



Title	WT1蛋白質と結合する新規蛋白質WT1 interacting protein(WTIP)のcDNAクローニング
Author(s)	金, 義浩
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41845
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	きむ 金 義 浩
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	WT 1 蛋白質と結合する新規蛋白質 WT 1 interacting protein (WTIP) の cDNA クローニング (cDNA Cloning of WT 1 Interacting Protein (WTIP))
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松澤 佑次 (副査) 教 授 金倉 讓 教 授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

WT1 (Wilms' tumor 1) は、小児腎腫瘍である Wilms 腫瘍の原因遺伝子を同定する過程で発見され、腎泌尿器系および性腺の発生に必須な遺伝子であるが、ほとんどすべての白血病細胞で発現レベルが高値であることが発見され、白血病初診時の発現レベルと予後が関連すること、白血病の微小残存病変のマーカーとして極めて有用であることなどが明らかになっている。

WT 1 蛋白質は449アミノ酸残基からなり、機能調節領域と Zinc finger を含む DNA 結合領域の 2 つの領域から構成されている。これらの領域へ結合する蛋白質によって機能調節が行われているのではないかとの観点から、種々の WT 1 結合蛋白質が発見されたが、白血病細胞内での特異的な結合蛋白質の報告はまだない。白血病細胞での WT 1 の機能を明らかにするために、WT 1 の機能調節領域と GST との融合蛋白質を用いて、WT 1 結合蛋白質を検索した。

【方法ならびに成績】

[GST 融合蛋白質の作製と WT 1 結合蛋白質の検索]

WT 1 の 1-182、1-294、181-294アミノ酸残基に相当する部分と GST との融合蛋白質を作製し、それぞれ、GST-WT 2、GST-WT 3、GST-WT 4 と名づけた。ヒト白血病細胞株 K562 細胞溶解液と GST 融合蛋白質を用いて West Western blot を行なったところ、GST-WT 2、GST-WT 3 で約 115kDa の特異的なバンドを認めた。同バンドは GST-WT 4 では認められないため、WT 1 の N 端側 182 アミノ酸残基内に結合部位を持つ WT 1 結合蛋白質の存在が示唆された。

[WT 結合蛋白質の精製と cDNA クローニング]

K562 細胞溶解液から、GST-WT 3 による West Western blot で結合をアッセイしながら、FPLC で WT 1 結合蛋白質を分離した。次に、SDS-PAGE で分離したバンドを PVDF 膜に転写、膜上で蛋白質をペプチドに分解した後、各ペプチドの分子量を質量分析器で測定した。ペプチドの分子量パターンをアミノ酸配列データベースと比較したところ、このバンド内に部分配列が既知である 3 種類の蛋白質があることが分かった。各蛋白質の既知領域の His タグ付加蛋白質で West Western blot を行ない、GST-WT 3 と結合する蛋白質 HYPA/FBP11 を見いだしたため、全長 (WTIP) のクローニングを行なった。WTIP は全長約 3 kbp であり、5' 末端の約 1.3 kbp がマウスの肢・腎発生および Huntington 病に關係する HYPA/FBP11 である。さらに WTIP の 3' 側には、腎癌患者血清中の自己抗体が認

識する自己抗原として同定された NY-REN-6 が含まれていた。

【WTIP と WT1 との結合部位の同定】

WTIP は Proline rich 領域と結合する WW domain を持っている。WTIP の変異体の His タグ付加蛋白質を用いて West Western blot を行なったところ、WW domain を含まない変異体では GST-WT3 との結合能は失われ、WW domain が WTIP と WT1 との結合に必要であることが示された。

【総括】

WT1 は zinc finger を持つ典型的な DNA 結合蛋白質であり、転写調節因子としての側面が強調されてきたが、WT1 の isoform が核内で spliceosome と colocalize し、spliceosome の構成要素である snRNPs と免疫沈降で共沈することが報告されてから、pre-mRNA processing への関与が注目されている。また、WTIP の WW domain は pre-mRNA splicing factor である yeast PRP40 と高いホモロジーがあるため、WTIP も pre-mRNA splicing に関わっていると考えられる。pre-mRNA splicing 関連蛋白質との結合が示されたことで、WT1 と白血病発症機構の関係が転写後調節という新たな視点から説明される可能性が開けた。今後、白血病細胞における WTIP の機能の解析を進めていく予定である。

論文審査の結果の要旨

本研究では、WT1 蛋白質と結合する新規蛋白質 WT1 interacting protein (WTIP) の cDNA がクローニングされ、WT1 と pre-mRNA splicing との関係が示されている。WT1 は、腎・泌尿器系の発生や発癌、白血病発症機構に深い関係がある多機能蛋白質であり、その機能調節機構の解明は重要な課題である。本研究では、WT1 断片の GST 融合蛋白質を用いて、結合蛋白質を検索し、ペプチドマッピング・発現スクリーニングという Bioinformatics の進歩を背景とした技術を用いて、WT1 結合蛋白質 WTIP を同定した。さらに、WTIP の WW domain と WT1 の Proline rich 領域で両者が結合することも示している。WTIP の機能は pre-mRNA splicing であることが予想されているが、WT1 と pre-mRNA splicing の関係については、転写後調節という新しい観点から近年注目を集めている問題である。WT1 は転写調節因子であるだけでなく、RNA と結合し、pre-mRNA の代謝にも関係すると考えられるようになってきている。WTIP が WT1 と結合するという本研究の結果は、この分野での発展の契機になる可能性を秘めている。WT1 の機能調節研究の進展に大きく貢献するものと考えられるため、本論文を学位に値するものと認める。