



Title	Bcl-2蛋白の細胞内局在の解析
Author(s)	片岡, 政子
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39878
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	片岡政子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12370号
学位授与年月日	平成8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	Bcl-2蛋白の細胞内局在の解析
論文審査委員	(主査) 教授 辻本賀英
	(副査) 教授 米田悦啓 教授 内山安男

論文内容の要旨

[目的]

Bcl-2蛋白の細胞内局在を知ることは、この蛋白の生理的な機能を知る第一歩として重要である。Bcl-2は膜蛋白であり、膜局在にはC末端疎水性領域が必要であり、細胞死抑制活性には膜局在が必要であるとされている。本研究では、生化学的細胞分画法および蛍光抗体法を用いてBcl-2蛋白の細胞内局在を明らかにし、さらに、体系的に作成した欠失変異蛋白を *in vitro* ミトコンドリア輸送系を用いることにより膜局在に必要な領域を同定することを目的とした。

[方法ならびに成績]

1) 生化学的細胞分画法および蛍光抗体法: ヒトBcl-2cDNAをネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクターpBC140にサブクローニングし、このプラスミドをカルシウム沈殿法により Ψ 2細胞にトランスフェクトし、G418(Genticin)にてセレクションを行い、Bcl-2を発現する Ψ 2細胞を得た。生化学的細胞分画法にてこの細胞より核分画、heavy membrane分画(ミトコンドリアを含む)、light membrane分画(ミクロソームを含む)、cytoplasm分画を回収し、蛋白を12.5% SDS-PAGEにて分離し、抗ヒトBcl-2モノクローナル抗体を用いたウエスタンプロットによりBcl-2を検出した。その結果、Bcl-2は大部分が核分画、特に外膜、とheavy membrane分画に、少量のlight membrane分画にも存在することが明らかとなった。また、この細胞を使って、抗ヒトBcl-2モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法、および、Zeissレーザースキャン顕微鏡による解析を行い、Bcl-2が核質ではなく細胞質内にheterogeneousに分布することを示す結果を得た。これらは、Bcl-2が核、ミトコンドリア、小胞体等の細胞小器官の膜に広く局在することを示唆する。

2) *in vitro* ミトコンドリア輸送系: Bcl-2のcDNAの欠失変異をほぼ全域をカバーするように導入し、それらの *in vitro* 転写および翻訳により、 $^{[35]}\text{S}$ メチニオンで標識した欠失変異蛋白を合成した。これらを前駆体蛋白とし、ラット肝ミトコンドリアを用いた *in vitro* ミトコンドリア輸送系でのアッセイを行った。その結果、Bcl-2のcDNA欠失変異蛋白のうち、カルボキシル末端の疎水性領域を欠くものと、それより上流の非疎水性領域を欠くものが、ミトコンドリアに移行しないことをみいだした。その他の部位に欠失を有する変異蛋白は野性型のBcl-2と同様、ミトコンドリアの膜に強固に結合することが明らかとなった。この結果より、Bcl-2蛋白の膜局在に必要な部位はカルボキシル末端の疎水性領域およびそれより上流の非疎水性領域であることが明らかになった。

[総括]

- 1) Bcl-2 蛋白の細胞内局在を細胞分画法および蛍光抗体法を用いて解析した結果, Bcl-2 は核膜, ミトコンドリア, 小胞体等の細胞小器官に広く分布することを明らかにした。
- 2) 体系的に作成したBcl-2 の欠失変異蛋白を *in vitro* ミトコンドリア輸送系に用いた結果, Bcl-2 蛋白の膜局在に必要な部位はカルボキシル末端の疎水性領域およびそれより上流の非疎水性領域であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究では, 細胞分画法という生化学的手法と蛍光抗体法および免疫電顕法という形態学的手法を組み合わせて用いることにより, 詳細に bcl-2 蛋白の細胞内局在を調べている。結果より, bcl-2 蛋白が核外膜, ミトコンドリア外膜, 小胞体膜等に広範に局在することが明らかになった。また *in vitro* ミトコンドリア輸送系により, bcl-2 蛋白がミトコンドリア外膜に局在することを示した。さらに, 体系的に bcl-2 のほぼ全域を網羅する欠質変異を作成し, その変異体を *in vitro* ミトコンドリア輸送系でアッセイすることにより bcl-2 の膜局在に関与する部位を明らかにした。これらは, bcl-2 蛋白の機能を解明する第一歩として重要である。よって, 本研究は学位に値する。