

Title	新規セリン/スレオニンキナーゼSLKのクローニングと生物学的役割の解析
Author(s)	山田, 栄太郎
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41965
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山田 栄太郎
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15375 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 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	新規セリン/スレオニンキナーゼ SLK のクローニングと生物学的役割の解析
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 前田 正知 教授 土井 健史 教授 西原 力

論文内容の要旨

タンパク質を逐次リン酸化することにより情報を伝達するプロテインキナーゼカスケードは、細胞外からの刺激情報を核内へ伝達するのに最も一般的な細胞内シグナル伝達様式である。近年の遺伝子クローニング技術の進歩にとともに、ここ数十年の間に多くのプロテインキナーゼのクローニングが行われてきた。また、現在進められているヒトゲノム計画により、数年以内にはすべてのキナーゼ分子の遺伝情報が出揃うことになる。今後、これらのキナーゼ分子によるシグナルネットワークや特異性を明らかにしていくことが、生物学的興味にとどまることなく、疾患発症メカニズムの解明や治療薬の開発に大きく寄与していくことは間違いない。本論文では、著者が遺伝子クローニングに成功した新規セリン/スレオニンキナーゼである SLK の発現ならびにその生物学的機能について得られた知見を纏めた。

プロテインキナーゼ間で類似するサブドメインから degenerate primer を設計し、モルモット好酸球から RT-PCR により新規プロテインキナーゼ cDNA 断片をクローニングすることに成功した。さらに、この cDNA 断片をプローブとしてモルモット肝臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、open reading frame を含む cDNA をクローニングした。この新規プロテインキナーゼは、セリン/スレオニンキナーゼで保存されたキナーゼドメインを N 末端側に持ち、そのアミノ酸配列は出芽酵母の MAPKKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) である STE20 と 40% 程度の類似性を有していたため、SLK (STE20-like kinase) と命名した。遺伝子情報の少ないモルモットでは、SLK の機能解析を進めるのは困難だと判断し、モルモット SLK の cDNA の一部をプローブとしてヒト SLK cDNA のクローニングを行った。その結果、ヒト SLK は N 末端側にキナーゼドメインを、C 末端側にはタンパク質の degradation に関与するといわれている PEST 配列や、タンパク質間の相互作用に関係している coiled-coil 構造を形成する配列を有することが明らかとなった。また、northern blot 解析や免疫組織化学染色により、多くの組織において mRNA、タンパク質レベルの SLK の発現を確認することができた。さらに、*in vitro* kinase assay により、SLK は人工基質である myelin basic protein やヒストンをリン酸化し、自己リン酸化も行うキナーゼ分子として機能することが明らかとなった。

次に、SLK が機能するシグナル伝達経路を探索した。SLK はプロテインキナーゼの中でも、STE20 や PAK (p21-activated kinase) など MAPKKKK として機能する分子と高い類似性を有していたことから、MAPK cascade を制御する分子ではないかと推測した。そこで、現在までに特に研究が進んでいる 3 つの MAPK cascade における SLK

の関与について検討した。まず、MAPK cascadeを制御することが知られている低分子量Gタンパク質がSLKの活性を制御するのかどうかを調べた。しかしRas、Rac、Cdc42の3種類の活性化型低分子量Gタンパク質により、SLKのキナーゼ活性は変化しなかった。この結果より、SLKはこれらの低分子量Gタンパク質の下流で機能するキナーゼではないことが示された。また、COS-7細胞内でSLKを高発現させることによって、ERK系、JNK系、p38系のMAPK cascadeを活性化させることができなかった。さらに、MAPK cascadeの下流に位置し、直接タンパク質の発現を制御している転写因子もSLKの高発現によって活性化されなかった。したがって、SLKはこれら3つのMAPK cascadeの上流キナーゼとして機能する分子ではないと推測された。

ところで、最近 *Xenopus* で xPlkk 1 (*Xenopus polo-like kinase kinase 1*) という分子が遺伝子クローニングされた。驚いたことに、xPlkk 1 とヒト SLK のアミノ酸配列は、キナーゼドメインで77.6%、全体でも44.8%という非常に高い類似性を有していた。同じ脊椎動物には属するものの、ヒトとアフリカツメガエルは進化上大きく離れた存在である。にもかかわらずこのような高い類似性を示していることから、SLK は xPlkk 1 のヒトカウンターパートではないかと推測した。xPlkk 1 は Plk (polo-like kinase) をリン酸化し、活性化するキナーゼである。そこで、ヒト SLK もヒト Plk をリン酸化し、活性化するのかが検討した。その結果、SLK は *in vitro* において Plk を直接リン酸化し、キナーゼ活性を上昇させることや、細胞内に SLK を過剰発現させることにより、Plk 活性が上昇することがわかった。また、Plk が細胞周期の G₂/M 期からM期にかけて機能するプロテインキナーゼであることから、細胞周期と SLK の発現やキナーゼ活性の相関について検討した。その結果、SLK のキナーゼ活性は、Plk の発現やキナーゼ活性が上昇する時期にピークになることがわかった。以上のことから、SLK は細胞周期の G₂/M 期からM期にかけて、Plk を直接リン酸化し、そのキナーゼ活性を上昇させる Plk の上流キナーゼであることが明らかとなった。一方、Plk は G₂/M 期からM期の終期にかけて発現し、G₂ 期からM期への移行や、M期からの脱出に関与することが知られている。そこで、SLK や SLK の mutant を細胞内で発現させることによって細胞周期に変化が起こるのではないかと考え、NIH/3T3細胞をSLKにより安定的形質転換させた。その結果、SLKのkinase negative mutantを強制発現させた細胞で、多核化や巨核化といった細胞分裂に関係する異常が認められた。この現象をPlkの分子作用機序と考え合わせると、SLKのkinase negative mutantの高発現によってPlkが活性化できない状態に陥り、G₂/M期の移行やM期脱出が出来なくなった結果であると推察された。

以上、本研究で遺伝子クローニングしたSLKは、Plkの上流に位置し、そのキナーゼ活性を上昇させることによって、細胞周期のG₂期からM期の正常な進行を制御するプロテインキナーゼであることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究では、モルモット好酸球から新規セリン/スレオニンキナーゼSLKの遺伝子をクローニングし、さらにヒトSLKのクローニングを行い、その生物学的機能について以下の知見を得た。

- 1: ヒトSLKは、N-末端側にセリン/スレオニンキナーゼドメインで保存された部分を持っていた。*in vitro* kinase assayでは、MBPやヒストンを基質としてリン酸化し、自己リン酸化活性も示した。また、northern blot解析や免疫組織化学染色により、SLKは幅広い組織において発現されていることを確認した。
- 2: SLKは酵母のMAPKKKKであるSTE20と類似性を有していたことから、ERK、JNK、p38系の上位キナーゼとして機能することが予想された。しかしSLKは、これら3つのMAPK cascadeを活性化しなかった。
- 3: 最近、STE20よりもSLKに対してはるかに高い類似性を有する *Xenopus* Plkk 1 がクローニングされた。*Xenopus* Plkk 1 は Plk をリン酸化し、活性化するキナーゼである。そこで、ヒトSLKもヒトPlkをリン酸化し活性化するかどうかを検討したところ、(1) SLKは *in vitro* においてPlkを直接リン酸化し、Plkのキナーゼ活性を上昇させること、(2) 細胞内にSLKを過剰発現させることによってPlkのキナーゼ活性を上昇させることがわかった。さらに、(3) PlkはG₂期からM期への移行や、M期からの脱出に関与している分子であることから、SLKのkinase negative mutantを強制発現させた細胞では、多核化や巨核化といった細胞分裂に関係する異常が認められた。

以上本研究で遺伝子クローニングしたSLKは、細胞周期のG2期からM期にかけて機能するキナーゼであるという新しい知見を示すことができた。したがってこれら成果は、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考ええる。