



Title	Identification and Characterization of Protein Products of the cot Oncogene with Serine Kinase Activity
Author(s)	青木, 正博
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37969
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	あおきまさひろ 青木正博
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 9 9 5 6 号
学位授与年月日	平 成 3 年 11 月 30 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 生理系専攻
学 位 論 文 名	Identification and Characterization of Protein Products of the <i>cot</i> Oncogene with Serine Kinase Activity (<i>cot</i> 癌遺伝子産物の同定とその機能解析)
論文審査委員	(主査) 教 授 豊島久真男 (副査) 教 授 羽倉 明 教 授 田中 武彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

多くの癌遺伝子産物が蛋白質リン酸化酵素活性を持ち、細胞内情報伝達において重要な役割を担うと考えられているが、殆どは何らかの形で細胞膜と結合したチロシンキナーゼで、セリン/スレオニンキナーゼ活性が証明されているのは、Raf, Mos, Pim-1の3種類のみである。一方、c-Raf-1, プロテインキナーゼC, MAPキナーゼなどのセリン/スレオニンキナーゼが、細胞質から核への情報伝達に深く関与していることが、最近の報告により示唆されている。

cot 癌遺伝子は、ハムスター由来癌遺伝子検索細胞SHOK細胞に、ヒト甲状腺未分化癌細胞株TCO-4のゲノムDNAをトランスフェクトし得られた形質転換細胞よりクローニングされた新しい癌遺伝子である。cDNAの塩基配列より、その遺伝子産物は415アミノ酸からなり、セリン/スレオニンキナーゼのキナーゼドメインと42-48%のsimilarityを持つが、金属結合部位、カルモデュリン結合部位など既知のドメイン構造は持たない全く新しいタイプのキナーゼであることが示唆された。しかし、これまで特異的な抗体が無く、*cot* 遺伝子産物は未だ同定されていなかった。*cot* 癌遺伝子の形質転換能や細胞内情報伝達に於ける役割を知るため、*cot* 蛋白質を同定し、その機能を解析することが本研究の目的である。

〔方法ならびに成績〕

- 1) *cot* 癌遺伝子産物の同定：カルボキシ末端に相当する合成ペプチドA47及び中間領域に相当する合成ペプチドA46を家兎に免疫し、免疫血清をペプチドカラムでアフィニティー精製した。この精

製抗体を用いて、まず、 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニンで標識した *cot* 形質転換 SHOK細胞の抽出液から免疫沈降を行なったところ、抗A47抗体で46KD及び52KDの2種類の蛋白質が沈降された。この蛋白質は、もとのSHOK細胞の抽出液からは沈降されず、抗体をペプチドA47で吸収してから用いると、形質転換SHOK細胞からも全く沈降されなかった。また、ウサギ網状赤血球ライゼートを用いて *in vitro* で翻訳した *cot* 遺伝子産物を免疫沈降したところ、A47、A46のどちらに対する抗体でも46KDと52KDの蛋白質が沈降された。それぞれ免疫に用いたペプチドで吸収すると完全にブロックされ、抗体の特異性が確認された。

- 2) 酵素活性の同定：*cot* 形質転換SHOK細胞の抽出液、及び *in vitro* で合成した *cot* 癌遺伝子産物を用いて、免疫複合体キナーゼアッセイを行った。抗A47抗体とプロテインAセファロースを用いた免疫沈降物に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを加え室温で3分間反応させ、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、46KDと52KDの自己リン酸化されたと考えられる蛋白質のバンドが検出された。また、ヒストンH1、H2aを反応チューブに加えるとこれらも同様にリン酸化され、*cot* 癌遺伝子産物が蛋白質リン酸化酵素活性をもつことが明らかになった。自己リン酸化された46KD及び52KD蛋白質のバンドを切り出し、リン酸化アミノ酸分析を行なったところ、主にセリン残基がリン酸化されていた。
- 3) 2種のペプチドの同定：*cot* 形質転換細胞由来の46KDと52KD、および *in vitro* で合成した46KDと52KD蛋白質の計4種類を自己リン酸化させ、V8プロテアーゼで部分分解し、ペプチドマッピングを行なった。4種類の蛋白質は非常によく似たパターンを示したが、52KD蛋白質を0.2 μg V8プロテアーゼで消化した際に、46KD蛋白質を消化した際には見られない21KDのバンドが検出された。このことから、46KDと52KD蛋白質の違いは、ポリペプチドの構造そのものの違いに起因することが示唆された。違いのある部と予測されたアミノ末端に相当するペプチドA48に対する抗体を調製し、免疫沈降を行なったところ、52KD蛋白質のみが沈降された。このことから、2つのATGコドン(ヌクレオチド24番及び168番)からのAlternative Initiationによるものであることが示唆された。
- 4) 細胞内分泌：細胞内局在を明らかにするため、*cot* で形質転換した細胞を、膜、細胞質、核抽出液に分離し、免疫複合体キナーゼアッセイを行なったところ、46KD及び52KD蛋白質のバンドは細胞質画分においてのみ検出された。

〔総括〕

cot 癌遺伝子産物について以下のことが明らかになった。

- 1) 分子量46KD及び52KDのアミノ末端の構造が異なる2種類の分子からなる。
- 2) 自己リン酸化能及びヒストンH1、H2aをリン酸化する能力を持つ。
- 3) リン酸化する残基は主にセリン残基である。
- 4) 細胞質に存在する。

論文審査の結果の要旨

cot 癌遺伝子は、SHOK細胞を受容細胞としたDNA トランスフェクション法により分離された新しい癌遺伝子であるが、その遺伝子産物は同定されておらず、機能は不明であった。

本論文では、合成ペプチドを用いて *cot* 遺伝子産物に対する特異的抗体を作製し、その抗体を用いて *cot* 遺伝子産物の同定と機能解析を行なった。その結果、*cot* 遺伝子産物が、分子量46KD及び52KDのアミノ末端の構造が異なる2種の分子種よりなること、セリン残基をリン酸化する蛋白質リン酸化酵素であること、細胞質に存在することを明らかにした。

これらは、*cot* 癌遺伝子の形質転換能や細胞内情報伝達に於ける役割を知る上での極めて重要な知見であり、本論文は学位授与に値するものと評価する。