



Title	Identification of p32 as a novel substrate for ATM in heart
Author(s)	加藤, 久和
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48923
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	加藤 久和
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第21793号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Identification of p32 as a novel substrate for ATM in heart (心臓におけるATM kinaseの新規基質タンパク質p32の同定と機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 武田 裕 教授 金田 安史

論文内容の要旨

〔目的〕

抗癌剤や放射線照射によって起こるDNA損傷は、ゲノムの不安定性を惹起し生体の恒常性維持を脅かすものである。DNA損傷応答機構において中心的な分子であるATMはタンパク質リン酸化酵素であり、様々な基質をリン酸化することで細胞周期の停止やDNA修復、細胞死を誘導することが知られている。一方、抗癌剤アドリアマイシンは多くの腫瘍に対して効果的であるが、重篤な心筋毒性を引き起こす副作用をもつ。その副作用のメカニズムを明らかにするため、マウスの心臓を用いてATMの新たな基質を探索し同定することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

マウスの心臓組織よりタンパク質を抽出し、陰イオン交換クロマトグラフィーで分離したのち、各フラクションと recombinant ATMを混合して *in vitro* リン酸化反応を行った。その結果、約0.7Mの塩濃度で溶出されるタンパク質群のうち30kD付近のバンドが野生型ATMでのみリン酸化されることを見出した。このバンドは不活性型ATMを用いた場合では検出されなかった。

このリン酸化バンドを同定するため、再度 *in vitro* リン酸化反応を行い ³²P標識したフラクションを逆相HPLCを用いて分離・精製し、銀染色とオートラジオグラフィの結果からリン酸化バンドが单一のタンパク質に由来することを確認した。さらに陰イオン交換カラムのフラクションを ³²P標識せずに再度逆相HPLCにて分離精製を行い、ゲルからバンドを切り出しトリプシン消化後のサンプルを質量分析によって解析した。PMF分析からこのリン酸化バンドはp32/gC1QBP/HABP1(以下、p32)であることが明らかとなった。

実際にATMがp32をリン酸化しているかを、大腸菌ならびに293T細胞から精製したリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* リン酸化反応で検討した。その結果p32はATMによって直接リン酸化されることが確認された。

次にATMによるp32のリン酸化部位の同定を試みた。まずリン酸化されるアミノ酸を決定するため、リン酸化アミノ酸分析を行い、セリンのみがリン酸化されることを証明した。ATMはその基質の間で進化的に保存されたS/TQモチーフをリン酸化することが知られているため、p32に存在する唯一のSQモチーフ、148番目のセリンをアラニ

ンに置換した変異体 (S148A) を用いて *in vitro* リン酸化反応を行った。S148A 変異体では ATM によるリン酸化は完全に抑制された。このことから ATM は p32 S148 をリン酸化することが明らかとなった。

[総 括]

今回、我々は *in vitro* リン酸化反応と 2 種類のカラムクロマトグラフィーを組み合わせた独自の方法でマウスの心臓から ATM の新規基質を探索し、p32 を同定した。p32 は様々なウイルスタンパク質と結合する他、pre-mRNA のプロセシングを制御していることが知られている。ATM による p32 のリン酸化は、DNA 損傷応答が mRNA プロセシングの制御にも関与していることが示唆される。今後の展望として、*in vivo* において ATM による p32 のリン酸化が、アドリアマイシンによる心筋細胞死のメカニズムにどのように関わっているかを明らかにしていく予定である。

論文審査の結果の要旨

アドリアマイシンは DNA 二重鎖切断を起こすことにより広範な腫瘍に作用する抗がん剤であるが、その副作用として古くから心不全の発症が問題になっている。しかしながら心臓に対する特異的な副作用のメカニズムについては未だ不明である。

申請者らは、抗がん剤の DNA 二重鎖切断に応答するメカニズムが、ドキソルビシンの心臓に対する副作用に関与しているのではないかという考え方の下、プロテインキナーゼ ATM の新たな基質をマウスの心臓を用いて精製し、その同定に成功した。同定した基質 p32 が確かに ATM によってリン酸化されることを証明し、そのリン酸化部位についても同定した。

申請者らが同定した p32 はこれまで mRNA のスプライシングの制御に関与しているとされており、ATM を中心とした DNA 損傷応答が、心臓においては mRNA スプライシングを制御するという、新たなメカニズムの可能性を示したという点で、重要な知見を提供しており、学位に値するものと認める。