

Title	A SOS in regulation of the SOS/ RAS positive feedback loop as identified by using single-molecule analysis in living cells
Author(s)	中村, 由樹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56116
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (中村 由樹)

論文題名

A SOS in regulation of the SOS/ RAS positive feedback loop as identified by using single-molecule analysis in living cells

(生細胞内の一分子計測に基づく、SOS/RAS positive feedback loopにおける調節因子としてのSOSの機能の提案)

Small GTPase RASは、細胞内シグナル伝達におけるhub proteinであり、複数の入力シグナルの統合や分岐を行って細胞の分化、増殖、生存などの細胞応答を適切に調節する。細胞応答を理解するためには、このように複雑な情報処理を行うRASの活性制御を理解する必要がある。RASの活性はGTP/GDPの結合状態に依存するが、RAS自身のGTP/GDP交換反応速度は非常に遅く、細胞外シグナル依存的なRAS活性化にはヌクレオチド交換因子が必要である。Son of sevenless (SOS)は、RASヌクレオチド交換因子のひとつであり、epidermal growth factor (EGF)シグナルなどに応じてRASを活性化する。RASのシグナル依存的な活性制御機構を理解するためには、SOSによるRAS活性制機構を明らかにする必要がある。そこで、本研究は、SOSによるRAS活性制御機構の解明を目標とした。これまでに*in vitro*、*in silico*研究から、SOSによるRAS活性制御には、SOSを介したRAS positive feedbackが大きく関与する事が報告されている。しかし、このSOS/RAS positive feedbackが、実際に生細胞で起こるのか、また、どのように調節されているのか分かっていなかった。

この問題を解決するため、本研究では、蛍光色素TMRで染色可能なHalo7蛋白質を融合したSOSをHeLa細胞に発現させ、SOSの生細胞一分子解析を行った。SOSは、シグナル依存的に細胞質から細胞膜へ膜局在変化する事が知られているが、細胞質の発現量に対して膜局在する分子が少ない為に、膜上のSOS分子の動態を計測することは困難だった。本研究では、SOSの1分子計測を行う事で、SOSのシグナル依存的な動態変化を捉える事ができた。この生細胞内でのSOS1分子解析により、私は、SOSと膜との相互作用kineticsを明らかにし、SOSの膜からの解離kinetic modelを提案した。このモデルから、SOSは、少なくとも3つの膜結合状態を持ち、Intermediate state (I state)と名付けた状態のみ、活性化RASと結合してpositive feedbackを仲介する事が示唆された。また、positive feedbackの実際の作用は、刺激後長時間で、滞在時間の長いI stateをとるSOS分子の割合を保つことによって、活性化RASと相互作用する分子を維持することであった。さらに、SOS domain間の距離や配向が、I stateの割合を厳密に調整している可能性が予想された。これは、SOS domainの距離や配向の調節によって、RAS positive feedbackが制御される可能性を示唆する。

Noonan Syndromeは、心疾患や発達障害を伴う先天性の遺伝子疾患である。NS患者は、RAS活性化シグナル伝達に関わる遺伝子に変異を持つことが知られており、SOSに変異を持つNS患者は、全体の15%を占める。SOSのNS変異は、SOSの全てのdomainで同定されている。RASとの相互作用domainでない場所にもNS変異が数多く同定されているという報告は、SOS domain間の距離や配向がSOS/RAS positive feedbackを調節するという可能性を補強する。そこで、SOSのNS変異体の生細胞一分子計測を行った。この実験も、最初の実験と同じく、Halo7 tagを付けた3種のNS変異SOSをHeLa細胞内に発現させ、TMRで染色して生細胞一分子解析を行った。その結果、どのNS変異SOSも膜局在の昂進という共通した特徴を持つが、それを実現する分子メカニズムは、変異体ごとに異なる事が明らかになった。それぞれの変異体を持つ分子メカニズムは、M269R変異ではI stateを経由せずに活性化RASと相互作用できるような構造変化、R552G変異ではI stateへの遷移の促進、R1131K変異では膜との親和性の上昇であった。これらの分子メカニズムの違いがSOS/RAS positive feedbackに与える影響は、変異ごとに異なった。この結果は、domain間相互作用の改変によって、RAS活性に大きく影響するpositive feedbackの応答性をコントロールできる可能性を示唆する。さらに、domain間相互作用によるSOS活性の適切な調節は、SOSと膜との親和性が適切な時に、正常に作用する事が示唆された。

以前の研究により、SOSが、他のタンパク質と様々なdomainで相互作用する事が報告されている。この報告は、生細胞内でSOS domain間の相互作用が調整され、それによってSOS/RAS positive feedback loopの応答性を制御している可能性を示唆する。本研究では、RAS positive feedback応答において、SOSは、RAS活性を調節する機能を持つ事を示した。この研究は、細胞応答に重要であるRAS活性制御の解明対して、大きく貢献する研究であると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中 村 由 樹)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 特任教授 柳田 敏雄
	副 査 教授 難波 啓一
	副 査 教授 井上 康志
	副 査 招聘教授 佐甲 靖志

論文審査の結果の要旨

従来、細胞応答に重要なhub protein であるSmall GTPase RASの活性化には、ヌクレオチド交換因子SOSとの positive feedbackが重要であると示唆されているが、実体は明らかでなかった。申請者は、蛍光標識したSOSをHeLa細胞内で一分子計測し、SOSと膜との解離kineticモデルを構築することで、このpositive feedbackが刺激依存的なRAS活性化に必須であり、SOS分子内の複数ドメインが協調的に働いて開状態を維持して、活性化RASとfeedback loopを形成する分子数を確保していることを明らかにした。さらに、SOS/RAS positive feedbackがSOSのdomain間相互作用やdomainの配向によって調節される可能性を示した。また、kineticモデルに基づいて、先天性遺伝子疾患であるNoonan症候群患者から同定された複数のSOS変異体を詳細に解析した結果、分子の動態異常を起こすメカニズムが変異体ごとに異なることをはじめて提案した。これらの結果は、SOSのdomain間相互作用によりRAS活性化が厳密に制御される事を示唆している。この研究は、RASの活性制御機構に新しい知見を与える重要な研究である。

以上により、本論文の申請者が博士号取得に値すると判断する。