



Translocation of Ki-ras p21 between membrane and cytoplasm by smg GDS

河村, 元博

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1726

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001726>

※ 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)	かわむらもとひろ 河村元博	(岐阜県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博ろ第1349号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成5年3月22日	
学位論文題目	Translocation of <u>ki-ras</u> p21 between membrane and cytoplasm by <u>smg</u> GDS <u>smg</u> GDSによるKi- <u>ras</u> p21の細胞膜から細胞質への移動	
審査委員	主査 教授 高井 義 美 教授 片岡 徹 教授 前田 盛	

論文内容の要旨

〔序文〕

PDGFなどの細胞増殖因子がその細胞膜受容体に作用すると、ras がん遺伝子産物 (ras p21)がGDP結合型の不活性型からGTP結合型の活性型に変換されることから、ras p21が細胞増殖因子のシグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。最近、私共の研究室ではras p21のGDP/GTP交換反応を促進する蛋白質、smg GDSを見出し、そのcDNAをクローニングしており、smg GDSが細胞増殖因子の受容体と共役してras p21を活性化すると考えている。一方、ある種の線維芽細胞に細胞増殖因子を作用させるか、GTP結合型のras p21を導入するとMAPキナーゼが活性化されることが報告されている。最近、私共の研究室ではツメガエル卵の細胞質画分からras p21依存性にMAPキナーゼを活性化するのに必要な蛋白質因子(REKS)を見出している。したがって、活性化されたras p21は細胞質に存在する標的蛋白質(REKS)を活性化してシグナルをMAPキナーゼに伝達すると考えられる。しかし、ras p21は通常細胞膜に局在しており、ras p21が細胞質に広く存在する標的蛋白質を効率よく活性化するとは考えにくく、活性化されたras p21が細胞質に一部遊離されて標的蛋白質を活性化する可能性が出てきた。

一方、私共の研究室ではsmg GDSがKi-ras p21以外の低分子量GTP結合蛋白質 rap1 p21、rho p21、rac p21にも作用することを明らかにしている。さらに、smg GDSがrap1 p21のGDP/GTP交換反応を制御するのみならず、rap1 p21の細胞膜から細胞質への遊離を促進することも見出している。そこで、本論文では、smg GDSがKi-ras p21の細胞膜から細胞質への遊離を促進するか否かについて検討した。

〔実験方法〕

・材料

Ki-ras p21 はバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞の膜画分より精製した。smg GDS は smg GDS を発現させた大腸菌より精製した。赤血球膜はヒト赤血球を低張処理で溶血した後、膜画分を調整した。smg GDS、c-Ki-ras p21、c-Ki-ras p21 の cDNA を SR α のプロモーターを持ったベクター (PC EV 4) に組み込み、発現プラスミドを作製した。

・Ki-ras p21 と赤血球膜の結合

GTP γ S と結合した Ki-ras p21 を smg GDS 存在下に赤血球膜と 4℃ で 5 分インキュベートし、遠心分離後、上清と沈査に存在する Ki-ras p21 をイムノブロット法で定量した。

・Ki-ras p21 の赤血球膜からの解離

上記の方法であらかじめ Ki-ras p21 を結合させた赤血球膜を調整した。この赤血球膜と smg GDS を 4℃ で 5 分間インキュベートし、遠心分離後、上清と沈査に存在する Ki-ras p21 をイムノブロット法で定量した。

・COS 7 細胞における Ki-ras p21 および smg GDS の発現

Ki-ras p21、Ki-ras^{v^a112} p21、smg GDS の発現プラスミドを DEAE デキストラン法で COS 7 細胞にトランスフェクションした。その後、COS 7 細胞を回収して破砕し、細胞膜画分と細胞質画分に遠心分離した。細胞膜画分と細胞質画分に存在する Ki-ras p21 をイムノブロット法で定量した。一方、同様の条件でトランスフェクションした細胞を ³²P i で標識した後、Ki-ras p21 を免疫沈降させ、Ki-ras p21 に結合している GDP と GTP の量比を測定した。

〔実験結果〕

Ki-ras p21 を赤血球膜とインキュベートすると、約 80% の Ki-ras p21 は赤血球膜に結合した。しかし、smg GDS は用量依存性に Ki-ras p21 の赤血球膜への結合を阻害した。一方、あらかじめ Ki-ras p21 を結合させた赤血球膜に smg GDS を作用させると、Ki-ras p21 は smg GDS の用量依存性に赤血球膜から遊離して上清に回収された。

COS 7 細胞に Ki-ras p21 発現プラスミドをトランスフェクションすると、約 75% の Ki-ras p21 が細胞膜画分に回収され、残り 25% が細胞質画分に回収された。一方、Ki-ras p21 発現プラスミドと smg GDS 発現プラスミドを同時にトランスフェクションすると、約 50% の Ki-ras p21 が細胞膜画分に回収され、残りの 50% が細胞質画分に回収された。同様の条件下で、Ki-ras p21 に結合しているグアニンヌクレオチドの量比を解析したところ、Ki-ras p21 を発現させた COS 7 細胞では大部分が GDP 結合型であったが、Ki-ras p21 と smg GDS を同時に発現させた COS 7 細胞では、ras p21 の GTP 結合型が明らかに増加していた。なお、Ki-ras^{v^a112} p21 を発現させた細胞では、約 60% が GTP 結合型であった。これはすでに ras^{v^a112} p21 について報告されている結果とよく一致していた。

〔考察〕

今回の無細胞系および細胞系の実験結果から、smg GDSがKi-ras p21の細胞膜からの遊離を促進することが明らかになった。さらに、smg GDSが細胞レベルでもKi-ras p21のGDP/GTP交換反応を促進することが明らかになった。したがって、smg GDSは単にKi-ras p21をGDP結合型からGTP結合型に変換して活性化させるのみならず、Ki-ras p21を細胞膜から細胞質に遊離させると考えられる。

従来、ras p21が細胞膜に局在することから、ras p21の標的蛋白質は細胞膜に存在すると推定されてきた。実際、出芽酵母のRAS蛋白質の標的蛋白質であるアデニレートシクラーゼは細胞膜に存在している。しかし、最近、私共の研究室で見出されたras p21の標的蛋白質REKSは細胞質に存在している。ras p21は標的蛋白質に結合して標的蛋白質を活性化すると考えられるので、細胞膜のras p21が細胞質のREKSを効率よく活性化するとは考えにくい。今回の実験結果から、smg GDSはKi-ras p21を活性化すると共に細胞質に遊離させ、Ki-ras p21をREKSにトランスファーして効率よく活性化するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

生体内にはras p21に代表される低分子量GTP結合蛋白質（G蛋白質）が多数存在しており、細胞の増殖、分化などの種々の細胞機能の制御に関与していることが明らかになりつつある。これらの低分子量G蛋白質にはGDP結合型の不活性型とGTP結合型の活性型があり、不活性型から活性型への変換はGDP/GTP交換反応によって、活性型から不活性型への変換はGTPase反応によって行われている。最近、これらの調節蛋白質の一つとして、Ki-ras p21のGDP/GTP交換反応を促進するGDP解離促進蛋白質（smg GDS）が本研究室で見出されている。本研究者は、この蛋白質がKi-ras p21の細胞膜から細胞質への移動を促進することを証明するために以下のような解析を行っている。まず、in vitroの系でKi-ras p21をsmg GDSとインキュベートしたあと赤血球膜を加え、膜画分と細胞質画分のKi-ras p21量を測定している。その結果、smg GDSが用量依存性にKi-ras p21の赤血球膜への結合を阻害することを明らかにしている。また、あらかじめKi-ras p21を結合させた赤血球膜にsmg GDSを加えて遊離してくるKi-ras p21を定量している。その結果、Ki-ras p21がsmg GDSの用量に依存して赤血球膜から遊離することを明らかにしている。次にKi-ras p21発現プラスミドとsmg GDS発現プラスミドをトランスフェクションしたCOS7細胞の膜画分と細胞質画分のKi-ras p21を定量している。その結果、smg GDSを発現させることによって細胞質画分に回収されるKi-ras p21が増加することを明らかにしている。さらに、この際、smg GDSがKi-ras p21のGDP/GTP交換反応を促進していることも明らかにしている。

本研究は、smg GDSがin vitroでもin vivoでもKi-ras p21の細胞膜から細胞質への移動を促進することを初めて示し、ras p21を介する細胞内情報伝達系におけるsmg GDSの役割について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。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。