

氏名(本籍)	藤本美津夫(埼玉県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2,138号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Molecular cloning and characterization of novel isoforms of hnRNP A2/B1-Novel single-stranded telomeric DNA binding proteins, hnRNP B0- (hnRNP A2/B1蛋白の新規アイソフォームのクローニングと機能解析-新たな一本鎖テロメアDNA結合蛋白hnRNP B0-)		
主査	筑波大学教授	医学博士	山本雅之
副査	筑波大学教授	医学博士	赤座英之
副査	筑波大学教授	医学博士	中内啓光
副査	筑波大学助教授	医学博士	清水徹
副査	筑波大学講師	医学博士	川上康

論文の内容の要旨

(目的)

hnRNP蛋白質(heterogeneous nuclear ribonucleo-protein)は、pre-messenger RNAに結合し、その代謝や輸送に関与している。ヒトでは約20種類が同定されているが、このうちhnRNP A2/B1蛋白質は、RNAとの関係の他に、脊椎動物のテロメアDNA配列であるd(TTAGGG)_nにも結合することが報告されている。候補者らは先に、hnRNP A2/B1蛋白質の組織特異的発現様式を検討し、精巢に特異的に発現している新規アイソフォームを見出した。また、同分子を分子クローニングし、hnRNP B0^{nb}蛋白質と命名した。hnRNP B0^{nb}蛋白質はA2/B1遺伝子の第9エキソンが選択的スプライシングによって欠失することにより生じるが、その結果、C末側領域がA2、B1蛋白質に比べて短く、蛋白質-核酸間、蛋白質-蛋白質間結合能に変化を招来している可能性が示唆された。本研究では、hnRNP A2/B1蛋白質の一本鎖テロメア配列DNAとの関係に着目し、各アイソフォーム間の分子レベルの機能の違いを明らかにすることを目標とした。

(対象と方法)

- hnRNP A2/B1各アイソフォームの組換え蛋白質の作製と精製-hnRNP A2/B1蛋白質および新規アイソフォーム(以下B0^{nb})蛋白質のcoding sequence をpET11c発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させた。さらに、大腸菌蛋白質を可溶化し、イオン交換(DEAE)クロマトグラフィー、ssDNAアフィニティークロマトグラフィーを用いて分離、精製した。
- hnRNP A2/B1各アイソフォームの一本鎖テロメアDNAに対する結合能
 - サウスウエスタン法にて各アイソフォームのテロメアDNA配列d(TTAGGG)_nに対する結合能を比較検討した。
 - ゲルシフト法で同様の検討を行い、B0、B1蛋白の平衡結合定数を決定した。
 - BIAcoreシステムを用いて、B0^{nb}、B1および大腸菌由来の一本鎖DNA結合蛋白質であるSSB(single strand binding protein)とテロメア配列DNAとの結合、解離反応速度定数を算出するとともに、その結合様式を比較した。
- hnRNP B0^{nb}、B1蛋白質の一本鎖テロメアDNA維持機構との関係
 - B0^{nb}、B1蛋白質のテロメアDNA保護作用の有無を、一本鎖テロメア配列DNAをマイクロコッカスヌクレアーゼ

処理することにより検討した。

(2)テロメラーゼ活性に対する影響を、HeLa細胞から抽出したテロメラーゼ分画にB0^b蛋白質を添加し、TRAP変法および、TRAP-ELISA法にて検討した。

(結果)

1. hnRNP A2/B1各イソフォームのクローニングと組換え蛋白質の作製と精製—大腸菌系で発現させた各イソフォームの組換え蛋白質は、期待される分子量を示した。B1およびB0^b蛋白質はカラムクロマトグラフィーによって、SDS-PAGE上単一のバンドを示す状態に分離精製された。

2. hnRNP A2/B1各イソフォームの一本鎖テロメアDNAに対する結合能—サウスウエスタン法にて各イソフォームの結合能を比較検討した結果、一本鎖テロメア配列DNAとの結合強度は、およそA2=B0^b ≧ B1 ≧ B0^a蛋白質の順であった。さらに、ゲルシフト法により配列特異的に結合することを確認するとともに、B0^aおよびB1の平衡結合定数(それぞれ $2.15 \times 10^{-7} \text{M}$, $1.85 \times 10^{-7} \text{M}$)を算出した。BIAcoreシステムを用いた解析の結果、テロメアDNAの反復配列最小単位であるTTAGGGの6塩基にB0^aおよびB1蛋白質は結合するが、大腸菌SSBは結合しないことが示され、その結合様式は1対1の結合モデルで解釈するのは困難で、複数の解離・結合定数を持つ複雑なモデルが必要であると考えられた。

3. hnRNP B0^a, B1蛋白質の一本鎖テロメアDNA維持機構との関係—テロメア配列DNAをマイクロコッカスヌクレアーゼ処理すると約30秒ですべてのDNAが分離されたのに対し、あらかじめB0^a蛋白質を添加すると30分以上の処理でもほとんど分解されなかった。また、テロメラーゼ分画にB0^a蛋白質を添加することによりテロメア伸長反応が亢進した。しかし、その作用は大腸菌SSBにも認められ、両者の間に有意差はなかった。

(考察)

原動物や酵母においては、テロメラーゼの調節機構やテロメア構造の維持機構に関与する一本鎖テロメアDNA結合蛋白質が知られている。しかし、脊椎動物においては昨年、テロメラーゼの酵素蛋白質が同定されたばかりで、テロメラーゼの調節や一本鎖テロメアDNA維持にかかわる蛋白質の存在や実体は未だ十分に解明されていない。hnRNP A2/B1蛋白質はテロメアDNA配列d(TTAGGG)_nに結合する性質をもつことが報告されていた。しかし、A2/B1蛋白質とテロメアDNAの結合はpre-mRNAの5'スプライシング部位に認められる配列r(UUAG)との相同性に基づく交差反応と解釈され、詳細な検討は行われていなかった。本研究では、A2/B1蛋白質各イソフォームのテロメアDNAとの相互関係を検討し、B0^a蛋白質が最も強く一本鎖テロメアDNAに結合すること、かつそれは反復最小単位である6塩基に結合すること、さらに、B0^a蛋白質はヌクレアーゼに対するテロメアDNAの保護作用とともに、*in vitro*でのテロメア伸長反応を亢進させることを明らかにした。精巣が生理的にテロメラーゼ活性を有しテロメア長が維持される組織であることから、精巣に組織特異的に発現されるB0^a蛋白質は、機能的な一本鎖テロメアDNA結合蛋白質の有力な候補であることが示唆される。

審査の結果の要旨

本研究は、hnRNP蛋白質(heterogeneous nuclear ribonucleo-protein)のうち、特に、hnRNP A2/B1蛋白質の脊椎動物のテロメアDNA配列への結合に注目して、解析を行ったものである。候補者らは先に、hnRNP A2/B1蛋白質の組織特異的発現様式を検討し、精巣に特異的に発現している新規イソフォームを見出し、同分子をhnRNP B0^{a/b}蛋白質と命名した。hnRNP B0^{a/b}蛋白質はA2/B1遺伝子の第9エキソンが選択的スプライシングによって欠失することにより生じるので、その結果、蛋白質—核酸間、蛋白質—蛋白質間結合能に変化を招来している可能性が示唆されている。昨年、脊椎動物において初めて、テロメラーゼの酵素蛋白質が同定されたが、テロメラー

ゼの調節や一本鎖テロメアDNA維持にかかわる蛋白質の存在や実体は未だ十分に解明されていなかった。本研究では、A2/B1蛋白質各イソフォームとテロメアDNAとの相互関係を検討し、B0^h蛋白質が最も強く一本鎖テロメアDNAに結合すること、さらに、B0^h蛋白質はヌクレアーゼに対するテロメアDNAの保護作用とともに、*in vitro*でのテロメア伸長反応を亢進させることを明らかにした。精巣が生理的にテロメラーゼ活性を有し、テロメア長が維持される組織であることから、精巣に組織特異的に発現されるB0^h蛋白質は、機能的な一本鎖テロメアDNA結合蛋白質の有力な候補であることが示唆される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。