

Title	Structure, Expression, and Chromosomal Localization of Human GAK
Author(s)	木村, 信也
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42727
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	木村信也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16393 号
学位授与年月日	平成13年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Structure, Expression, and Chromosomal Localization of Human GAK. (Cyclin G結合因子 GAK の構造と発現の解析、および染色体座位決定)
論文審査委員	(主査) 教授 野島 博 (副査) 教授 仲野 徹 教授 岡田 雅人

論文内容の要旨

【目的】

サイクリンは、CDK (Cyclin dependent kinase) と結合してそのキナーゼ活性を正に制御している因子で、G1/S期やG2/M期の移行など細胞周期の制御をおこなっている。なかでも Cyclin G1 は新しいタイプのサイクリンで、p53癌抑制遺伝子によって発現が誘導される。また Cyclin G1 結合因子のひとつとして、ホスファターゼ PP2A の B' サブユニットが同定されており、この因子の出芽酵母ホモログはストレス応答に関与しているとの報告がある。したがって、Cyclin G1 はアポトーシス・DNA 損傷チェックポイント・ストレス応答に関与するサイクリンであると推察される。したがって、Cyclin G1 の機能をあきらかにするために、Cyclin G1 結合因子の同定・単離を行ったところ、ラット NRK 細胞 cDNA ライブラリーからラット GAK が単離された。

【方法ならびに成績】

ヒト GAK の単離

ヒト繊維芽細胞 (KD) から作成した cDNA ライブラリーをラット GAK の cDNA の SacI 断片を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。100万クローンをスクリーニングしたうち、8つの陽性のクローンを単離した。そのうち最も長い4.3kbのクローンにおいても GAK の N末端側がかけていたので、5'-RACE法により、完全長の cDNA を得た。ヒト GAK は1311アミノ酸で、セリン・スレオニンキナーゼドメイン、tensin 様ドメイン、auxilin 様ドメイン、チロシンリン酸化部位などが、ラットの GAK と保存されていた。

GAK のキナーゼ活性の解析

GAK がキナーゼとして機能するかどうかを調べるために、ヒストン H1 をもちいてキナーゼアッセイを行った。ラット NRK 細胞からの GAK ポリクローナル抗体による免疫沈降物、および大腸菌で発現させた GST-GAK のキナーゼ活性を調べたところ、いずれもヒストン H1 をリン酸化することがわかった。さらに、これらと GST-cyclin G1、GST-cdk 5 が GST-GAK のキナーゼ活性に与える影響を調べたところ、GAK はこれら Cyclin や cdk によっては活性に変化がないことが示された。さらに、Immunodepletion 法によって、Cyclin G、GAK、cdk 5 の免疫沈降物のキナーゼ活性がそれぞれ独自のものであることが示された。

ヒト GAK の細胞周期における発現

次に、GAK と Cyclin G1 の細胞周期における制御について調べた。2重チミジンブロック法によって S 期に同調

した HeLa 細胞を用いてノーザン法により mRNA の発現を調べたところ、Cyclin G 1 および GAK の発現は細胞周期を通じて弱く一定であった。ウエスタン法によりタンパク量を調べたところ、GAK は S および G 2 期において発現が低く、M 期で僅かに発現が上昇していた。

細胞周期におけるキナーゼ活性の解析

S 期で同調した HeLa 細胞の抽出物を持ちいて、抗 GAK、抗 Cyclin G 1、抗 cdk 5 の免疫沈降物によるヒストン H 1 キナーゼ活性を調べた。GAK および cdk 5 のキナーゼ活性は細胞周期を通じ一定であったが、Cyclin G 1 のキナーゼ活性は G 1 期にピークを持ち、S 期に低下していた。

ヒト組織における GAK および Cyclin G 1 の発現

GAK および Cyclin G 1 のヒトの各組織における mRNA の発現をノーザンプロット法により調べた。GAK は精巢において最も発現が高かった。Cyclin G 1 は心臓、骨格筋、子宮、小腸などでとくに強く発現していた。またマウス組織では骨格筋において特に強く Cyclin G 1 が発現していた。

ヒト GAK の染色体座位決定

FISH 法により、GAK の染色体位置のマッピングを行った。ヒト GAK の cDNA をビオチンラベルすることで得られた FISH シグナルが、有糸分裂中期の 4 番染色体の短腕 (4 p16) のうち 85% に得られた。この位置は以前に報告のあった、Cyclin G 1 の位置 (5 q32-34) とは異なる。

【総括】

以前に我々が同定したラット GAK のヒト cDNA を単離し、ヒト GAK は 1311 アミノ酸タンパク質をコードし、セリン・スレオニンキナーゼドメイン、tensin/auxilin 相同ドメイン、チロシンリン酸化部位がラットの GAK と保存されていたことを明らかにした。また同調させた HeLa 細胞での GAK と Cyclin G 1 の発現パターンの解析から、GAK は G 1 期でわずかに発現が上昇していたが、Cyclin G 1 の発現は細胞周期を通じて一定であった。一方、Cyclin G 1 のヒストン H 1 キナーゼ活性は G 1 期に上昇していた。またヒトの組織においては GAK は精巢で発現が多く、Cyclin G は心臓、骨格筋、子宮、小腸などで発現が高かった。さらに、ヒト GAK は 4 p16 にマッピングされた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Cyclin G 1 の機能を明らかにするため、その結合因子の単離と解析を行い、以下について明らかにした。

- (1) 新規な Cyclin G 1 結合因子を単離し、GAK (cyclin G 1 associated kinase) と命名した。
- (2) GAK は 1311 アミノ酸のタンパク質をコードし、セリン・スレオニンキナーゼドメインを持つ因子であった。
- (3) GAK と Cyclin G 1 の結合を *in vitro* および *in vivo* で示した。
- (4) GAK は Cyclin G 1 のサイクリン依存性キナーゼ (CDK) としては働かず、GAK のキナーゼ活性は Cyclin G 1 によって負の制御を受けていた。
- (4) GAK は核と細胞質の両方に局在し、細胞質ではクラスリンの会合を制御しているが、核では Cyclin G 1 および Rb をリン酸化していることを見いだした。
- (5) GAK は Rb のセリン 601 をリン酸化することを *in vitro* で示した。
- (6) GAK は Caspase-3 の標的配列を持ち、胸腺細胞のアポトーシスにおいてプロテアーゼによる分解を受けて 85 kDa のフラグメントに断片化された。

本研究は GAK と Cyclin G 1 の研究を中心として、分子細胞生物学の分野に新たな知見を与えたと判断されるので、博士 (医学) の学位に値すると考えられる。