

Title	DYNAMIC PROPERTIES OF NUCLEAR LAMINS IN XENOPUS CELLS
Author(s)	Takamori, Yasuharu
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3143776
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	たかもり やす はる 高 森 康 晴
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 3 6 6 2 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生理学専攻
学位論文名	Dynamic properties of nuclear lamins in <i>Xenopus</i> cells. (アフリカツメガエル細胞における核内ラミンの動的性質)
論文審査委員	(主査) 教授 小倉 明彦 (副査) 教授 田嶋 正二 助教授 水野 孝一 講師 井上 明男

論 文 内 容 の 要 旨

1. はじめに

核膜には、物質の輸送に関係する核膜孔複合体 (NPC)や核膜の裏打ち構造である核ラミナなどの構造が存在する。核ラミナの主要な構成蛋白質としては、中間径フィラメント蛋白質の一種である、ラミンが同定されている。本研究ではラミンBの部位特異的の抗体を作成し、アフリカツメガエルの培養細胞を用いて、ラミンBの動的性質について調べた。また、アフリカツメガエルの分裂期の卵抽出液を用いて、*in vitro*の核膜崩壊について調べた。

2. アフリカツメガエルのラミンBのcDNAの同定

はじめにアフリカツメガエルの血球細胞のラミンBを抗原として、ラミンBに特異的なウサギ血清を得た。この血清を用いて、アフリカツメガエル卵由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、ラミンB 1、ラミンB 2、ラミンB 3の3種類のクローンを得ることができた。なお、ラミンB 1、ラミンB 2についてはそれぞれ2種類ずつのサブタイプがとれ、アミノ酸配列でおのおの91.6%、94.1%の相同性を示した。

3. ラミンBの部位特異的の抗体の作成

ラミン蛋白質は中央のロッド部分とN末ならびにC末の三つの領域からなる。そこで、得られたラミンB 1およびラミンB 2のクローンを用いて、ラミンB 1 (583aa)についてはN末領域 (7-173aa)、およびC末領域 (365-583aa)、ラミンB 2 (623aa)については中間領域 (63-418aa)のリコンビナントのGST-融合蛋白質を作製した。それぞれの蛋白質を抗原とし、ウサギ抗-ラミンB 1 N末領域抗体、ウサギ抗-ラミンB 1 C末領域抗体、マウス-ラミンB 2中間領域抗体の3種類のポリクローナルな特異的の抗体を得た。

4. 中間期の細胞におけるラミンの状態

得られた3種類の抗体を用いて、アフリカツメガエルの腎臓由来の培養細胞であるA 6細胞を間接蛍光抗体法で観察した。C末領域の抗体、および中間領域の抗体は、ともに核膜に強い蛍光を示した。一方、N末領域の抗体では、核膜の蛍光は弱く、核内に強い蛍光を示した。また、単離したアフリカツメガエルの肝臓の核を間接蛍光抗体法で観察したところ、同じような結果が得られた。これらの結果からラミンは核膜の裏打ち構造だけではなく、核内にも存在して構造を作っていることが示唆された。また、部位特異的の抗体による染色の違いから、これらの構造の構築様式は異なることが示唆された。

5. 分裂期の細胞におけるラミンの状態

次に分裂期の A 6 細胞を N 末領域の抗体、中間領域の抗体を用いて観察した。prophase では染色体の凝縮が始まるが、この時期では中間期とは異なり、いずれの抗体でも核膜に強い蛍光が見られた。なお、N 末領域の抗体で観察された核内の蛍光は、prophase の初期の核では見られたが、後期の核では見られなかった。metaphase から anaphase にかけては、核膜が崩壊し染色体の移動がおこるが、この時期ではいずれの抗体でも、凝縮した染色体を除く細胞質全体に強い蛍光が見られた。telophase では染色体の脱凝縮と核膜の再構成がおこるが、この時期では prophase 同様に、いずれの抗体でも核膜に強い蛍光が見られた。以上の結果は、中間期の核膜のラミナ構造と、prophase および telophase の核膜のラミナ構造の構築様式は異なっていることを示唆している。おそらくこの時期においては、ラミンは核膜に存在しているながら完全に重合していない状態にあるため、普段ブロックされている抗原部位が露出し、認識されるようになったものと考えられる。

6. 分裂期の卵抽出液中における in vitro の核膜の崩壊

無細胞システムは生化学的な操作が容易で、核膜の構築と崩壊の現象を調べるには有利である。そこで、アフリカツメガエルの分裂期の卵から調製した抽出液と、アフリカツメガエルの単離核を用いて、in vitro の核膜の崩壊を試みた。分裂期の卵抽出液とアフリカツメガエルの血球細胞の核を混ぜ、ATP 存在下で 25°C で反応させた。反応後約 30 分で核は膨潤し、その後、凝集しはじめ、60 分後には一本の棒状になった。DHCC による核膜の蛍光染色は、核が膨潤したところから少しずつ弱くなり、60 分後にはほとんど見られなくなった。同じ現象は肝臓の核でも見られた。次にラミン B 2 の抗体および、核膜孔複合体の構成蛋白質である p62 の抗体を用いて、核膜崩壊時の蛍光変化を観察した。いずれの蛋白質も核が膨潤し始めるころに部分的に核から消えはじめ、ドット状のパターンを示した。以上の結果から、分裂期の卵抽出液中において、核膜崩壊がおきることがわかった。しかし、普通の細胞の分裂とは異なり、核の膨潤があることや、染色体の凝集の前に核膜が崩壊することがわかった。このことから、核膜崩壊は染色体の凝集とは異なる系により制御されていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞が増殖する際、染色体を包む核膜構造はいったん崩壊し、染色体が分配され後に再形成される。この変化を司るのは、ラミン類と呼ばれる核膜裏打ち蛋白質である。高森君はラミン蛋白のどのような変化がこの劇的な変化をもたらすのかに興味を持ち、研究を進めた。ツメガエル卵 cDNA ライブラリーをスクリーニングして新しい種類のラミンを 2 種同定して構造決定し、またラミン蛋白の領域ごとに特異的な抗体を作成して細胞増殖の各段階でのラミンの状態について解析した結果、各段階ごとにラミン類が特徴的な状態で存在することを明らかにした。これらの結果は細胞増殖の機構研究に新しい方法と視点を提供したものであり、理学博士の学位論文としてふさわしいものと認める。