

[生物学標準]

次の文を読み、以下の設問（１）～（３）に答えよ。

（i）あるシグナル伝達経路ではプロテインキナーゼ X、機能未知のタンパク質 A、B が働く。B は X 及び A と結合することが分かっている。UV 刺激を与えた^(ア)細胞から細胞抽出液を回収したところ、A は SDS-PAGE 上で非刺激時に比べて移動度が低下した。UV 刺激に依存した A の移動度の変化は、X あるいは B を欠失した細胞では認められなかった。A の移動度の変化が^(イ)翻訳後修飾によるものであるかどうかを調べたところ、^(ウ)リン酸化がこの移動度低下の一因であることがわかった。

（ii）A がプロテインキナーゼ X の直接の基質であるかどうかを *in vitro* キナーゼ・アッセイで調べた。上流刺激なしでも活性をもつ^(エ)恒常的活性型のプロテインキナーゼ X を精製し、^(オ)³²P で標識した ATP を用いて、X による A のリン酸化を A への放射能の取り込みを指標に調べた。X 単独では A のリン酸化は極めて弱いですが、タンパク質 B を添加すると A のリン酸化が劇的に上昇した。B 単独では A のリン酸化は検出されなかった。

（iii）その後の研究から、A はプロテインキナーゼ X の直接のリン酸化基質であることがわかった。B 存在下でのプロテインキナーゼ X による A のリン酸化について、そのキネティックスを *in vitro* キナーゼ・アッセイにより検討した。また、プロテインキナーゼ X の良い基質として知られる C についても、X によるリン酸化反応速度を計測した。このリン酸化反応は単純なミカエリス・メンテン反応にしたがうと仮定する。

（１）

（a）下線（ア）について。細胞抽出に使用した細胞溶解バッファー中には以下の試薬が含まれていた。試薬について使用目的を含めて 30 字程度で説明せよ。

- ・ PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)
- ・ Triton X-100

（b）下線（イ）について。タンパク質の翻訳後修飾の一つとして、タンパク質の C 末端のシステイン残基にプレニル基が結合するプレニル化がある。プレニル化によるタンパク質の脂質修飾により、修飾タンパク質はどのような局在制御をうけるか。プレニル基の化学的性質をもとに 30 字程度で説明せよ。

（c）下線（ウ）について。タンパク質の移動度の低下がリン酸化によることを、バンドシフトを指標に調べる方法を 50 字程度で説明しなさい。リン酸化特異的抗体は使用しないものとする。

(2)

(d) 下線(エ)について. プロテインキナーゼ X はそのキナーゼドメイン内のトレオニン残基が上流キナーゼによりリン酸化されて活性化する. この活性化はキナーゼドメイン内の電荷の変化によると考えられ, トレオニンを同様の電荷変化をもたらすアミノ酸に置換すると X は恒常的活性型になる.

プロテインキナーゼ X を恒常的活性型にするには上記のトレオニン残基をどのアミノ酸に置換すればよいか. 可能性のある 2 種類のアミノ酸を 3 文字表記で記すとともに, それぞれの構造式を書きなさい.

(e) 下線(オ)について. *in vitro* キナーゼ・アッセイに用いた ^{32}P 標識されている ATP は, α 位, β 位, γ 位のうちのどのリン酸基が標識されているか.

(f) 文(i)(ii)のみからでは, タンパク質 B 添加時におけるタンパク質 A の劇的なリン酸化上昇は, プロテインキナーゼ X がタンパク質 A を直接の基質とするリン酸化によるものとは言い切れない. 他の可能性をあげなさい.

(3)

(g) プロテインキナーゼ X による基質 C のリン酸化反応に関して, *in vitro* キナーゼ・アッセイにより得られた「C の濃度 (横軸) — 反応速度 (縦軸)」のプロットを図 1 に示す. プロテインキナーゼ X の濃度は 0.5 nM, V_{\max} は 800 pM/s として, ミカエリス・メンテン定数 K_m (nM) 及び 酵素の触媒触媒定数 k_{cat} (s^{-1}) の値を答えよ. 答えに至る式も添えること.

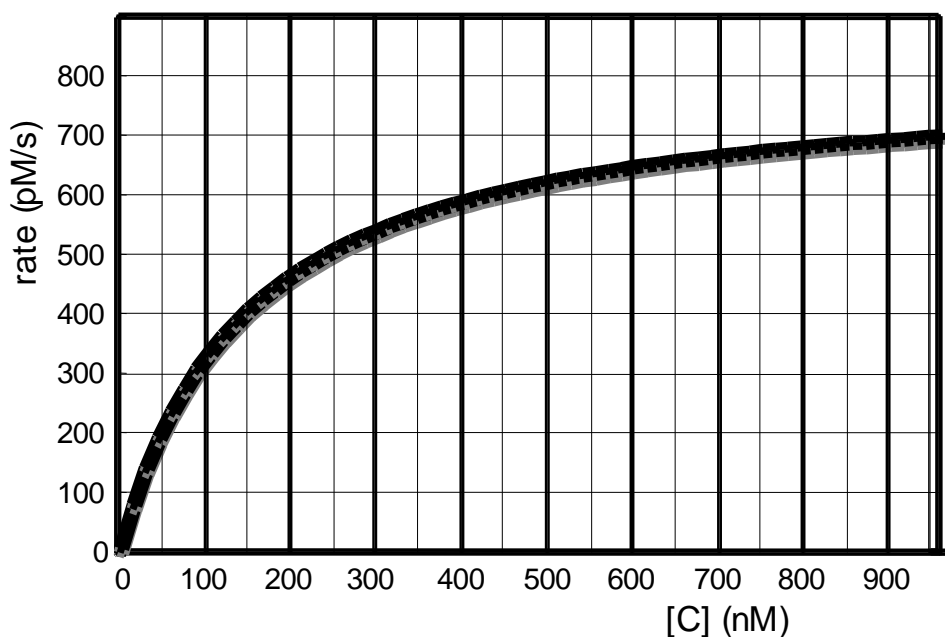


図 1. タンパク質 C の濃度とプロテインキナーゼ X による C のリン酸化反応速度

(h) プロテインキナーゼ X による A のリン酸化における K_m 及び k_{cat} の値を, B が共存する場合, 共存しない場合の両方について表 1 に示した. 「タンパク質 B はプロテインキナーゼ X と基質 A の両者と結合することで間接的に両者の親和性を高めてリン酸化反応を促進する.」という仮説について, 表 1 のデータから判断して, その妥当性を述べなさい.

表 1. プロテインキナーゼ X の A リン酸化における K_m 値及び k_{cat} 値

タンパク質 B	K_m (nM)	k_{cat} (s^{-1})
非存在時	131	7.4×10^{-7}
存在時	139	3.3×10^{-3}