



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	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38308
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 中 なか がわ 川 雅 まさ 史 し
 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 AGTCCAATGTGAGCCTGCACAAATACCTCTGC-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 をスクニ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 μg 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, そのマウスホモローグと考えられた。

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。