



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15584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 綱野信行 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、今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プ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。10⁻⁸M 1、25(OH)₂D₃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10⁻⁸M 1、25(OH)₂D₃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Δ4-88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Δ78-233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。Δ181-230、Δ78-114では核局在性は保たれており、Δ117-173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、細胞内分布は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とした。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。