

Title	Structure of the Carboxyl-terminal Src Kinase, Csk
Author(s)	小川, 輝
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45089
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	お 小 川 輝
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 8 4 1 9 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Structure of the Carboxyl-terminal Src Kinase, Csk (Carboxyl-terminal Src Kinase (Csk) の結晶構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 中川 敦史 (副査) 教授 月原 富武 教授 原田 明 教授 岡田 雅人

論 文 内 容 の 要 旨

Src ファミリーキナーゼ (SFK) は最初に同定された原ガン遺伝子産物である Src とそのホモログによって構成される。SFK は蛋白質基質のチロシン残基をリン酸化するチロシンキナーゼとして機能し、基質のリン酸化によってシグナルを下流に伝える分子スイッチの役割を担っている。SFK は上流分子の刺激に応じて自己リン酸化しその活性を上昇させる一方、刺激のない状態では C 末端のチロシン残基がリン酸化され活性が低い状態に維持されている。この抑制的なチロシンリン酸化を担う酵素がチロシンキナーゼ Carboxyl-terminal Src Kinase (Csk) である。本研究は Csk 全長の立体構造を解明することを目的として行われた。

Csk は Src Homology 2 (SH2) ドメインと Src Homology 3 (SH3) ドメインを 1 個ずつ持つ。これらのドメインは多くのシグナル分子において、特定のアミノ酸配列に結合することで分子間・分子内の相互作用を担っている。Csk と同様の一次配列上の特徴を持つ SFK においては、これらのドメインは自分子内の配列と相互作用することで、キナーゼコアを活性の無い状態に保つ役目をする事が明らかになっている。

申請者は SH3・SH2 ドメインとチロシンキナーゼドメインを含む Csk 全長の結晶構造解析を行った。試料の調製は、バキュロウイルスと昆虫細胞による蛋白質発現系を用い、発現した蛋白質は 3 段階のカラムクロマトグラフィーによって高度に精製された。結晶化スクリーニングで得られた結晶化条件を最適化し、最大 2.5 Å 分解能の反射を与える結晶を得た。回折データの測定は大型放射光施設 SPring-8 において行った。水銀誘導体 1 個を用いた SIRAS 法によって位相を決定し、得られた電子密度を元に原子モデルを構築した。その後の構造精密化により R 因子 24.6%、 R_{free} 因子 28.8% の最終構造を得た。

構造解析の結果得られたドメインの相対的配置は SFK と著しく異なるものであった。第一に Csk においては SH2 ドメインやリンカー部分の配列が SFK では見られない形でキナーゼドメインと相互作用していた。この事と既報の生化学的データをあわせると、Csk の活性発現には触媒部位と非触媒部位の相互作用が必要であることが推察される。第二の相違点は Csk-SH2 ドメインのリガンド結合ポケットが外側を向いている点である。この事は Csk-SH2 ドメインが分子間相互作用を担っていることを示唆する。結晶中に含まれる複数のコンフォメーションの比較から、SH2 ドメインとキナーゼドメインの一部が一つのドメインのように一体となって結晶中で変位していることがわかった。以上の発見は、最近同定された Csk の結合蛋白質 Cbp が引き起こす Csk の活性上昇を構造面から理解する基礎を与え

る。

論文審査の結果の要旨

細胞内の情報伝達を担う分子スイッチとして機能している Src ファミリーキナーゼ (SFk) をリン酸化し抑制制御を行う、Carboxyl-terminal Src Kinase (Csk) の全長の立体構造を X 線結晶構造解析法により決定した。

Csk と SFk は酵素と基質の関係に例えられるように機能的に密接な関係にあるが、両者のアミノ酸配列を比べると、3つの相異なる配列をもつドメイン構造が同じ順序を保っている。このような一次構造上の類似性にも関わらず、SFk はリン酸化による活性制御を受けるのに対し、Csk はリン酸化によって制御されず細胞内で比較的構造的な活性を保つといったように、2つの酵素は機能的に多くの相違点を持っている。

Csk の機能を構造面から明らかにするためには、その全長構造の解明は不可欠であるが、Csk のようなマルチドメインのタンパク質の構造解析は、一般的に困難であると言われている。本学位論文では、Csk 全長の大量調製・結晶化を行い、X 線結晶構造解析法によりその立体構造を原子レベルで解明した。これにより、一次構造上は SFk と同じようなドメイン配列を持つ Csk がそれらと全く異なるドメイン配置を持ち、これらのドメイン間の相互作用により Csk の活性を制御する機構を明らかにした。

これらの結果は、SFk および Csk を介した細胞内の情報伝達機構の解明に大きく貢献するものであり、博士 (理学) の学位に値するものであると認める。