

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON THE REMODELING OF SPERM BASIC NUCLEOPROTEINS
DURING FERTILIZATION IN ANURAN AMPHIBIANS

（無尾両生類の受精における精子核塩基性蛋白質の置換に関する研究）

学位論文内容の要旨

動物の精子核には体細胞核とは異なる特異な塩基性蛋白質（sperm-specific basic protein: SBP）が含まれ、受精卵では雄性前核の形成に伴ってそれが体細胞型ヒストンに置換されことによりはじめて精子核ゲノムが胚発生に参加できるようになると考えられている。しかし、この置換の過程および調節機構は、核／細胞質比が極端に低いという受精卵の特殊事情によりほとんど調べられていない。本研究は、多数の精子核を同調的に前核化し得る無尾両生類卵の無細胞系を利用して、精子核からSBPを除去する活性をもつ分子を卵細胞質から分離、同定するとともに、雄性前核を構成する塩基性蛋白質の解析を通じて、受精卵におけるSBPの置換のしくみを解析したものである。

1. 精子特異的塩基性蛋白質（SBP）の離脱をもたらす卵細胞質因子

Bufo japonicus（ヒキガエル）の精子核塩基性蛋白質はプロタミンのみからなる。リゾレシチン処理により膜を除いた精子を同種成熟卵の遠心抽出液（egg extract: EE）中でインキュベートすると、核は直ちに脱凝縮した後、受精卵におけると同様の時間経過で前核および染色体を形成した。プロタミンに対する抗体を用いて免疫組織化学的に調べると、受精後5分以内の精子核、EE処理1分以内の精子核では脱凝縮とともにプロタミンが消失していた。精子核に脱凝縮およびプロタミンの離脱をもたらす活性は、成長期の卵母細胞、成熟卵、胞胚の細胞質粗抽出物には存在したが、囊胚、成

体の肝臓のそれには認められなかった。

EEとインキュベート後種々の時間に精子核を回収し、0.4N硫酸で抽出される核蛋白質をSDS-PAGEにより解析すると、5分以内にプロタミンが消失し、代わりにヒストンを含む多数の蛋白質が結合していた。他方、6種類のSBP(SP1-6)に加え一部のコアヒストンをもつアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 精子を *Bufo* EEとインキュベートすると、全てのSPが消失し新たにヒストンが加わって結果的に *Bufo* 精子前核と同じ組成の塩基性蛋白質がもたらされた。 *Xenopus* 卵から調製したEEでも、 *Bufo* 卵のそれと全く同じ変化を *Bufo* および *Xenopus* 精子に引き起こさせた。

精子核に脱凝縮とSBP離脱をもたらす活性は、EEの可溶性成分のうち酸性の高分子分画に認められ、この成分中では *Xenopus* 精子から SP1-6だけが選択的に除去された。このことを利用し、インキュベーション後に *Xenopus* 精子に残存するSP3-5/H3の比率をSDS-PAGEにより測ることによってプロタミン除去活性 (protamine-removing activity: PRA) を定量化した。 *Bufo* EEの可溶性分画を出発点に、Q-Sepharose によるイオン交換クロマト、Superose 12 によるゲルろ過によって精子核の脱凝縮を伴う高いPRAのフラクションが回収された。この精製標品と *Bufo* 精子をインキュベートして得た上清をゲルろ過および抗プロタミン抗体を用いた Western解析等により分析したところ、精子核から離脱した分子量5kDaのプロタミンが140kDaの移動度を示す蛋白質に結合していることが明かとなった。従って、PRAは酵素的分解によってではなくプロタミンに対する強い親和力によってこれを精子核から除去すると考えられる。

精製されたPRAは熱(100℃, 10分)に耐性、RNase および DNaseには非感受性だが、proteinase Kにより失活した。また native-PAGEでは140kDa、SDS-PAGEでは36kDaの移動度を、等電点電気泳動においては4.2-4.5の等電点を示し、Glx、Lys含量の高いアミノ酸組成を有していた。これらの性質はいずれも従来“ヌクレオブラズミン”として知られてきた *Xenopus* 卵の酸性蛋白質と酷似しており、PRAはヌクレオブラズミンのはたらきに基づく結論した。

2. 前核および卵割期の細胞核に特異なH1ヒストン

Bufo EE中に同種精子核をインキュベートすることにより誘導された前核を集めて、その酸抽出蛋白質を2次元電気泳動(SDS-AUT)法により解析した。上述したように

プロタミンはすばやく消失したが、代わりにコアヒストン H2B、H3、H4および H2Aの変異体 H2A.Xが付加され、その量はインキュベーションとともに60分までに増加した。また前核には分化した細胞の核にみられるH1は存在せず、代わりにH1とは移動度の異なる蛋白質(H1X)が存在することが分かった。

EEの可溶性成分中で DNA-celluloseをインキュベートすると、H1Xは他のヒストン群と共にDNAに結合したが、コアヒストンとは異なって5%過塩素酸および 0.7M NaClによりDNAから溶離した。H1Xは他のH1に類似したLys含量の高いアミノ酸組成を有していたが、V8プロテアーゼによるペプチドマッピングでは他のH1のいずれとも異なるパターンを示した。

種々の発生段階の胚の核から酸抽出される蛋白質を2次元電気泳動で解析すると、胞胚期までは前核と同じヒストン組成が維持されていたが、囊胚期以降ではH1X、H2A.Xが著しく減少し、代わりに分化した細胞の核にみられるH1が出現し、H2Aが増加していた。H1X、H2A.Xはその後さらに減少し、成体の核にはH1Xが全く存在しなかったが、H2A.Xは少量なから認められた。前核および卵割期の核に特徴的なH1サブタイプおよびH2A.Xは Xenopus 卵の無細胞系で誘導された前核および初期胚の核にも存在することが確認された。XenopusではBufoのH1Xと同じ移動度を示す蛋白質が4種存在していたが、それらの酸、塩に対する溶出性、ペプチドマッピングのパターン、囊胚期における他のH1の出現にともなう著しい減少などから、いずれもBufoのH1Xと相同の蛋白質であると結論された。以上の結果から、H1Xはこれまで報告されていなかった初期胚に特異なH1サブタイプであると結論した。

本研究により、受精の際に精子核からSBPを除去する活性が卵細胞質からはじめて分子的に同定され、それがこれまで機能不明であったヌクレオブラズミンによりもたらされることが直接的に証明された。両生類の卵割期に特異なH1サブタイプの発見とともに、これらの成果を可能にした両生類卵の無細胞系を用いた実験を活用することによって、精子核クロマチンの精子型から体細胞型への変換およびその調節機構の解析をさらに深めることが可能であると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 桐 千 明

副 査 教 授 山 本 正

副 査 教 授 堀 浩

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON THE REMODELING OF SPERM BASIC NUCLEOPROTEINS DURING FERTILIZATION
IN ANURAN AMPHIBIANS

(無尾両生類の受精における精子核塩基性タンパク質の置換に関する研究)

動物の成熟精子核クロマチンは、プロタミンに代表される特異な塩基性蛋白質 (sperm-specific basic proteins:SBP)を含んでいて、ヌクレオソーム構造を基本とする通常の体細胞核とは著しく異なる。このことは、精子形成及び受精過程でSBPが何時、如何にして形成されまた除去されるのか、という興味深い問題を提起する。前者については近年いくつかの脊椎動物について研究されるようになったが、後者は巨大な卵細胞に1ヶしか精子が入らないという受精現象に特有の事情のため、これまで分子的な解析の対象になり得なかった。大隅圭太提出の学位論文は、無尾両生類卵の無細胞系を利用してこの難点を克服し、受精過程における精子核クロマチンのリモデリングのしくみの解析にはじめて成功したものである。論文は主論文と参考論文6編から成る。

申請者はまず抗プロタミン抗体を用いた免疫組織化学的観察から、受精卵では卵の受精丘直下にある精子核が、また成熟卵の遠心抽出液からなる無細胞系でインキュベートされた精子核でも1分以内に、それぞれSBPを失っていることを見出した。これらの精子核は常に脱凝縮を伴っており、脱凝縮とSBPの離脱を指標に調べると、

その細胞質活性は両生類はもとより哺乳類を含めた異種精子核にも作用すること、また卵母細胞から胞胚までの細胞質に固有のものであること等が示された。さらに電気泳動による解析から、核にヒストンをも併せもつつメガエル精子からはSBPのみが選択的に除去されるという重要な事実を発見し、この特性を利用して電気泳動的に検出されたSBPとヒストンの量比をもとにSBPを除去する活性を定量化することに成功している。この方法を用いて申請者は成熟卵細胞質を出発点に核からプロタミンを除去する活性を精製し、その分子量、特異な耐熱性、等電点やアミノ酸組成等からヌクレオプラズミンであると結論し、さらに従来記載されていた方法に従って調整したヌクレオプラズミンがプロタミン除去活性をもつという実験によりこの結論を再確認している。興味深いことに、精製ヌクレオプラズミン中ではSBPは分解されることなくヌクレオプラズミンに結合して核から回収される。この事実に着目して申請者はヌクレオプラズミンがSBPとストイキオメトリックに結合することにより後者を離脱させる仕組みを提案し、これまで論議が絶えなかった精子プロタミンの離脱の機構について新しい視点を導入している。申請者はさらに無細胞系で精子前核が形成される過程での核蛋白質の変化を追跡し、前核から胞胚期までの核クロマチンは分化した細胞核のそれとは異なった特異なH1のサブタイプからなることを発見し、それをH1Xと命名した。H1XはMBTまでの短い細胞周期に見合ったクロマチンの状態を反映しているとみなされ、その具体的な役割の解明が期待される。

以上の成果は、受精卵で起こるSBPの置換の追跡としてはこれまで唯一の報告であったウニの例にくらべて、SBPを離脱させる卵細胞質因子の分子の実態を同定しまた離脱の仕組みにも迫っている点でこれを明らかに超えており、発表と同時にこの分野の研究者の注目を集めている。とりわけこれまで不明であったヌクレオプラズミンの機能を解明し、精子核クロマチンを出発点として体細胞型クロマチンを再構成する実験系を開拓したことの意義は高く評価される。

参考論文6編は主論文の根幹をなす内容を含み、いずれも権威ある国際雑誌に掲載され高い評価を受けている。申請者に対する最終試験は、1月31日動物学専攻の教官多数の出席のもとに論文の口頭発表と質疑応答の形で行われ、満足すべき結果であった。従って審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認める。