

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 博子

細胞周期制御に関与すると考えられている cdk3 に結合するタンパク質として ik3-1/Cables が同定されているが、本研究は、その類似遺伝子のクローニングと解析をおこなったものであり、下記の結果を得ている。

- 1: 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、ik3-1/Cables の類似遺伝子 ik3-2 (interactor with cdk3-2) の cDNA を単離した。ik3-2 は、481 残基のアミノ酸をコードし、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%)。ヒトゲノムのデータベースによると、ik3-1 は 18 番染色体に、ik3-2 は 20 番染色体に相同な遺伝子が存在する。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。
- 2: 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。発現量は各組織でほぼ同程度であった。ik3-1/Cables は脳・神経組織において主に発現し、cdk5、c-abl と結合し、神経の伸長に関与すると報告されている。それに対して、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、神経組織以外で機能している可能性がある。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。

- 3: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。これにより、クローニングされた ik3-2 cDNA は ik3-2 遺伝子のコーディング部分のほぼ全長を含んでいると考えられた。
- 4:免疫沈降実験やプルダウン実験を行い、ik3-1 と同様に、ik3-2 も cdk3、cdk5、c-abl と結合することがわかった。ただし、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 の欠失体を用いたプルダウン実験で、cdk5 との結合責任領域は cyclin box を含む C 端側であることがわかった。
- 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。ik3-1/Cables は主に N 端で c-abl と結合することが報告されている。今回の実験結果から、ik3 ファミリーは N 端で c-abl と結合し、C 端で cdk5 と結合することで、c-abl、cdk5 間の相互作用を促進していると考えられた。
- 5: ik3 ファミリーは p53、p73、TRAP、PCTAIRE2 とともに結合することが判明している。神経以外の組織では、これらのタンパク質と複合体を形成し、アダプター因子として働くことで細胞周期制御などに関与している可能性が考えられる。

以上、本論文は ik3-2 の cDNA のクローニングと、タンパク相互作用の解析を行ったもので、ik3-2 と ik3-1 との相違を明らかにした。癌細胞の増殖メカニズムの解析において、細胞周期制御因子の解析が重要であるが、cdk3 など機能が十分明らかになっていないものが多い。本研究は、細胞周期制御に関与する様々なタンパク質と相互作用をする ik3 ファミリーの解析を通じて、細胞周期制御の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。