



Title	Identification of Amino Acid Sequence in the Hinge Region of Human Vitamin D Receptor that Transfers a Cytosolic Protein to the Nucleus
Author(s)	道上, 敏美
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3172719
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	道 上 敏 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 5 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 27 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	Identification of Amino Acid Sequence in the Hinge Region of Human Vitamin D Receptor that Transfers a Cytosolic Protein to the Nucleus (ヒトビタミンD受容体ヒンジ領域における核移行シグナルの同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎
	(副査) 教 授 網野 信行 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

リガンド非存在下でのヒトビタミンD受容体(VDR)の細胞内分布については、主として細胞免疫化学の手法を用いた検討がなされてきたが、現在まで一致した見解は得られていない。そこで本研究では、Green Fluorescent Protein (GFP) との融合蛋白を構築することにより VDR の細胞内分布を生細胞を用いて観察し、さらに核移行シグナルの同定を行う。

【方法】

① GFP 融合蛋白を用いた野生型 VDR の細胞内分布の検討

VDR の発現ベクター-pSG5hVDR と GFP 融合ベクター-pGreen Lantern を用いて、GFP を野生型 VDR の N 端側につないだ GFP-wtVDR と、C 端側につないだ wtVDR-GFP の 2 つのプラスミドを構築した。融合発現ベクターをカチオン性脂質を用いて COS7 細胞とヒト骨芽細胞系細胞である MG63 細胞に導入し、融合蛋白の細胞内分布を蛍光顕微鏡にて観察した。pcDNA ベクターに組み込んだ wtVDR-GFP を COS7 細胞に導入後 G418 により選択を行い、stable transfectant を得た。この stable transfectant に 10^{-8} M の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加し、VDR の細胞内分布に対するリガンドの影響についても検討した。

② VDR の核移行シグナル (NLS) の同定

まず、種々の欠失変異 VDR と GFP との融合プラスミドを構築し、COS7 細胞と MG63 細胞に一過性に導入し、その細胞内分布を蛍光顕微鏡にて観察した。それぞれの融合蛋白の全長が適切に発現されていることは、抗 GFP 抗体および抗 VDR 抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。また、DNA 結合能と核移行能との機能的関連性を検討する目的で、DNA 結合能を欠く C79S 変異体についても細胞内分布を検討した。さらに、欠失変異の解析から NLS 候補と考えられたアミノ酸配列が、他の蛋白質に対しても NLS として機能するかどうかを検討するため、本来は細胞質および細胞膜に存在する蛋白質であるアルカリフォスファターゼ (ALP) と GFP との融合蛋白に VDR の NLS 候補配列を挿入し、細胞内分布に与える影響を検討した。

【成績】

① 野生型 VDR の細胞内分布

COS7 と MG63 を用いた一過性発現実験において、GFP は単独では細胞質と核の両方に均一に分布していた。一

方、GFP-wtVDR、wtVDR-GFP は両者ともに核優位に分布し、細胞質にも一部存在を認めた。 10^{-8} M $1, 25$ (OH) $_2$ D $_3$ を添加して 3 時間後の観察では、蛍光はほぼ核のみに集積した。

wtVDR-GFP の stable transfectant に 10^{-8} M $1, 25$ (OH) $_2$ D $_3$ を添加して、融合蛋白の細胞内分布を経時的に観察した。一過性発現実験と同様に、リガンド非存在下では wtVDR-GFP は核優位に局在し、細胞質にも分布を認めた。リガンド添加後 3 時間、8 時間の観察では、wtVDR-GFP はほぼ核のみに集積していた。

② NLS の同定

欠失変異 VDR の細胞内分布を検討したところ、DNA 結合領域を完全に欠失している $\Delta 4-88$ 変異体がある程度核への局在性を示したのに対し、ヒンジ領域とホルモン結合領域の一部を欠く $\Delta 78-233$ 変異体は核局在性をほぼ完全に失い、蛍光は核と細胞質に均一に認められた。 $\Delta 181-230$ 、 $\Delta 78-114$ では核局在性は保たれており、 $\Delta 117-173$ は核局在性を喪失した。DNA 結合能を欠く C79S 変異体は核に局在していた。以上よりヒンジ領域のアミノ酸 (a.a.) 117-173 の領域に VDR の NLS が存在すると考えられたので、この領域内のアミノ酸配列を検討した結果、a.a.154-158 の RPPVR という配列が候補の一つと考えられた。また、RPPVR の下流に 10 個のアミノ酸をはさんで RPNSR という配列が存在し、ここを含む a.a.154-173 はいわゆる bipartite NLS として働く可能性が考えられた。そこで、a.a.154-158 の RPPVR 配列あるいは a.a.154-173 の配列を GFP-ALP 融合蛋白に挿入し、細胞内分布がどう変わるかを検討した。GFP-ALP は本来細胞質優位に存在し、核には分布しないが、RPPVR 配列を挿入すると、蛍光は細胞質と核の両方に分布するようになった。さらに、a.a.154-173 の配列を挿入すると、GFP-ALP は核優位の分布を示した。

【総括】

GFP をタグとして用いて生細胞での観察を行った結果、野生型 VDR はリガンド非存在下では核優位に局在し、細胞質にも一部分布していた。リガンド添加により核への局在性は高まった。種々の欠失変異 VDR の細胞内分布の検討から NLS 候補と考えられた a.a.154-173 の配列は、本来細胞質蛋白である ALP の細胞内分布を核優位に変化させ、この配列が VDR の NLS であることが証明された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、従来の免疫細胞化学を用いた検討では結論の得られなかったビタミン D 受容体 (VDR) の細胞内分布の検討を行うにあたり、Green Fluorescent Protein (GFP) をタグとして用いることにより生細胞での検討を可能とした。詳細な解析により、VDR のリガンド存在下、リガンド非存在下での細胞内分布を明らかにした。さらに、種々の欠失変異 VDR や DNA 結合能を欠失する変異体 VDR との GFP 融合蛋白を作製し、その細胞内分布を検討することにより、他の核受容体のものとは異なるユニークな核移行シグナルを見いだした。ことに、本来細胞質に存在する蛋白質であるアルカリフォスファターゼの GFP 融合蛋白にこのシグナルを挿入することによりこのシグナルが核移行シグナルとして機能することを確実に証明した。本論文は研究の手法、論理の進め方ともに、優れたレベルに達しており、学位の授与に値すると考えられる。