The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DYNAMICS OF THE RAS/ERK MAP KINASE CASCADE AS MONITORED BY FLUORESCENCE PROBES
Author(s)	藤岡, 亜紀
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46364
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【61】

氏　　名	藤　岡　亜　紀（ふじ おか あ き）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０１１８　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	DYNAMICS OF THE RAS/ERK MAP KINASE CASCADE AS MONITORED BY FLUORESCENCE PROBES （Ras/ERK MAPK カスケードのダイナミクス）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松田　道行 （副査） 教　授　目加田英輔　　教　授　岡田　雅人

論　文　内　容　の　要　旨

［　目的　］

Ras/ERK MAPK カスケードは、増殖・分化などの細胞にとって必須の情報伝達を担っている。この重要なシグナル伝達をより理解するため、これまで多くのシミュレーションモデルが立てられてきた。しかしながら、モデルを構築する上で重要なパラメータの多くは、実測されておらず、モデルごとに大きなばらつきがある。そこで本研究では、Ras/ERK MAPK カスケードの信頼できるモデルを構築することを目的とし、様々な蛍光プローブを用いた実験により、生きた細胞からパラメータを実測し、シミュレーションモデルを立てた。

［　方法ならびに成績　］

パラメータの実測方法

(1)GST 融合タンパク質を用いて、Ras/ERK MAPK（カスケードのシグナルを構成する代表的な分子である Ras、Raf、MEK、ERK の細胞あたりの分子数を算出した。

(2)fluorescence resonance energy transfer（FRET；蛍光共鳴エネルギー移動）の原理を用いたプローブ Miu2（MAPK-indicator unit ERK2）を作製し、上皮細胞増殖因子（epidermal growth factor；EGF）刺激時における ERK の活性化と、それに伴う核移行を観察した。

(3)新規蛍光蛋白質である Dronpa を利用して MEK と ERK の核内・核外移行の速度を測定した。

(4)Dronpa を用いて、Ras-Raf、Raf-MEK、MEK-ERK 複合体の解離定数を求めた。

以上の実験から得られたパラメータを用いて、Ras/ERK MAPK カスケードを構成する基本的な分子、反応式のみを組み込んだシミュレーションモデルを構築した。このモデルは、フィードバックループや足場タンパク質等の重要な分子を省略した、非常に単純化されたモデルであるにも関わらず、EGF 刺激下で観察された ERK の活性変化と、核移行の時空間的な変化をほぼ再現することができた。

また Ras、Raf、MEK、ERK の分子数を算出したところ、他の分子に比べ、Raf の細胞内濃度は約 100 倍低いこ

とがわかった。そこで、我々のモデルにおいて、Rafの濃度の検討を行ったところ、Rafの濃度に依存して、刺激前・刺激後のリン酸化型MEK、ERKの濃度が高くなることがわかった。このことは、siRNAによりc-Rafをノックダウンした細胞を用いることで、実験的に証明することができた。

［　総括　］

本研究において我々は、様々な蛍光プローブを用い、生きた細胞から得たパラメータを組み込んだ、Ras/ERK MAPKカスケードのシミュレーションモデルを構築した。

上述した結果より、細胞内濃度の最も低かったRafは、下流のシグナルのリン酸化レベルを規定していることが示唆された。つまりRafは、Ras/ERK MAPKカスケードにおいて、ボトルネックの役割を果たしており、RafからMEK、ERKへとシグナルが増幅し伝播していると考えられる。

また今回得られた結果は、蛍光プローブを用いて得られたパラメータの有用性を示すとともに、今後より複雑なシミュレーションモデルを構築する際にこれらのパラメータが有用であろうと考えている。

論文審査の結果の要旨

申請者は、新たに開発した様々な蛍光プローブを用いて、生細胞におけるRas/ERK MAPKカスケードの動態を詳細に解析し、全てのパラメータに実測データを用いた初めてのRas/ERK MAPKカスケードのシミュレーションモデルを完成した。

この研究の過程で、申請者はRas/ERK MAPカスケードの構成因子の中では、Rafの細胞内濃度がRas、MEK, ERKよりも極めて少ないことを見出し、この情報伝達系がRafの量に感受性が高いことをシミュレーションにより予測し、そして実験によりその裏づけを得た。

以上の結果は、蛍光プローブが細胞内蛋白群の動態を定量的に解析するために優れたツールであることを示すのみならず、その成果として得られるパラメータが細胞内情報伝達系のシミュレーションモデルの構築において極めて有意義であることを示しており、学位に値するものと認められる。