

論文内容要旨

報告番号	甲 先 第 276 号	氏 名	松田真弥
学位論文題目	Activation mechanism of PCTAIRE kinase 3 (PCTK3) (PCTAIRE kinase 3 (PCTK3)の活性化機構)		
<p>内容要旨</p> <p>CDK (cyclin dependent kinase)は、細胞周期を始めとする様々な細胞機能の制御に関わるSer/Thrキナーゼであり、その活性はcyclinとの結合やCDK-activating kinaseなどのプロテインキナーゼによるリン酸化によって調節されている。CDKファミリーに属するPCTAIRE kinase 3 (PCTK3)は組織選択的な発現パターンを示すことから、細胞周期制御以外の生理機能を発揮する特殊なCDKであることが推測されていると考えられている。しかしながら、活性調節因子が同定されていないため、PCTK3の活性化機構や生理機能の解析は十分には進められていない。そこで、本研究では、PCTK3の活性調節機構の解明を目的とし、活性調節因子の探索を試みた。まず初めに、HEK293T細胞にStrep-PCTK3を遺伝子導入し、プルダウン実験および各種抗cyclin抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、PCTK3結合因子としてcyclin A2及びcyclin E1を同定した。そこで、CDKの一般的な基質であるretinoblastoma (Rb)を基質とした<i>in vitro</i>キナーゼアッセイを行った結果、PCTK3はcyclin A2によって特異的に活性化されることが明らかとなった。また、免疫細胞染色により、cyclin A2はCDK2とは核で共局在したのに対して、PCTK3とは細胞質で共局在を示した。さらに、PCTK3のアミノ酸配列中にはcAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA)のリン酸化モチーフがいくつか存在することから、PCTK3がPKAの基質である可能性が示唆された。そこで、<i>in vitro</i>及び<i>in vivo</i>キナーゼアッセイにより検証したところ、PCTK3はPKAによってリン酸化されることが明らかとなった。加えて、擬似リン酸化変異体を用いた実験により、PCTK3はPKAによりSer¹²がリン酸化されることでcyclin A2非存在下においても活性化され、さらにcyclin A2存在化においてはcyclin A2/CDK2とほぼ同等の強い活性を示した。以上の結果より、CDK2は核においてcyclin Aによって活性制御を受け、細胞周期を制御するのに対して、PCTK3は核から細胞質に移行したcyclin AやPKAによって活性制御を受けることが明らかとなった。さらに、内在性PCTK3の発現が認められるHEK293T細胞を用いてノックダウン解析を行ったところ、PCTK3 siRNAを導入した細胞では、細胞形態が変化すると共に、細胞膜辺縁にF-actinの凝集が観察された。また、PCTK3ノックダウン細胞ではアクチン脱重合因子であるcofilinのリン酸化が亢進していたことから、PCTK3はアクチン動態を調節して細胞の形態形成に関与する可能性が示された。そこで、アクチン動態の調節において重要な役割を担うRhoA及びRac1の活性を調べた結果、PCTK3ノックダウンによってRhoA活性が増加するのに対して、Rac1活性は減少し、PCTK3はそのバランスを制御していることが考えられた。さらに、PCTK3ノックダウンがRhoA/ROCKの上流因子に及ぼす影響を調べた。その結果、PCTK3をノックダウンすることによって、細胞が運動する際に足場となる細胞接着斑の構成因子であるfocal adhesion kinase (FAK)のTyr³⁹⁷及びSrcのTyr⁴¹⁶のリン酸化が上昇し、活性化されることを明らかにした。これらの結果から、PCTK3はFAKやSrcの活性を抑制することによってアクチン動態及び細胞形態を制御していることが推測された。</p>			