OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	核局在化シグナルによって特異的に活性化されるキナーゼの部分精製と性状解析
Author(s)	栗原, 敏修
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065806
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	栗原敏修（くりはらとしなお）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10635 号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	**核局在化シグナルによって特異的に活性化されるキナーゼの部分精製と性状解析**
論文審査委員	（主査） 教授 上田 重晴 （副査） 教授 米田 悦啓　教授 田中亀代次

論文内容の要旨

（目　的）

蛋白質の核移行には核局在化シグナル（Nuclear localization signal:NLS）が必須であることが知られている。NLSはリジン，アルギニンなどの塩基性のアミノ酸に富む，数個のアミノ酸配列からなることが特徴である。本来核移行できない蛋白質にSV40 large T抗原のNLSを含む合成ペプチドを化学的に架橋し，培養細胞にマイクロインジェクションすると核に移行することから，NLSが核移行に必要十分であることが証明されている。一方，SV40 large T抗原のNLSのある特定のリジンをスレオニンに変えた変異型の合成ペプチドを同様に架橋した蛋白質は核に移行できないことから，核移行に係わる核蛋白質輸送装置がNLSを正確に見分け，選択していることになる。

最近，いくつかのNLS結合蛋白質が同定され，そのうちいくつかの蛋白質が核移行に関与することが明らかにされている。また，これらの蛋白質以外の細胞因子の必要性も示唆されている。しかし，細胞質でNLSとNLS結合蛋白質が結合した後，核移行が遂行される過程でどのような反応やステップが必要であるかは全く不明である。また，核移行を考える上で，NLSがNLS結合蛋白質に結合した後の核移行機構の質的変化を評価することはNLS結合蛋白質の機能のみならず，これに関連する核蛋白質輸送装置全体の機能解明にも重要と思われる。そこで本研究ではNLSによって特異的に誘導される細胞内現象を解析することを目的として，さまざまな細胞内反応系の調節に重要な役割を果たす蛋白質の燐酸化に着目しNLSに特異的な細胞内蛋白質燐酸化反応の解析とそれに係わるキナーゼの部分精製，性状解析をおこなった。

（方法ならびに成績）

1．In vivo phosphorylation

Xenopus oocyteに合成ペプチド（SV40 large T抗原の野生型のNLS，及び1つのアミノ酸をリジンからスレオニンに変えた核移行活性を欠く変異型のNLS）をマイクロインジェクションした後，oocyteを^{32}P正燐酸でラベルした。このラベルしたoocyteを可溶化して細胞質抽出液を得た。次に，未分画では燐酸化される蛋白質が多く，解析を容易にするため先の細胞質抽出液をDEAEセファロースゲルを用いて大きく4つに分画した。コントロールとして合成ペプチド溶解に用いた緩衝液をマイクロインジェクションし，同様の操作を行なった。それぞれ分画したサンプルは，SDS電気泳動法で解析した。

SV40 large T抗原のNLSをインジェクションしたoocyteから得られた1つの分画で主として34kDaの蛋白質の

特異的な燐酸化が見られた。これに対し，変異型のNLSをインジェクションしたoocyteの同分画同蛋白質の燐酸化は非常に弱かった。この結果から，in vivoでNLSによって特異的に活性化されるキナーゼの存在が初めて示唆された。

2．In vitro phosphorylation

以下に示す方法で分画したサンプルにその精製途中で得られた基質（34kDa）を含む分画と0.5-0.1mM NLS合成ペプチド（野生型のNLS またはその変異型のNLS）を加え1 μCi^{32} P-γ-ATPを含む10μM ATP，5 mM $MgCl_2$存在下で，30℃，10分間反応させた。反応停止後，反応させたサンプルをSDS電気泳動法にかけて蛋白質の燐酸化を解析した。

in vivo と同様，変異型のNLSでは基質はほとんど燐酸化されず，野生型のNLS存在下で特異的に基質を燐酸化させる分画が得られた。他のNLS（ヌクレオプラスミン，polyoma virus T 抗原）の合成ペプチドでも同様に基質の燐酸化が見られたが，reverse型（アミノ酸配列がSV40 large T抗原の野生型のNLSと逆）や核移行に無関係な合成ペプチド（ラミンBのCの末，ヒストンH2B）では燐酸化は見られなかった。既知のキナーゼの基質としてよく利用される蛋白質（ヒストンH1，プロタミン，ミエリン塩基性蛋白質，カゼイン，フォスビチン）については，これらを燐酸化しなかった。このことから，NLSによって特異的に活性化されるキナーゼが既知のキナーゼと異なる可能性が示唆された。

3．Partial purification of the kinase

Ehrlich腹水癌細胞を可溶化して得られる細胞質抽出液をDEAEセファロースカラム用いて塩濃度0.13M，0.23M，0.53M のステップで分画後30mMの塩濃度の緩衝液で透析し上記のin vitroアッセイを行なった。以下，同様にして，活性のある分画をハイドロキシアパタイトカラムにかけて燐酸濃度75mM，125mM，150mMのステップで分画後，活性のある分画をゲル濾過にかけてキナーゼ分画と基質分画に分けた。最終的に，このキナーゼ分画をHPLC（高速液体クロマトグラフィー）monoQカラムを用いて0.2M-1Mの塩濃度勾配で分画した。

HPLCで分画して得られた最終標品をSDS電気泳動し銀染色すると他の分画にはなくてキナーゼ活性する分画にのみ検出される蛋白質として95kDa，70kDa，65kDaの分子が確認できた。

（総　括）

1．NLS によって特異的に活性化するキナーゼの存在をin vivo及びin vitroで初めて示した。

2．このキナーゼは既知のキナーゼの基質として汎用される蛋白質を燐酸化しないことから，未知のキナーゼであることが示唆された。

3．最終的にHPLCで精製したキナーゼ活性の存在する分画には候補分子として3つの蛋白質分子が確認された。

4．核移行におけるこのキナーゼの役割は現在未解明であるが，今後このキナーゼを完全精製することにより，キナーゼの役割を明らかにし，その得られた知見からさらに蛋白質の核移行機構の全容の解明が進展すると思われる。

論文審査の結果の要旨

蛋白質の核内移行のメカニズムについての研究は，主に，核局在化シグナル結合蛋白質をはじめとする細胞質因子，核膜孔構成蛋白質を中心として行なわれてきた。しかし，それぞれの分子がどのような役割や関連をもって蛋白質の核内移行という現象に係わっているのかはまだ明らかではない。

本研究は，核局在化シグナルの認識から始まり蛋白質の核内移行が完了するまでの細胞内現象を補えることを目的とし，さまざまな細胞内反応系の調節に重要な役割を果たす蛋白質の燐酸化に着目して核局在化シグナルによる特異的な細胞内燐酸化反応について検討したものである。その結果，核局在化シグナルで特異的に活性化されるKinaseの存在をin vivo及びin vitroで初めて示した。さらに，このKinaseを部分精製することにより，最終的に3つの候補分子を得た。本研究の結果は，核局在化シグナル結合蛋白質などの細胞質因子，核膜孔構成蛋白質などの核内移行に係わる分子の役割やその関連性の解明とともに，蛋白質の核移行全体のメカニズムの解明に新たな方向性を提示するものである。よって，この核局在化シグナルで特異的に活性化されるkinaseの発見は，蛋白質の核内移行の研究のみならず，ひろく細胞生物学上で大きな意味を持つものであり，本論文は学位論文として十分価値あるものと認められる。