

論文の内容の要旨

論文題目

cdk3,cdk5 結合タンパク質 ik3-1/Cables の
類似遺伝子 ik3-2 のクローニングとその解析

指導教官 浅野 茂隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月進学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 佐藤 博子

<背景と目的>

多くのヒト癌細胞では、細胞周期の調節因子の機能異常が認められている。したがって、細胞周期制御の解析が、癌細胞増殖の制御や癌化形質の制御の解明において重要である。細胞周期の重要な制御因子として、サイクリンと cdk (cyclin-dependent kinase)の複合体が知られている。cdk3 は、cyclin E と結合して G1/S 期移行に関与する cdk2 と 76%の相同性を持ち、細胞周期制御に関与すると考えられているが、機能は十分には解明されていない。私達は、cdk3 と結合するタンパク質として ik3-1 (interactor with cdk3-1)を同定している。ik3-1 は C 端側に cyclin box 類似の構造を持つ新規のタンパク質である。この ik3-1 は、Zukerberg らによっても、c-abl や神経特異的な cdk である cdk5 に結合するタンパク質 Cables (cdk5 and Abl enzyme substrate)としてクローニングされた。Zukerberg らは、ik3-1/Cables が cdk5 の c-abl によるチロシンリン酸化を増強し、cdk5/p35 キナーゼ活性を高めることで、神経細胞の成長に関与することを報告している。

ik3-1 の塩基配列を用いて EST のデータベースやヒトゲノムの塩基配列情報を検索すると類似の遺伝子の存在が示唆された。そこで、今回の研究では、ik3-1 をプローブとし

たマウス cDNA ライブラリーのスクリーニングと RT-PCR により、その ik3-1 類似の cDNA をクローニングし、ik3-2 (interactor with cdk3-2)と名付け、その特徴を解析した。

<実験方法>

マウスマクロファージ cDNA ライブラリーを用いて、低い stringency の条件で、ik3-1 の cDNA をプローブとしたハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。次に、それによって得られた ik3-1 類似の cDNA の一部をプローブとして、B16 (マウスメラノーマ細胞株) cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。最後に、5' RACE により全翻訳領域を含む cDNA をクローニングし、ik3-2 と名付けた。

マウスの各組織の Poly A-RNA をナイロン膜に転写し、ik3-2 の cDNA の一部をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行い、発現パターンを調べた。また、ik3-2 の N 端を認識するウサギポリクローナル抗体を作成し、マウス脳組織での内在性 ik3-2 タンパク質の発現を調べた。

COS7 細胞に ik3-2 と cdk3、cdk5、c-abl を共発現させ、免疫沈降、またはプルダウン実験により ik3-2 タンパク質とそれぞれのタンパク質の結合を調べた。また、ik3-2 タンパク質の N 端側の部分のみと C 端側の部分のみを発現する欠失体を作成し、cdk5 タンパク質との結合領域を検討した。

<結果>

マウスマクロファージおよび B16 の cDNA ライブラリーのスクリーニングと 5'RACE により、ik3-2 の cDNA を単離した。ik3-2 は、481 残基のアミノ酸をコードしており、アミノ酸配列では ik3-1 と 47% の類似性がある。ik3-2 の C 端側は、ik3-1 と相同性が高く(約 90%)、cyclin box 類似の領域があるが、N 端側は ik3-1 との相同性は低い(約 30%)。

ノーザンプロット解析で ik3-2 はマウスの様々な組織で発現がみられた。発現量は各組織ではほぼ同程度であったが、胃と皮膚ではサイズの異なるバンドがみられ、alternative polyadenylation や alternative splicing の可能性が考えられた。

内在性 ik3-2 タンパク質の確認のため、ik3-2 の N 端抗体を用いたマウス脳組織の免疫沈降実験を行った。リコンビナント ik3-2 を COS 7 細胞に発現させたものを比較に用いたところ、リコンビナントと内在性の ik3-2 は同じサイズのバンドとして検出された。

ik3-1 は cdk3、cdk5、c-abl と結合することが知られているので、ik3-2 タンパク質とこれらのタンパク質との結合を調べた。COS 7 細胞に ik3-2 タンパク質と cdk3 や cdk5 タンパク質を共発現させて行った免疫沈降実験で、cdk3、cdk5 の両者とも ik3-2 に結合した。cdk3 は ik3-2 より ik3-1 に強く結合し、cdk5 は ik3-1、ik3-2 と同程度に結合した。また、ik3-2 の cdk5 と結合する領域を調べるため、ik3-2 の N 端側のみを発現する欠失体と C 端側のみ

を発現する欠失体を用いたプルダウン実験を行った。cdk5 は ik3-2 の全長と C 端側に結合し、N 端側には結合しなかった。GST 融合 ik3-2 タンパク質と c-abl タンパク質を共発現させて、プルダウン実験を行うと、ik3-2 に c-abl は結合した。

以上の結果から、(1) ik3-2 は cdk3 と結合するが、ik3-1 と cdk3 の結合と比較すると弱い、(2) ik3-2 は cdk5 と C 端側で結合する、(3) ik3-2 は c-abl と結合する、ことがわかった。

<考察>

マウス ik3-1 と ik3-2 はアミノ酸配列に相同性があり、両者は ik3 遺伝子ファミリーを構成していると考えられる。ヒトゲノムのデータベースによると、ik3-1、ik3-2 それぞれの相同遺伝子と思われるものが1つずつ存在する。ショウジョウバエでは ik3 に相同な遺伝子は1つだけなので、哺乳類でみられる ik3-1 と ik3-2 は同じ遺伝子から派生したものと考えられる。ik3-1 と ik3-2 は、その一次構造の類似性から、類似した機能を持つと予測される。ik3-1、ik3-2 とともに cdk3、cdk5、c-abl と結合するという実験結果は、この考えと一致する。

ik3-1/Cables は脳組織において、cdk5、c-abl と結合し、c-abl による cdk5 のリン酸化を強めるアダプター因子として働き、神経の伸長に関与していると報告されている。ik3-2 も cdk5、c-abl と結合することから、脳、神経組織では同様の機能を持つことが予測される。一方、神経細胞以外の増殖の盛んな組織では、cdk5 の活性を制御する p35 タンパク質が存在しないため、cdk5 は不活性の状態であるので、ik3 ファミリー/cdk5/c-abl という組み合わせでは機能していないと考えられる。ik3-1 の発現は、脳、神経組織で主にみられるが、ik3-2 は脳、神経組織以外でも同程度の発現がみられることから、ik3-2 は神経組織以外で主に機能している可能性がある。

私達の研究では、ik3 ファミリーは p53、p73 とともに結合することが判明している。また、p53 による G1 期停止、p73 によるアポトーシスにおいて c-abl が重要な働きをしていることが知られている。このことから、ik3 ファミリーは p53/c-abl、および p73/c-abl、と複合体を形成するアダプター因子として働くことにより、神経以外の組織でも細胞周期制御などに関与している可能性が考えられる。

ik3 ファミリーはアダプター因子として働いている可能性があるが、ik3-2 は ik3-1 と N 端構造が大きく異なるので、N 端には異なるタンパク質が結合することが予測される。結合タンパク質の違いによって、ik3-2 は ik3-1 と異なる働きを示すことも考えられる。今後は、ik3-2 の N 端側に特異的に結合するタンパク質を調べるのが、ik3-2 の機能解析において重要であると思われる。