

ニンジン NMCP1 の核表層局在に機能するタンパク質領域の解析

生物資源科学専攻 作物生産生物学講座 植物機能開発学 塗騰

1. 緒言

核質と細胞質は核膜によって仕切られている，近年，有糸分裂や発育におけるその多様な働きが明らかになってきた。核膜の核質側の面には，核膜を支持する構造があり，核ラミナと呼ばれている。核ラミナは，ラミンタンパク質が重合した網目状繊維構造であり，核膜に内在するタンパク質および染色質と相互作用することによって核膜と染色質の結合に働いていると考えられている。核ラミナに類似する構造は植物にも存在するが，ラミン関連の遺伝子は植物では見つかっていない。そのため，植物の核膜支持構造は動物のものとは異なるタンパク質によって作られていると考えられている。NMCP1 および2はその最も有力な候補である。DcNMCP1 (ニンジン NMCP1) 核表層への局在には，DcNMCP1 のなかの保存された配列 RYNLRR が必要であることが明らかにされている。本研究では DcNMCP1 が，この領域を介して核内のほかのタンパク質が相互作用しているかを，ファーウエスタンブロッティングおよびプルダウンアッセイにより検証した。

2. 材料と方法

植物材料：ニンジン胚軸由来のカルスを $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 2,4-D を含む改変 MS 培地で培養したのち，体細胞胚を誘導した。核の単離：体細胞胚を細胞壁分解酵素で処理した後，非イオン界面活性剤を含む抽出溶媒に懸濁し，ホモジェナイザーで破碎した。これを篩で濾過し，遠心分離により核画分を得た。電気泳動：Laemmli (1970) の方法に従い，Towbin ら(1979)の方法で PVDF 膜に転写した。ファーウエスタンブロッティングおよびプルダウンアッセイ：単離核を 0.4M 塩酸に懸濁し，4°C で 60 分間振盪したのち，遠心分離して残渣を除いた。上清にアセトンを加え，沈殿したタンパク質を回収し試料とした。ファーウエステンのプローブおよびプルダウンのベイトには，DcNMCP1 のアミノ酸配列 RYNLRR を含む領域と GST (glutathione-S-transferase) との融合タンパク質を，大腸菌の系で合成して用いた。

3. 結果と考察

ニンジンの希塩酸可溶性核タンパク質を電気泳動し，PVDF 膜に転写した。この膜をプローブで処理し，GST をタグとして抗体を用いて結合したタンパク質を検出したところ，97, 42 および 38kDa のバンドが検出された。一方，プルダウンアッセイでは 120 および 92kDa のタンパク質がベイト結合画分に検出された。以上の結果から，DcNMCP1 は RYNLRR を含む領域を介して核内の 92-97kDa のタンパク質と結合していることが示唆された。

4. まとめ

1) ニンジン体細胞胚から効率よく核を単離する方法を確立した。2) ニンジンの NMCP1 は RYNLRR を含む領域を介して核内の 92-97kDa のタンパク質と結合していることが示唆された。