



Identification of a novel *Drosophila* protein kinase highly homologous to protein kinase N(PKN)

植野, 望

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1639

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001639>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



| | | |
|------------|---|-------|
| 氏名・（本籍） | 植 ^{うえ} 野 ^の 望 ^{のぞみ} | （大阪府） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） | |
| 学位記番号 | 博い第1094号 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | |
| 学位授与の日付 | 平成9年3月31日 | |
| 学位論文題目 | Identification of a novel <i>Drosophila</i> protein kinase highly homologous to protein kinase N (PKN) (PKNに高い相同性を示す, ショウジョウバエ新規タンパクキナーゼの同定) | |
| 審査委員 | 主査 教授 山村 博 平 教授 岡田 昌 義 教授 尾 原 秀 史 | |

論文内容の要旨

多細胞生物の発生過程において、蛋白質磷酸化酵素は重要な役割を担っていると考えられる。発生学においてはこれまで、遺伝学的・形態学的解析に適したショウジョウバエを用いた実験系がよく用いられてきた。主に変異体の表現型の解析から、あるいは哺乳動物蛋白質磷酸化酵素の相同遺伝子の探索からショウジョウバエ発生における多くの蛋白質磷酸化酵素の役割が明らかになってきた。

本研究においては、そのショウジョウバエに着目し、PCR法を用いてショウジョウバエの胚発生過程において重要な役割を担う新規蛋白質磷酸化酵素を同定・機能解析することを目指とし、発生過程において部位並びに時期特異的な発現様式を呈する新規蛋白質磷酸化酵素の遺伝子クローニングを行った。

まず最初に、蛋白質磷酸化酵素に保存されたアミノ酸配列（キナーゼ触媒部位）に対応し、制限酵素認識部位を組み込んだオリゴヌクレオチドをプライマーとし、ショウジョウバエのゲノムDNAをテンプレートにPCRを行った。このPCR産物をプローブとして、ショウジョウバエの成虫原基（imaginal disc）由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。そして、ここで得られたクローンの内、最も大きな遺伝子長のものについて、塩基配列を決定した。この結果、この遺伝子は、ATP結合領域を含む典型的なキナーゼ触媒部位をもち、セリン／スレオニンキナーゼをコードしていることがわかった。さらにこの触媒部位のホモロジー検索の結果、PKC（protein kinase C）ファミリー、殊に最近注目を集めているPKN（protein kinase N）のキナーゼ触媒部位と顕著な相同性が認められた。

この結果を受けて、この新規に単離されたセリン／スレオニンキナーゼをDpkn（*Drosophila* protein kinase related to PKN）と命名した。

さらにDpknの発現特異性を確認するために二つの実験を行った。

まずショウジョウバエの胚、幼虫、蛹、成虫由来のRNAについて、DpknのcDNAをプローブとしてノーザン・ブロットイングを行った。この結果、Dpknはショウジョウバエの発生過程において終始発現しており、さらに胚生後期に発現が減弱することが明らかとなった。次に、胚生の間のDpkn発現の組織特異性を調べるために、胚について、ジゴキシゲニンでラベルしたRNAプローブを用い

たホールマウント・in situハイブリダイゼーションを行った。その結果、早期から中胚葉系に発現し、後期においては体性の中胚葉である筋肉系に発現が認められた。

このような特徴的な発現様式に加えて、PKNは、これまでヒト、マウスといった哺乳動物ならびにアフリカツメガエルといった両生類においてその存在が報告されているが、今回無脊椎動物であるショウジョウバエにおいてもその存在が示唆されたことからPKNが種を越えて機能する重要な分子であることが考えられる。また、最近の研究からPKNは低分子量G蛋白質であるRhoの標的分子であり、細胞骨格系を制御し、ことに細胞運動、細胞分裂等を引き起こすと考えられる。今回我々が遺伝子クローニングを行ったDpknは発生過程において早期中胚葉および後期の体性の筋肉系に発現していることから、中胚葉系の細胞移動、筋肉の運動等の制御に関わっている可能性が考えられる。今後Dpkn遺伝子の全長のcDNAクローニング、構造解析、さらには遺伝学的解析による個体レベルでのDpknの機能解析を進めたい。

論文審査の結果の要旨

多細胞生物の発生過程において、蛋白質磷酸化酵素は重要な役割を担っていると考えられる。発生学においてはこれまで、遺伝学的・形態学的解析に適したショウジョウバエを用いた実験系がよく用いられてきた。主に変異体の表現型の解析から、あるいは哺乳動物蛋白質磷酸化酵素の相同遺伝子の探索からショウジョウバエ発生における多くの蛋白質磷酸化酵素の役割が明らかになってきた。

本研究においては、そのショウジョウバエに着目し、PCR法を用いてショウジョウバエの胚発生過程において重要な役割を担う新規蛋白質磷酸化酵素を同定・機能解析することを目指し、発生過程において部位並びに時期特異的な発現様式を呈する新規蛋白質磷酸化酵素の遺伝子クローニングを行った。

まず最初に、蛋白質磷酸化酵素に保存されたアミノ酸配列（キナーゼ触媒部位）に対応し、制限酵素認識部位を組み込んだオリゴヌクレオチドをプライマーとし、ショウジョウバエのゲノムDNAをテンプレートにPCRを行った。このPCR産物をプローブとして、ショウジョウバエの成虫原基（imaginal disc）由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。そして、ここで得られたクローン内、最も大きな遺伝子長のものについて、塩基配列を決定した。この結果、この遺伝子は、ATP結合領域を含む典型的なキナーゼ触媒部位をもち、セリン／スレオニンキナーゼをコードしていることがわかった。さらにこの触媒部位のホモロジー検索の結果、PKC（protein kinase C）ファミリー、殊に最近注目を集めているPKN（protein kinase N）のキナーゼ触媒部位と顕著な相同性が認められた。

この結果を受けて、この新規に単離されたセリン／スレオニンキナーゼをDpkn（Drosophila protein kinase related to PKN）と命名した。

さらにDpknの発現特異性を確認するために二つの実験を行った。まずショウジョウバエの胚、幼虫、蛹、成虫由来のRNAについて、DpknのcDNAをプローブとしてノーザン・ブロッティングを行った。この結果、Dpknはショウジョウバエの発生過程において終始発現しており、さらに胚生後期に発現が減弱することが明らかとなった。次に、胚生の間のDpkn発現の組織特異性を調べるために、胚について、ジギキシゲニンでラベルしたRNAプローブを用いたホールマウント・in situハイブリダイゼーションを行った。その結果、早期から中胚葉系に発現し、後期においては体性の中胚葉である筋肉系に発現が認められた。

このような特徴的な発現様式に加えて、PKNは、これまでヒト、マウスといった哺乳動物ならびにアフリカツメガエルといった両生類においてその存在が報告されているが、今回無脊椎動物であるショウジョウバエにおいてもその存在が示唆されたことからPKNが種を越えて機能する重要な分子であることが考えられる。また、最近の研究からPKNは低分子量G蛋白質であるRhoの標的分子であり、細胞骨格系を制御し、ことに細胞運動、細胞分裂等を引き起こすと考えられる。今回我々が遺伝子クローニングを行ったDpknは発生過程において早期中胚葉および後期の体性の筋肉系に発現していることから、中胚葉系の細胞移動、筋肉の運動等の制御に関わっている可能性が考えられる。本研究は中胚葉発生過程における新しいセリン/スレオニンキナーゼDpknを見出し、中胚葉系の細胞移動、筋肉の運動などの制御に関わる重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。