



Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein

林, 俊

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-11-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2671

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002671>

※ 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。



【 65 】

氏 名 ・(本 籍) 林 俊 (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1460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14年11月30日

【 学位論文題目 】

Identification and characterization of RPK118,
a novel sphingosine kinase-1-binding protein
(新規スフィンゴシンキナーゼ結合タンパク質、
RPK118の同定と機能解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一

 教 授 黒田 嘉和

 教 授 山村 博平

序文

スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine 1 phosphate ; SPP) は細胞外及び細胞内で作用する情報伝達物質として細胞増殖、アポトーシスの抑制、細胞運動の亢進など多岐にわたる細胞機能の調節に関わっている。細胞外の SPP 作用としては、最近 EDG 受容体が同定され、これを介して情報が伝達されることが明らかにされた。一方、細胞内における SPP の作用としては細胞周期に於ける G1-S 期への促進効果などが明らかにされているものの、そのメカニズムに関しては不明であった。

今回の研究では、細胞内における SPP の作用機構を明らかにする目的で、SPP 産生酵素であるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の細胞内分布を調節する分子の同定に照準を合わせた。酵母 two-hybrid 法を用いて SPHK1 結合分子を検索したところ、新規タンパク質 RPK118 (ribosomal S6 kinase-like protein with two pseudo-kinase domains) を同定した。そこで、この分子の構造的および生化学的特性について解析をおこなった。

実験方法

酵母 two-hybrid screening 法と cDNA のクローニング

Bait (餌) として SPHK-1 の全長 cDNA を使用し、ラット脳の cDNA ライブラリーを使用して Yeast two-hybrid スクリーニングを実施した。酵母の陽性クローンから抽出した cDNA の遺伝子情報を解析、検索して部分的なヒト RPK118 の遺伝子情報を同定した。更に 5'-RACE 法を用いてヒト全長 RPK118 の cDNA 配列を決定した。

ノーザンブロット解析

ヒト各臓器より抽出した 1µg の mRNA の電気泳動転写膜を ^{32}P でラベルした RPK118 の cDNA とハイブリダイズさせた。結果は Fuji Bio-Imaging analyzer BAS2000 を用いて解析した。

免疫沈降実験

FLAG-RPK118 及び、influenza hemagglutinin (HA)-SPHK1 発現ベクターを同時に COS7 細胞に遺伝子導入し、48 時間後に細胞を可溶化し、免疫沈降実験を行った。

In vitro リン酸化能測定

COS7 細胞に FLAG-RPK118 又は、FLAG-ribosomal S6 kinase 3 (RSK3) 蛋白発現ベクターを導入し、48 時間後に細胞を可溶化した。FLAG 融合蛋白質は抗 FLAG 抗体 M2 ビーズで免疫沈降し、免疫沈降産物は洗浄後、S6 ペプチド 250µM の存在下、又は非存在下で ^{32}P ATP を用いて *in vitro* リン酸化反応を行った。 ^{32}P の S6 ペプチドへの取り込み量の結果は P81 濾紙に吸着させた後、Cerenkov カウントで測定した。自己リン酸化能の評価には免疫沈降物を SDS-PAGE 法により分離し、その後 BAS2000 イメージアナライザーで評価した。

共焦点顕微鏡

10^6 個/ml の形質転換 COS7 細胞をカバースリップ上で培養し、4% パラホルムアルデヒドで固定、0.2% Triton X-100 で可溶化処理、1% BSA でブロッキング、抗体処理を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

ドット・プロット・オーバーレイ・アッセイ

Sf9 細胞発現系で GST-RPK118 を発現させた後、GST-RPK118 を glutathione-Sepharose 4B で精製した。精製後の GST-RPK118 は様々な

リン脂質がブロットされたニトロセルロース膜と反応させ、フィルターを洗浄後、フィルターに結合した GST-RPK118 を抗 GST 抗体を用いて検出した。

結果

新規スフィンゴシンキナーゼ 1 結合分子、RPK118 の同定

細胞内における SPHK 1 結合タンパク質を同定するために、我々は yeast two hybrid 法を用いてラットの脳 cDNA library をスクリーニングした。その結果、分子量が 52kDa の "human ribosomal S6 kinase" として既に報告されていた分子の C 末側アミノ酸配列をコードする遺伝子が得られた。しかしながら、この報告された核酸配列はフレームシフトを伴う判読ミスのため不完全なタンパク質であることが判明した。そこで我々は 5' race 法を用いてこの遺伝子の全長配列の決定を行った。

同定された cDNA は 3201 bp で、計算上の分子量が 118KDa の 1066 のアミノ酸配列からなる新規タンパク質であった。BLAST アルゴリズムを使用して、この新規タンパク質 RPK118 の構造解析を行った結果、4 つの機能的領域を有することを明らかにした。それらは、1. phox-homologus (PX) 領域、2. *Saccharomyces cerevisiae* End13/Vps4, Sorting nexin 15 and *Emeicella nidulans* PalB-homology (ESP) 領域、3. pseudo-kinase 1 (PSK1) 領域、4. pseudo-kinase 2 (PSK2) 領域である。PX 領域はホスファジリイノシトール 3 リン酸 (PtdIns(3)P) と特異的に結合し、小胞輸送に関係することが知られる。一方、ESP 領域の機能は不明であるが、これも小胞輸送に関係するらしい。RPK118 の C 末側の PSK1 及び PSK2 領域に関しては、プロテイン・キナーゼ活性に重要な DFG モチーフが YFS に変換され構造的にキナーゼ活性を有さないことから、偽キナーゼ (pseudokinase) と我々が今回新たに命名した。データベースの検索では RPK118 の相同分子が

Drosophila melanogaster と *Caenorhabditis elegans* にも存在し、RPK118 は進化の課程で高度に保存された新規遺伝子群 (RPK ファミリー) であることが判明した。

RPK118 の生化学的特性

RPK118 の各臓器の mRNA の発現レベルをノーザンブロット法によって検討した。RPK118 は様々な臓器で普遍的に発現しており、特に骨格筋、脳、心臓、胎盤、腎臓、肝臓に多く発現していた。次に酵母 two-hybrid 法による結合結果を更に確認するために、SPHK1 と、RPK118 の免疫沈降実験を実施した。その結果、SPHK1 は RPK118 と特異的に結合し、また PSK 2 領域を欠く RPK118 (Δ PSK-RPK118) とは結合しなかった。更に PSK 領域のみから成るタンパク質も RPK118 と結合した。これらの結果は yeast two hybrid 法の結果と合致した。

RPK118 と SPHK1 は COS7 細胞内初期エンドソーム上で同一局在を示す

我々は免疫蛍光染色法を用いて COS7 細胞内における RPK118 と SPHK-1 の細胞内局在を検討した。GFP-RPK118 を COS7 細胞に発現させると、GFP-RPK118 は核を除く細胞質にびまん性に分布し、一部ではリング状の構造として観察された。また、FLAG-RPK118 も GFP-RPK118 と同一の細胞内局在を示したことから、GFP による細胞内分布の変化の可能性は低いと考えられる。HA-SPHK1 と GFP-RPK118 を同時に COS7 細胞に発現させると、HA-SPHK1 の一部は上記と同様のリング状の分布を示すことが分かった。更に、SPHK1 との結合部位である PSK2 領域からなるフラグメントを共発現させると、SPHK1 のリング状構造上への局在は消失した。このリング状の構造体は初期エンドソームのマーカーとして知られる EEA1 と同一局在を示したことから、RPK118 は SPHK1 を初期エンドソームにリクルートするアダプタータンパク質として機能していることが強く示唆された。

RPK118 は PX ドメインを介してホスファジリイノシトール-3-リン酸 (PtdIns(3)P) に特異的に結合する

次に我々はドット・プロット・オーバーレイ・アッセイを用いて RPK118 と PtdIns(3)P との結合を調べた。その結果、RPK118 は他のイノシトールリン脂質と比較して、PtdIns(3)P に特異的に結合した。RPK118 は PtdIns(5)P に弱い結合を認めたが、PtdIns(4,5)P₂、PtdIns(1,4,5)P₃、PtdIns(1,3,5)P₃、には結合しなかった。PX 領域を欠損した RPK118 は PtdIns(3)P に結合しなかった。

考察

今回、我々は SPHK1 と結合する新規タンパク質 RPK118 を同定した。RPK118 は P S K 2 領域を介して SPHK1 と結合し、P X 領域を介して SPHK1 を PtdIns(3)P 陽性初期エンドソームにリクルートするアダプター分子であることを明らかにした。P X 領域を有するタンパク質としてはソーティングネキシン分子が報告されている。ソーティングネキシン分子の或ものは EGF レセプターと結合し、これを初期エンドソームにリクルートするしたり、また過剰発現させることでエンドソームの形態異常が起こることなどが知られているが、これらの分子は P S K 2 領域を欠いているため SPHK1 と結合することは出来ない。今回の我々の発見により P S K 領域を有する一連のタンパク質 (RPK ファミリー) が存在することが明らかになった。これらは P S K 2 領域を介して SPHK1 を細胞内の目的の場所にソーティングすることにより、S P P の多岐にわたる作用を調節しているらしい。更に、RPK118 により初期エンドソームにリクルートされた SPHK1 は、細胞内顆粒輸送において重要な機能調節を担っている可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1461号	氏名	林 俊
論文題目	Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase -1 - binding protein 新規スフィンゴシンキナーゼ結合タンパク質、RPK118の同定と機能解析		
審査委員	主 査 中 村 俊 一 副 査 黒 田 嘉 和 副 査 山 下 淳 子		
審査終了日	平成14年10月28日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【はじめに】

スフィンゴシン-1-リン酸 (SPP) は細胞外及び細胞内で作用する情報伝達物質として細胞増殖、アポトーシスの抑制、細胞運動の亢進など多岐にわたる細胞機能の調節に関わっている。細胞外の SPP 作用としては、最近 EDG 受容体が同定され、これを介して情報が伝達されることが明らかにされた。一方、細胞内における SPP の作用としては細胞周期に於ける G1-S 期への促進効果などが明らかにされているものの、そのメカニズムに関しては不明であった。

今回の研究では、細胞内における SPP の作用機構を明らかにする目的で、SPP 産生酵素であるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の細胞内分布を調節する分子の同定に照準を合わせた。酵母 two-hybrid 法を用いて SPHK1 結合分子を検索したところ、新規タンパク質 RPK118 を同定した。そこで、この分子の構造的および生化学的特性について解析をおこなった。

【方法】

<酵母 two-hybrid screening 法と cDNA のクローニング>

Bait (餌) として SPHK1 の全長 cDNA を使用し、ラット脳の cDNA ライブラリーを使用して Yeast two-hybrid スクリーニングを実施した。酵母の陽性クローンから抽出した cDNA の遺伝子情報を解析、検索して部分的なヒト RPK118 の遺伝子情報を同定した。更に 5'-RACE 法を用いてヒト全長 RPK118 の cDNA 配列を決定した。

<共焦点顕微鏡>

10⁶ 個/ml の形質転換 COS7 細胞をカバースリップ上で培養し、4% パラホルムアルデヒドで固定、0.2% Triton X-100 で可溶化処理、1% BSA でブロッキング、抗体処理を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

<ドット・プロット・オーバーレイ・アッセイ>

Sf9 細胞発現系で GST-RPK118 を発現させた後、GST-RPK118 を glutathione-Sepharose 4B で精製した。精製後の GST-RPK118 は様々なリン脂質がプロットされたニトロセルロース膜と反応させ、フィルターを洗浄後、フィルターに結合した GST-RPK118 を抗 GST 抗体を用いて検出した。

【結果】

酵母 two hybrid 法を用をもちいて SPHK1 結合分子を検索したところ、新規タンパク質 RPK118 を同定した。RPK118 は分子量 118 k の蛋白質で 4 つの機能的領域、PX、ESP、PSK1、PSK2 ドメインを有することが明らかにされた。データベースの検索では RPK118 の相同分子が *Drosophila melanogaster* と *Caenorhabditis elegans* にも存在し、RPK118 は進化の課程で高度に保存された新規遺伝子群 (RPKファミリー) であることが判明した。RPK118 は PSK2 ドメインを介して SPHK1 と結合し、他方 PX 領域を介してフォスファチジルイノシトール 3 燐酸と結合することが生化学的手法を用いて明らかにされた。

【考察】

今回、我々は SPHK1 と結合する新規タンパク質 RPK118 を同定した。RPK118 は PSK2 領域を介して SPHK1 と結合し、PX 領域を介して SPHK1 を PtdIns(3)P 陽性初期エンドソームにリクルートするアダプター分子であることを明らかにした。PX 領域を有するタンパク質としてはソーティングネキシン分子が報告されている。ソーティングネキシン分子の或ものは EGF レセプターと結合し、これを初期エンドソームにリクルートするしたり、また過剰発現させることでエンドソームの形態異常が起こることなどが知られているが、これらの分子は PSK2 領域を欠いているため SPHK1 と結合することは出来ない。今回の我々の発見により PSK2 領域を有する一連のタンパク質 (RPKファミリー) が存在することが明らかになった。これらは PSK2 領域を介して SPHK1 を細胞内の目的場所にソーティングすることにより、SPP の多岐にわたる作用を調節しているらしい。更に、RPK118 により初期エンドソームにリクルートされた SPHK1 は、細胞内顆粒輸送において重要な機能調節を担っている可能性が示唆された。

本研究は、SPHK1 に対する結合蛋白質 RPK118 を発見し、その生化学的特性を明らかにすることにより SPHK1 の作用機構を分子レベルで理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。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。