



Title	CHARACTERIZATION OF A NUCLEAR FACTOR THAT ENHANCES DNA BINDING ACTIVITY OF ssCRE-BP/PUR α , A SINGLE-STRANDED DNA BINDING PROTEIN
Author(s)	丁, 云
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39999
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	丁 い 云 うん
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 12989 号
学位授与年月日	平成 9 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	CHARACTERIZATION OF A NUCLEAR FACTOR THAT ENHANCES DNA BINDING ACTIVITY OF ssCRE-BP/PUR α , A SINGLE-STRANDED DNA BINDING PROTEIN (一本鎖 DNA 結合蛋白質 ssCRE-BP/pur α の DNA 結合活性を増加させる因子について)
論文審査委員	(主査) 教授 三木 直正
	(副査) 教授 津本 忠治 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

慢性モルヒネ投与により生じる耐性や依存性の機構を解明するために、オピオイド受容体やサイクリック AMP (cAMP), カルシウムなどの系を中心に研究が進められてきた。しかし、モルヒネの長期投与によって現れる耐性や依存性の現象を、比較的短期間の反応であるアデンレートシクラーゼ活性や蛋白質リン酸化のみで説明するのは困難である。このような観点から、モルヒネによる遺伝子発現調節の研究が耐性や依存性の機構を解明する上で重要であると思われる。当研究室では、ソマトスタチン遺伝子のプロモータ領域の cyclic AMP response element (CRE) を含むオリゴ DNA をプローブとしてゲルシフトアッセイを行い、神経細胞由来の NG108-15 細胞及びマウス小脳の核抽出液中に、慢性モルヒネ処理により変化する一本鎖 CRE 結合蛋白質 ssCRE-BP/pur α が存在することを見出した。本研究では、この ssCRE-BP/pur α 及びその活性化因子の性質を調べ、モルヒネの作用部位についても検討した。

【方法】

(1)薬物投与法：体重 25-30 g の ddy 系雄性マウスに初日 10 mg/kg から 20, 40, 80, 100 mg/kg まで連日增量し、その後、100 mg/kg を維持量として更に 3 日間、1 日 2 回ずつ皮下投与した。

(2)ssCRE-BP/pur α の cDNA の発現ベクター pGEX-2 T への組み込み：ssCRE-BP/pur α の cDNA を *Ava* II と *Eco* R I で切り出し、5' 末端側に、合成 *Bam* H I - *Ava* II アダプターをつけ、pGEX-2 T 発現ベクターに挿入した。各欠損変異型組み替え蛋白質は pGEX-2 T - ssCRE-BP を制限酵素で欠損させた後、あるいは polymerase chain reaction (PCR) により欠損 cDNA フラグメントを作製し、pGEX-2 T にサブクローニングした。

(3)組み替え蛋白質の精製：各組み替え蛋白質を大腸菌で発現させ、ハーベストした大腸菌をバッファ A (20 mM HEPES (PH7.6), 100 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluroide) 中で超音波破碎後、10,000 g 10 分間遠心し、その上清を Glutathione-Sepharose 4 B アフィニティカラムにかけ、融合蛋白質を精製した。

(4)ゲルシフトアッセイ：ソマトスタチンの CRE を含む 36 マーオリゴ DNA を合成し、[32 P] ATP と T 4

polynucleotide kinase 用いて、5' 末端を標識した。この標識オリゴ DNA と核抽出液あるいは精製した組み替え融合蛋白質と室温で30分間反応した後、4% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーを行った。

(5) ウエスタンプロット：マウスの各組織の蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲルケに泳動した後、ニトルセルロース膜に転写した。精製した GST-ssCRE-BP を抗原として、ポリクローナル抗体を作製し、ssCRE-BP/pur α の分布を検討した。

(6) 免疫組織化学：ssCRE-BP/pur α のポリクローナル抗体を用い、各組織及び各種類の細胞において、ssCRE-BP/pur α の分布を検討した。

【成績】

(1) ウエスタンプロット及び免疫組織化学により、ssCRE-BP/pur α は神経由来の細胞系及びマウスの脳に高い発現を認めた。このことから、ssCRE-BP/pur α が、脳において重要な機能を持つことが示唆された。

(2) ssCRE-BP/pur α と DNA との結合ドメインを決定するために、組み替え蛋白質合成法により、野生型 ssCRE-BP/pur α 蛋白質 (FT) 及び各種の欠損変異型蛋白質を合成した。いずれも大腸菌で発現させ、目的の蛋白質は Glutathione Sepharose 4 B カラムクロマトグラフィーにより精製した。各種の蛋白質は SDS-PAGE 上で分子サイズから予想される位置に認められた。ssCRE-BP/pur α またはその欠損変異型蛋白質と DNA との結合はゲルシフドアッセイを用いて検討した。ssCRE-BP/pur α の N-末端側のグリシン多い部分を欠損したもの (N50), C-末端側のグルタミン、グルタミン酸多い部分を欠損したもの (C228), あるいは両側を欠損したもの (50-215, 50-228) は、ssCRE-BP/pur α の DNA 結合能に影響しなかった。しかし、欠損蛋白質 (50-215) をさらに N-末端側 (165-215) あるいは C-末端側 (50-165) を欠損したところ、両方とも DNA との結合能を失った。C-末端側のグルタミン、グルタミン酸の多い部分は多くの転写因子に共通して見られるが、この部分を含む欠損蛋白質 (N215) は DNA と結合しなかった。以上の結果より、ssCRE-BP/pur α と DNA との結合に必要なドメインは、50番目アミノ酸残基から215番目アミノ酸残基にわたる部分に存在すると考えられる。

(3) 精製した ssCRE-BP/pur α と GST-ssCRE-BP は、単独では DNA との結合活性は弱かった。しかし、カゼインや内在性活性化因子 (activator) により、DNA 結合能が著明に増大した。この内在性活性化因子は、約66kDa で、熱安定性、トリプシン感受性の蛋白質であった。

(3) モルヒネ慢性投与群のマウス小脳の ssCRE-BP/pur α の mRNA 量や蛋白質量は対照群と有意な差はみられなかったが、内在性の ssCRE-BP/pur α の DNA 結合活性を増加させる因子がモルヒネ慢性投与により抑制されることが示唆された。

【総括】

ssCRE-BP/pur α の DNA 結合活性を特異的に増加させる内在性因子を見出した。この因子は約66kDa で、熱安定性、トリプシン感受性の蛋白質で、ssCRE-BP/pur α の DNA 結合ドメインと相互作用し、ssCRE-BP/pur α の DNA 結合活性を増加させる。モルヒネ慢性処理により、この因子の活性化作用を抑制されたことから、この内在性因子はモルヒネ慢性投与によって生じる耐性や依存性と関与すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、モルヒネの耐性・依存性形成に関与する一本鎖 cAMP response element (CRE) 結合蛋白質 (ssCRE-BP/pur α) とその内在性活性因子の性質について検討したものである。

慢性モルヒネ処理したマウス小脳において、ssCRE-BP/pur α の DNA 結合活性が著明に抑制された。ssCRE-BP/pur α は、脳に高い発現を認め、他の組織にはほとんど発現していないことより、脳において重要な役割を担っていると考えられた。さらに、ssCRE-BP/pur α の DNA 結合活性を特異的に増加させる内在性活性化因子を見出

した。この内在性因子は約66kDaで、熱安定性、トリプシン感受性の蛋白質であり、ssCRE-BP/pur α のDNA結合ドメインと相互作用することにより、ssCRE-BP/pur α のDNA結合活性を増加させた。モルヒネ慢性処理により、脳内ssCRE-BP/pur α 量は変化しなかったが、活性化因子の活性が抑制されたことから、この活性化因子がモルヒネによる耐性や依存形成と関係していることが示唆された。

本研究により得られた知見は、モルヒネの耐性や依存形成機構の解明に向けて重要な情報を与えるもので、学位の授与に値すると考えられる。