

網膜色素変性症原因遺伝子産物 KLHL7 の標的分子の探索

遠藤 智之 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

背景及び目的

ユビキチンは真核生物に高度に保存されたタンパク質であり、標的タンパク質に共有結合する翻訳後修飾分子である。ユビキチン修飾系は細胞周期や DNA 修復、小胞輸送など広範な生命現象に関与することが知られている。ユビキチンによる翻訳後修飾はユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の3つの酵素が担い、ユビキチンリガーゼが基質と E2-ユビキチンの両方に結合することで基質選択性を示す。

ユビキチン修飾系の破綻はパーキンソン病やアルツハイマー病など様々な神経変性疾患の原因となることが報告されている。網膜色素変性症は視細胞の脱落により徐々に視力が失われる神経変性疾患であり、これまで多くの原因遺伝子が見つかった。近年、BTB タンパク質である KLHL7 の変異が優性変異型の網膜色素変性症の原因となることが報告された。BTB タンパク質ファミリーは Cul3 型ユビキチンリガーゼ複合体において基質をリクルートするアダプターとして機能することが知られている。当研究室の先行研究により、KLHL7 が他の BTB タンパク質と同様に Cul3 型ユビキチンリガーゼ複合体を形成しており、その病原性変異がユビキチンリガーゼ活性をドミナントネガティブに抑制することが示された。これらのことから、KLHL7 の変異は、標的タンパク質のユビキチン化を抑制することにより、網膜色素変性症の一因となることが考えられた。しかし、KLHL7 によりユビキチン化される基質は未だに明らかになっていない。本研究では、KLHL7 によるユビキチン化の標的となるタンパク質を同定することを目的として、KLHL7 と結合するタンパク質の探索を行った。

1. 酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニング

ヒト胎児脳由来の cDNA ライブラリー(Dualsystems biotech)を用いた酵母ツーハイブリッド法により KLHL7 と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。

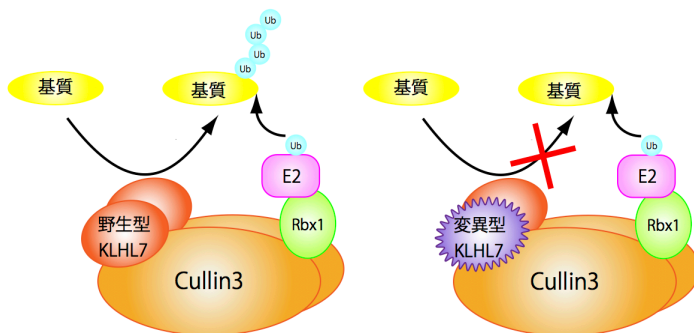
2. 酵母ツーハイブリッド法による結合ドメインの解析

スクリーニングで得られた因子が KLHL7 のどのドメインと結合するかを検証するため、酵母ツーハイブリッド法による解析を行った。

結果及び展望

酵母ツーハイブリッド法を用いたスクリーニングの結果、KLHL7 と相互作用する因子を取得した。酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングで得られた因子には偽陽性が含まれる。従って、他の生化学的解析を行うことでその相互作用を検証する必要がある。現在、哺乳類培養細胞(HEK293T)においてスクリーニングで得られた因子と KLHL7 を発現させ、免疫沈降法により相互作用を検証している。また、免疫染色法により細胞内における局在を観察している。

今後は、KLHL7 との結合が確認されたタンパク質が Cul3-KLHL7 複合体によりユビキチン化されるかを検証する。また、そのユビキチン化の生理学的意義について明らかにする予定である。KLHL7 によるユビキチン修飾系の解析は網膜色素変性症の疾患機序の解明につながると期待される。



[図 1] Cul3-KLHL7 複合体のモデル図

方法

酵母の形質転換と陽性クローンの選択

酢酸リチウム法により、PJ69-4a 株に Bait と Prey の各発現プラスミドを導入することで形質転換体を取得した。さらに、SC-LWA 平板培地で Ade2 レポーター遺伝子を発現している形質転換体を選択した。