

31G-pm02

Src 型チロシンキナーゼ Lyn の C-lobe 領域への会合分子の探索

○千代 理恵子¹, 小幡 裕希¹, 岡本 彩¹, 福本 泰典¹, 中山 祐治¹, 山口 直人¹
(¹千葉大院薬)

【目的】Src 型チロシンキナーゼ(SFKs)は、細胞膜受容体直下においてシグナルを伝達し、細胞の増殖・分化に関与することが知られている。当研究室ではこれまでに、SFKs のメンバーの一つである Lyn が細胞質で新規合成された後にゴルジ体を経由して細胞膜へ輸送されること、Lyn のゴルジ体から細胞膜への輸送はキナーゼドメイン C-lobe に結合する脂質代謝酵素 long chain acyl-CoA synthetase 3(ACSL3)によって制御されることを明らかにしてきた。しかし、Lyn の輸送の詳細なメカニズムは未だに不明である。本研究では、局在制御による Lyn の機能を解明することを目的に、更なる C-lobe 結合蛋白質の探索を試みた。【方法・結果】Lyn は、開いた構造になったときに分子表面に露出する C-lobe 領域において、ACSL3 と結合することを我々は既に見出している。そこで、Lyn のキナーゼドメイン C-lobe を GST に融合させた GST-C-lobe 融合蛋白質を調製すべく、その発現ベクターを大腸菌に形質転換した。この大腸菌を可溶化し GSH カラムで精製することにより GST-C-lobe 融合蛋白質を得た。これを用いて、HeLa 細胞の Triton 可溶性画分から C-lobe 領域特異的に結合する蛋白質を pulldown したところ、分子量 64 kDa の蛋白質(p64)が Lyn キナーゼドメイン C-lobe に結合した。【考察】C-lobe 領域は ACSL3 だけでなく p64 と結合することが分かった。そこで、p64 が Lyn のゴルジ体から細胞膜への輸送に関わっているのではないかと考え、現在 MALDI-TOF-MS 法により p64 の同定を行なっている。今後は Lyn と p64 の相互作用を in vitro GST-pulldown assay と in vivo 免疫沈降法により解析していく。また、免疫染色法により Lyn と p64 の局在解析を行う。更に、shRNA を用いたノックダウンなどにより Lyn の輸送メカニズム解析を進めていきたいと考えている。