

論文要旨

論文題目

Subcellular Localization of DNA amplified in mammary carcinoma 1

(DAM1) Expressed as a Fusion protein with Green Fluorescent

Protein : A Green Fluorescent Protein Study

(DAM1 - GFP 融合蛋白質の細胞内局在)

氏名 幸澤浩明 




## 論文要旨

【目的】ヒト1番染色体では乳癌において高頻度に染色体欠失や増幅が認められている。我々はすでに Differential display 法で単離した染色体 1p13.3-21 領域に存在する遺伝子 DNA amplified in mammary carcinoma 1 (DAM1) が、乳癌由来の樹立培養細胞株 MCF-7 および BT-20 でそれぞれ基準値の 10 倍、5 倍に増幅されていることを明らかにした。またこの遺伝子にコードされた蛋白は 26 kDa の大きさを 255 個のアミノ酸からなり、スプライソゾーム関連タンパクの 1 つと同一であることを報告した。この DAM1 蛋白の作用をより明確にすることを目的として Green Fluorescent Protein (GFP) を用いてその細胞内局在を検討した。

【材料および方法】DAM1 cDNA の蛋白質をコードしている領域の両端に *NheI* の制限酵素認識配列を付加し polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて増幅した。この PCR

生成物を TA クローニング法を用いてクローニングし、シーケンスを確認した。さらにサブクローニングした PCR 生成物を GFP ベクターの Multiple Cloning Site (MCS) 内の *NheI* サイトに組み込み、適切なコンストラクトを選択し増幅させ、Midi prep®を用いて精製した。一方、MCF-7 をチャンバースライド内で 60% コンフルエントになるまで培養し、この細胞内に精製したプラスミドベクターと陽性荷電脂質からなる脂質二重膜小胞（カチオニックリポソーム）を緩やかに混合し、電気的な相互関係により複合体を形成させ、貪食や膜融合により細胞内に取り込ませる方法いわゆるリポフェクション法を用いて導入した。さらに培養を続け、6 時間後に培養液を無血清とし 48 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで固定した。蛍光顕微鏡を用いて DAM1-GFP 融合蛋白質の細胞内局在を解析した。コントロールとして GFP ベクター単独の導入を同様に行なった。

【結果と結論】 DAM1-GFP 融合タンパク質は核内で優位に発現していることが確かめられた。また GFP ベクター単独の導入では核内の発現はほとんど無く細胞質内にび漫性に発現していた。DAM1 蛋白質の機能についてはいまだ不明な点が多いが、MCF-7, BT-20 などの乳癌細胞においてスプライソゾーム関連蛋白質の 1 つとして核内で重要な働きをしている可能性が示唆された。また DAM1 遺伝子は核移行シグナルを持っていないことから、他の蛋白質とのインターアクションが考えられる。その蛋白質を見いだすことも今後の課題である。

|   |              |                   |         |   |
|---|--------------|-------------------|---------|---|
| 報告番号  | * 課程博<br>論文博 | 第 号               | 氏名      | 半澤 浩明   |
| 論文審査委員  |              | 平成 14 年 12 月 24 日 |         |   |
|   |              | 主査教授              | 田 中 龍 夫 |  |
|   |              | 副査教授              | 野 田 寛   |  |
|   |              | 副査教授              | 高 須 信 行 |  |
| ( 論 文 題 目 )   |              |                   |         |   |
| Subcellular Localization of DNA amplified in mammary carcinoma 1(DAM1)<br>Expressed as a Fusion protein with Green Fluorescent Protein<br>: A Green Fluorescent Protein Study   |              |                   |         |   |
| (論文審査結果の要旨)   |              |                   |         |   |
| 上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。   |              |                   |         |   |
| 1. 研究の背景と目的   |              |                   |         |   |
| ヒト1番染色体では乳癌において高頻度に染色体欠失や増幅が認められている。著者等ははすでにDifferential display法で単離した染色体1p13.3-21領域に存在する遺伝子DNA amplified in mammary carcinoma 1 (DAM1) が、乳癌由来の樹立培養細胞株MCF-7およびBT-20でそれぞれ正常細胞の10倍、5倍に増幅されていることを報告した。またこの遺伝子にコードされた蛋白は26 kDaの大きさで255個のアミノ酸からなり、スプライソゾーム関連タンパクの1つと同一であることを報告している。このDAM1蛋白の作用をより明確にすることを目的としてGreen Fluorecent Protein (GFP) を用いてその細胞内局在を検討した。 |              |                   |         |   |
| 2. 研究内容   |              |                   |         |   |
| DAM1 cDNAの蛋白質をコードしている領域をGFPベクターのMultiple Cloning Site (MCS)内のNheIサイトに組み込み、DAM1-GFP融合蛋白質発現コンストラクトを作成した。次に適切なコンストラクトを選択し増幅させ、Midi prep®を用いて精製した。  |              |                   |         |   |

備考

- 1 要旨の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
- 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
- 3 \*印は記入しないこと。

一方、MCF-7をチャンバースライド内で60%コンフルエントになるまで培養し、この細胞内に精製したプラスミドをリポフェクション法を用いて導入した。さらに培養を続け、6時間後に培養液を無血清とし48時間後に4%パラホルムアルデヒドで固定した。蛍光顕微鏡を用いてDAM1-GFP融合蛋白質の細胞内局在を解析した。コントロールとしたGFPは細胞質にのみに存在するのに対し融合蛋白質は核内に局在していた。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

この研究はDAM1が核内で働く蛋白質であることを明らかにしたものである。DAM1蛋白質の機能についてはいまだ不明な点が多いが、著者等は相同性検索の結果からスプライソゾーム関連蛋白質の1つとして核内で重要な働きをしている可能性を示唆している。しかしDAM1遺伝子は核移行シグナルを持っていないことから、他の蛋白質とのインターアクションによって核内に運ばれると考えている。新しい方法を駆使して行った研究のレベルは高くなお発展が期待される。

以上の結果から本論文は学位授与に十分値するものと判断した。

備考

- 1 要旨の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
- 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
- 3 \*印は記入しないこと。