



Title	Development and evaluation of visualization techniques for analyses of nuclear and chromosome proteins
Author(s)	東, 恒仁
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46825
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	東 恒 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 20286 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Development and evaluation of visualization techniques for analyses of nuclear and chromosome proteins (染色体・核蛋白質に対する可視化解析技術の開発に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福井 希一 (副査) 教 授 伊東 一良 教 授 清水 浩 教 授 塩谷 捨明 教 授 卜部 格 教 授 小林 昭雄 教 授 原島 俊 教 授 金谷 茂則 教 授 大竹 久夫 教 授 関 達治 教 授 仁平 卓也

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は染色体・核蛋白質の可視化技術の開発に関する研究をまとめたものであり、第一章（緒言）、本論三章、第五章（結言）からなる。

第一章では本研究の背景と目的、およびその意義について記述した。

第二章ではこれまでそのホモロジーが高いために可視化に使用できる良質の抗体が得られてこなかった染色体蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製方法について検討をおこなった。単離染色体から蛋白質を抽出する際に、酢酸法を用いると他法を用いる場合に比べて効率的に染色体蛋白質の抽出が可能であるとともに、透析後の蛋白質が凝集しにくいことが判明した。本蛋白質群を用いてモノクローナル抗体を作製し、間接蛍光抗体法による細胞内局在を基準とするスクリーニングを行った。抗原蛋白質が染色体に局在するモノクローナル抗体についてウエスタンブロッティングおよびマスマスペクトロメトリーによる抗原の同定を試みた。その結果、これまで可視化に用いることが可能な良質の抗体が得られてこなかったリンカーおよび全てのコアヒストンに対する抗体の獲得に成功した。またβ-アクチンが染色体蛋白質であることを証明した。本章で提案した手法を用いることで可視化に使用できる良質の抗体の効率的な作製が可能になると期待された。

第三章ではアルギン酸カルシウムマイクロビーズを用いる哺乳類培養細胞に対する新しい遺伝子導入方法の開発について報告した。本手法により、これまで比較的遺伝子導入が難しいとされてきたヒトリンパ球由来 K562 細胞に対する効率的で安価かつ簡便な遺伝子導入が可能になった。また本手法は安定細胞系の構築にも用いることが可能であったことから、リンパ系細胞における蛋白質の局在・動態解析に有効な手法であることが示唆された。

第四章では二光子励起法を用いた Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法による染色体蛋白質の三次元的な動態解析に関して報告した。二光子励起法を用いることでこれまで考慮されてこなかった Z 軸方向の蛋白質の動態を解析できることを明らかにした。加えて本手法を用いた場合には、通常用いられる一光子励起法に比べて蛍光回復時間が約 1/4 に短縮されることが判明した。従って、本手法により比較的動きが遅い蛋白質の動態解析がよ

り容易になることが示唆された。

最後に第五章では、本研究において開発した三種類の可視化解析技術について総括し、染色体・核蛋白質の可視化解析に関する研究の将来の展望について記述した。

論文審査の結果の要旨

蛋白質の可視化解析技術の開発および評価は、今後の生物工学分野の発展にとって不可欠のものである。本論文は染色体・核蛋白質の可視化解析に応用できる新しい技術を提案し、評価したものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

- (1) 従来はアミノ酸レベルの相同性の高さから作製が困難であったが、本論文においては染色体蛋白質に対する効率的なモノクローナル抗体の新しい作成方法を提案している。
- (2) アルギン酸カルシウムマイクロビーズを用いた哺乳類培養細胞に対する新しい遺伝子導入方法を提案している。開発した手法は浮遊系細胞に対する遺伝子導入効率が極めて高いことを明らかにしている。
- (3) 二光子励起法を Fluorescence recovery after photobleaching による蛋白質の細胞内動態解析に適用しその効果を評価することで、迅速かつ正確な新しい染色体・核蛋白質の動態解析法を提案している。

以上のように、本論文において開発・提案した手法は今後の染色体・核蛋白質の動態・機能解析の発展に大きく貢献するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。