

Title	分裂期細胞への外来性ヒストンH1の注入による染色体脱凝縮の遅延とその細胞分裂への影響
Author(s)	松岡, 洋祐
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38160">https://hdl.handle.net/11094/38160</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	まつおかようすけ 松岡洋祐
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10622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	分裂期細胞への外来性ヒストンH1の注入による染色体脱凝縮の遅延 とその細胞分裂への影響
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓 (副査) 教授 田中亀代次 教授 上田 重晴

### 論文内容の要旨

#### (目的)

細胞分裂終期には染色体の脱凝縮、紡錘体から間期微小管への再編成、核膜の再形成といった現象が同調して進んでいき、その結果2個の正常な娘細胞が生ずる。これらの現象は同調的にしか進行し得ないものであるのかそれとも独立に進行し得るものであるのかを知る目的で以下の研究を行った。

#### (方法ならびに成績)

細胞分裂終期に起こる現象の一つである染色体の脱凝縮を遅延させることを試みた。ヒストンH1(以下H1と略記)は染色体凝縮に関与していることが示唆されているので、分裂期の細胞に過剰量のH1を注入しその影響を見た。

H1分画はウシ胸線の核から過塩素酸により抽出した。これをSDSゲル電気泳動にかけ、H1の2つのサブタイプ、H1A、H1Bを精製した。得られた結果が確かにH1に起因するものであること明らかにするために、ニフトリのH1を大腸菌で発現させ、これをSDSゲル電気泳動で精製したのもを使用した。

3mg/mlの精製H1をRat Kangaroo腎由来の細胞であるPtK2 cellのprometaphaseに注入し、45、90、180分後にそれぞれ固定し、ヘキスト染色で染色体を、抗チューブリン抗体、抗ラミンB抗体(ラミンBは核膜の裏打ちをしている蛋白質である)を用いた間接蛍光抗体法で、それぞれ紡錘体及び微小管、核膜を染色した。対照としては、H1同様に低分子量で塩基性蛋白質であるチトクロームCを注入した。チトクロームCを注入した場合、45分以内にヘキスト染色、抗チューブリン抗体染色、抗ラミンB抗体染色ともに正常な、2個の娘細胞が観察された。H1を注入した場合には、45、90分後では細胞のほぼ中央に並んだままで脱凝縮していない染色体が観察され、抗チューブリン抗体では紡錘体が、抗ラミンB抗体では微小な顆粒が観察された。これらは正常な細胞分裂におけるmetaphaseの像によく似ていた。180分後では、染色体はmetaphase型とは異なる形とはなるものの依然として凝縮していた。一方、抗チューブリン抗体では間期型の微小管が観察され、抗ラミンB抗体では凝縮した染色体の周りに核膜前駆体と思われる構造体が観察された。染色体は二分されずに一塊りとなって存在し、細胞質分裂も起きていなかった。注入後24~48時間後には染色体は完全に脱凝縮し、核膜もほぼ正常な形となった核を一つもつ細胞が観察された。

次に上記のH1の活性がH1のリン酸化状態と関係するかどうか調べた。H1を細胞分裂期に支配的に働いているとされるMPF(成熟促進因子=細胞分裂促進因子)でリン酸化、あるいはアルカリ性ホスファターゼで脱リン酸化

し、それらの活性を調べたところ、無処理のものと差が見られなかった。

以上の結果はH1A, H1Bどちらのサブタイプでも、また組換えH1を用いても同様に観察された。

H1を注入して3時間後には、ラミンBを有する複数の構造体が観察された。構造体にはラミンBがその構造体全体（おそらくその内部まで）に存在するもの（タイプAとする）と、構造体の辺縁部（おそらく膜上のみ）に存在するもの（タイプBとする）の二種類が観察された。タイプBは染色体が局部的に脱凝縮しつつある細胞に見られることから、タイプAに染色体脱凝縮に伴う何らかの変化が加わってタイプBが出現すると推測される。このような構造体は核膜前駆体と考えられる。これらの構造体に核蛋白質が輸送され得るかどうかを知るために、H1注入後3～7時間後にSV40 (Simian Virus 40) large T 抗原の核移行シグナル合成ペプチドを結合したウシ血清アルブミンを注入し30分後に固定して、その局在を観察した。その結果、タイプBの構造体には核蛋白質が局在することが判明した。タイプBの構造体のなかにはDNAを含まぬものが観察されることがあるが、そのようなものにも核蛋白質は局在した。SV40 large T 抗原の核移行シグナル中の一つのアミノ酸を変換し、核移行活性をなくしたのを用いた場合には、タイプB型への局在化も観察されなくなった。従って、タイプB型構造体には能動輸送により核蛋白質が移行することが確認された。

(総括)

1. H1をprometaphaseに注入することで染色体脱凝縮の遅延を引き起こすことができた。この活性に関してはH1のリン酸化状態やサブタイプ間による差は見られなかった。
2. 染色体脱凝縮が遅延しても紡錘体は間期型微小管に再編成され、核膜の再形成も進行する。従って、染色体の脱凝縮と微小管の再編成、核膜の再形成過程の一部（おそらくタイプAの構造体出現まで）は独立に起こり得ると結論できた。
3. DNAを含まぬ核蛋白質局在化活性を有する構造体が出現し得ることがわかった。
4. H1注入後に観察される核蛋白質の局在化が起こる構造体と、起こらない構造体とを比較、検討することにより核蛋白質局在化に必要な構造、機能に関わる因子を追求できることが期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

高等真核生物の細胞分裂終期には、様々な現象が同調して進行していく。これらの現象を総合的に理解するうえで個々の現象がそれぞれどの程度独立性を持って進行し得るかを知らずには非常に意義深いものである。本論文ではヒストンH1を用いることにより、染色体脱凝縮という一つの現象を遅延させることに成功し、その結果、染色体脱凝縮と紡錘体から微小管への再編成は独立に起こり得ること、核膜の再形成はある程度独立に進行するものの、核蛋白質輸送能という機能を持つ核膜となるには染色体脱凝縮が必要であることが示唆された。これらがほ乳類細胞をin vivoで解析した成果であることも高く評価できる。また、核膜形成の中間段階と考えられる構造体が同定されたことは今後、核膜の構造と機能に関する研究が行われていく上で重要な意味を持つと思われる。

以上の理由により、本論文は学位論文として十分価値があるものと認められる。