

医研 245

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

The Traf2- and Nck-interacting Kinase as a Putative Effector of Rap2 to Regulate Actin Cytoskeleton.

(Traf2- and Nck-interacting Kinase は Rap2 の標的分子としてアクチン細胞骨格を制御する)

氏 名 平良清  印

(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、ラット脳から Rap2 結合分子をアフィニティー精製し、得られた分子を質量分析・アミノ酸配列解析により同定した。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により検討すると共に、アクチン細胞骨格の再編成による細胞形態の変化を定量解析した。

(結果)

約 155kDa の蛋白質を精製し、質量分析・アミノ酸配列解析により Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) と同定した。TNIK 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、TNIK 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 を認識することが判明した。細胞内局在解析では、Rap2 を単独で発現させると核周辺に、TNIK を単独で発現させると細胞質全体に

局在した。両者を共発現させると、TNIK が核周辺に移行し、両者の局在が一致した。TNIK 発現細胞では JNK の活性化が引き起こされたが、加えて Rap2 を共発現させても JNK の活性化は増強されなかった。一方、TNIK 単独発現による細胞形態変化は僅かであったが、Rap2 を共発現させると相乗的に形態変化が増強され、細胞の基質への接着・伸展が阻害された。

(考察)

以上の結果は TNIK が Rap2 の特異的標的分子としてアクチン細胞骨格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。TNIK は多数のヒト癌細胞で過剰発現が認められる MAP4K4 の類縁分子であり、Rap2 は TNIK を制御することにより癌細胞の転移能などに関与する可能性がある。

(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	平良 清人
論文審査委員	審査日	平成 17 年 2 月 3	
	主査教授	小川由英	
	副査教授	陣野吉廣	
	副査教授	田中龍夫	
(論文題目)			
The Traf2- and Nck-interacting Kinase as a Putative Effector of Rap2 to Regulate Actin Cytoskeleton			
(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			
低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap2 は、 <i>ras</i> 癌遺伝子産物 (Ras) をプロトタイプとする Ras ファミリーに属する。Rap2 が Ras の標的分子の殆どと結合することから、従来 Rap2 は Ras と同じシグナル伝達経路に作用すると考えられていた。しかし、Rap2 と Ras の標的分子結合領域はアミノ酸残基が 1 つ異なることから、このアミノ酸残基 (フェニルアラニン 39) を認識して 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る。著者らは Rap2 の未知の特異的標的分子を検索し、特異的標的分子の Rap2 による制御について解析した。			
2. 研究内容			
Rap2 をリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより、ラット脳から約 155 kDa の蛋白質 (p155) を精製した。p155 は Rap2 に結合するが Ras には結合せず、Rap2 の特異的標的分子候補と考えた。			
p155 を同定するため、p155 をトリプシンで消化して得たペプチドを質量分析・アミノ酸配列解析に供し、プロテオームデータベースと照合した。その結果、p155 は Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK: 腫瘍壊死因子受容体アダプター蛋白			

- 備考 1 用紙の規格は、A4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。

質 Traf2 と細胞増殖因子受容体アダプター蛋白質 Nck の両方に結合するプロテインキナーゼ) と判明した。

ラット脳由来 p155 と同様に、ヒト TNIK の組換え蛋白質も、Rap2 に特異的に結合した。ヒト TNIK と Rap2 の結合の分子機構を酵母 Two-hybrid 法と試験管内結合実験で検討したところ、TNIK の活性制御ドメインが、Rap2 のフェニルアラニン 39 を認識して結合することが明らかとなった。

TNIK はアクチン細胞骨格に作用して細胞の形態変化を引き起こすと報告されていたが、培養細胞に TNIK を単独で遺伝子導入して発現させた際の細胞形態の変化は軽微であった。しかし TNIK と Rap2 を同時に強制発現させると、著明な形態変化を生じ、細胞の基質への接着・伸展が抑制された。この表現型は TNIK のキナーゼ活性に依存しており、Rap2 により引き起こされた TNIK の自己リン酸化と、自己リン酸化された TNIK の細胞骨格画分への移行を伴っていた。以上の結果から、TNIK は Rap2 の特異的標的分子として、アクチン細胞骨格を制御すると結論した。

3. 研究結果の意義と学術水準

本研究は Ras ファミリーに属する Rap2 の新しい特異的標的分子を同定し、Rap2 によるアクチン細胞骨格制御に関わる新しいシグナル伝達経路の存在を初めて明らかにしたものである。本研究は Ras 以外の Ras ファミリー分子がアクチン細胞骨格に作用して癌細胞の浸潤・転移に関与する可能性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。