

Title	Ras and calcium signaling pathways converge at Raf1 via the Shoc2 scaffold protein( Abstract_要旨 )
Author(s)	Yasuda(Yoshiki), Sayaka
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2011-03-23
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/142105">http://hdl.handle.net/2433/142105</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

京都大学	博士 ( 医学 )	氏名	安田 (吉木) さや香
論文題目	<b>Ras and calcium signaling pathways converge at Raf1 via the Shoc2 scaffold protein</b> (Ras とカルシウムのシグナルは、Raf1 において Shoc2 を介して合流する)		
(論文内容の要旨) <p>Ras/Raf/MEK/ERKシグナル伝達系は、細胞のがん化にきわめて重要な役割を果たすことが知られており、細胞の増殖や分化を制御している。上皮増殖因子 (EGF) の刺激により活性化されたレセプターは各種のアダプター分子を細胞膜へリクルートし、Rasのグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) を細胞膜へと局在化させる。活性化されたRasはRaf1を原形質膜へ動因し、活性化したRaf1からその下流にあるMEK、ERKへとシグナルが伝わる。</p> <p>これまでの多くの研究成果により、がんでは上述のシグナル伝達系を構成する因子群を始めとして、様々な遺伝子に変異が起きていることがわかってきた。しかし、これら遺伝子の異常がどのように無秩序な細胞増殖を導くのかは未だによく理解されていない。この原因として、増殖因子により誘導されるシグナル伝達経路は多岐にわたり、複雑に入り組んでいることが挙げられる。個々の分子の影響が広汎にわたることで、因子間の関係性を探ることが困難となっているのである。また、既存のがん研究は“細胞をシステムとして理解する”という明確な意思をもっていなかったために、細胞内の“いつ・どこで”分子活性が変化するかという定量的な時空間情報が不足していた点も挙げられる。これらの問題点を解消すべく、特定の蛋白だけを活性可能な、合成 GEF を利用した実験系を構築すると共に、蛋白の活性を生きた細胞でリアルタイムに観察できる蛍光蛋白を使ったバイオセンサーを開発、利用することで、細胞増殖シグナル伝達系のシステムの理解を試みた。</p> <p>cAMP依存性Rap1 のGEFであるEpacのGEFドメインをRasのGEFドメインに置換したeGRFを作成し、発現細胞株HeLa-eGRF細胞を樹立した。この細胞を特異的なcAMPアナログ (007) で刺激したところ、Rasは007によってEGFで刺激した場合と同程度まで効率的に活性化したが、Raf1、MEK、およびERKの活性化はEGFによる活性化の約半分に留まった。そこで、007によるERK活性化は阻害しないが、EGF依存性のERK活性化を阻害する薬剤を探索したところ、PLCの阻害剤であるU73122 が得られた。また、PLCの下流に位置するPKCの阻害剤Gö6983 によって、EGF依存性のERK活性化が阻害されなかったことから、007によるERK活性化にはカルシウムが必要であると考えた。カルシウムの影響を確認するために、この細胞株を007と同時にカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンで刺激したところ、ERKのリン酸化はEGF刺激時と同等の値を示した。</p> <p>次に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づくバイオセンサーを使用して、Raf1 の原形質膜への動因および構造変化を観察したところ、Raf1 の活性化には Ras の活性だけではなく、ERK のリン酸化同様に細胞内カルシウム濃度の増加および、カルモジュリンの抑制を必要としていることがわかった。さらに、カルシウム依存性の Raf1 の活性化は Ras と Raf1 の足場タンパク質である Shoc2 のノックダウンによって解除されることがわかった。</p> <p>これらの結果から、Shoc2 がカルシウムおよびカルモジュリン依存的に、Ras を介した Raf1 の活性化を調節していることが示された。</p>			

以上、合成 GEF や FRET バイオセンサーを活用することで、細胞増殖シグナル伝達系の詳細を明らかにできたことは、シグナル伝達機構におけるシステム特性の理解を深めるにあたり、これら手法の有用性を示している。

(論文審査の結果の要旨)

Ras/Raf/MEK/ERK シグナル伝達系は、上皮細胞増殖因子 (EGF) により活性化され、細胞の増殖や分化を制御している。また、このシグナル伝達系の恒常的な活性化は、細胞がん化にもきわめて重要な役割を果たす。しかし、このシグナル伝達系の活性は様々な情報伝達系のクロストークによって制御されているために、その正確な制御機構については未知の点が多く残されている。

申請者は、まず、Ras のみを特異的に活性化する実験系を用いて、EGF による Raf1 と ERK の活性化には Ras の活性化のみでは不十分であり、EGF により活性化されるホスホリパーゼ C 依存的な Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が必要であることを示唆する結果を得た。すなわち、この実験により EGF の下流に Ca<sup>2+</sup>依存的な Raf1 の活性増強機構が存在することが示唆された。さらに、この Ca<sup>2+</sup>依存的な Raf1 の活性増強機構は、Ras と Raf1 の足場タンパク質である Shoc2 が必要であること、Ca<sup>2+</sup>依存性は Calmodulin による Ras と Shoc2 の結合阻害が原因であることなどが示唆された。

以上の実験結果を踏まえ、申請者は EGF 刺激による Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇は Calmodulin の Ras からの解離を誘導し、それが Ras と Shoc2 との結合を可能とし、続いて Shoc2-Ras 複合体が Raf1 へ効率的にシグナルを伝達するというモデルを提唱した。この結果は、Ca<sup>2+</sup>濃度と足場タンパク質 Shoc2 の機能とに関連があることを示し、Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達系と Ras/Raf/MEK/ERK シグナル伝達系のクロストークのメカニズムを解明する手がかりを与えたものと言える。

以上の研究は、細胞がん化を制御する Ras/Raf/MEK/ERK シグナル伝達系の解明に貢献し、それらの制御を目的とした治療法の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 ( 医学 ) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成23年2月15日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降