、分化において重要な情報伝達反応の一つであるが、増殖・分化刺激後の細胞内における両者の時空間的な情報伝達反応の様相は詳しく解析されていない。本研究では、上皮成長因子(EGF)刺激後のRas/Raf1相互作用反応特性を明らかにするため、蛍光タンパク質(GFP)を融合させたRasとRaf1を細胞内で可視化し、多分子平均観察、1分子観察の異なる2つの方法でそれらの挙動を解析した。

多分子解析により以下の点が明らかになった。(1)刺激後のRasとRaf1の相互作用反応は細胞膜上で空間的に不均一に起きた。RasとRaf1が特に濃縮して60分以上も反応を持続させる部位が局所的に現れ、そこからは膜ラッフルが形成された。(2)EGFが細胞膜上に均一に結合しているにもかかわらず、一部の細胞膜部位に存在するRasはRaf1と相互作用しなかった。これらは、外部刺激が細胞膜に一様に入力されても、Rasの活性化や、RasからRaf1への情報伝達反応が細胞膜の場所により異なる事を示唆している。

一方、1分子解析により、(1)EGF刺激前後に関わらずRasとRaf1は細胞膜と細胞質を行き来し、膜上滞在時間の時定数は数百ミリ～数秒であった。(2)RasとRaf1の相互作用反応が特に持続した膜ラッフルの様な部位でも、個々のRasやRaf1分子は数秒以内にラッフル膜と普通の膜との間で入れ替わっていた。(3)刺激後、Raf1の膜滞在時間はRasよりも1.3～2.6倍長かったため、Raf1はRasから解離後も膜にとどまることが示唆された。これらは、個々のRasとRaf1の膜上の相互作用はせいぜい数秒間しか維持されない動的反応であることを示している。

以上の結果から、Ras/Raf1細胞内情報伝達反応は、個々の分子を秒オーダーで入れ替えながら、分子間相互作用反応を局所的に数十分間にもわたり維持する動的で不均一な性質を持つことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

細胞の増殖・分化に関与するRas情報伝達反応機構の研究は、これまで、多数細胞の多数分子の平均値を解析し、多くの情報伝達反応経路を明らかにして発展してきた。しかし、生きた細胞内で、情報伝達分子が刺激後いつ、細胞内のどこで活性化するのか？また、情報伝達反応が細胞内の場所により異なるか？局所的な反応の違いが細胞応

答とどう結びついているか？　は明らかではない。

審査論文では、EGF 刺激に応答した Ras から cRaf-1 への情報伝達反応を、GFP を用いて多分子平均観察、1 分子観察し、Ras/Raf1 細胞内情報伝達反応が、個々の分子を秒オーダーで入れ替えながら細胞膜の局所では相互作用反応を数十分間も維持するダイナミックで不均一な反応であり、局所的な反応の持続が細胞骨格の再編成という不均一でダイナミックな細胞応答に繋がることを示した点で評価できる。

具体的には、多分子平均観察から、Ras と Raf1 が特に濃縮して相互作用反応を長時間持続する場所が細胞膜の局所に現れ、そこからは膜ラッフルが形成されることを発見した。また、細胞外刺激が細胞膜に均一に入力されても、Ras の活性化や Ras/Raf1 相互作用反応は細胞膜の場所により異なることを示した。1 分子観察から、EGF 刺激に関わらず、Ras と Raf1 が細胞質と細胞膜を行き来し、Ras/Raf1 相互作用反応が 60 分以上も持続する膜ラッフル部位でも、分子の入れ替えが数百ミリ～数秒オーダーで起こることを示した。

以上のことに加え、本論文では、「Ras は時空間的に不均一な活性化を用いて、複数の異なる反応経路を調節する」と言う独創的な仮説を提唱し、さらに、多分子平均観察と 1 分子観察を相補的に組み合わせた情報伝達反応の解析方法を実践し、今後、研究が展開してゆく一つの方向を提示した点でも重要であると考える。これらの理由から、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。