

学位論文題名

Pim-1 結合タンパク質 PAP-1 の機能解析および、
PAP-1 と網膜色素変成症の関連についての研究

学位論文内容の要旨

Pim-1 は c-Myc との協調的ガン化能を持つ原ガン遺伝子で、その遺伝子産物は約 33 kDa のセリンスレオニンキナーゼである。また Pim-1 は IL-3 や GM-CSF などのサイトカインにより様々な細胞において早期に発現が誘導される遺伝子であることから、Pim-1 のリン酸化シグナルが細胞の生存、増殖に重要であることが示唆されてきた。しかし、Pim-1 が発現したのちに細胞内でどのような機能を果たしているかについてはいまだ不明な点が多い。当研究室では c-Myc のガン化シグナルとの関連から Pim-1 の解析を行っており、これまでに Pim-1 の結合タンパク質として PAP-1, HP-1, TRAF4 associated factor 2 / SNX6 を同定している。本研究で私はそのうちの一つである PAP-1 の機能解析を行った。

1. Pim-1 結合因子としての PAP-1 の同定

PAP-1 は Pim-1 の結合因子として単離された新規遺伝子で、全長213アミノ酸をコードするが、既知の機能ドメインは存在せず、特徴的な配列はC末端側のリジンとヒスチジンの連続した塩基性領域だけであった。mRNA の発現は胸腺や精巣に高いがそれ以外の臓器でもほぼ全身に発現が見られる。

まず、PAP-1 と Pim-1 の結合を免疫沈降法と *in vitro* プルダウン法で検討し、PAP-1 側については結合部位が N 末端側から中央部にかけてにあることを確認した。また、PAP-1 は細胞内で塩基性領域により核内にドット状に局在することが欠失変異体の局在の検討から明らかとなり、PAP-1 を共導入して Pim-1 の局在を観察した。その結果、Pim-1 は PAP-1 の存在する核内のドットに集合し PAP-1 と共局在することが明らかとなった。また、Pim-1 はセリン/スレオニンキナーゼであるので、PAP-1 を基質に用いてリン酸化反応を行ったところ、PAP-1 は Pim-1 によるリン酸化を受けた。Pim-1 のリン酸化基質のコンセンサス配列に相同性のある配列が PAP-1 中には 2 カ所あり、それぞれのセリン、スレオニン残基に変異を導入しリン酸化の有無をみたところ、C 末端側の 203、204、207 番目のセリン残基が Pim-1 によるリン酸化部位であると考えられた。以上のことより、PAP-1 は Pim-1 と核内のドット状構造で結合し、Pim-1 のリン酸化の標的となることが考えられた。

2. PAP-1 と相同性を持つ転写コリプレッサー CIR のスプライシング関連因子としての機能の発見

PAP-1 と相同性を持つタンパク質をデータベースから検索したところ CIR を得た。CIR は CBF1/RBP-J の結合因子として単離され、SAP30 や HDAC1 との結合能および転写抑

制能を持つことから転写抑制複合体に含まれる転写コリプレッサーであると報告されていた。CIRは細胞内に斑点状に局在することとPAP-1同様に塩基性領域を持つことから、CIRの欠失変異体の局在を検討した。その結果、CIRの局在を決定するドメインが塩基性領域だけでなくC末端側にも存在すると考えられた。その領域はRSドメインと相同性があったので、RSドメインを持つスプライシングファクターであるSRタンパク質との結合を検討した。その結果CIRはSC35, SF2/ASF, U2AF35と結合し、それだけでなくCIRと結合することも明らかとなったPAP-1自身にもU2AF35との結合が見られ、細胞内局在の検討においてもPAP-1のドット状局在はスプライソソームと共局在した。そこで、E1Aのminigeneをレポーターとする*in vivo* splicing assayを行ったところ、PAP-1, CIR共にレポーターのスプライシングパターンを変化させた。また、PAP-1はCIRだけでなくCIRの結合因子であるSKIPと三者複合体を形成することを明らかとし、この三者の複合体が転写調節だけでなくプロモーター特異的なスプライシングの調節も行うという可能性が考えられた。

3. 網膜色素変性症とPAP-1の関連

網膜色素変性症(RP)は網膜上の光受容細胞が徐々に変性して視野狭窄や夜盲症を引き起こし、最終的には失明に至ることもある遺伝病であるが、最近PAP-1が網膜色素変性症の原因遺伝子であることが明らかとなり、その遺伝子変異からくるPAP-1の機能の変化を検討した。その結果、いくつか見つかっている変異体とこれまでに明らかとなったPAP-1結合因子との結合能、PAP-1機能に重要と思われる細胞内局在について変化がないかを検討したところ、ある変異体ではスプライシング調節に重要と考えられるU2AF35との結合が減少していた。この変異体は細胞内局在でもWTと異なり、PAP-1の塩基性領域を欠いた変異体が示すような拡散した局在を示した。このことから、本研究で明らかとなった、PAP-1の核内ドット状局在とスプライシング調節との関係が、その変異体では異常であることが予想され、最近明らかになりつつある他の網膜色素変性症の原因遺伝子にスプライシング関連遺伝子群があることとPAP-1の機能との関連に興味を持たれる結果であった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	有賀	寛	芳
副査	教授	松田		正
副査	助教授	高橋		和彦
副査	助教授	平		敬宏

学位論文題名

Pim-1 結合タンパク質 PAP-1 の機能解析および、 PAP-1 と網膜色素変成症の関連についての研究

Pim-1 は c-Myc との協調的ガン化能を持つ原ガン遺伝子で、その遺伝子産物は約 33 kDa のセリンスレオニンキナーゼである。また Pim-1 は IL-3 や GM-CSF などのサイトカインにより様々な細胞において早期に発現が誘導される遺伝子であることから、Pim-1 のリン酸化シグナルが細胞の生存、増殖に重要であることが示唆されてきた。しかし、Pim-1 が発現したのちに細胞内でどのような機能を果たしているかについてはいまだ不明な点が多い。当研究室では c-Myc のガン化シグナルとの関連から Pim-1 の解析を行っており、これまでに Pim-1 の結合タンパク質として PAP-1, HP-1, TRAF4 associated factor 2/ SNX6 を同定している。本研究で申請者はそのうちの一つである PAP-1 の機能解析を行った。

1. Pim-1 結合因子としての PAP-1 の同定

PAP-1 は Pim-1 の結合因子として単離された新規遺伝子で、全長213アミノ酸をコードするが、既知の機能ドメインは存在せず、特徴的な配列はC末端側のリジンとヒスチジンの連続した塩基性領域だけであった。mRNA の発現は胸腺や精巣に高いがそれ以外の臓器でもほぼ全身に発現が見られる。

まず、PAP-1 と Pim-1 の結合を免疫沈降法と *in vitro* プルダウン法で検討し、PAP-1 側については結合部位がN末端側から中央部にかけてにあることを確認した。また、PAP-1 は細胞内で塩基性領域により核内にドット状に局在することが欠失変異体の局在の検討から明らかとなり、PAP-1 を共導入して Pim-1 の局在を観察した。その結果、Pim-1 は PAP-1 の存在する核内のドットに集合し PAP-1 と共局在することが明らかとなった。また、Pim-1 はセリン/スレオニンキナーゼであるので、PAP-1 を基質に用いてリン酸化反応を行ったところ、PAP-1 は Pim-1 によるリン酸化を受けた。Pim-1 のリン酸化基質のコンセンサス配列に相同性のある配列が PAP-1 中には2カ所あり、それぞれのセリン、スレオニン残基に変異を導入しリン酸化の有無をみたところ、C末端側の203、204、207番目のセリン残基が Pim-1 によるリン酸化部位であると考えられた。以上のことより、

PAP-1 は Pim-1 と核内のドット状構造で結合し、Pim-1 のリン酸化の標的となることが考えられた。

2. PAP-1 と相同性を持つ転写コリプレッサー CIR のスプライシング関連因子としての機能の発見

PAP-1 と相同性を持つタンパク質をデータベースから検索したところ CIR を得た。CIR は CBF1/RBP-J の結合因子として単離され、SAP30 や HDAC1 との結合能および転写抑制能を持つことから転写抑制複合体に含まれる転写コリプレッサーであると報告されていた。CIR は細胞内に斑点状に局在することと PAP-1 同様に塩基性領域を持つことから、CIR の欠失変異体の局在を検討した。その結果、CIR の局在を決定するドメインが塩基性領域だけでなく C 末端側にも存在すると考えられた。その領域は RS ドメインと相同性があったので、RS ドメインを持つスプライシングファクターである SR タンパク質との結合を検討した。その結果 CIR は SC35, SF2/ASF, U2AF35 と結合し、それだけでなく CIR と結合することも明らかとなった PAP-1 自身にも U2AF35 との結合が見られ、細胞内局在の検討においても PAP-1 のドット状局在はスプライソソームと共局在した。そこで、E1A の minigene をレポーターとする *in vivo* splicing assay を行ったところ、PAP-1, CIR 共にレポーターのスプライシングパターンを変化させた。また、PAP-1 は CIR だけでなく CIR の結合因子である SKIP と三者複合体を形成することを明らかとし、この三者の複合体が転写調節だけでなくプロモーター特異的なスプライシングの調節も行うという可能性が考えられた。

3. 網膜色素変性症と PAP-1 の関連

網膜色素変性症 (RP) は網膜上の光受容細胞が徐々に変性して視野狭窄や夜盲症を引き起こし、最終的には失明に至ることもある遺伝病であるが、最近 PAP-1 が網膜色素変性症の原因遺伝子であることが明らかとなり、その遺伝子変異からくる PAP-1 の機能の変化を検討した。その結果、いくつか見つかっている変異体とこれまでに明らかとなった PAP-1 結合因子との結合能、PAP-1 機能に重要と思われる細胞内局在について変化がないかを検討したところ、ある変異体ではスプライシング調節に重要と考えられる U2AF35 との結合が減少していた。この変異体は細胞内局在でも WT と異なり、PAP-1 の塩基性領域を欠いた変異体が示すような拡散した局在を示した。このことから、本研究で明らかとなった、PAP-1 の核内ドット状局在とスプライシング調節との関係が、その変異体では異常であることが予想され、最近明らかになりつつある他の網膜色素変性症の原因遺伝子にスプライシング関連遺伝子群があることと PAP-1 の機能との関連に興味を持たれる結果であった。

以上の結果は転写制御機構、網膜色素変性症疾患の原因遺伝子の発見を提示したものであり、創薬に結びつく可能性を大いに占めており、学位論文にふさわしく、薬学博士として米田 宏を推薦するものである。