



Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase C-interacting protein with structural motifs related to RBCC family proteins

徳永, 千春

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1822

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001822>

※ 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）

徳 永 千 春

（東京都）

博士の専攻
分野の名称

博士（医学）

学位記番号

博い第1169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

Molecular cloning and characterization of a novel proteinkinase
C-interacting protein with structural motifs related to RBCC
family proteins（RBCCファミリー蛋白質様構造を有する、新規プロテインキナーゼ
C結合蛋白質の分子クローニング及びその解析）

審査委員

主査 教授 吉 川 潮

教授 齋 藤 尚 亮 教授 山 本 節

論文内容の要旨

I. 序 文

プロテインキナーゼC（PKC）は、細胞の様々な機能の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、その細胞内における分子レベルでの作用機構については不明な点も多い。現在までにPKCには10種類の分子種が見い出されており、それらは全てアミノ末端側に制御領域、カルボキシル末端側に触媒領域を有し、制御領域の構造類似性より、cPKC（PKC α , β I, β II, γ ）、nPKC（PKC δ , ϵ , η , θ ）、aPKC（PKC ζ , ι/λ ）の3グループに分類されている。制御領域には発癌プロモーターであるホルボールエステルなどの種々の活性化因子が結合し、PKCは活性化される。

最近、蛋白質間相互作用を利用して、PKC結合蛋白質が単離され、それらが各分子種に特異的な基質やその活性制御に関わる蛋白質として機能することが明らかにされてきた。細胞内で相互作用する結合蛋白質を見出す有効な方法の一つとして酵母Two-Hybrid法があり、これまでにPKCに対してもこの方法により幾つかの結合蛋白質が同定されている。本研究では、PKCと相互作用し、その機能を果たす新たな蛋白質を見出すため、酵母Two-Hybrid法を行い、全長498アミノ酸残基をコードする新規クローンを得た。コードされる蛋白質は、Coiled-coil領域、RING Zinc Finger領域、B-box領域を有し、転写因子や原癌遺伝子産物が多く含まれるRBCCファミリーと相同な構造を有することから、RBCK1（RBCC Protein Interacting with PKC1）と命名した。

RBCK1蛋白質は動物細胞内で、PKC β I及びPKC ζ と結合することが確認され、また、DNA結合能及び転写活性化能を有することが判明した。以上の結果から、RBCK1蛋白質は新たな転写因子であり、PKCの下流においてその役割を果たすことが示唆される。

II. 方法

酵母Two-Hybrid法：ラットPKC β I制御領域と酵母転写因子GAL4のDNA結合領域との融合蛋白質発現プラスミドを酵母CG-1945株へ導入し、GAL4の転写活性化領域融合蛋白質発現プラスミドに挿入されたラット脳cDNAライブラリーから、 β -ガラクトシダーゼ活性及びヒスチジン

栄養要求性を指標として陽性クローンを得た。全長クローンをRACE法により取得し塩基配列を決定した。

ノザンブロット法：全長RBC K1をコードするDNA断片を32pで標識することによりプローブを作成し、成熟ラットの各種臓器から抽出したmRNAを用いてノザンブロットを行った。

免疫沈降法：エピトープタグとしてFLAG及びHAをそれぞれ融合したRBC K1とPKC分子種を共発現するCOS-7細胞を1% Triton X-100を含むlysisバッファーを用いて溶解し、抗FLAG抗体との反応の後、プロテインGセファロースビーズの添加により免疫沈降反応を行った。免疫沈降物の検出には、抗FLAG抗体或いは抗HA抗体を1次抗体、アルカリホスファターゼ融合抗マウスIgG抗体を2次抗体とするウェスタンブロット法により行った。

PCR法を利用した結合DNA配列の検索：中央部に40merのランダム配列、両端に既知配列を有する二本鎖合成DNAを、大腸菌を宿主として発現、精製したGST融合RBC K1蛋白質を結合したグルタチオンセファロースビーズと混合し、GST融合RBC K1蛋白質とDNA間の結合反応を行った。その後、結合したDNA画分を回収し、既知配列と相補なプライマーを用いたPCR法により増幅した。本操作を5回繰り返した後、得られたDNA断片を32pで標識し、GST融合RBC K1蛋白質によりゲルシフト反応を行った。シフトしたバンドからDNA断片を回収し、再びPCRにより増幅した後、同様に、ゲルシフト反応を行った。また同時に回収したDNA断片の塩基配列を決定し、5クローン以上重複して得られた断片については化学合成のうえ同様の方法でゲルシフト反応を行った。

ルシフェラーゼ法による転写活性の測定：全長RBC K1蛋白質、RBC K1アミノ末端欠失変異体、及びRBC K1カルボキシル末端欠失変異体をGAL4 DNA結合領域との融合蛋白質としてCOS-7細胞に発現し、ルシフェラーゼ法により転写活性を測定した。レポーターとしてはGAL4認識配列の5回繰り返し配列と合成最小プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を配置したプラスミドを用いた。ルシフェラーゼの活性測定は発現細胞を24時間培養した後、細胞溶解液を調節しルミノメーターにより計測した。

Ⅲ. 結果

RBC K1のクローニング：PKC β Iの制御領域を用いた酵母Two-Hybrid法とRACE法により、ラット脳cDNAライブラリーから全長498アミノ酸残基をコードするクローンを単離した。本蛋白質は、アミノ末端側から、2つのCoiled-coil領域、RING Zinc Finger領域、B-box領域及びB-box類似領域を有する新規蛋白質であり、RBC K1 (RBC C protein interacting with PKC1) と命名した。ESTデータベース上には、ヒトやマウス等にRBC K1と1次アミノ酸配列で約90%の相同性を示す蛋白質をコードする遺伝子断片が登録されていた。

RBC K1の発現：RBC K1 cDNA全長をプローブとしたノザンブロット法により、2.4kntのRBC K1 mRNAは、成熟ラット各臓器に均一に発現していた。

細胞内でのRBC K1とPKCの結合：免疫沈降法により、RBC K1蛋白質は動物細胞内で、PKC β I及びPKC ζ と結合することが確認されたが、PKC α , PKC γ , PKC δ , PKC ϵ には結合は検出されなかった。

RBC K1のDNA結合能：RING Zinc Fingerを有する蛋白質には、幾つかの転写因子が含まれることより、RBC K1蛋白質のDNA結合能を検討した。PCR法を用いたDNA結合配列の*in vitro* 検索法により、RBC K1蛋白質に結合する複数の配列が得られ、それらには5'-TGG-3'

或いは、その相補配列 5'-CCA-3'を共通に認められた。また、これらのDNA配列はそれぞれ R B C K1蛋白質と配列特異的に結合することがゲルシフト法により確認された。

R B C K1の転写活性：G A L4DNA結合領域を融合したR B C K1蛋白質全長及びその欠失変異体の転写活性をルシフェラーゼ法を用いて解析した。G A L4DNA結合領域と融合した全長R B C K1蛋白質は、G A L4DNA結合領域単独に比べて約2倍の転写活性を示した。また、R B C K1蛋白質のアミノ末端側を欠失する変異体は全長R B C K1蛋白質と同程度の転写活性を示したが、カルボキシル末端側を欠失する変異体には反対にG A L4DNA結合領域単独よりも低い活性のみが認められた。これらの結果から、R I N G Zinc Finger, B-box領域、及びB-box類似領域を有するカルボキシル末端側に転写活性化領域が存在すると推定され、R B C K1蛋白質は転写因子として機能することが示唆された。

IV. 考案

酵母Two-Hybrid法を用いてラット脳cDNAライブラリーから、新規P K C結合蛋白質R B C K1を単離同定した。R B C K1蛋白質の特徴的な構造として、システインに富むR I N G Zinc Fingerが存在し、このR I N G Zinc FingerはDNA結合或いは蛋白質複合体の形成に関与していると考えられている。一方、R B C K1蛋白質は、R I N G Zinc Finger領域以外のシステインに富む領域としてB-box領域、B-box類似領域を有し、又、二量体形成を含めた蛋白質結合に機能すると考えられている Coiled-coil領域を併せ持つ。これらの蛋白質モチーフを併せ持つ蛋白質群はR B C Cファミリーと総称されており、転写因子と予測されるもの(X N F-7)や、原癌遺伝子産物(P M L, T18, rfp)が含まれている。実際に、R B C K1蛋白質は、ゲルシフト法によりDNA結合活性を有すること、並びにルシフェラーゼ法により転写促進活性を有することが示されたことから、R B C K1蛋白質は塩基配列特異的にDNAに結合し、転写因子として機能する可能性が高い。一方、P K Cは遺伝子発現の制御に関与する報告が多数あるが、P K Cが直接に転写因子のDNA結合活性、転写活性、核移行等を制御することは明らかにされていない。R B C K1蛋白質は、動物細胞内でP K C β IとP K C ζ が結合することが確認され、また、並行して細胞内局在を検討したところ、R B C K1蛋白質は通常細胞質に存在し、細胞をP K C活性化剤であるホルボールエステルで刺激すると、その核移行が認められた。これらの結果から、R B C K1は新たな転写因子であり、P K Cの下流においてP K Cシグナルによる転写活性化を受けている可能性が示唆される。転写機構は、数種の基本転写因子群及び様々な転写制御因子が複雑に結合することにより複合体を形成し、制御されていることが知られている。R B C K1はDNAに結合する転写因子として作用するのみならず、P K Cをはじめとする複数の蛋白質と結合することが予想され、今後、P K Cを含めた蛋白質リン酸化酵素によるR B C K1のDNA結合、転写活性、及び核移行の制御について検討するとともに、R B C K1と相互作用する蛋白質の同定、解析を行うことにより、P K Cを介する遺伝子発現制御機構が解明されることが期待される。

論文審査の結果の要旨

プロテインキナーゼC (P K C) は細胞膜イノシトールリン脂質の加水分解反応に共役して活性化を受ける蛋白質リン酸化酵素であり、放出反応等の短期的な細胞変化から、増殖、分化といった長期的な応答にいたる広範な細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。また、

PKCは10種類を超える分子種から構成される分子ファミリーであり、それぞれの分子種は特異的な生理機能の調節に関与していると推定されている。しかし、PKC分子種は互いに高い構造相性を示し、また、一部の分子種の間ではその機能が相補されることから、個々の分子種の具体的な役割については、なお、不明な点が多く残されている。一方、最近、PKCの特定の分子種に特異的に結合する蛋白質が単離され、PKCの機能制御分子あるいは標的蛋白質として役割の検討されはじめている。

本申請者は、PKCの機能制御に関する蛋白質、あるいはPKCの標的蛋白質の検索を目的として酵母Two-Hybrid法を実施し、PKC β 1分子種に特異的に結合する新たな蛋白質の分子クローニングに成功した。分離されたクローン、RBCK1は転写因子や原癌遺伝子産物が含まれるRBCCファミリー蛋白質に特徴的なモチーフ構造を有する。また、実際に培養細胞内でPKC β 1分子種および分子種に結合し、他のPKC分子種とは結合能を示さなかった。RBCK1は転写因子様の構造モチーフを持つことから、PCR法を用いたDNA結合配列の*in vitro*検索を行い、RBCK1に結合する複数のオリゴヌクレオチド配列を得た。これらのDNAはゲルシフト法により、実際にRBCK1へ結合することが確認された。また、RBCK1を酵母転写因子GAL4のDNA結合領域との融合蛋白質として培養細胞内に発現したところ、RBCK1-GAL4 DNA結合領域の融合蛋白質はGAL4 DNA結合領域単独に比べて有意に高い転写活性を持つことが示された。これらの結果から、RBCK1はPKCの下流においてPKCシグナルによる活性化を受ける転写因子として機能していることが強く示唆される。

本研究は、RBCCファミリー蛋白質様構造を有する新規PKC結合蛋白質の分子クローニングを行なったものであるが、従来ほとんど行われなかったPKCにより制御を受ける蛋白質による遺伝子発現制御機構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。