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

①

主論文

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

Partial purification and characterization of the kinase which is specifically activated by nuclear localization signal

微生物病研究所防疫学部門

Department of Preventive Medicine, Research Institute for Microbial diseases, Osaka Univ.

栗 原 敏 修

Toshinao Kurihara

Abstract.

Nuclear localization signal (NLS) is necessary for protein to be transported into the nucleus.It is unkown what phenomena happen on the course from recognition of NLS to migration of nuclear proteins into the nucleus in the cell.I have indicated the existance of the kinase which is specifically activated by NLS synthetic peptide injected in Xenopus oocyte.Furthermore using in vitro kinase assay ,I have partially purified this kinase with chromatographies from Ehrlich ascites tumor cells.The partially purified kinase fraction has three candidate bands of Mr=95,000 ,70,000 and 65,000 on SDS- PAGE .

Key Words:Nuclear localization signal,Protein phoshorylation,Synthetic peptide

（抄録）

Xenopus oocyteに野生型SV40 large T抗原の核局在化シグナル合成ペプチドをマイクロインジェクションし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で明らかにした。in vitroでも同様の核局在化シグナルに特異的な燐酸化がおこることを核局在化シグナル合成ペプチドやそのコントロールとして用いた非核局在化シグナル合成ペプチドを利用したin vitro assayで確認した。また、このin vitro assayでは既存のkinaseの基質として汎用される蛋白質を燐酸化しなかった。Ehrlich腹水癌細胞の細胞質から種々のカラムを用いてこのkinaseを部分精製した。最終的にHPLCで分画したkinase分画には3つの候補となる蛋白質分子が認められた。

（序論）

蛋白質の核内移行には核局在化シグナル(Nuclear localization signal:NLS)が必須とされている[1)2)]。NLSの特徴としては、Lys,Argなどの塩基性アミノ酸が豊富な、数個ないし十数個のアミノ酸配列からなることが挙げられる。このNLSをもつ合成ペプチドを本来核に移行できないアルブミンのような非核蛋白質と化学的に架橋し培養細胞の細胞質にマイクロインジェクションするとペプチドーアルブミン結合物は約30分以内に核内に局在する。これに対し、点変異をもつ変異型NLS合成ペプチドを同様に架橋したアルブミンは細胞質にとどまった[3)4)]。このように、細胞質内では正確にNLSを識別し運搬する機構が存在している。識別する機構としては　NLS結合蛋白質がいくつか同定されているが、現在まで完全に精製された蛋白質としてはGeraceらの56kDa,54kDaの蛋白質[5)]やSilver らの酵母の70kDaの蛋白質[6)]がある。最近、Imamotoらは熱ショック蛋白質の一つであるhsc70がNLS結合蛋白質の一つとして核蛋白質輸送に働いていることを示した[7)]。蛋白質核内輸送装置に関連するものとして、Adamらはsemi-intactの系で細胞質因子が核内輸送に必要であることを示した[8)]。このように、複数の蛋白質核内輸送に関与する蛋白質分子が明らかになってきたが、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。そこで、本研究ではNLSの認識から始まる蛋白質の核内移行という現象の全体像を捕え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て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kinaseの部分精製、性状解析を行なった。

（方法）

Microinjection to oocytes and labeling

MBS（modified Barth solution:88mMNaCl,1mMKCl,0.41mM$CaCl_2$,0.82mM $MgSO_4$,2.4mM $NaHCO_3$,and 20mM Hepes, pH7.3)[9)]中で数個の未受精のXenopus oocyte(stage5-6)に20mMの合成ペプチド(SV40 large T 抗原の野生型のNLS(CPKKKRKVEDP)、及び128番目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(CPKTKRKVEDP))を一個あたり50nl量マイクロインジェクション(装置Narishige 1M-6,MN-153)した後、oocyteを0.5mCi/mlの^{32}P正燐酸で3時間ラベルした。マイクロインジェクションからラベルまでは室温21℃の環境下で行なった。コントロールとして合成ペプチド溶解に用いた50mM Hepes, pH7.3 bufferを同量マイクロインジェクションした。

Subcellular fractionation

ラベルしたoocyteを20倍量のhomogenization buffer(20mM pyrophosphate,20mM Tris-HCl, pH7.5,10mM EGTA,10mM $MgCl_2$,100mM NaF,1mM Na_3VO_4,1mM DTT,10μg/ml leupeptin,1μg/ml aprotinin,0.1mM PMSF)[9]で可溶化後、5,000g,5分と300,000g,30分の遠心後、上清を細胞質抽出液とした。次に、細胞質抽出液を大きく分画するため、1/3量のDEAE- Sephacel[10]を加え4℃、8時間ローテイションした。溶出は0.23M,1M,2M NaClで4℃各1時間の条件で行なった。各分画はSDS電気泳動法を用いて解析した。

Gel electrophoresis and autoradiography

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)は、10%のpolyacrylamideを用いた。染色は銀染色を行なった。autoradiographyは、FUJI filmRX-H100を用い-80℃で行なった。

In vitro phosphorylation assay

精製途中ゲル沪過で得られた基質(p34)を含む分画を基質分画（後述）とし、これと0.5-1mMNLS合成ペプチド(野生型のNLSまたはその変異型のNLS)を各カラムで分画したsampleに加え、1μCi^{32}P-γ-ATPを含む10μM ATP,5mM $MgCl_2$,50mM Tris-HCl, pH7.5,30mM KCl存在下で、30℃,10分間反応させた。反応停止後、sampleをSDS 電気泳動法にかけて蛋白質の燐酸化を解析した。

Partial purification of the kinase

Ehrlich腹水癌細胞に4倍量のlysis buffer A(20mM Hepes ,pH7.3,10mMKCl,5mM $MgCl_2$,1mMDTT,10μg/ml leupeptin,0.2mM PMSF)を加え、2μg/ml cytocalasin B存在下で4度、30分静置。次に、homogenizerで10回homogenizeした。lysateは200,000gで遠心(model 50.2Ti,Beckman Instrument)し,上清をbuffer B(20mM Hepes, pH7.3,30mMKCl,5mM $MgCl_2$,,1mMDTT,10μg/ml leupeptin,0.2mM PMSF)で平衡化したDEAE -Sephacelにかけた[11]。次に、0.53MKClのbuffer Bでkinaseを含む分画を溶出し、buffer Bで透析した。この分画をbuffer C(potassium phosphate, pH7.2,0.3MKCl,5mM $MgCl_2$,,1mMDTT,10μg/ml leupeptin,0.2mM PMSF)で平衡化したHydroxyapatite gelにかけた。kinaseを含む分画を125mM potassium phosphate, pH7.2のbuffer Cで溶出し、同様に透析した。この分画をBuffer Bで平衡化したSephacryl S-300を用いてさらに、分画した。kinase分画をHPLC(Gradient Pump 2249,Variable Wavelength Monitor 2141,Pharmacia LKB Biotechnology)を用いて10%glycerolを含むbuffer B で平衡化したmono-Qで分画した。各分画のassayには前述のIn vitro phosphorylation assayを用いた。

（結果）

In vivo phosphorylation

野生型のSV40 large T抗原のNLSの合成ペプチドをマイクロインジェクションしたoocyteから得られた細胞質抽出液をDEAE-Sephacelを用いて分画したうち、1M,2MNaClで溶出する分画で34kDaの蛋白質の燐酸化がみられた。一方、変異型のNLSの合成ペプチドをインジェクションしたoocyteでは野生型に比して同分画の同蛋白質の燐酸化は弱かった。コントロールのbufferをインジェクションしたoocyteではまったく燐酸化は認められなかった(Figure.1)。これにより、in vivo でNLSにより特異的に活性化されるkinaseの存在が示唆された。

In vitro phosphorylation

NLS合成ペプチドと燐酸化

野生型のSV40 large T抗原のNLSの合成ペプチド量を0.5mM,1.0mM,2.0mMと増量させていくと基質である34kDaの蛋白質の燐酸化は増強した。一方、変異型のNLSを同様に増量させても同基質の燐酸化は野生型の場合に比して弱かった。また、NLS合成ペプチドを加えていない場合はまったく燐酸化されなかった(Figure.2A)。他のNLS合成ペプチドや非NLS合成ペプチドでも同様の燐酸化がみられるか検討した。Nucleoplasminやpolyoma virus large T 抗原のNLSの合成ペプチドでは34kDaの蛋白質の燐酸化がみられたにもかかわらず、野生型NLSのアミノ酸配列の逆配列の合成ペプチドであるreverse T、NLSを含まないlaminBのC末端の合成ペプチド、酵母では核移行活性を有するが哺乳類ではその活性が認められないhistone H2B[12]のNLS合成ペプチドでは、ほとんど燐酸化されなかった(Figure.2B)。これから、確かにin vitroでもNLS特異的な燐酸化が再現できることが確かめられた。

既知の基質の燐酸化

一般的に、kinaseの精製によく用いられる基質がNLS特異的に燐酸化されるかどうかについて検討した。in vitro assayでhistone H1,protamine,myelin basic protein[13],casein[14],phosvitinはいずれも燐酸化されなかった。

kinaseの反応条件の検討

マグネシウム濃度とkinase活性については、マグネシウム濃度5mMで最大値を示した(Figure.3A)。塩濃度とkinase活性については、塩濃度の増加につれてkinase活性は減弱し、100mMを越えるとコントロールの活性とほとんど、差がなくなった(Figure.3B)。

Partial purification of the kinase

Ehrlich腹水癌細胞から得られた細胞質分画をDEAE-Sephacelで分画すると0.53M KClで溶出される分画にkinase活性がみられた。次に、Hydroxyapatite gelで分画すると125mM phosphateで溶出される分画に活性が認められた。この分画をSephacryl S-300でゲル沪過すると2つの蛋白質のピークに一致したkinase活性のピークが認められ、いずれも分子量は150kDa以上であった(Figure.4)。また、このゲル沪過によりkinase分画と、主に分子量34kDaの基質を含む分画が分離できた。最終的に、kinase活性のピークをHPLC mono-Qカラムで分画し、SDS電気泳動法の後に、銀染色するとautoradiographyでkinase活性のみられた分画にのみ見られ、他の分画にはない分子として95kDa,70kDa,65kDaの3つの蛋白質が認められた(Figure.5A,5B)。

（考察）

現在まで、ここで精製したkinase以外に核局在化シグナルで特異的に活性化されるkinaseの存在についての報告はない。Xenopus oocyteの細胞質でbufferやSV40 large T 抗原の点変異型のシグナルの合成ペプチドをマイクロインジェクションした場合は燐酸化されず、野生型の核局在化シグナルの合成ペプチドをマイクロインジェクションした場合のみ、特に34kDaの蛋白質分子が強く燐酸化された。このkinaseの核局在化シグナル特異性はin vitro kinase assayから、SV40 large T 抗原の核局在化シグナル以外にnucleoplasminやpolyoma virus T抗原の核局在化シグナルでも確かに活性化され、核移行活性のないreverse T、lamin Bの非核局在化シグナル部分の合成ペプチドや酵母でしか核移行活性の認められないhistone H2Bの核局在化シグナルでは活性化されなかった。このことから、このkinaseの活性化は核局在化シグナルによりかなり厳密に行なわれていることが示唆された。最終的にHPLCで分画したkinase活性の存在する分画にのみ認められた3つの異なる分子量の蛋白質分子のうちで、どれがkinaseの活性に必須な分子であるかは本実験では同定できなかったが、今後、このkinaseの完全精製によって明らかにされていくだろう。

次に、このkinaseで燐酸化される基質について検討したが、既存のkinaseの基質として用いられる物質、例えば、MAP kinaseの基質であるmyelin basic protein[12]やcasein kinaseの基質であるcasein[13]などはいずれも燐酸化されなかった。よって、このkinaseは、既知のkinaseと異なる可能性が示唆された。このように、一般的にkinaseの精製で用いられている基質を燐酸化しないため精製途中で得られた34kDaの蛋白質を基質として用いたが、この34kDaの蛋白

質分子以外にin vivoでは200kDa,23kDaの蛋白質分子でも核局在化シグナルで特異的な燐酸化が認められた。in vitroでは、34kDaと同じ分画に存在していっしょに燐酸化される23kDaの分子や、HPLC mono-Qによる分画後、NLS特異的kinaseの存在する分画に見られるにもかかわらず、燐酸化されなくなる97kDa、95kDaの基質がある。97kDa、95kDaの基質が燐酸化されなくなる原因として、97kDaの場合、別のkinase の存在が考えられる。すなわち、34kDaの基質を燐酸化するkinase以外に核局在化シグナルで特異的に活性化される別のkinaseが存在し、HPLCにより97kDaの基質とkinaseが分離されたため燐酸化されなくなった可能性がある。また、95kDaの基質はkinaseとの分離以外に基質の量的問題も関係する可能性がある。すなわち、95kDaの基質蛋白質分子に比べて加えた34kDaの基質蛋白質分子のモル比は約30倍以上であるため、95kDaの基質蛋白質分子が燐酸化されにくかった可能性も否定できない。

これらの細胞質可溶性分画に存在する基質の役割については、不明であるが、もし核移行に関係するとすれば、核局在化シグナル受容体や、その他の核輸送装置を構成する蛋白質分子の可能性が示唆される。また、核膜孔でも、このような核局在化シグナルで特異的に燐酸化される基質があれば、核膜孔通過でATP依存性のステップであるtranslocation[15)16)]に必要な核膜孔構成蛋白質の同定につながる可能性がある。

このように、核局在化シグナルで特異的に活性化されるkinaseを追うことにより、核局在化シグナル受容体、細胞質因子、核膜孔構成蛋白質などの蛋白質の核移行に重要な核輸送装置の包括的解明が可能となるであろう。

（結語）

1.NLSで特異的に活性化するkinaseの存在を in vivo,in vitroで初めて確認した。

2.既知の基質を燐酸化しないことから、未知のkinaseである可能性が示唆された。

3.HPLCで最終的に精製したkinase活性の存在する分画には他の分画には見られない3つのバンドが認められた。

4.このkinaseを完全精製し、役割を解析することにより、核蛋白質輸送の解明に大きく寄与すると思われる。

（謝辞）

稿を終えるにあたり、御指導賜りました大阪大学微生物病研究所防疫学部門上田重晴教授に心より謝意を表します。御指導御鞭撻いただきました大阪大学細胞生体工学センター細胞構造機能研究部門（細胞構造分野）米田悦啓教授に深く感謝いたします。

（参考文献）

1.Forbes DJ,Structure and function of the nuclear pore complex.Annu. Rev.Cell Biol.8:495-527,1992.

2.Bustos JG,Heiman J,Hall MN,Nuclear protein localization.Biochemica et Biophysica Acta,1071:83-101,1991.

3.Yoneda Y,Arioka T,Imamoto N,Sugawa H ,Shimonishi Y,Uchida T,Synthetic peptides containing a region of SV 40 large T antigen involved in nuclear localization direct the transport of proteins into the nucleus.Exp Cell Res 170:439-452,1987.

4.Lanford RE,Kanda K,Kennedy R,Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal.Cell 46:575-582,1986.

5.Adam S,Gerace L,Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals for nuclear import.Cell 66:837-847,1991.

6.Stochaj U,Osborne M,Kurihara T,Silver P,A yeast protein that binds nuclear localization signal:Purification localization,and antibody inhibition of binding activity.J Cell Biol 113:1243-1254,1991.

7.Imamoto N,Matsuoka Y,Kurihara T,Kohno K,Miyagi M,Sakiyama F,Okada Y, Tsunasawa S,Yoneda Y,Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins.J Cell Biol 119:1047-1061,1992.

8.Adam SM,Marr RS,Gerace L,Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requireds soluble cytoplasmic factors.J Cell Biol 111:807-816,1990.

9.Gotoh Y,Moriyama K,Matsuda S,Okumura E,Kishimoto T,Kawasaki H,Suzuki K,Yahara I,Sakai H,Nishida E,Xenopus M phase MAP kinase:Isolation of its cDNA and activation by MPF.EMBO J 10:2661-2668,1991.

10.Matsuda S,Koasako H,Tatsuya T,Moriyama K,Sakai H,Akiyama T,Gotoh Y,Nishida E,Xenopus MAP kinase activator:Identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade.EMBO J 11:973-982,1992.

11.Imamoto SN,Matsuoka Y,Semba H,Okada Y,Uchida T,Yoneda Y,A protein recognized by antibodies to Asp-Asp-Asp-Glu -Asp shows specific binding activity to heterogenous nuclear transport signals.J Biol Chem 265:16504-16508,1990.

12.Moreland RB,Langevin GL,Singer RH,Garcea RL,Hereford LM,Amino acid sequences that determine the nuclear localization of yeast histone 2B. Mol.Cell.Biol.7:4048-4057,1987.

13.Gototh Y,Nishida E,Matsuda S,Shiina N,Kosako H,Shiokawa K,Akiyama T,Ohta K,Sakai H,In vitro effects on microtuble dynamics of purified Xenopus M phase-activated MAP kinase.Nature 349:251-254,1991.

14.Huang KP,Itarte E,Singh TJ,Akatsuka A,Phosphorylation of glycogen synthase by cyclic AMP-independent casein kinase-2 from rabbit skeletal muscle.J Biol Chem 257:3236-3242,1982.

15.Richardson WD,Mills AD,Dilworth SM,Raskey RA,Dingwall C,Nuclear protein migration involves two steps:Rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores.Cell 52:655-664,1988.

16.Newmeyer DD,Forbes DJ,Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro:Nuclear pore binding and translocation.Cell 52:641-653,1988.

Figure1.NLS specific phosphorylation(p34) in Xenopus oocyte injected with wild NLS peptide of SV 40 large T antigen(wild T peptide).

Extracts prepared from oocytes which were microinjected with buffer(-),wild T peptide(T),and mutant T peptide(mu-T),followed by labeling with ^{32}P-orthophosphate ,were fractionated by step-elution procedure on DEAE - Sephacel.Each fraction was electrophoresed in 10% polyacrylamide gel ,and the gel was exposed to X-ray film .

Figure2.In vitro phosphorylation by NLS peptides and other peptides.

(A)NLS specific in vitro phosphorylation has dose dependency.

Wild and mutant NLS peptides of SV 40 large T antigen were added to the reaction mixture at the final peptides concentrations of 0.5mM,1.0mM,and 2.0mM. Buffer was used as control.Reaction mixtures were incubated at 30℃ for 10 min. Reaction was stopped by the addition of SDS-PAGE sample buffer.Each phosphorylated sample was electrophoresed in 10% polyacrylamide gel and the gel was exposed to X-ray film .

(B)NLS specific in vitro phosphorylation by other kinds of NLS peptides.

NLS peptides of nucleoplasmin and polyoma virus T antigen, and non-NLS peptides of mutant T , reverseT (reverse sequence of wild T peptide),lamin B (peptides of non NLS region),and histone H2B(NLS region in yeast,but non-functional in

mammals)were added to the reaction mixture at the concentration of 1mM. In vitro phosphorylation was performed as described in (A).

Figure 3.(A)Effect of $MgCl_2$ concentration on the kinase activity.

In vitro reaction was performed at the various concentrations of $MgCl_2$ in the presence(■)or absence(□) of 1mM wild T peptide.The kinase activity was determined by measuring the density of the band of p34(main substrate)with densitometric scanning.The maximal activity was indicated as 1.0.

(B)Effect of NaCl concentration on kinase activity.

The kinase activity was measured as described in (A).

Figure 4.Gel filtration chromatography of the kinase.

125mM phosphate buffer fraction of hydroxyapatite gel was applied to Sephacryl S-300.Each fraction was assayed in the presence(■) or absence(□) of wild T peptide as mentioned in Fig.2.The kinase activity had two peaks that were separated from substrate(p34) fraction. The broken line is absorbance at 280nm.The molecular weight markers used are IgG(Mr=150,000),bovine serum albumin (Mr=67,000),and ovalbumin(Mr=43,000).

Figure 5.HPLC mono-Q column fractionation of the first peak of the kinase on Sephacryl S-300 gel filtration chromatography.

(A)Autoradiography

In vitro phosphorylation assay was performed in these fractions as mentioned in Fig.2.

(B)Silver staining

The same fractions in (A) were analyzed by silver staining.The kinase fractions (fractions 3 and 4) had mainly 3 bands(black arrow heads ,Mr=95,000,70,000,and 65,000) which were candidates for the kinase.

Figure.1

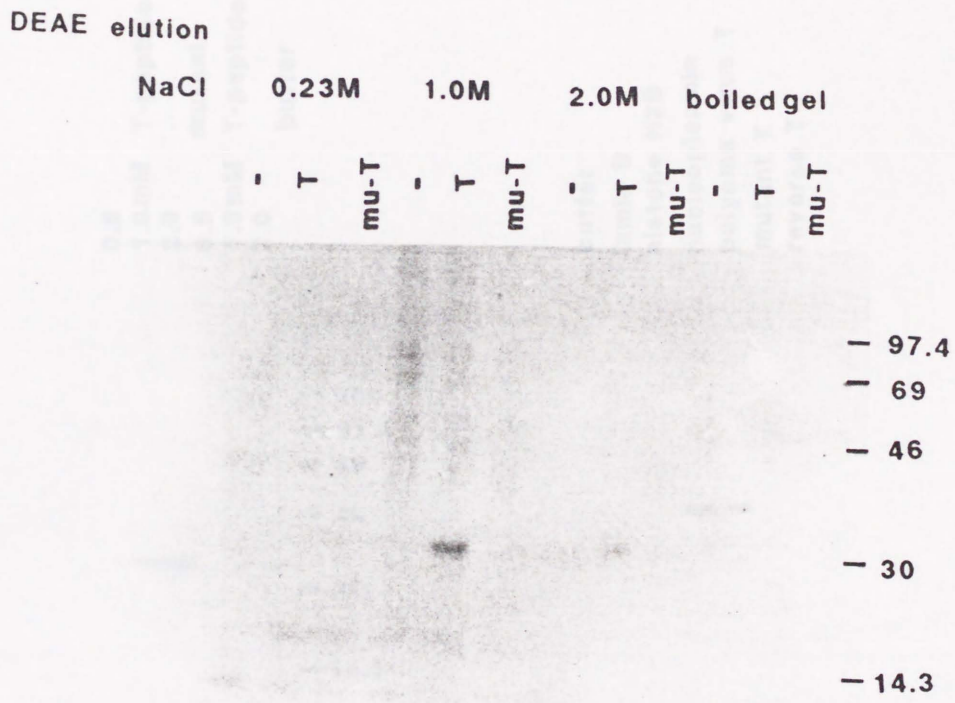

DEAE elution
NaCl
0.23M
1.0M
2.0M
boiled gel
-
T
mu-T
-
T
mu-T
-
T
mu-T
-
T
mu-T
97.4
69
46
30
14.3

Figure.2

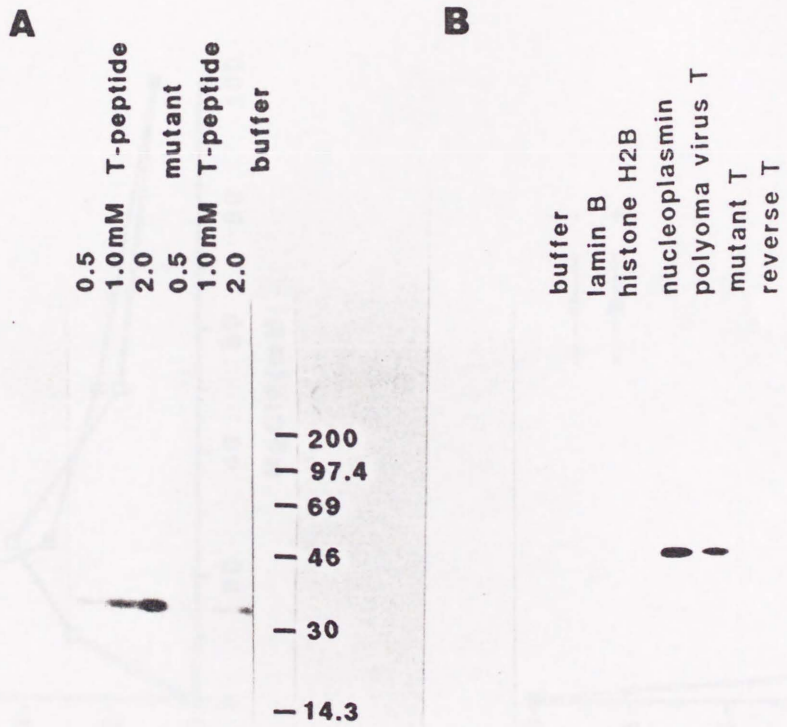
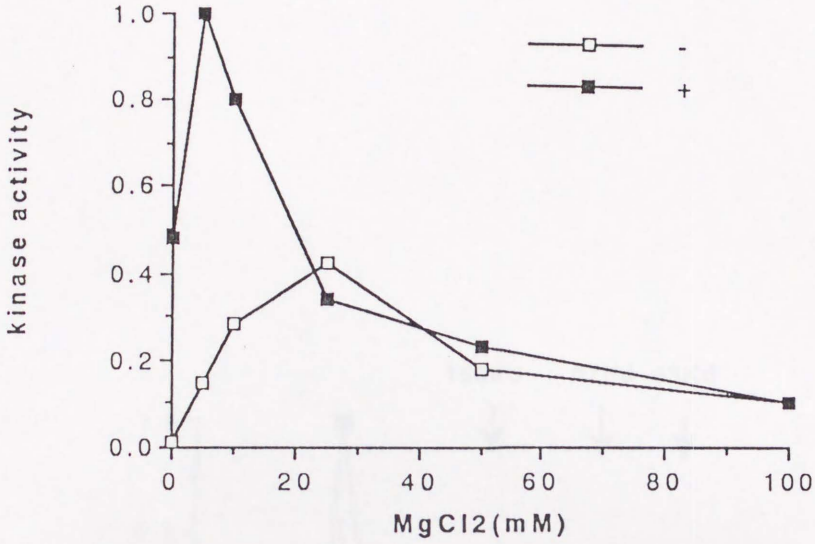

A
0.5
1.0mM T-peptide
2.0
0.5 mutant
1.0mM T-peptide
2.0 buffer
200
97.4
69
46
30
14.3
B
buffer
lamin B
histone H2B
nucleoplasmin
polyoma virus T
mutant T
reverse T

Figure.3

A


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
kinase activity
0
20
40
60
80
100
MgCl2(mM)
-
+

B

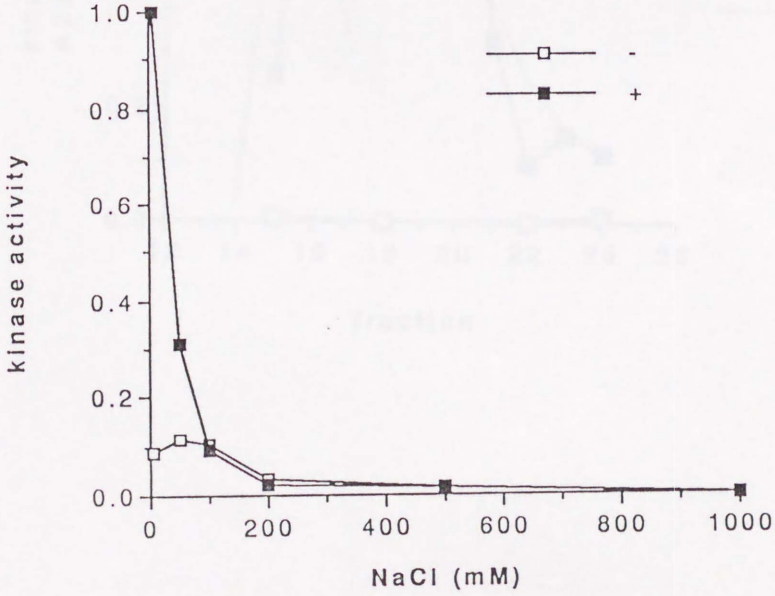

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
kinase activity
0
200
400
600
800
1000
NaCl (mM)
-
+

Figure.4

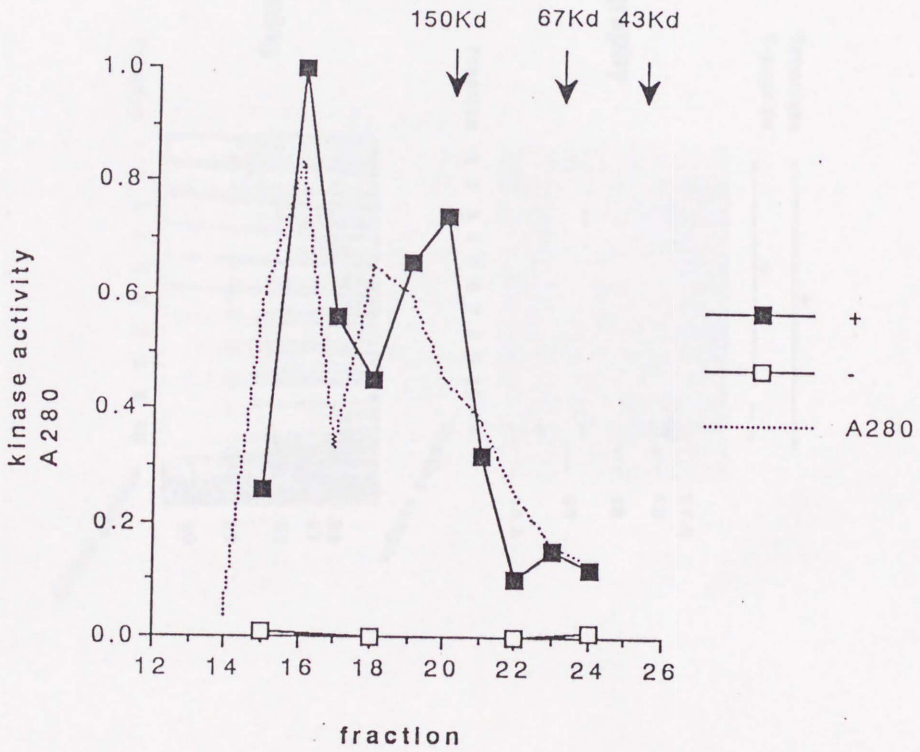
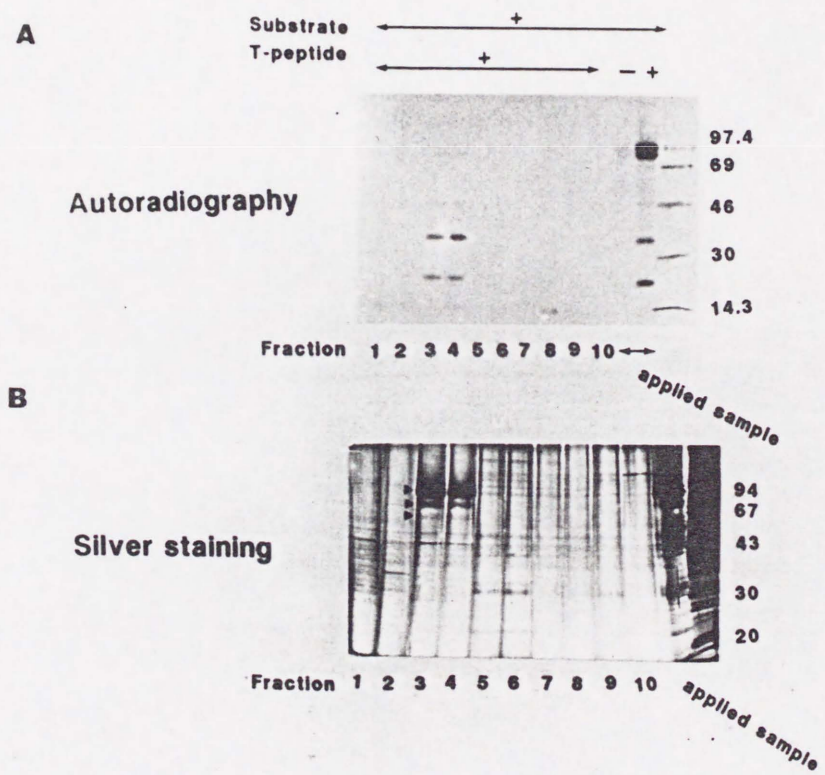

150Kd
67Kd
43Kd
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
kinase activity
A280
12
14
16
18
20
22
24
26
fraction
+
-
A280

Figure.5


A
Substrate
T-peptide
+
+
− +
Autoradiography
97.4
69
46
30
14.3
Fraction 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
applied sample
B
Silver staining
94
67
43
30
20
Fraction 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
applied sample