

| | |
|--------------|---|
| Title | Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase |
| Author(s) | 寺井, 健太 |
| Citation | 大阪大学, 2006, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/46193 |
| 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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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 | 寺井健太 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第 20117 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 18 年 3 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻 |
| 学位論文名 | Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase (Ras による cRaf の構造変化は、MEK との結合を誘導する) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 松田 道行 (副査) 教授 高井 義美 教授 岡田 雅人 |

論文内容の要旨

目的

細胞の癌化において Ras/Raf/Mek/Erk のシグナル伝達経路は重要な役割を担い、Ras は膵臓癌で 80%、Raf は悪性黒色腫で 60% の活性化型変異体が見つかっている。この伝達経路を解析することが癌化の治療へとつながると考え、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく分子プローブを作製し、Ras/Raf/Mek のシグナル伝達の機序を解析した。

Raf の活性化のメカニズムには 2 つの説があり、1 つは Raf が細胞膜上へ局在変化し、リン酸化されることで必要十分という説、もう一つは、リン酸化に加え Ras による Raf の構造変化が必要という説である。しかしながら、Raf の構造変化に関しては、多くの論文の Discussion で書かれることがあるが、実際に観察する事は難しく、推測されているのみである。そこで FRET を用いて Raf 分子の構造変化を検出し、Raf のリン酸化、酵素活性、他分子との相互作用などの生化学的手法に加え、過去に調べることができなかった構造変化の観点より、その活性化の機序を解析した。

方法ならびに成績

1. c-Raf-1 の構造変化をモニターする分子の作製

N 末より緑色蛍光蛋白 (GFP) の黄色変異体である YFP、全長の Raf、シアン色変異体の CFP を直列に連結したキメラタンパク質を作製した。Raf は N 末に制御領域、C 末に触媒領域を持つことが知られていたため、不活化状態で折りたたまれ、活性化すると開くようにデザインした。つまり、不活化状態では CFP と YFP が近傍にあるために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こり、CFP が光らずに YFP 由来の蛍光が、活性状態では CFP と YFP の距離が離れるために CFP 由来の蛍光が観察される。

2. 増殖因子刺激時における c-Raf-1 の構造変化と局在変化

増殖因子刺激後、プローブは細胞質から細胞膜上に局在移行し、同時に Raf の構造変化が起こることが観察された。この結果より Raf は細胞膜上でのみ構造変化している事が明らかになった。

3. c-Raf-1 の構造変化がシグナル伝達に与える影響

Ras による Raf の構造変化は MEK と結合するために必要ではないかと考え、Raf と MEK のそれぞれに CFP、YFP を融合させ、分子間の FRET 効率を測定した。その結果、Raf の構造変化は MEK との結合能に相関し、MEK のリン酸化に必要であることを明らかにした。

総括

本研究の特色は、生きた細胞内でタンパクの構造変化、タンパク-タンパク間の相互作用を解析したことにある。In vitro の系において、前者は結晶構造解析や NMR、後者は免疫沈降法や表面プラズモン共鳴を利用した方法で解析が進められているが、これらの系はあまりにも単純化し過ぎているために、生体内の現象を完全に反映することは難しい。私は、これらの問題を解決するために FRET の原理を用いて細胞内でタンパクの構造変化、タンパク間の相互作用の解析を行った。Ras/Raf/MEK のシグナル伝達経路を制御する分子は 14-3-3、Akt、KSR、SUR-8 など多くの分子が知られており、これらの分子が存在する細胞内で解析することが、より生理的な条件下でのタンパクの構造変化、相互作用を解析することとなる。また、細胞内で解析することの、もう一つの利点として、従来の生化学的な手法で大量精製が困難な分子でも、遺伝子導入のみで解析が可能になることにある。今まで解析が難しかった全長の Raf を用いることが可能になり、全長の Raf は Ras と MEK に同時に結合することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

細胞の癌化において Ras/Raf/Mek/Erk のシグナル伝達経路は重要な役割を担い、Ras は膵臓癌で 80%、Raf は悪性黒色腫で 60% の活性化型変異体が見ついている。申請者は、この伝達経路を解析することが癌化の治療へとつながると考え、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく分子プローブを作製し、Ras/Raf/Mek のシグナル伝達の機序を解析した。

Raf の活性化のメカニズムには 2 つの説があり、1 つは Raf が細胞膜上へ局在変化し、リン酸化されることで必要十分という説、もう一つは、リン酸化に加え Ras による Raf の構造変化が必要という説である。申請者は、FRET を用いて Raf 分子の構造変化を検出し、Ras による Raf の構造変化は MEK と結合する誘導する事を見出した。これらの研究は、今後ヒトの癌化を解明する一助となり、学位に値するものと認める。