



# Interacting proteins for the serine/threonine protein kinase PKN family

柴田, 秀樹

---

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2001-09-21

(Date of Publication)

2014-11-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2567

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002567>

※ 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。



【277】

氏 名・(本 籍) 柴田 秀樹 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (理学)

学 位 記 番 号 博ろ第62号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成13年9月21日

【学位論文題目】

**Interacting proteins for the serine/threonine protein kinase PKN  
family**

(セリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素  
PKNファミリーの相互作用蛋白質)

審 査 委 員

主査 教授 小野 功貴

教授 林 文夫                      教授 吉川 潮

PKN は、カルボキシル末端側にプロテインキナーゼ C (PKC) と相同性の高い触媒領域、アミノ末端側に荷電アミノ酸に富んだ配列とロイシンジッパー様構造 (CZ 領域) の繰返し構造を有するセリン/スレオニンプロテインキナーゼであり、その活性は脂肪酸やリン脂質、活性化型の低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoA によって上昇する。ヒトには、PKN $\alpha$ 、PKN $\beta$ 、PKN $\gamma$ /PRK2 の 3 つのアイソフォームが存在し、一次構造上、触媒領域に加えて、アミノ末端側に存在する CZ 領域、分子中央部に位置する約 100 アミノ酸の領域 (D 領域) がアイソフォーム間で保存されている。一方、D 領域と触媒領域の間に存在する領域 (リンカー領域) は、分子種によって長さが異なり、PKN $\beta$ 、PKN $\gamma$ /PRK2 のリンカー領域にはプロリンに富んだ配列が存在する。

ロイシンジッパー構造は、転写因子やホルモン受容体などで蛋白質間相互作用に関与していることが報告されており、またプロリンに富んだ配列は SH3 領域や WW 領域の認識配列として機能している可能性があることから、これらの領域を介して PKN ファミリーはその調節蛋白質や基質蛋白質と相互作用している可能性が考えられる。そこで、本研究においては、まず PKN $\alpha$  の RhoA 結合領域を決定し、次に酵母 Two-Hybrid 法を用いて、PKN ファミリーの相互作用蛋白質を新たに同定することを試みた。

1) PKN $\alpha$  の種々の組換え変異体を用いて、酵母 Two-Hybrid 法、及び *in vitro* 結合実験を行い、PKN $\alpha$  の RhoA 結合領域を詳細に検討した。その結果、PKN $\alpha$  の CZ1 領域内のアミノ酸残基 33-111 が RhoA との結合に必須であることが明らかとなった。また、p122 RhoGAP の存在下、及び非存在下において、RhoA の GTP 加水分解活性測定系に、PKN $\alpha$  のアミノ末端領域に相当する組み換え体を添加することにより、GTPase 活性の阻害が認められたことから、RhoA は PKN $\alpha$  と結合することにより活性化型を維持する可能性が示唆された。

2) PKN $\alpha$  のアミノ末端領域を bait とした酵母 Two-Hybrid Screening により、human brain cDNA library から、複数のクローンを単離した。それぞれの結合領域を検討した結果、アクチン架橋蛋白質  $\alpha$ -actinin、ゴルジ体と中心体に局在する足場蛋白質 CG-NAP、肺癌、卵巣癌、乳癌などの癌で小脳変性を随伴する症候群において患者血中、脳脊髄液中に存在する自己抗体が認識する抗原である PCD17 については、PKN $\alpha$  の RhoA 結合領域を含まないアミノ末端領域と結合することが示された。一方、神経特異的中間径フィラメントの構成成分である neurofilament-L、basic Helix-Loop-Helix 型転写因子である NDRF/NeuroD2 との結合には、PKN $\alpha$  の RhoA 結合領域を含むアミノ末端領域全体を必要とした。これらの結果は PKN $\alpha$  のアミノ末端領域が、多様な蛋白質と多面的に相互作用する可能性を示しており、また PKN $\alpha$  が細胞骨格から遺伝子発現に至る様々な細胞機能の制御に関与している可能性が考えられる。NDRF/NeuroD2 との結合を詳細に検討したところ、PKN $\alpha$  は、NDRF/NeuroD2 の basic Helix-Loop-Helix 領域と結合していることが明らかとなった。また、P19 細胞と rat insulin promoter element 3 (RIPE3) reporter を用いた NDRF/NeuroD2 の転写活性測定系に、活性化型 PKN $\alpha$  を共発現させると、NDRF/NeuroD2

に依存した転写活性化が特異的に増強された。酵素活性を有さない変異体 PKN $\alpha$  の共発現ではこの現象が見られないことから、NDRF/NeuroD2 による転写活性化の亢進は PKN $\alpha$  の酵素活性に依存していると考えられる。

3) PKN $\beta$  のプロリンに富んだ領域を含むリンカー領域を bait とした酵母 Two-hybrid Screening を行い、human embryonic kidney (HEK) 293 細胞 cDNA library より、3 つのクローンを単離した。1 つは、Rho family に対する GTP 加水分解活性促進蛋白質 Graf のカルボキシル末端に存在する SH3 領域をコードしており、他の 2 つは、長さの異なる同一 cDNA であり、ホモロジー検索の結果、新規のクローンであった。その予想されるアミノ酸配列は Graf の SH3 領域と高い相同性を有していた。5'-RACE 法を用いて全長 cDNA を単離したところ、予想されるアミノ酸配列は分子全体にわたって Graf と高い相同性があり、モチーフ検索の結果、分子中央部に PH 領域、RhoGAP 領域が存在した。この新規蛋白質を、Graf2 と名付け、以下の解析を行った。Northern blot 解析、及び、ウサギを免疫することで獲得した特異抗体を用いた Western blot 解析を行ったところ、Graf2 は、骨格筋において高い発現が観察された。組み換え体 Graf2 は、*in vitro* において、RhoA と Cdc42Hs の有する GTP 加水分解活性を促進したが、Rac1 に対する促進活性は観察されなかった。酵母 Two-hybrid 法において Graf、Graf2 の SH3 領域は PKN $\beta$  のリンカー領域と結合したが、PKN $\alpha$  のリンカー領域との結合は見られなかった。COS 細胞に共発現させた Graf、あるいは Graf2 は PKN $\beta$  と共沈し、*in vitro* において大腸菌で発現、精製した Graf、Graf2 の SH3 領域は、PKN $\beta$  のリンカー領域と結合した。また、*in vitro* において、活性化型 PKN $\beta$  は Graf、Graf2 をリン酸化した。これらの結果から、PKN $\beta$  が Rho シグナルの調節機構に関与していることが考えられる。

(別紙1)

論文審査の結果の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                   |     |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 柴 田 秀 樹                                                                                                           |     |         |
| 論<br>文<br>題<br>目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Interacting proteins for the serine/threonine protein kinase PKN family<br>(セリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素 PKN ファミリーの相互作用蛋白質) |     |         |
| 審<br>査<br>委<br>員                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 区 分                                                                                                               | 職 名 | 氏 名     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 主 査                                                                                                               | 教 授 | 小 野 功 貴 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 副 査                                                                                                               | 教 授 | 林 文 夫   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 副 査                                                                                                               | 教 授 | 吉 川 潮   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 副 査                                                                                                               |     |         |
| 要 旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                   |     |         |
| <p>蛋白質リン酸化酵素は、細胞の増殖・分化・細胞周期などの制御において重要な役割を果たしていることが知られており、各種蛋白質リン酸化酵素の活性制御機構の解明・その基質となる標的蛋白質の同定は、各酵素の細胞内情報伝達機構における位置づけを解明する上で極めて重要である。また、蛋白質リン酸化酵素は、極めて多彩な分子ファミリーを形成し、各分子ファミリーがそれぞれ特徴的な細胞内情報伝達に関与していることが明らかになりつつある。本研究は、これら蛋白質リン酸化酵素のうち、プロテインキナーゼ C (PKC) 関連酵素の PKN について、その結合蛋白質の解析により本酵素群の機能を解明しようとするものである。PKN は、カルボキシル末端側に PKC と相同性の高い触媒領域、アミノ末端側に荷電アミノ酸に富んだ配列とロイシンジッパー様構造 (CZ 領域) の繰り返し構造を有するセリン/スレオニン蛋白質リン酸化酵素であり、その活性は脂肪酸やリン脂質、活性化型の低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoA によって上昇する。</p> |                                                                                                                   |     |         |

ヒトには、PKN $\alpha$ 、PKN $\beta$ 、PKN $\gamma$ /PRK2 の 3 つのアイソフォームが存在し、一次構造上、触媒領域に加えて、アミノ末端側に存在する CZ1 領域、分子中央部に位置する約 100 アミノ酸の領域 (D 領域) がアイソフォーム間で保存されている。一方、D 領域と触媒領域の間に存在する領域 (リンカー領域) は、分子種によって長さが異なり、PKN $\beta$ 、PKN $\gamma$ /PRK2 のリンカー領域にはプロリンに富んだ配列が存在する。ロイシンジッパー構造は、転写因子やホルモン受容体などで蛋白質間相互作用に関与していることが報告されており、またプロリンに富んだ配列は SH3 領域の認識配列として機能している可能性があることから、これらの領域を介して PKN ファミリーはその調節蛋白質や基質蛋白質と相互作用している可能性が考えられる。そこで本申請者は、まず PKN $\alpha$  の RhoA 結合領域を決定し、次に酵母 two-hybrid 法を用いて、PKN ファミリーの相互作用蛋白質を新たに同定することを試み、以下の結果を得た。

1) PKN $\alpha$  の種々の組換え変異体を用いて、酵母 two-hybrid 法、及び *in vitro* 結合実験を行い、PKN $\alpha$  の RhoA 結合領域を詳細に検討した。その結果、PKN $\alpha$  の CZ1 領域内のアミノ酸残基 33-111 が RhoA との結合に必須であることが明らかとなった。また、p122 RhoGAP の存在下、及び非存在下において、RhoA の GTP 加水分解活性測定系に、PKN $\alpha$  のアミノ末端領域に相当する組み換え体を添加することにより、GTPase 活性の阻害が認められたことから、RhoA は PKN $\alpha$  と結合することにより活性化型を維持する可能性が示唆された。

2) PKN $\alpha$  のアミノ末端領域を bait とした酵母 two-hybrid screening により、human brain cDNA library から、複数のクローンを単離した。それぞれの結合領域を検討した結果、アクチン架橋蛋白質  $\alpha$ -actinin、ゴルジ体と中心体に局在する足場蛋白質 CG-NAP、肺癌、卵巣癌、乳癌などの癌で小脳変性を随伴する症候群において患者血中、脳脊髄液中に存在する自己抗体が認識する抗原である PCD17 については、PKN $\alpha$  の RhoA 結合領域を含まないアミノ末端領域と結合することが示された。

一方、神経特異的中間径フィラメントの構成成分である neurofilament-L、basic Helix-Loop-Helix 型転写因子である NDRF/NeuroD2 との結合には、PKN $\alpha$ の RhoA 結合領域を含むアミノ末端領域全体を必要とした。これらの結果は PKN $\alpha$ のアミノ末端領域が、多様な蛋白質と多面的に相互作用する可能性を示しており、また PKN $\alpha$ が細胞骨格から遺伝子発現に至る様々な細胞機能の制御に関与している可能性が考えられる。NDRF/NeuroD2 との結合を詳細に検討したところ、PKN $\alpha$ は、NDRF/NeuroD2 の basic Helix-Loop-Helix 領域と結合していることが明らかとなった。また、P19 細胞と rat insulin promoter element 3 (RIPE3) reporter を用いた NDRF/NeuroD2 の転写活性測定系に、活性化型 PKN $\alpha$ を共発現させると、NDRF/NeuroD2 に依存した転写活性化が特異的に増強された。酵素活性を有さない変異体 PKN $\alpha$ の共発現ではこの現象が見られないことから、NDRF/NeuroD2 による転写活性化の亢進は PKN $\alpha$ の酵素活性に依存していると考えられる。

3) PKN $\beta$ のプロリンに富んだ領域を含むリンカー領域を bait とした酵母 two-hybrid screening を行い、human embryonic kidney (HEK) 293 細胞 cDNA library より、3つのクローンを単離した。1つは、Rho family に対する GTP 加水分解活性促進蛋白質 Graf のカルボキシル末端に存在する SH3 領域をコードしており、他の2つは、長さの異なる同一 cDNA であり、ホモロジー検索の結果、新規のクローンであった。その予想されるアミノ酸配列は Graf の SH3 領域と高い相同性を有していた。5'-RACE 法を用いて全長 cDNA を単離したところ、予想されるアミノ酸配列は分子全体にわたって Graf と高い相同性があり、モチーフ検索の結果、分子中央部に PH 領域、RhoGAP 領域が存在した。この新規蛋白質を、Graf2 と名付け、以下の解析を行った。Northern blot 解析、及び、ウサギを免疫することで獲得した特異抗体を用いた Western blot 解析を行ったところ、Graf2 は、骨格筋において高い発現が観察された。組み換え体 Graf2 は、*in vitro*において、RhoA と Cdc42Hs の有する GTP 加水分解活性を促進したが、Rac1 に対する促進活性は観察されなかった。

酵母 two-hybrid 法において Graf、Graf2 の SH3 領域は PKN $\beta$ のリンカー領域と結合したが、PKN $\alpha$ のリンカー領域との結合は見られなかった。COS 細胞に共発現させた Graf、あるいは Graf2 は PKN $\beta$ と共沈し、*in vitro*において大腸菌で発現、精製した Graf、Graf2 の SH3 領域は、PKN $\beta$ のリンカー領域と結合した。また、*in vitro*において、活性化型 PKN $\beta$ は Graf、Graf2 をリン酸化した。これらの結果から、PKN $\beta$ が Rho シグナルの調節機構に関与していることが考えられる。

以上のように、本研究は、PKN ファミリーの機能解析をその結合蛋白質の解析を通して行ったものであり、本酵素群の細胞内情報伝達機構における役割を考える上で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。よって学位申請者 柴田秀樹 は博士(理学)の学位を得る資格があると認める。