



Microinjection of smg/rap1/Krev-1 p21 into Swiss 3T3 Cells Induces DNA Synthesis and Morphological Changes

吉田, 泰久

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1205

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001205>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	よし だ やす ひさ 吉 田 泰 久	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)	
学位記番号	博い第855号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成5年3月31日	
学位論文題目	Microinjection of <i>smg/rap1/Krev-1</i> p21 into Swiss 3T3 Cells Induces DNA Synthesis and Morphological Changes <i>smg/rap1/Krev-1</i> p21 のマイクロインジェクションによる Swiss 3T3 細胞の DNA の合成および形態変化に及ぼす効果	
審 査 委 員	主査 教授 高 井 義 美 教授 片 岡 徹 教授 玉 木 紀 彦	

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

smg p21 は *ras* p21 類似低分子量 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) の 1 つであり、A、B の 2 種類がある。*smg* p21A は *rap1A* p21、*Krev-1* p21 と、また、*smg* p21B は *rap1B* p21 と同一の蛋白質である。*smg* p21 は *ras* p21 のエフェクター部位と同一のアミノ酸配列を有しており、*ras* p21 と同様の作用、あるいは拮抗作用を有すると考えられる。NIH 3T3 細胞において、*Krev-1* p21 は v-Ki-ras p21 のトランスフォーム活性を抑制することが報告されている。また、本研究室では最近、NIH 3T3 細胞に *smg* p21 を過剰発現させると、*ras* p21、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)、platelet-derived growth factor (PDGF) による *c-fos* プロモーターの活性化を抑制するが、*c-raf-1* による活性化は抑制しないことを見いだしている。*ras* p21 は PDGF レセプターや C キナーゼの下流にあり、*c-raf-1* は *ras* p21 の下流で *ras* p21 の一部の作用を遂行するとされている。これらの事実より、NIH 3T3 細胞では *smg* p21 は *ras* p21 の作用に拮抗していると考えられる。

smg p21 には GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型がある。本研究室では、*smg* p21 の GDP 結合型から GTP 結合型への変換を促進する蛋白質として GDP 解離促進蛋白質 (*smg* GDS) を見いだしている。この *smg* GDS は *smg* p21 の他、Ki-ras p21、*rho* p21、*rac* p21 にも作用する。また、本研究室では、*smg* p21 が A キナーゼや G キナーゼによってリン酸化されると、その結果、*smg* GDS によって活性化されやすくなることも明らかにしている。したがって、*smg* p21 は A キナーゼや G キナーゼの下流で、A キナーゼや G キナーゼの種々の作用の少なくとも一部を遂行していると考えられる。

Swiss 3T3細胞では、cyclic AMP (cAMP) はインスリンの存在下でDNA合成を促進することが知られている。PDGFもSwiss 3T3細胞のDNA合成を促進するが、この場合もプロスタグランジンを介してcAMPが合成され、この結果、PDGFによるDNA合成がさらに促進されと考えられている。これらの結果から、cAMPはSwiss 3T3細胞のDNA合成に重要な役割を果たしていると考えられる。

今回、細胞増殖および細胞形態の制御における *smg* p21 の役割を明らかにする目的で、Swiss 3T3細胞に *smg* p21 をマイクロインジェクションし、DNA合成および形態変化に及ぼす作用について解析した。

[方法]

1.DNA合成

静止期にある Swiss 3T3 細胞を、牛胎児血清 (FCS)、PDGF、インスリン、Dibutyl cAMP (Bt₂cAMP) の種々の組み合わせで刺激し、5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を加えて培養した後固定し、抗BrdU抗体で染色し、ラベリングインデックスを計算してDNA合成を観察した。また、静止期の Swiss 3T3 細胞50個に、精製した *Ki-ras* p21、*smg* p21B、*smg* GDSを種々の組み合わせで、Bar-Sagi らの方法に従ってマイクロインジェクションし、同様に BrdU でラベルした。

2.形態変化

精製した *Ki-ras* p21、*smg* p21B、*smg* GDSを種々の組み合わせでマイクロインジェクションした Swiss 3T3 細胞を、12時間培養後に固定して電子顕微鏡で観察するか、あるいは、位相差顕微鏡上で培養しながらビデオで記録することにより、細胞膜のラフリングを観察した。同様にマイクロインジェクションした Swiss 3T3 細胞を BrdU でラベルし、固定後抗BrdU抗体と phalloidin で二重染色し、DNA合成とストレスファイバーの状態を confocal laser scanning 顕微鏡で観察した。

[結果]

1.DNA合成

Swiss 3T3細胞をFCS、インスリン+Bt₂cAMP、インスリン+PDGFでそれぞれ刺激すると、DNA合成は著明に促進されたが、PDGF、Bt₂cAMP、インスリンをそれぞれ単独で刺激すると、DNA合成はほとんど認められなかった。*Ki-ras*^{val-12}p21あるいはGDP結合型*Ki-ras* p21+*smg* GDSをそれぞれマイクロインジェクションした細胞では、インスリン非存在下でもDNA合成が促進された。GTPγS結合型 *smg* p21BあるいはGDP結合型 *smg* p21B+*smg* GDSをそれぞれマイクロインジェクションした細胞では、インスリン存在下でのみDNA合成が促進された。GDP結合型 *Ki-ras* p21あるいはGDP結合型 *smg* p21Bをそれぞれ単独でマイクロインジェクションした細胞では、インスリンの存在に関係なくDNA合成は促進されなかったが、*smg* GDSをインス

リン存在下にマイクロインジェクションした細胞ではある程度のDNA合成が認められた。

2.形態変化

Ki-ras^{val-12} p21 をマイクロインジェクションした細胞では、インスリン非存在下でも細胞膜のラッフリングが認められたが、GTP γ S結合型 *smg* p21B をマイクロインジェクションした細胞では、インスリン存在下でのみ細胞膜のラッフリングが認められた。GDP結合型 Ki-ras^{val-12} p21 GDP結合型 *smg* p21B、*smg* GDS をそれぞれ単独でマイクロインジェクションした細胞では、インスリンの存在に関係なく細胞膜のラッフリングが認められなかった。抗BrdU抗体と phalloidin による二重染色法で、それぞれDNA合成とストレスファイバーを観察したところ、Ki-ras^{val-12} p21 をマイクロインジェクションした細胞では、DNA合成とストレスファイバーの減少が認められたが、GTP γ S結合型 *smg* p21B をマイクロインジェクションした細胞では、ストレスファイバーには変化がなく、DNA合成のみが認められた。

[考察]

smg p21 はAキナーゼによりリン酸化され、その結果、*smg* GDSにより活性化されやすくなる。Swiss 3T3細胞では、Bt₂cAMPやプロスタグランジンなどcAMPのレベルを上昇させる薬剤がインスリン存在下でDNA合成を促進する。AキナーゼはcAMPによって活性化されるので、*smg* p21 はSwiss 3T3細胞において、cAMPのDNA合成作用の少なくとも一部を遂行している可能性が高いと考えられる。

本研究において、活性型 *ras* p21 をマイクロインジェクションした細胞では、インスリン非存在下でDNA合成と細胞膜のラッフリングが認められるが、活性型 *smg* p21 をマイクロインジェクションした細胞では、インスリン存在下でないとこのような作用が認められないことが明らかになった。これらの結果に対して、次の2つの可能性が考えられる。i) 活性型 *ras* p21 はPDGFおよびインスリンの両者の作用を遂行することができるが、*smg* p21 はインスリンの作用を遂行できない。ii) 活性型 *ras* p21 はインスリン様 growth factor を作ることができ、それがインスリンの作用を遂行するが、*smg* p21 にはそのような作用がない。さらに、本研究において、活性型 *ras* p21 をマイクロインジェクションした細胞では、DNA合成とストレスファイバーの減少が認められるが、活性型 *smg* p21B をマイクロインジェクションした細胞では、ストレスファイバーには変化がなく、DNA合成のみが認められることが明らかになった。

このように、Swiss 3T3細胞では、*smg* p21 と *ras* p21 の作用が若干異なっているものの両者共に増殖促進的に働くが、NIH 3T3細胞では、Krev-1 p21 がv-Ki-ras p21 のトランスフォーム活性を抑制するとともに、*smg* p21 を過剰発現すると *ras* p21、TPA、PDGFによる *c-fos* プロモーターの活性化を抑制するなど、*smg* p21 が増殖抑制に働いていることがすでに報告されている。したがって、*ras* p21 と *smg* p21 の標的蛋白質が、Swiss 3T3細胞では一部オーバーラップしており、NIH 3T3細胞では全く異なっている可能性が強い。今後、*smg* p21 と *ras* p21 の生理機能と作用機構を理解するには、NIH 3T3細胞とSwiss 3T3細胞のように *smg* p21 の作用の異なった種類の細胞におい

て、それぞれの低分子量G蛋白質の標的蛋白質を解析することが重要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

smg p21 は *ras* p21 類似低分子量GTP結合蛋白質 (G蛋白質) の1つであり、*ras* p21 のエフェクター部位と同一のアミノ酸配列を有しており、*ras* p21 と同様の作用、あるいは拮抗作用を有すると考えられる。NIH 3T3細胞においては *smg* p21 は *ras* p21 の作用に拮抗して増殖抑制に働いていることが既に報告されている。一方、*smg* p21 がAキナーゼやGキナーゼによってリン酸化されると、その結果、GDP解離促進蛋白質 (*smg* GDS) によって活性化されやすくなることが明らかになっている。また、Swiss 3T3細胞では、 Bt_2c AMPやプロスタグランジンなどcAMPのレベルを上昇させる薬剤がインスリン存在下でDNA合成を促進する。AキナーゼはcAMPによって活性化されるので、*smg* p21 は Swiss 3T3細胞において、cAMPのDNA合成作用の少なくとも一部を遂行している可能性が高いと考えられる。

本研究者は Swiss 3T3細胞に精製したKi-*ras* p21、*smg* p21B、*smg* GDSを種々の組み合わせでマイクロインジェクションし、DNA合成および形態変化に及ぼす作用について解析している。活性型Ki-*ras* p21、Ki-*ras* p21+*smg* GDSをマイクロインジェクションした細胞では、インスリン非存在下でもDNA合成が促進され、細胞膜のラフリングが認められるが、活性型 *smg* p21B、*smg* p21B+*smg* GDSをマイクロインジェクションした細胞では、インスリン存在下でのみDNA合成が促進され、細胞膜のラフリングが認められることが明らかになった。また、活性型Ki-*ras* p21をマイクロインジェクションした細胞ではDNA合成とストレスファイバーの減少が認められるが、活性型 *smg* p21をマイクロインジェクションした細胞ではストレスファイバーには変化がなく、DNA合成のみが認められることが明らかになった。このように、本研究者は Swiss 3T3細胞では、*smg* p21 と *ras* p21 の作用が若干異なっているものの両者共に増殖促進的に働くことを明らかにしており、今後、*smg* p21 と *ras* p21 の生理機能と作用機構を理解するには、NIH 3T3細胞と Swiss 3T3細胞のように *smg* p21 の作用の異なった種類の細胞において、それぞれの低分子量G蛋白質を解析することが重要であることを示唆している。以上、本研究者の研究は Swiss 3T3細胞において、*smg* p21 と *ras* p21 の作用が若干異なっているものの両者共に増殖促進的に働くことを初めて明らかにしたものであり、価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。