

氏名	鈴木 恵理香
学位（専攻分野）	博士（学術）
学位記番号	総研大乙第12号
学位授与の日付	平成7年9月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Molecular cloning and functional characterization of a novel intranuclear protein NP90 in the nervous system
論文審査委員	主査 教授 池中一裕 教授 小幡邦彦 教授 岡田泰伸 教授 高井義美（大阪大学）

論文内容の要旨

神経系は多種の機能を持っており、それぞれの機能を果たす細胞にある神経伝達物質、神経ペプチドやイオンチャンネルなどの分子によって機能を発揮する。神経系の発生や構造に特異的な栄養因子、接着因子や細胞内骨格タンパク質などの分子が関与している。機能分子の遺伝子発現は核タンパク質によって制御されるから、神経系に特異的な機能分子の発現を制御する神経系特異的な核タンパク質の存在が予想される。1970年代には非ヒストンタンパク質の電気泳動パターンの中脳器間の比較から、脳には特異的な非ヒストンタンパク質が多くあることが示された。しかし、非ヒストンタンパク質は種類も多く同定には困難があった。モノクローナル抗体は未知の分子も認識できる有用な方法であり、すでにいくつかの核タンパク質がモノクローナル抗体を用いたイムノスクリーニング法で単離、同定されている。そこでこの有用なモノクローナル抗体の作成技術を用いて、神経特異的な核タンパク質を探索することを目的として、モルモットの脳の細胞核の非ヒストンタンパク質分画を抗原として神経細胞の核を認識するモノクローナル抗体5E5が作成された。この抗体はモルモットやラットの神経系の神経細胞の核を認識したが、ウエスタンブロットでは複数のバンドを認識し、直接、抗原タンパク質を同定することはできなかった。そこで、この抗体が認識する抗原のcDNAを発現ベクターを用いて同定し、この抗原の性質や機能を解明することを目的として本研究を行った。

このモノクローナル抗体をもとにしてラットの海馬のcDNAライブラリーをイムノスクリーニングし、モノクローナル抗体に陽性なクローン5E5-2を得た。5E5-2cDNAをプローブとしてラットの脳のcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、4.1kbのクローンを得、さらにPCR法を用いてポリ(A)テールを含む0.5kbのcDNAクローンを得た。このようにしてクローニングした5E5cDNAは全長約4.5kbであった。5E5-2cDNAをプローブにしてラットの脳のノザンハイブリダイゼーションを行うと、4.5kbの単一なバンドが得られた。塩基配列の解析の結果、このcDNAがコードするタンパク質は推定分子量が約90kDaであり、既存のタンパク質にホモロジーがなかったのでこのタンパク質をNP90と命名した。

NP90cDNAの塩基配列の解析より、NP90は825個のアミノ酸から成り、cDNAからの推定分子量は89.829Daであった。比較的疎水性の高い分子であり、アルギニンに富み、非常に塩基性の高いタンパク質であると考えられた。既存のDNA結合タンパク質にみられるロイジンジッパー構造、Zn-フィンガー構造やホメオドメインはみられなかった。また高プロリン領域、高グリシン領域や核移行シグナルを持っていた。実際に、COS-1細胞にNP90cDNAを導入すると、NP90分子はCOS-1細胞の核内に局在した。これよりNP90の核移行シグナルは実際に機能しているものと考えられた。NP90に対する抗体を用いた組織切片の間接蛍光抗体染色やウエスタンブロットティングからNP90は核内に局在していることがわかった。ホモロジー検索の結果、NP90とホモロジーの高いものはみつからなかった。これよりNP90は新しい核タンパク質であると考えられた。

NP90の組織局在性は脳に高い発現を示した。ラットの脳の切片では、NP90は神経細胞に広く分布していた。特に、大脳皮質の神経細胞、海馬の錐体細胞や小脳のプルキンエ細胞が強く染色された。しかし、白質部分は染色されなかった。NP90の発生過程における発現量はラットの胎仔の発生期を通じて高発現がみられた。胎仔の大脳皮質では皮質全体に抗

体で認識される細胞がみられ、分化し終えた神経細胞がNP90を持っているものと考えられた。

核抽出液をDNAセルロースカラムでDNA結合タンパク質分画とDNA非結合タンパク質分画に分けたところ、NP90はDNA結合タンパク質分画に回収された。これよりNP90はDNAに親和性のあるタンパク質である可能性が示唆された。

NP90は核マトリックスのタンパク質であるSP120に、SP120の核内部の骨格構造に局在した間接蛍光抗体法による染色像と同じパターンを示した点、既知のDNA結合ドメインはもっていないがDNAに親和性がある点、アルギニン-グリシン配列に富んだ領域は核骨格付着領域に結合することが確かめられているので、同様にアルギニン-グリシン配列に富む領域を持つ点などの類似点があった。このSP120の生理的機能は、DNAを核の骨格構造になぎ止めておくことである。SP120のアルギニン-グリシン配列に富んだ領域は核骨格付着領域に結合することが確かめられているので、同様にアルギニン-グリシン配列に富む領域を持つNP90も核骨格に付着して機能するタンパク質であろうと推定できる。これを確かめるにはNP90のアルギニン-グリシン配列に富んだ領域の発現タンパク質を調製し、核骨格付着領域との親和性を調べるなどの実験系が考えられる。NP90の機能解明にはさらに詳しい研究が必要である。

審査結果の要旨

神経系の特徴的な機能と構造は神経伝達物質やイオンチャンネル、また特異的な栄養因子、接着因子や細胞内骨格タンパク質などの分子によって担われている。このような分子の発現を制御するための神経系特異的なタンパク質の存在が予想される。1970年代に脳には特異的な非ヒストンタンパク質が多くあることが示されたが、ほとんど同定されていない。モノクローナル抗体は未知分子の同定に有用な方法であり、赤川らにより神経細胞の核を認識するモノクローナル抗体5E5が作成されている。本研究ではこの抗体5E5の抗原分子を同定し、その性質をしらべた。この抗体はウエスタンブロットでは複数のバンドを認識したため、抗原をタンパク質化学的に同定することはできなかった。そこで、この抗原のcDNAを発現ベクターを用いて同定した。クローニングされた5E5cDNAは全長約4.5kbであった。ラットの脳からも4.5kbの単一なmRNAが得られた。塩基配列の解析の結果、コードするタンパク質は推定分子量が約90kDaであり、既存のタンパク質にホモロジーがなかったためこのタンパク質をNP90と命名した。融合タンパク質を用いてNP90に特異的なモノクローナル抗体の作成し、以後の解析に用いた。

NP90cDNAの塩基配列より、NP90は推定分子量89.829Daで、疎水性が高く、アルギニンに富み、塩基性の高いタンパク質であると考えられた。既存のDNA結合タンパク質にみられるモチーフ構造はないが、高プロリン領域、高グリシン領域や核移行シグナルを持っていた。間接蛍光抗体法やウエスタンブロッティングからNP90は核内に局在していることがわかり、NP90cDNAを導入したCOS-1細胞でも発現したNP90分子は核内に局在した。

NP90は脳に高い組織局在性を示した。神経細胞は広く分布するが、特に大脳皮質や海馬の錐体細胞や小脳のプルキンエ細胞に強く発現された。神経系の発生過程における発現をしらべたところ、分化を終えた神経細胞は早期からNP90を持つことがわかった。

核抽出液をDNAセルロースカラムでDNA結合タンパク質分画とDNA非結合タンパク質分画に分けたところ、NP90はDNA結合タンパク質分画に回収された。これよりNP90はDNAに親和性のあるタンパク質であると結論された。

NP90は核マトリックスのタンパク質SP120に、間接蛍光抗体法で同じパターンの染色像を示した点、既知のDNA結合ドメインはもっていないがDNAに親和性がある点、アルギニン-グリシン配列に富む領域を持つ点などの類似点があった。NP90もSP120と同様、核骨格に付着して機能するタンパク質であろうと推定された。

本研究は神経組織に特異的な核タンパク質NP90を発見し、そのDNA結合能、組織発現などを示したものである。その機能の解明には他の同定されている核タンパク質と同様、今後の研究が必要であるが、神経組織の特異的遺伝子発現に手がかりを加えたものであり、博士論文に値するものと結論した。

審査委員会は、鈴木恵理香氏の提出論文の内容および生理学一般の知識について試問を行った。その結果、鈴木氏は、本人の行った研究に関連する知識・技術、および生理学、分子生物学全般における学識を十分に有していると判断された。氏の提出論文の前半はすでに *J. Biochem.* に掲載されており、後半の研究も若干の実験を追加して論文にまとめることが可能である。提出論文、公表論文、英語の能力も十分なレベルにあると判断された。

以上のことから、審査委員会は、鈴木恵理香氏の論文内容、学識、語学力ともに博士(学術)を授与するに値すると判定した。