

eIF2 α キナーゼ阻害因子 p58^{IPK}の カイコ相同遺伝子のクローニング

阪下浩介¹⁾・李在萬²⁾・日下部宜宏²⁾・
河口 豊²⁾

1)九州大学大学院生物資源環境科学府
2)九州大学大学院農学研究院

(2007年1月11日受領)

KOSUKE SAKASHITA, JAE-MAN LEE, TAKAHIRO KUSAKABE
and YUTAKA KAWAGUCHI: Molecular cloning of an inhibitor of eIF2 kinase, p58^{IPK} in silkworm, *Bombyx mori*.

RNAiは二本鎖RNAによって誘導される配列特異的な遺伝子の発現抑制現象である。哺乳類細胞においては、長い二本鎖RNAは配列非依存的に細胞内の遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られているが、昆虫細胞における二本鎖RNA応答は現在まで知られていない。本研究では、カイコ細胞の二本鎖RNA応答機構の分子機構を解明する試みの一環として、哺乳類細胞において二本鎖RNAによる翻訳抑制に関わる因子であるp58^{IPK}のカイコ相同遺伝子のクローニングを行った。カイコp58^{IPK}相同遺伝子のcDNAの塩基配列を決定したところ、その全長はおよそ2.7 kbpであり、1455 bpのオープンリーディングフレームを保持していた。推定されるタンパク質は485アミノ酸残基よりなり、TPRドメインおよびDnaJドメインを有していた。また、多重配列比較を行った結果、他の生物種の相同遺伝子と高い相同性を示した。

キーワード : カイコ, RNAi, 二本鎖RNA, eIF2キナーゼ阻害因子

緒言

RNAiは細胞内に導入された二本鎖RNAによって誘導される配列特異的な遺伝子の発現抑制現象である。真核生物において広く保存されており、様々な生物種で遺伝子の機能解析手法として利用されている。一方、哺乳類細胞においては、長い二本鎖RNAは抗ウイルス応答を誘導することで配列非依存的に細胞内の遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られている。

昆虫類では、RNAiの効果は得やすい場合が多いが、生物種による差異が大きい。鞘翅目、直翅目の昆虫ではRNAiの効果が高い場合が多いが、カイコを含む鱗翅目昆虫においてはRNAiの効果を得にくい場合がしばしばあり、RNAiによる機能解析を行う際に問題となっている。このようなRNAi効果の低さは、RNAi以外の二本鎖RNA応答機構が働いていることによる可能性が考えられるが、昆虫を含む無脊椎動物については哺乳類細

胞でみられる二本鎖RNAによる配列非依存的な影響は現在まで知られていない。

本研究では、カイコ細胞の二本鎖RNA応答機構の分子機構を解明する試みの一環として、哺乳類細胞において二本鎖RNAによる翻訳抑制に関わる因子であるp58^{IPK}のカイコ相同遺伝子のクローニングを行った。

材料と方法

カイコESTデータベース(MITA et al., 2003)に登録された部分配列情報を元に、RACE-PCR法によってカイコp58^{IPK}相同遺伝子の翻訳領域を含む塩基配列を決定した。決定した塩基配列を元にアミノ酸配列を推定し、CLUSTAL W(THOMPSON et al., 1994)およびPfam(SONNHAMMER et al., 1997)を用いて推定アミノ酸配列の多重配列比較およびドメイン解析を行った。

結果

カイコp58^{IPK}相同遺伝子のcDNAの塩基配列を決定したところ、その全長はおよそ2.7 kbpであり、1455 bpのオープンリーディングフレームを保持していた。推定されるタンパク質のアミノ酸配列は485アミノ酸残基よりなり、TPRドメインおよびDnaJドメインを有していた。また、多重配列比較を行った結果、他の生物種の相同遺伝子との高い相同性を示し、ヒト、キイロショウジョウバエ、ガンビエハマダラカの相同遺伝子との相同性はそれぞれ43%/63%、54%/71%、56%/73%(identity/similarity)であった(図1)。

考察

真核生物転写開始因子eIF2のサブユニットのリン酸化は様々なストレスによって誘導され、ストレスに応答する翻訳調節にはたらいっている。哺乳類細胞では、細胞内に導入された二本鎖RNAは細胞質に存在する二本鎖RNA依存性タンパク質キナーゼPKRを活性化し、eIF2のリン酸化を誘導することでタンパク質の翻訳開始の抑制を引き起こす。この応答はRNAiの効果に影響を及ぼすことが知られており、これを回避するために哺乳類細胞におけるRNAiではsiRNA、shRNAなどの短い二本鎖RNAが用いられている(ELBASHIR et al., 2001)。P58^{IPK}はPKRの阻害因子としてはじめ哺乳類において単離され(GALE et al., 1996)、その後小胞体ストレスによって活性化されるeIF2キナーゼであるPERKの活性も阻害することが明らかになった(YAN et al., 2002)。また、植物の相同遺伝子はウイルスの毒性発現や小胞体ストレス応答に関与することが報告されている(BILGIN et al., 2003; KAMAUCHI et al., 2005)。昆虫細胞における

P58^{IPK} の働きは現在のところ不明であるが、多くの昆虫種においても相同遺伝子が保持されており(図1)、重要な役割を担っていると考えられる。

```

BmP58 -----MDYLASISWNVKTPCLVFLIFEVVLEFSECATQAEVNHKLELGRDFLARGQLS
AgP58 -MLLNIHDSQLADSRRLGTVLLFLLELFEGAE-TATQAEIDRHELEIGRDFLARGQLS
DmP58 MALPLSDLMLIGGGEKLAACLVLVLLLELFEGAEASPADIENHLELKGKFLARGQLS
HsP58 -----MVPAGSVTSRLGSVFPFLVLLVLDLQYEGAEQGVN-ADVEKHLELGGKLLAAGQLA
TPR1
BmP58 DALTHYHAAVEGDPHNYLYFKRGTVYALGKAKFALDQFSKVLLEKPDFTSARLQRANV
AgP58 DALTHYHAAVEGDPHNYLYFKRGTVYALGKAKFAISDFSRVLELKPDTAARAQRGSV
DmP58 DALTHYHAAVEGDANNYLYFKRGTVYALGKTRFAVDFSRVLELKPDTAARAQRGSV
HsP58 DALSQFHAAYVGDPDNYIAYYRRTATVFLAMGKSKAALPDLTKVITQLKMDFTAAQRGHL
TPR2 TPR3
BmP58 YLKLQYTDKDDYLVETVYADPFNEE---ATNOYHRIDEYIDDLRVEAYYRGDHRRAAV
AgP58 YLKLQYTDKDDYLVETVYADPFNEE---ANMHSRIGPARDQWVLCVDLMFRGDFTTAI
DmP58 HMKSGEYEQAIQDFDQVLOEPPNGL---VLEHYSRLAPAEQWVLYVQQLTQYSDHGNAT
HsP58 LLKQGLDEAEDDFKVKLKSNSPSENEEKEAQSQILKSDMQRRLRSQALNAPGSDYTAAT
TPR4 TPR5
BmP58 ELATRLLDVSPIWMLRQLRAESYAALNDFSAVSDIRSVNRLQDSDTGYYRLATLLYK
AgP58 ALLSQLEVPWSPVPIRESRAQMYLIRIGDRMAVSDFRSVNRLSHDSTGYNKLARTLYD
DmP58 PMITQELLEISPIWVPRQARSDAYIATINDPLLAIDLQVNRLLTQDSTEGHYKIAQLLYT
HsP58 AFLDKLIEVQVDAELRELRACFVKEGEPKRAISDLKAASKLNDNTEAFYKISLTYYO
TPR6
BmP58 LGHV-SALKEIREGLRDLPEHKCFPFYKVKVVDKLLQECEDKSSARDFAGOMKSSASAV
AgP58 IGDSSGAALKEIREGLRDLPEHKCFPFYKIKKVKVYVVDQATAREEQRKDCVAGGKEL
DmP58 IGHATNALKEIREGLRDLPEHKCFPFYKLRVKEKLVNVAEQAREEKHFAECIAAGEAV
HsP58 LGDHLELSLSEVREGLRDLPEHKCFPFYKIKKVKVYVVDQATAREEQRKDCVAGGKEL
TPR7
BmP58 LLVETEVTLVIFARRWLCSCAVKEFELYSEFALGHCSAL EIRATR-DCCATRR-RAARTR
AgP58 IKLEPDPVPIVYNGKQLLCSCLVEKEEFTDAVVRREALDYPDPEVMCDRAE-ALIGAE
DmP58 LRNEPEETMIRYEGHKVLCYTGDEQFGKALQQCKEALDIMKDAQVYGRAD-ALLGTE
HsP58 MKTEPSIAEYTVRSKERI CHCFSKDEKPEVAIRVCEVLEQMPDNVWALKDRAEAYLIEE
TPR8
BmP58 DVRRPITRAYKEALEDEGFORAKEGLSRAQKLOKQSEQRDYKILGVKRTATKQEI IKAY
AgP58 MYDEATAQYREALEINDNLRAKDGI EHAQRVOKQAEERDYKILGVKRTATKQEI IKAY
DmP58 MYDDAHSFOALDLEEENRTRAKGIRAKKLOKQSEQRDYKILGVKRSASKQEI IKAY
HsP58 MYDEATQDYETAQEHNNDDOIREGLEKAQRLLKQSKRQDYKILGVKRNKAKQEI IKAY
DnaJ
BmP58 RKAQKWHPDNYHGDE-KKLAEKFFIDIAAAKEVLTDPERAFDGGSD-DPLDP-----
AgP58 RKAQKWHPDNYGDDQ-KKMAEKFFIDVAAKEVLTDPERKRRFDAGDPLDPE-----
DmP58 RKAQKWHPDNFRDEE-KKVAEKFFIDIAAAKEVLTDPERKRRFDNGDPLDPE-----
HsP58 RKLALQWHPDNFQNEEKKKAEKFFIDIAAAKEVLTDPERKRRFDGGEPLDDEAQQGGGG
DnaJ
BmP58 -DAQHDAFHSFP---HHFQHGSPFQFKFHFN
AgP58 -AG-RNGFGGNGPFHFFHHGSPFQFKFHFN
DmP58 -SNQRGGFGEHPFHFFHGHGSPFQFKFHFN
HsP58 GNPFRHSWNSWQGFNPFSSGGPFRFKFHFN

```

図1 P58^{IPK} 相同タンパク質のアミノ酸配列の多重配列比較
比較した全配列において保存されているアミノ酸残基を赤、類似したアミノ酸残基を青で示した。破線は TPR ドメイン、太線は DnaJ ドメインを示す。AgP58, *Anopheles gambiae* hypothetical protein (XP_312173.1)。DmP58, *Drosophila melanogaster* CG8286-PA (NP_649916.1)。HsP58, *Homo sapiens* DNAJC3 (NP_006251.1)。

文 献

- BILGIN, D. D., LIU, Y., SCHIFF, M. and DINESH-KUMAR, S. P. (2003) P58^{IPK}, a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Dev. Cell*, **4**, 651-661.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. and TSUSCHL, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- GALE, M. JR., TAN, S. L., WAMBACH, M. and KATZE, M. G. (1996) Interaction of the interferon-induced PKR protein kinase with inhibitory proteins P58^{IPK} and vaccinia virus K3L is mediated by unique domains: implications for kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4172-4181.
- KAMAUCHI, S., NAKATANI, H., NAKANO, C. and URADE, R. (2005) Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.*, **272**, 3461-3476.
- MITA, K., MORIMYO, M., OKANO, K., KOIKE, Y., NOHATA, J., KAWASAKI, H., KADONO-OKUDA, K., YAMAMOTO, K., SUZUKI, M. G., SHIMADA, T., GOLDSMITH, M. R. and MAEDA, S. (2003) The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 14121-14126.
- SONNHAMMER, E. L., EDDY, S. R. and DURBIN, R. (1997) Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*, **28**, 405-420.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. and GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- YAN, W., FRANK, C. L., KORTH, M. J., SOPHER, B. L., NOVOA, I., RON, D. and KATZE, M. G. (2002) Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 15920-15925.