

Ha-ras致癌基因產物(Ha-ras p21)的羧基端胺基酸序列影響膽固醇合成中間物質對其轉譯後的修飾作用

林玉玲

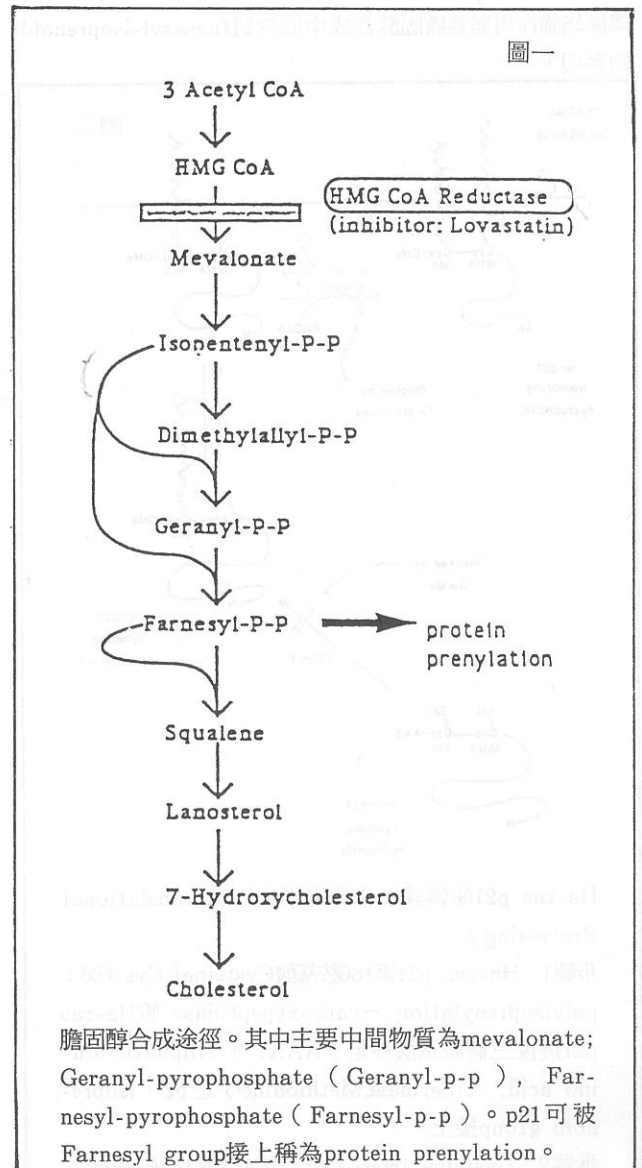
本院生化學科

摘要

Ha-ras致癌基因產物 (Ha-ras p21) 與細胞漿膜接合 (associated with plasma membrane) 之後成為成熟的p21 (m-p21), 才能影響細胞的分化或進而使細胞轉形 (transform) 成為癌細胞, 研究發現ras protein的羧基端倒數第一個胺基酸為絲胺酸 (Serine) 或甲硫胺酸 (Methionine) 時可被15碳的膽固醇合成中間產物 (15C farnesyl isoprenoid) 所轉譯後修飾 (posttranslational modification), 當以基因定點突變方法 (site-directed mutagenesis) 將ras protein羧基端倒數第一個胺基酸 serine 或methionine改變為白胺酸 (Leucine) 時, 則ras-protein可被-20碳的geranylgeranyl isoprenoid所修飾。ras-protein之後再被palmitate修飾 (palmitoylation) 才成為成熟的p21 (m-p21)。因此若能瞭解ras protein的轉譯後修飾作用受到那些因素控制, 則將可作為抑制ras致癌基因的研究方向。

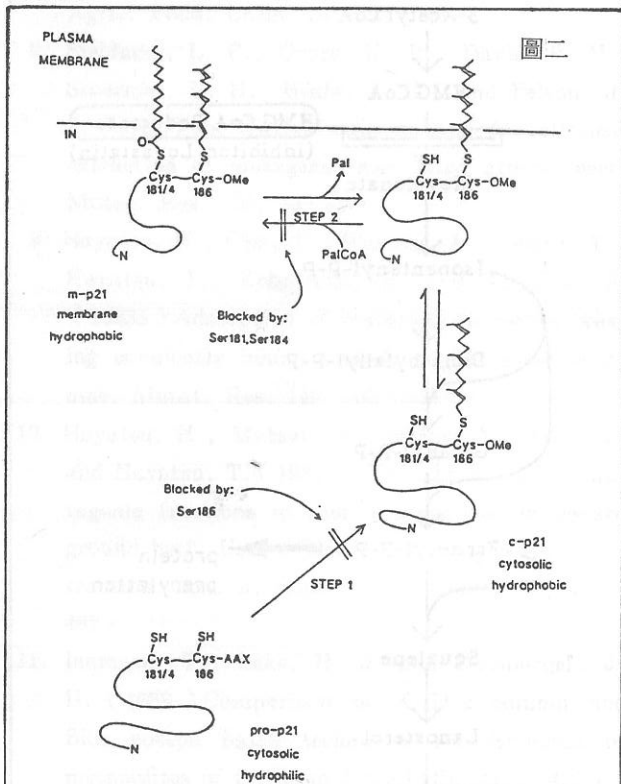
一、前言

Ha-ras gene為能使老鼠產生Harvey Sarcoma的ras-gene, 其蛋白質產物為Ha-ras p21, 其羧基端胺基酸的序列為Cys-Ali-Ali-Ser/or Met-COOH。Ha-ras p21被發現與真核細胞中多種含Cysteine residue結構之蛋白質一樣, 均可被15碳的farnesyl isoprenoid所修飾, 進而再發生palmitoylation使ras-p21能穩定與GTP接合; 此farnesyl isoprenoid (如farnesyl pyrophosphate) 為膽固醇合成中間物質 (見圖一), 因此膽固醇的合成過程與Ha-ras p21的轉譯修飾作用已被證實。而Ha-ras p21的胺基酸序列改變是否會影響其posttranslational modification或palmitoylation則為本篇主要的探討內容。



二、Ha-ras p21被膽固醇合成中間物質farnesyl isoprenoid所修飾的過程

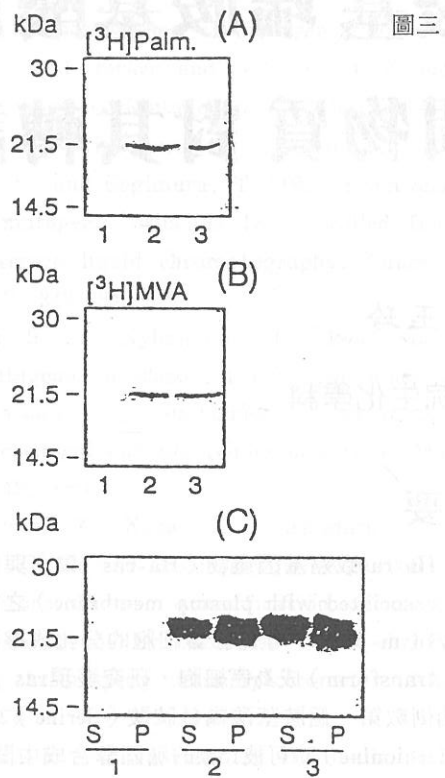
Ha-ras p21於羧基端倒數第四個胺基酸一半胱胺酸 (Cysteine) 的位置可被15C的膽固醇合成中間物質 (farnesyl isoprenoid) 接上, 其後步驟如下(1)最末端3個胺基酸切斷後, 倒數第四個胺基酸Cysteine被Methylation而farnesyl group接上 (形成cytosolic p21即c-p21) (2)再被palmitic acid接上 (palmitoylation), 成為成熟而更穩定的p21 (m-p21) (見圖二)。m-p21接上GTP後開始影響細胞的分化, 展現其致癌基因的活性。曾有研究以純化的p21 farnesyltransferase證明此酵素能辨認的即是含有Cys-Ali-Ali-Ser/或Met之結構。因此Ha-ras p21的轉譯後修飾作用需要膽固醇合成中間物質farnesyl-isoprenoid的參與。



Ha-ras p21的轉譯後修飾過程 (Posttranslational Processing)

步驟1: Ha-ras p21第186胺基酸Cysteine (Cys 186) polyisoprenylation - carboxypeptidase 將Ha-ras p21最後三個胺基酸移走 (AAX; A:Aliphatic amino acid, X:Serine或Methionine) 之後, isoprenoid group接上。

步驟2: Cysteine 186的上游 (第181或184胺基酸) 接至plasma membrane上的palmitic acid (palmitoylation) 可使p21更穩定, 稱為mature p21。



以 $[^3\text{H}]$ palmitate 標示所得的Ha-ras p21分佈結果顯示。lanes 1, lanes 2, lanes 3分別為COS細胞植入pCMV5 expression vector作為control組所得的ras protein (lanes 1); 植入pCMV5-Ha ras (wide type) 所得的ras protein product (lanes 2); 植入pCMV5-Ha ras (Leu 189) 所得的ras protein。

圖(A)分別將以上三種ras proteins與 $[^3\text{H}]$ palmitate incubation 18小時之後的結果。

圖(B) $[^3\text{H}]$ MVA (mevalonate) incubation 24小時之後的結果。

圖(C)自COS細胞fraction中取得的soluble fraction部份 (lanes S) 及particulate fraction (lanes P)。
 (Soluble fraction中可得到的為cytosolic p21, particulate fraction中可得到的為m-p21)。

三、探討Ha-ras p21的胺基酸序列是否影響其farnesylation

將Ha-ras p21羧基末端胺基酸Ser/或Met定點突變。

許多哺乳類動物細胞羧基末端倒數第四個胺基酸Cysteine位置可被20碳的geranylgeranyl group接上, 而非15碳的farnesyl group, 因此欲探討此二種isoprenoid是否

