

Title	抗染色体モノクローナル抗体M108を利用した核-染色体の構築機構についての研究
Author(s)	金田, 能尚
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38136
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	かね だ よし なお 金 田 能 尚
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 10610 号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	抗染色体モノクローナル抗体 M108 を利用した核-染色体の構築機構 についての研究
論文審査委員	(主査) 教授 田中亀代次 (副査) 教授 吉川 寛 教授 松原 謙一

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

染色体は遺伝情報を次の世代に伝えるばかりでなく核を構成する重要なオルガネラである。しかし高等動物における染色体の構築機構の大部分は依然として不明のままである。そこで高等動物における染色体の構築機構を解明するために種々の抗染色体モノクローナル抗体を用いて解析を進めてきた。そのうち1つの抗体 M108 は核、染色体及び細胞質の各々の分画に分子量 40kDa のタンパク質 (p40) を共通抗原として認識するが、各々の抗原は細胞周期に応じて分裂間期の核膜, S~G 2 期の細胞質内 particle, 分裂期の染色体周囲とその局在を変える。また細胞質内 particle は径約 30nm 前後のタンパク複合体であることも明らかになっている。染色体の構築機構を解明するためには核の構築や細胞質の因子の関与を知る必要があり、その点から M108 をプローブとして解析することにより更に従来解明されていない高等動物における染色体の構築のメカニズムが、明らかになると考えられる。本研究では、特に M108 の核内抗原 p40 に注目しその機能につき解析し検討を加えた。

(研究方法)

M108 を利用し間接蛍光抗体法により抗原の局在を調べると共に分裂間期及び分裂期の各段階での抗原の局在の変化を Laser confocal 顕微鏡を用いて調べた。さらに核内の抗原の局在は免疫電顕法でも確かめた。次にこの核内抗原 p40 の生化学的性状を調べるためにエールリッヒ腹水癌細胞 (マウス) から核を分離し DNaseI 処理 (200 µg/ml), Salt wash 処理 (0.15M NaCl), high salt-detergent 処理 (0.5M NaCl, 2 % NP40) を行いそれぞれの抽出液をイムノプロットし p40 の抽出条件を調べた。単離した染色体についても染色体周囲抗原 p40 の抽出条件を検討した。さらに G 2 期の細胞内に M108 を導入し、その及ぼす影響を観察し p40 の機能について検討した。

(結果及び考察)

まず M108 による間接蛍光抗体法を行った。それによると核内の p40 は、分裂間期の核膜周囲に存在し分裂期になると染色体周囲へと移行する。Laser confocal 顕微鏡を用いた観察では分裂間期の核膜周囲の局在がさらにはっきりする。さらに分裂期では、その抗原が段階をおって凝縮クロマチンの周囲、個々の染色体周囲へと移行し再びクロマチンの周囲を経て核膜へと移行していく様子がとらえられた。免疫電顕法では、分裂間期の核においては p40 は核膜内側でクロマチンが核膜に結合する所に集中して局在していることが解った。次にまずコルセミド処理で M 期に同調させた細胞から染色体を分離し染色体周囲の p40 の抽出条件を調べた。染色体周囲の p40 は DNaseI によつての

み抽出が可能であり high salt や detergent 処理では抽出できなかった。次に核膜周囲の P40 の抽出条件を調べる為にエールリッヒ腹水癌細胞（マウス）から核を単離し、DNaseI 処理（200 μ g/ml）→salt wash 処理（0.15M NaCl）→high salt detergent 処理（0.5M NaCl, 2%NP40）を行いそれぞれの抽出液を M108, 抗ヒストン H1 抗体, 抗ラミンB 抗体を用いてイムノブロットを行った。クロマチン結合タンパクであるヒストン H1 は DNaseI 処理により抽出されるが p40 は DNaseI 処理だけでは抽出されず salt wash 処理後に high salt-detergent 処理を行うことで初めて抽出が可能であった。これは核膜の裏内タンパクであるラミンB の抽出条件と同一であった。さらに抽出方法の変法を試み、まず salt wash 処理を行い、続いて high salt 及び detergent 処理を施行し、最後に DNaseI 処理を行いそれぞれの抽出液を M108 と抗ラミンB 抗体でイムノブロットした。その結果、ラミンB は high salt-detergent 処理で抽出されたが p40 は high salt-detergent 処理後に DNaseI 処理を行い初めて抽出が可能であった。これらのことは分裂間期の核では p40 はクロマチンと核膜の両方に結合していることを示唆するものであり、クロマチンは p40 を介して核膜に結合することで高次構造を保持していると考えられる。また M108 を G2 期の細胞質内へ導入した所、染色体の不分離或は脱凝縮の阻害により mitotic arrest を起こすことが観察され、この抗原 p40 が分裂期の後半に染色体の周囲に核膜が生成される step にも関与していることが示唆された。

（総括）

抗染色体抗体 M108 を用いてその核内抗原 p40 の機能に関して解析し、以下のことが判明した。

1. 分裂間期の核ではクロマチンは p40 を介して核膜と結合しその高次構造の保持を行っている。
2. p40 は分裂期後半にクロマチンの周囲に核膜が生成される step にも深く関与している可能性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

現在においても高等動物における核-染色体の構築機構の大部分は依然として不明のままであるのが現状である。しかし本研究は抗染色体モノクローナル抗体を作成し、それらを利用することにより核-染色体の構築機構の解明を試みたものである。その結果として従来報告されていない新しい染色体周囲タンパク質の同定に成功し、しかも形態学的及び生化学的分析からそのタンパク質の染色体の構築機構への関連を明らかにした。今後このアプローチを発展させることにより核-染色体の構築機構がさらに解明されるものと期待される。以上より本研究はその結果と方法論において十分注目されるものであり学位論文に値するものとする。