Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

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）　河村元博（かわむらもとひろ）　（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 ki-ras p21 between membrane and cytoplasm by smg GDS

smg GDSによるKi-ras 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SRαのプロモーターを持ったベクター（PCEV4）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

GTPγS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。

・COS7細胞におけるKi-ras p21およびsmg GDSの発現

Ki-ras p21、Ki-ras^{val12} p21、smg GDSの発現プラスミドをDEAEデキストラン法でCOS7細胞にトランスフェクションした。その後、COS7細胞を回収して破粋し、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^{32}Pi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。

COS7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COS7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COS7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^{val12} 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^{val12} 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。