

高等真核細胞の特定染色体のプロテオーム解析の基礎的研究

●高見 恭成

宮崎医科大学部生化学第二

研究の目的と進め方

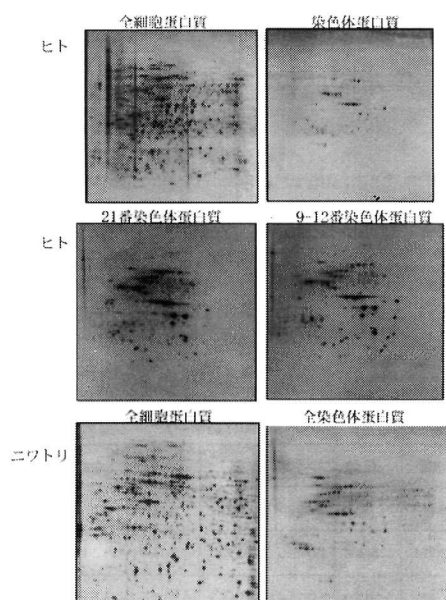
本研究課題はヒトおよびニワトリのM期染色体の染色体蛋白質の同定を目的とする。1)ソーティングしたヒトおよびニワトリの染色体蛋白質を2D-PAGEで解析する。2)種を問わず共通に存在する染色体蛋白質、逆に、種特異的な染色体蛋白質を同定する。3)特定染色体に特有な蛋白質を同定する。4)量的に多い蛋白質のアミノ酸配列は気相シーケンサで決定する。5)クロマチン免疫沈降法で、構造変化を生じた狭いクロマチン領域内で変動した蛋白質の同定方法を確立する。

2001年度の研究の当初計画

- (1)M期同調のためのノコダゾール処理の至適条件をヒトGM130B細胞およびニワトリDT40細胞に合わせて設定する。
- (2)ヒト染色体のソーティング法は確立されているが、蛋白質調製用のソーティングのためにシース液成分の濃度変更などの条件検討を行う。
- (3)ニワトリ染色体のソーティングに関する条件設定を行う。多くのミクロ染色体を持つため、これらを有効に分画するための条件検討を行う。
- (4)ソーティング済のヒト第9～12, 18, 21番, X, Y染色体、さらに他の染色体の蛋白質を2D-PAGEで解析する。ソーティング済のニワトリの第1～8番染色体の蛋白質を2D-PAGEで解析する。
- (5)クロマチン免疫沈降法で、欠失DT40変異株のクロマチン蛋白質の同定方法を確立する。

2001年度の成果

- (1)特定染色体の蛋白質に関しては、ヒトの第9～12, 18, 21番染色体およびニワトリのミクロ染色体などを解析



2D-PAGE パターン

した(図を参照)。

- (2)染色体蛋白質の2D-PAGE泳動パターンはヒトおよびニワトリの全蛋白質のパターンとは明らかに異なる。
- (3)メジャー蛋白質の多くは種および染色体の種類を問わず共通に存在する。
- (4)ヒトに存在し、ニワトリに存在しない種特異的な蛋白質が存在する。
- (5)特定染色体に特有な蛋白質が存在する。

国内外での成果の位置づけ

超微量蛋白質のプロテオーム解析において、最も肝要なことはこれらのターゲット蛋白質を、いかに再現性良くかつ効率的に分画し分取するかということであり、本課題はこのようなことを念頭において行うところに特色がある。クロマチン構造変化を介したゲノム機能発現制御機構の研究は膨大であるが、この構造変化に係っている染色体蛋白質を網羅的に同定する試みは最初である。また、膨大なプロテオーム解析研究の中で、特定染色体の蛋白質をターゲットにしている唯一のものである。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

- (1)ニワトリは多くのミクロ染色体を有するため、これらを有効に分画することにまだ成功していない。
- (2)比較的量の多い10個のヒト染色体蛋白質のアミノ酸配列決定を、気相シーケンサで直接およびBrCN分解後、試みたが決定できなかった。
- (3)クロマチン免疫沈降法については結果を得ることができなかった。

今後の課題

- (1)ヒト染色体蛋白質調製用の染色体ソーティングのために、シース液成分の濃度変更などの条件検討をさらに行う。
- (2)ニワトリ染色体蛋白質調製の条件設定を行う。さらに、ニワトリは多くのミクロ染色体を持つため、これらを有効に分画するための条件検討を行う。
- (3)ソーティング済のヒト第9～12, 18, 21番, X, Y染色体以外の染色体蛋白質およびニワトリの第1～8番染色体蛋白質などを2D-PAGEで解析する。
- (4)種を問わず共通に存在する染色体蛋白質および種特異的な染色体蛋白質を同定する。さらに、特定染色体に特有に存在する蛋白質を同定する。
- (5)アミノ酸配列決定は質量分析法を用いて行う。

成果公表リスト

1. 111131044
Ahmad, A., Nagamatsu, N., Kouriki, H., Takami, Y. and Nakayama, T. : Leucine zipper motif of chicken histone acetyltransferase-1 is essential for in vivo and in vitro interactions with the p48 subunit of chicken chromatin assembly factor-1. Nucleic Acids Res. 29, 3, 629-637(2001).
2. 111131049
Nakayama, T. and Takami, Y. : Participation of histones and histone-modifying enzymes in cell functions through alterations in chromatin structure. J. Biochem. 129,4, 491-499(2001).