

延研257

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4 as a Putative Effector of Rap2 to Activate the c-Jun N-terminal Kinase.

(Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 4 は Rap2 の
標的分子として c-Jun N-terminal Kinase を活性化する)

氏 名 町 田 典 子 

(目的)

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap2 は、 *ras* 癌遺伝子産物 (Ras) の類縁分子であり、もう一つの類縁分子 Rap1 と同様に、 Ras の標的分子の殆どと結合する。一方、 Ras と Rap1 の標的分子結合領域が全く同一であるのに対し Rap2 のそれはアミノ酸残基が 1 つ異なっている

(F39)。従って、 Rap2 にのみ特異的に結合する標的分子が存在する可能性があり、 Rap2 はそれを介して Ras とは異なる独自のシグナル伝達経路を制御する可能性がある。今回我々は Rap2 の未知の特異的標的分子を検索し、その下流シグナル伝達経路について解析した。

(方法)

Rap2 に特異的に結合する分子を発見するため、酵母 Two-hybrid 法によりヒト胎児脳 cDNA ライブラリーの約 470 万クローンをスクリーニングした。得られた分子と Rap2 の結合の特異性と結合の分子機構は、酵母 Two-hybrid 法と組替え蛋白質同士の試験管内結合実験で検討

した。また、両者の細胞内局在部位の異同は、培養細胞での強制発現の後、免疫蛍光染色法により検討した。さらに、両者により制御される下流シグナル伝達経路として、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を、抗活性化型 JNK 抗体によるウエスタンブロット解析および免疫沈降キナーゼアッセイにより検討した。

(結果)

スクリーニングの結果、mitogen-activated kinase kinase kinase kinase 4 (MAP4K4) をコードするクローンが得られた。MAP4K4 は Ras、Rap1 には結合せず、Rap2 とのみ特異的に結合した。結合の分子機構としては、MAP4K4 の C 末端に存在する CNH ドメインが、Rap2 の GTP 結合型コンフォメーションにおける F39 を認識していることが判明した。また、細胞内局在部位の解析では、Rap2 を単独で発現させた場合は核周辺に、MAP4K4 を単独で発現させた場合は細胞質全体に局在が認められた。

両者を共発現させると、MAP4K4 が核周辺に移行し、両者の局在が一致した。MAP4K4 は下流シグナル伝達経路として JNK の活性化を引き起こすことが報告されているが、

MAP4K4 単独発現による JNK の活性化は僅かであった。しかし、MAP4K4 と Rap2 を共発現させると、JNK の活性化は相乗的に増強した。

(考察)

以上の結果は MAP4K4 が Rap2 の特異的標的分子として JNK の活性化を制御することを示しており、Rap2 が Ras、Rap1 とは異なる独自のシグナル伝達機能を持つことが明らかとなった。MAP4K4 は脳腫瘍、肺癌、乳癌、卵巣癌、腎癌、皮膚癌等の多数のヒト癌細胞で過剰発現が認められており、Rap2 は MAP4K4 を制御することにより癌細胞の悪性形質に関与する可能性がある。

平成 17 年 2 月 7 日

(別紙様式第 7 号)

論文審査結果の要旨 (1)

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	町田 典子
論文審査委員	審査日	平成 17 年 2 月 3 日	
	主査教授	野中 竜雄	(野中印)
	副査教授	陣野 吉廣	(陣野印)
	副査教授	田中 裕大	(田中印)

(論文題目)

Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase 4 as a Putative Effector of Rap2 to Activate the c-Jun N-terminal Kinase

(論文審査結果の要旨)

上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。

1. 研究の背景と目的

Rap2 は癌遺伝子産物 Ras の類縁分子であり、Ras と同様に細胞の癌化や癌細胞の悪性形質に関与すると考えられている。Ras は、Raf などの複数の標的分子と物理的に結合し、これらを活性化することで細胞増殖シグナルを伝達する。Rap2 は Ras の標的分子群と結合することから、Ras と同じシグナルを伝達すると推測されていた。

しかし、Rap2 と Ras では、標的分子との接触面を形成する 9 アミノ酸残基 (標的分子結合領域) のうち 1 アミノ酸残基が異なる。このことから、著者らは「既知の Ras 標的分子ではない Rap2 特異的標的分子が存在する」との仮説を立てて未知の Rap2 標的分子を探索し、それを介する新しいシグナル伝達経路を解析した。

2. 研究内容

Rap2 特異的標的分子を発見するため、蛋白質分子間相互作用を検出する分子遺伝学的手法 (Yeast Two-Hybrid システム) を用いて、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーの約 460 万クローンをスクリーニングした。その結果、これまで知られて

- 備考 1 用紙の規格は、A 4 とし縦にして左横書きとすること。
2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。
3 *印は記入しないこと。

いなかった Rap2 結合分子として、多くの癌細胞で過剰発現している mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP4K4) が単離された。

次に、Rap2 と MAP4K4 の結合特異性とその分子機構を Yeast Two-Hybrid システムと組換え蛋白質同士の試験管内結合実験で検討した。その結果、MAP4K4 は Rap2 と特異的に結合し、Ras やその他の類縁分子には結合しないことが判明した。また、その分子機構として、MAP4K4 の C 末端に存在する活性制御ドメインが、Rap2 の標的分子結合領域に存在する Rap2 特異的アミノ酸残基 (フェニルアラニン 39) を認識して結合することが明らかとなった。

最後に、Rap2 と MAP4K4 を介するシグナル伝達経路を、培養細胞への遺伝子導入による同時発現実験により解析した。その結果、Rap2 と結合して活性化された MAP4K4 は、細胞の分化やアポトーシスに関与する MAP キナーゼである c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化することが判明した。

以上の結果から、MAP4K4 が Rap2 の特異的標的分子として JNK を制御することが明らかとなり、Rap2-MAP4K4-JNK という従来未知であったシグナル伝達経路が癌細胞の悪性形質に関与する可能性が示唆された。

3. 研究結果の意義と学術水準

本研究は Ras 類縁分子である Rap2 の特異的標的分子を初めて同定し、Rap2 により制御される新しいシグナル伝達経路を明らかにしたものであり、細胞の癌化や癌細胞の悪性形質に関する Ras 類縁分子の役割を解明する端緒となる有意義で高い水準にある研究と考えられる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。