



Association of Elongation Factor 1 α and Ribosomal Protein L3 with the Proline-Rich Region of Yeast Adenylyl Cyclase-Associated Protein CAP

柳原, 千枝

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1723

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001723>

※ 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） やなぎ はら ち え 柳 原 千 枝 （兵庫県）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学位記番号 博い第1120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10年3月31日

学位論文題目 Association of Elongation Factor 1 α and Ribosomal Protein L3 with the Proline-Rich Region of Yeast Adenylyl Cyclase-Associated Protein CAP
(出芽酵母アデニル酸シンラーゼ結合蛋白質 (CAP) のproline-rich 領域へのペプチド鎖延長因子1 α 及びリボソーム蛋白質 L3 の結合)

審査委員 主査 教授 片 岡 徹
教授 松 尾 雅 文 教授 中 村 肇

論文内容の要旨

【緒 言】

アデニル酸シンラーゼ結合蛋白質 (CAP) は多様な機能をもち、そのN末端部分はアデニル酸シンラーゼと結合してRASに対する反応性を調節しており、C末端部分はアクチンと結合して細胞骨格の調整維持に参与している。さらに、CAPは上記二つの部分の間にSH3領域結合配列に類似する2つのproline-rich領域 (P₁ 及びP₂) を持つ。我々はこのP₂ 領域に特異的に結合する分子量48-kDa及び46-kDaの2つの蛋白質を同定し、部分的アミノ酸配列決定により、それらがペプチド鎖延長因子1 α (EF1 α) とリボソーム蛋白質L3 (rL3) であることを証明した。CAPのP₂領域の欠失により、*in vivo* でも*in vitro* でもこれらの蛋白質のCAPへの結合は失われた。染色体CAP遺伝子をP₂ 領域欠失変異を持つCAP遺伝子と置換した酵母株を作製し、CAP P₂ 領域の機能を調べた。P₂ 領域の欠失したCAPを持つ細胞では野生型で認められたCAPとF-actinの細胞内分布の一致が消失し、CAPの細胞内分布に異常が認められた。以上の結果より、これらの蛋白質のP₂ 領域への結合が機能的に意義を持つことが示唆された。

【実験方法】

proline-rich領域を含む種々のCAP断片を、大腸菌内でGST (グルタチオンS転移酵素) との融合蛋白質として発現し、グルタチオン・アガロース樹脂に固定化した。この固定化した樹脂に大量の酵母細胞抽出液の細胞質画分を通し、特異的にCAP P₂ 領域に結合する2つの蛋白質を精製した。精製した蛋白質の部分的アミノ酸配列決定を行い、BLASTP検索法を用いて出芽酵母ゲノムデータベースのホモロジー検索により2つの蛋白質を同定した。それぞれに特異的な抗体を使用し、これらの蛋白質の*in vivo* 及び*in vitro*におけるCAP P₂ 領域への結合を調べた。さらに染色体CAP遺伝子をP₂ 領域欠失変異を持つCAP遺伝子に置換した出芽酵母株を作製し表現形質の変化を調べた。熱ショックへの感受性、窒素源飢餓、及びアミノ酸の影響はField, Gerst, Wangらの記載した方法で行った。さらにそれらの細胞株のCAPとF-actinの細胞内分布をそれぞれ特異的抗体およびPhalloidin

を用いた蛍光染色法により調べた。

【結 果】

1. proline-rich領域に結合する蛋白質の精製と同定

大腸菌内で GST との融合蛋白質として CAP の全長, その P_1 領域を含む断片 (アミノ酸番号 253-307), CAP (253-307) と P_2 領域を含む断片, CAP (308-368) をそれぞれ発現させた。同様に, ポリメラーゼ連鎖反応を用いて CAP (308-349) と P_2 領域に一致する CAP (350-371) を作製し, GST 融合蛋白質として発現させた。出芽酵母野性株 S P 1 (*MAT α his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can1*) の細胞質画分および膜画分を, P_1 領域を含む GST-CAP (253-307), P_2 領域を含む GST-CAP (308-368), もしくは GST をそれぞれ吸着させたグルタチオン・アガロースカラムに通した後, 10 mM glutathione にて GST 融合蛋白質とそれに結合した蛋白質を溶出した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法でそれぞれの蛋白質を分離した結果, P_2 領域を含む CAP 断片に結合する蛋白質として, 細胞質画分から分子量 48-kDa と 46-kDa の 2 つの蛋白質が同定された。それらを SDS-PAGE ゲルより切り出し, リジレンドペプチターゼで消化後, 生じたペプチドを逆相 HPLC を用いて分画した。分画されたペプチドの一部の N 末端アミノ酸配列をプロテイン・シーケンサーを用いて決定した。48-kDa 蛋白質由来の 1 ペプチドは SHINVVVIGHVDSGK, 46-kDa 蛋白質由来の 1 ペプチドは VDWAREHFEEK のアミノ酸配列を示した。BLASTP プログラムを用いたホモロジー検索の結果, 前者は出芽酵母ペプチド鎖延長因子 1 α (EF1 α) のアミノ酸番号 6-20, 後者はリボゾーム蛋白質 L3 (rL3) のアミノ酸番号 192-201 に完全に一致した。さらに, EF1 α と rL3 に特異的な抗体を用いて確認したところ, 48-kDa 蛋白質は抗 EF1 α 抗体と, 46-kDa 蛋白質は抗 rL3 抗体に反応した。これらの結果より, 2 つの蛋白質が EF1 α と rL3 である事が証明された。 P_1 領域を含む GST-CAP 断片や GST と結合し, 共に溶出された蛋白質中には, EF1 α と rL3 が存在しないことが特異的な抗体を用いて示され, 両蛋白質は *in vitro* で P_2 領域に特異的に結合することがわかった。

さらに, *in vivo* にて EF1 α と rL3 の CAP P_2 領域への結合を調べた。野性型 CAP と P_2 領域欠失変異を持つ CAP をそれぞれ GST との融合蛋白質として S P 1 細胞に発現させた。この細胞の抽出液から, GST-CAP をグルタチオン・アガロースクロマトグラフィーで精製し, それに結合している EF1 α と rL3 をそれぞれの抗体を用いてウェスタンブロット法で検出した。EF1 α も rL3 も共に GST-CAP に結合していたが, P_2 領域の欠失した GST-CAP には結合していなかった。

2. P_2 領域欠失変異を持つ CAP 遺伝子を持つ酵母細胞の形態の変化

P_2 領域欠失変異を持つ CAP 遺伝子を URA3 マーカーを持つプラスミドに挿入し, それを酵母細胞にトランスフォーメーションすることにより, 染色体 CAP 遺伝子の隣に変異体 CAP 遺伝子が挿入された株を得た。次に, 5-フルオロオロチン酸を用いて URA3 マーカーが欠失した細胞を選択することにより, 両 CAP 遺伝子が組換えを起こし, P_2 領域欠失変異体 CAP 遺伝子に統一された株を得た。得られた酵母株を用いて, これまで CAP のさまざまな欠失変異を持つ出芽酵母細胞で認められてきた表現形質の変化の有無を調べた。その結果, CAP N 末端部分欠失変異体で見られていた熱ショック感受性, CAP C 末端部分欠失変異体で観察されていた腫素源飢餓感受性, 過剰アミノ酸投与による毒性, もしくは細胞の肥大化等の異常は認められなかった。

次に, 出芽酵母の野生型細胞と, 染色体 CAP 遺伝子 P_2 領域欠失変異を持つ CAP 遺伝子に置換した細胞における CAP と F-actin の細胞内分布を調べた。それぞれの細胞をフォルムアルデヒドで固定

し、ウサギ抗CAPポリクローナル抗体とFITC標識抗ウサギIgG抗体を用いてCAPを蛍光染色し、さらにローダミン標識phalloidinでF-actinを蛍光染色して、レーザー走査顕微鏡MCR-1024で観察した。野生型細胞では、F-actinは主にbudと母細胞のcortical patchに存在しCAPもF-actinとほぼ一致した分布を示すのに対し、P₂領域の欠失したCAPをもつ細胞ではF-actinは野生型と同様の分布を示すにもかかわらず、CAPは母細胞の細胞質に分散して存在し、F-actinとの共存が失われていた。

【考 察】

我々はCAPのP₂領域に、*in vivo* および *in vitro* において、特異的に結合する2つの蛋白質、ET1 α とrL3を同定した。P₂領域のアミノ酸配列はSH3結合部位ClassIIコンセンサスモチーフ、特にcortactinで認められるSH3結合部位に相同性が高い。しかし、ET1 α もrL3もSH3に似た配列は持っておらず、これらは新しいproline-rich領域結合蛋白質であることが示された。生理的機能から考えて、上記2つの蛋白質とCAPの結合が酵母細胞内における蛋白質合成に何らかの影響を与えていることが予測されたが、染色体CAP遺伝子をP₂領域欠失変異を持つCAP遺伝子に置換した細胞株では、種々のCAP欠失変異を持つ出芽酵母株で認められてきた蛋白質合成と関係すると考えられる表現型の異常（熱ショックや窒素源飢餓への感受性、過剰アミノ酸の毒性など）は認められなかった。しかし、それに代わって、CAPの細胞内における局在に異常をみとめた。P₂領域が欠失したCAPをもつ細胞における同様の異常は、他の研究グループによっても認められている。Freemanらは、*in vitro*でF-actin結合蛋白質Abp1がCAP P₂領域と結合することから、CAPがAbp1と結合出来ないことがP₂領域欠失細胞におけるCAPの細胞内分布異常の原因であろうと推察しているが、*in vivo*での両者の結合は証明出来なかった。本研究の結果より、ET1 α またはrL3との結合が、CAPの細胞内分布に影響する可能性が示された。実際、細胞性粘菌において、そのET1 α はF-actin結合蛋白質として発見されたAbp50と同一のものであることが証明されている事は上記可能性を支持する。酵母のET1 α のF-actinとの結合能は未だ証明されていないが、ET1 α がCAPとアクチンフィラメントとの間の橋渡しとして働いている可能性がある。今後ET1 α 、rL3そしてAbp1を含むP₂領域結合蛋白質とのCAPとの結合の生理的機能を明らかにするためにさらなる研究が必要である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

出芽酵母アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質CAPは、複数の機能を有する蛋白質であり、そのN末端部分はアデニル酸シクラーゼと結合してRas蛋白質に対する反応性を調節し、C末端部分はアクチンと結合して細胞骨格の調節維持に関与している。さらに、CAPは、上記2つの部分の間にSH3領域結合配列に類似する2つのProline-rich領域P₁とP₂を有している。CAPは哺乳動物細胞にも存在し、その構造がよく保持されている。申請者は、このProline-rich領域の機能を、その結合蛋白質を明らかにすることにより研究した。

申請者は、Proline-rich領域P₁またはP₂を含むCAP断片を各々大腸菌内でグルタチオン-S-転移酵素（GST）との融合蛋白質として発現させ、それを吸着させたグルタチオン・アガロース樹脂のカラムに大量の酵母細胞抽出液の細胞質画分を通すことにより、Proline-rich領域に結合する蛋白質を検索し、精製した。その結果、P₂領域に特異的に結合する分子量48,000および46,000の2つの蛋白質を同定し、それらの部分的アミノ酸配列決定と出芽酵母ゲノム・データベースのホモロジー検

索によって、各々がペプチド鎖延長因子1 α (EF1 α) とリボゾーム蛋白質L3 (rL3) であることを見いだした。さらに、それぞれに特異的な抗体を用いて、最終的にアイデンティティーを証明した。EF1 α と rL3 は、SH3 領域を有しない新しいタイプのProline-rich領域結合蛋白質である。

次にCAPの種々の欠失変異体との結合をin vivo およびen vitroで調べることにより、上記両蛋白質はP₂ 領域でCAPに結合していることを証明した。さらに、これらの蛋白質とCAPとの結合の生理的意義を検討するため、染色体CAP遺伝子をP₂ 領域欠失変異体を持つCAP遺伝子で置換した出芽酵母株を作製し、その表現形質の異常を調べた。その結果、両結合蛋白質の構造から予想される蛋白質合成に関係した異常は認められなかったが、CAPとF-アクチンの細胞内分布を蛍光染色法を用いて調べたところ、P₂ 領域を欠失したCAPを有する細胞では、CAPの細胞内分布に異常がみられ、野生型細胞で観察されるCAPとF-アクチンの細胞内分布の一致性が失われていることが判明した。EF1 α は、他の生物においてF-アクチンと結合することが示されているので、それがF-アクチンとCAPとの橋渡しとして働き、CAPの細胞内分布を決定している可能性が示唆された。

本研究は、アデニル酸シクラーゼ結合蛋白質CAPについて、そのProline-rich領域の機能を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったその結合蛋白質の構造と機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。