

Title	cDNA cloning of the murine 30-kDa protein homologous to the 32-kDa subunit of human replication protein A.
Author(s)	中川, 雅史
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38308
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名	中 川 雅 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 5 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 2 月 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	cDNA cloning of the murine 30-kDa protein homologous to the 32-kDa subunit of human replication protein A. (人のreplication protein Aの32-kDaサブユニットと相同のマウス30-kDa蛋白質のcDNAクローニング)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 木 谷 照 夫 教 授 辻 本 賀 英

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

免疫グロブリンH鎖V領域遺伝子の再編成に関わると考えられている、高度に保存されたシグナル塩基配列に結合する蛋白質を、マウス pre B 細胞株の核蛋白抽出液中に同定し、精製を通してその cDNA をクローニングすることを目的として研究を行なった。

〔方 法〕

1. 細胞培養, 核蛋白抽出及び蛋白質精製:

Balb/cマウスを Abelson virus で transform した pre B 細胞株 (AT3-44-16) を大量培養器にて培養し、粗核分画を分離後核蛋白を抽出した。前記シグナル配列を含む53baseの合成 DNA (5' -CCAGAGACACAGTGAGGGA AGTCCAATGTGAGCCTGCACAAATACCTCTCTGC-3') を化学的に結合させて作製した DNA affinity column に、核蛋白抽出液を800mM KCl の高塩濃度条件で apply し、十分洗條後、2000mM KCl に塩濃度を上昇させることにより DNA に結合した蛋白質を回収した。

2. DNA 結合活性の検定:

精製に用いた DNA を³²P で標識した probe を用い、gel retardation assay を行なった。

3. 部分アミノ酸配列の決定:

精製された蛋白質を SDS-PAGE 後 PVDF 膜に electroblotting し、Ponceau 染色下に切り出し、lysyl endopeptidase にて in situ digestion を行なった。溶液中に溶出した polypeptide を HPLC にて精製後、automatic amino acid sequencer にて、それぞれのアミノ酸配列を決定した。

4. cDNA クローニング:

決定されたアミノ酸配列より、degenerated mixed oligonucleotide primer を合成し、同じ細胞株より作製した cDNA を template に PCR 反応を行ない、DNA fragment を得た。その DNA fragment を probe として、λgt10 に作製した cDNA library をスクリーニングしクローニングを行なった。

5. cDNA の DNA 配列の決定, コードされる蛋白質の一次構造の推定, ホモロジー検索:

得られた cDNA を M13 vector にクローニングし, deletion mutant 法にて DNA sequence を決定した。さらに, open reading frame を推定し, 蛋白質一次構造を決定した。date base との間で, アミノ酸レベルのホモロジー検索を行なった。

〔結果〕

1. 50リットルの細胞培養より560mgの核蛋白を得, 精製の結果, 36 μ gのDNA結合蛋白質を回収した。SDS-PAGE上66-, 54-, 30-kDaの3種類の蛋白質がほぼ均一なバンドとして精製された。
2. gel retardation assayの結果, 上記蛋白質回収液にはDNA結合活性が認められた。さらにDNA probeのannealing状態を変化させたprobeを用いたgel retardation assayの結果, DNA結合活性は, 二本鎖DNAよりも一本鎖DNAに対し強いことが判明した。
3. 30-kDa蛋白質に関し5つのpolypeptideのアミノ酸配列が決定できた。
4. PCR反応の結果, 462baseのDNA fragmentが得られ, そのDNA配列は判明しているアミノ酸配列をコードしうるものであることが確認された。そのDNA fragmentをprobeとして使い, 100万plaqueより10ヶのcDNAクローンを得ることができた。
5. DNA配列を決定したところ, cDNAは1447baseよりなり270アミノ酸をコードしうるものであり, その際推定分子量約30-kDaとなりSDS-PAGE上の分子量と一致し, しかも決定されたすべてのアミノ酸配列を含むものであることから, 精製された30-kDa蛋白質のcDNAであることが確認された。またホモロジー検索の結果, この蛋白質は, 人のreplication protein A (以下RP-A)の32-kDaサブユニットと同じアミノ酸数よりなり, その87%が一致, 95%が類似していた。

〔総括〕

今回我々は, 人のRP-Aの32-kDaサブユニットと相同のマウス30-kDa蛋白質を精製し, そのcDNAをクローニングした。人のRP-Aは70-, 32-, 13-kDaのサブユニットよりなり, 一本鎖DNAに結合し, DNA複製を促進する活性を持つ細胞の増殖に関わる蛋白と考えられている。また, 遺伝子の相同的組み換えを促進する活性も報告されており, 免疫グロブリン遺伝子の再編成にも何らかの形で関与している可能性も考えられる。さらに, その32-kDa蛋白質は, 細胞周期によりリン酸化・脱リン酸化をうけRP-Aの機能調節に関わると考えられており, 今回の研究により, 人とマウスの間でアミノ酸レベルで高い保存が示されたこともその機能的な重要性を示唆すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は, マウス pre B細胞株の核蛋白抽出液中に, 免疫グロブリン遺伝子の再編成に関わると考えられているシグナル配列に結合する蛋白質を, 同定, 精製し, そのcDNAをクローニングすることを目的として行なわれたものである。

DNA affinity columnにより最終精製された66-k, 54-k, 30kDaの蛋白のうち, 30-KDa蛋白質のcDNAがクローニングされ, その一次構造が決定された。

それは, 人のreplication protein A (RP-A)の32-kDaサブユニットと高度に類似していることが明らかになり, そのマウスホモログと考えられた。

人のRP-Aは, DNA複製や遺伝子の相同的組み換えに関与することが知られており, 免疫グロブリン遺伝子の再編成にも関与する可能性が考えられる。

本研究により, マウスのRP-Aの30-kDaサブユニットの一次構造が明らかになり, 今後RP-Aの機能を分子レベルで解明する手がかりの1つとなった点, 学位論文に値する。