

Title	LBP-p40と結合しうる核内蛋白質の解析
Author(s)	木下, 勝就
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40010
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	木下勝就
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12993 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	LBP - P40と結合しうる核内蛋白質の解析
論文審査委員	(主査) 教授 田中亀代次 (副査) 教授 花岡 文雄 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

【目的】

細胞は分裂期に劇的な変化を起こす。染色体凝集もその内の1つである。しかし染色体の高次構造を制御する機構は依然として不明のままである。我々は染色体構築機構を解析するために、まず染色体を構築する蛋白質の同定とその機能解析が重要と考え、数種の抗染色体モノクローナル抗体を作成した。その中でM108と名づけられた抗体は細胞質では顆粒状の構造物を、核では分裂期に染色体周囲を、分裂間期に核膜周囲を認識し、それぞれに分子量40kDaの共通抗原を認める。我々はエールリッヒ腹水癌細胞を用いてこの抗体が認識する蛋白質を細胞質分画から精製しこの蛋白質がLaminin binding protein precursor P40であることを証明した。またエピトープタグを用いた実験から、LBP-P40が細胞質だけでなく核内にもソーティングされることを確認した。今までに核内でLBP-P40が機能しているという報告はない。核内におけるLBP-P40の機能を解析する1つの手段として、LBP-P40と結合しうる核内蛋白質を解析し同定した。

【方法ならびに成績】

native LBP-P40は単離核からDNase I処理後、high salt-detergent (0.5M NaCl, 1% NP40)処理で抽出される。LBP-P40と結合すると考えられる核蛋白質は、LBP-P40の抽出条件からDNAあるいはクロマチンに強固に結合するものが存在するという仮説をもとに、DNAセルロースカラムを用いて核抽出液のfractionationを行った。核抽出液をDNAセルロースカラムにかけ、0.3M NaClでwashし0.5M NaClで溶出した。この0.5M NaCl核分画にDNAセルロースカラムと強固に結合する蛋白質が存在し、この中にLBP-P40と結合する蛋白質が存在する可能性がある。従ってこの0.5M NaCl核分画とrecombinant LBP-P40との関係をDNAセルロースカラムを用いて解析した。コントロールとして、LBP-P40のみをカラムにかけ0.3M NaClでwashした後、0.5M NaClで溶出した。抗LBP-P40ポリクローナル抗体でイムノプロットしたが、0.5M NaCl分画にLBP-P40のシグナルは認めなかった。LBP-P40と先ほど述べた0.5M NaCl核分画をNaCl濃度を0.15Mに調整した後、同時にDNAセルロースカラムにかけ同様に0.3M NaClでwashし0.5M NaClで溶出した。0.5M NaCl分画にLBP-P40のシグナルを認めた。以上の結果より、0.5M NaCl核分画を加えることによりLBP-P40が0.5M NaCl分画中に認められるようになった。すなわち0.5M NaCl核分画中にLBP-P40と結合する蛋白質の存在が示唆された。0.5M NaCl核分画のク

マシー染色により、この中にヒストンH1とコアヒストンが豊富に含まれていることが推定された。従ってLBP-P40とヒストンH1あるいはコアヒストンの蛋白間相互作用をDNAセルロースカラムを用いて調べた。コントロールとしてLBP-P40のみをカラムにかけ0.1M, 0.3M, 0.5M NaClで溶出した。LBP-P40のシグナルは0.3M NaCl分画に認められた。LBP-P40とヒストンH1をカラムにかけ同様に溶出した。シグナルはコントロールと同様に0.3M NaCl分画に認められた。次にLBP-P40とコアヒストンをカラムにかけ同様に溶出した。LBP-P40の溶出が0.3M NaCl分画から0.5M NaCl分画にシフトした。すなわちコアヒストンのいずれかと結合することにより0.5M NaCl分画にLBP-P40が溶出されたことを示唆する。LBP-P40 affinity columnを作成し、ヒストンH1とコアヒストンをカラムにかけ0.1M, 0.3M, 0.5M NaClで溶出した。ヒストンH1は主として0.3M NaCl分画に溶出され、コアヒストンは0.5M NaCl分画に溶出された。LBP-P40はヒストンH1よりコアヒストンのいずれかにより強固に結合していることが示唆された。次にコアヒストンを形成するどの分子とLBP-P40が結合するのかを調べるために、各コアヒストン分子の組み替え蛋白(GST結合)を作成し、これを用いてLBP-P40とのin vitro binding assayを行った。その結果LBP-P40のシグナルはヒストンH2AとH2Bに認められた。

【総括】

LBP-P40と結合しうる核内蛋白質をDNA cellulose column, LBP-P40 affinity column, in vitro binding assayを用いて解析し、以下のことが判明した。

1. LBP-P40はヒストンH2AとH2Bに結合している。
2. LBP-P40はコアヒストンとの結合を介し、クロマチンDNAに強固に結合していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Laminin binding protein precursor P40 (LBP-P40) は今まで細胞質内に局在すると考えられており、核内に局在し機能しているという報告はない。またLBP-P40の機能も40S ribosome上に局在していることが判明しているだけで未だ説明されておらず、LBP-P40と結合しうる蛋白質の解析もなされていない。著者の研究室がはじめてLBP-P40が細胞質だけでなく核内に存在することを証明した。

本研究では大腸菌組み替え蛋白質を用い、DNA cellulose column, LBP-P40 affinity column, in vitro binding assayなどの実験の結果、LBP-P40と結合する核蛋白質がhistone H2AとH2Bであることを明らかにした。

本研究は、LBP-P40と結合する核内蛋白質をはじめて同定し、LBP-P40がコアヒストンに結合していることを示した点で、LBP-P40の核内における機能の解明に貢献する重要な研究であり学位に値すると思われる。