The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular cloning of one isotype of human lamina-associated polypeptide 1s and a topological analysis using its deletion mutants
Author(s)	近藤, 幸宏
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43935
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	近藤幸宏（こんどうゆきひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　17695　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Molecular cloning of one isotype of human lamina-associated polypeptide 1s and a topological analysis using its deletion mutants. （核内膜の膜タンパク質ヒトLAP1Bのクローニングと局在解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　内山　安彦　　教　授　目加田英輔

論文内容の要旨

〔目的〕核膜に局在する蛋白質のクローニングおよび核膜に局在化機構の解明。また核膜に局在する蛋白質の機能の解析。

〔方法ならびに成績〕ラット肝細胞より細胞核を分離し、DNAse I・塩溶液により処理し、染色質とその周辺のタンパク質を除去することで核膜を分画した。次いで界面活性剤・塩溶液を作用させ核膜に局在するタンパク質を可溶化した。陽イオン交換・陰イオン交換及びハイドロキシアパタイトの3種のカラムクロマトグラフィーにより核膜のタンパク質を分離濃縮し、それぞれの画分をマウスに免疫し、定法によりハイブリドーマを樹立した。培養上清をラット細胞株3Y1の間接蛍光抗体法を用いて、形態学的観察により核膜に局在するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリドーマ株をスクリーニングした。その結果、核質タンパクに対する抗体を産生する複数のハイブリドーマを得たが、核膜に局在するタンパク質に対する抗体を産生するハイブリドーマは陽イオン交換カラムから得られた画分を免疫したマウスから一株だけ得られた（以下DD10と呼ぶ）。DD10はウエスタンブロット法によって75、68、55 kDaの抗原を認識することが確かめられた。DD10の抗原を知るためにラット胎児脳より作られたファージライブラリィをDD10上清によってスクリーニングした。その結果、DD10はLamina-asssociated polypeptide 1s（LAP1s）に対する抗体であることが判明した。

LAP1sは核内膜に局在するII型の膜タンパク質でありN末を核質側に、C末を核膜内腔側に向け膜貫通ドメインで1回核内膜を貫通している。1978年にGeraceとBlobelらによりA、B、Cの3つのアイソタイプのある核膜のタンパク質として同定され、1995年にMartinとGeraceらによりラットでLAP1Cがクローニングされている。ついで、私はHela細胞より作られたファージライブラリィをラットLAP1CのcDNA配列の一部を用いてスクリーニングしhumanLAP1BのcDNAをクローニングした。huLAP1Bは584アミノ酸からなる、66.3 KDaのタンパク質でpIは8.32である。339aa-361aaに核膜貫通ドメインをもつ。ラットとヒトの比較では、アミノ酸レベルでの相同性は73.6%である。特に核膜内腔側（C末）の相同性は高く89%である。核質側の相同性は65.8%と低いが、かなり保存された配列が分散して存在している。

ついで、私はhuLAP1Bが核内膜に局在する経路と局在に必要な配列を明らかにするためにN末端にGFPを融合

させたhuLAP1Bのデリーションミュータントのシリーズを発現ベクターに構築し、Hela及び293T細胞にトランスフェクトし、GFP蛍光の局在をコンフォーカル顕微鏡にて解析した。その結果、(1)HuLAP1Bはまず小胞体膜に膜貫通ドメイン346aa-368aaによって挿入されてから核内膜にターゲットする。(2)核内膜にターゲットするためには膜貫通ドメインだけでは不十分で、さらに最低183aa-345aaの核質側後半ドメインが必要である。(3)核質側ドメイン前半1aa-182aaにも後半183aa-345aaにも各々、核質との相互作用が推定される。(4)相同性の高い核膜内腔側のデリーションは、huLAP1Rの核内膜へのターゲットに影響を及ぼさない等のことが判明した。デリーションミュータントのシリーズの核質との相互作用を確かめるために、トランスフェクトされた細胞を界面活性剤（0.5% Toraiton-X）で処理し核膜を消化すると、N末全長を有するデリーションミュータントのみが非常に安定で、各々、核質との相互作用が推定される核質側ドメイン前半1aa-182aaもしくは後半182aa-345aa単独では界面活性剤処理に感受性があった。このことから(5)huLAP1Bの核質との安定した相互作用にはN末の二つのドメインの両者が必要であると考えられる。

〔総括〕核内膜に局在するタンパク質は、現在のところLBR（laminB receptor）・Emerinn・LAP1s・LAP2s（thymoproteins）・otefin・nurin・MAN1が同定され、それぞれクローニングされている。今回、私は核膜の新規タンパク質を、モノクロナール抗体（mAb）を用いて同定しようと試みたところ、新規タンパク質の同定には至らなかったが、LAP1sに対するmAbを得た。

LAP1sはもともとLAP2s（thymoproteins）とともに、核膜を裏打ちするlamina、染色体と結合するタンパク質として同定された。また、LAP1sは細胞の分化にともなってアイソタイプの発現パターンが変わること、一方、LAP2sは遺伝子の転写に関与することなどが明らかになっており、これらタンパク質の機能の重要性が明らかになりつつある。LAP2βは既にホモローグの比較・ドメインの解析も行われておりN末側にDNAとlaminBに結合する配列をそれぞれ独立して有していることが判っており、核内膜局在化の経路・機構も解析されている。興味深いことにLAP1sとLAP2sの間には相同性はまったくない。これはlaminaおよび染色体に対してLAP1sとLAP2sは別の配列で相互作用することを示している。また、LAP2β・Emerin・MAN1はN末側にLEMドメインと呼ばれる共通する配列をもつがLAP1sは持たない。これまで、LAP1sの核内膜局在化の機構はあきらかにされておらず、ホモローグの比較・ドメインの解析も行われていなかったことから、私は、huLAP1Bをクローニングした。またN末にGFPを融合したhuLAP1Bデリーションミュータントのシリーズを用いて核内膜局在化機構を追及し、これらの点のいくつかを解明した。

近年、Emery-Dreifuss型筋ジストロフィーの原因遺伝子がEmerinであることや、慢性疲労症候群の患者に高率にlaminBに対する自己抗体が陽性であることがあきらかになるなど核膜や核膜を裏打ちして局在するタンパク質と疾患の関係が徐々にあきらかになりつつある。細胞の分化と遺伝子転写との関係のみならず核膜に局在するタンパク質の解析は、今後ますます重要と成ってゆくであろう。

論文審査の結果の要旨

Lamina associated polypeptide 1s（LAP1s）は膜貫通ドメインを一ケ所もつA、B、Cの3つのisotypeが存在する__型膜タンパク質で核内膜に局在する。LAP1sに対するモノクロナール抗体<DD10>を獲得し、Human LAP1B（HuLAP1B）をクローニングした。HuLAP1BとRatLAP1Bの相同性はアミノ酸レベルで73.6%であった。特に核膜内腔に限っては89%の高い相同性を示した。次いで核膜へのターゲッティングを観察するために、N末にGFPを付けたHuLAP1Bのデリーションミュータントのシリーズを作製し、Hela細胞で一過性に発現させた。その結果(1)HuLAP1Bはまず小胞体膜に膜貫通ドメイン346aa-368aaによって挿入されてから核内膜にターゲットする。(2)核内膜にターゲットするためには膜貫通ドメインだけでは不十分で、さらに最低183aa-345aaの核質側後半ドメインが必要である。(3)核質側ドメイン前半1aa-182aaにも後半183aa-345aaにも各々、核質との相互作用が推定される。(4)相同性の高い核膜内腔側のデリーションは、HuLAP1Bの核内膜へのターゲットに影響を及ぼさない等のことが判明した。核内膜へのタンパク質の新たな知見であり、学位に値すると考える。