

学 位 論 文 題 名

Studies on Structure and Expressin of the Genes for
sperm-specific Nuclear Basic Protein SP4 in *Xenopus laevis*

(アフリカツメガエル精子特異的塩基性核蛋白質 SP4 遺伝子の
構造と発現に関する研究)

学位論文内容の要旨

通常精子核クロマチンは体細胞型ヒストンの代わりに精子に特異的な塩基性核蛋白質 (Sperm-specific nuclear basic proteins, SBPs) を持ち、体細胞核のそれに普遍的なヌクレオソーム構造をとらないことが知られている。これらのSBPsは成熟精子の核を強く凝縮させることによって核の転写活性を抑えるとともに、受精が成立するまでの間精子のDNAを物理的、化学的な傷害から保護するのに役立つと考えられている。このことは、精子形成過程で、いつ、いかなる仕組みで精子形成細胞のクロマチンが体細胞型から精子型への転換を遂げるのか、という興味深い問題を提起する。これまでの免疫組織化学的観察及び電気泳動法を利用した研究により、SBPsは精子形成過程の最終段階である核の凝縮期になって初めて合成され、体細胞型ヒストンの全部あるいは一部と置き換わることが明らかにされている。しかしSBPsのそれを含めて精子形成過程で発現する遺伝子に関する研究は一部の哺乳類で行われているのみであり、その過程での転写調節機構についてはほとんど不明である。ヒストンとは対照的にSBPsの組成が動物種により著しく異なって多様であることを考慮すれば、精子形成過程におけるSBP遺伝子の発現及び翻訳調節機構を分子生物学的な観点から解明することは重要だと思われる。

以上の観点から、本研究ではSBPsの構成が大きく異なる2種の無尾両生類アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) およびニホンヒキガエル (*Bufo japonicus*) を選び、これら精子に特異的な塩基性核蛋白質の合成の仕組みを遺伝子の発現調節の面から明らかにすることを旨として、SBP遺伝子の構造解析を行った。

1. 精子形成過程におけるSBP遺伝子の転写開始時期: SBPsは、ニホンヒキガエルではプロタミンに属する2種類の低分子強塩基性蛋白質のみからなるのに対し、アフリカツメガエルでは体細胞型のコアヒストン (H3、H4 および少量の H2A、H2B) と精子核に特異的な蛋白質 (SPs1-6) からなる。これらのうち、最近cDNAが得られたヒキガエルのプロタミン、アフリカツメガエルのSP4の遺伝子発現時期を調べた。各組織から抽出したtotal RNAを電気泳動後プロットし³²Pで標識したcDNA (ヒキガエルpBP2; ツメガエルpXHP531) をプローブに用いノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、両遺伝子は精巣でのみ転写されていた。精巣組織をディスペーゼで解離し、セルセップ装置を用いて2-5%BSA勾配中で精子形成細胞を大きさによって分画することにより得た第一次精母細胞と精細胞から抽出したRNAを用いてノーザン解析をおこなったところ、ヒキガエル

のプロタミンの遺伝子は、典型的な哺乳類のプロタミン遺伝子と同じく精細胞（半数体）でのみ転写されていた。他方、アフリカツメガエルでは第一次精母細胞と精細胞の両方からSP4 mRNAが検出され、mRNAのサイズは第一次精母細胞期（650-710ヌクレオチド）では精細胞のそれ（560-800ヌクレオチド）よりも長かった。転写開始時期をさらに詳しく決定するため*insitu*ハイブリダイゼーションをおこなった結果、アフリカツメガエルSP4遺伝子は第一次精母細胞の後期パキテン期（4倍体）に転写が始まることが明らかになった。SBP遺伝子が減数分裂前期に転写されるというのは初めての発見である。

2. アフリカツメガエルSP4遺伝子の構造解析：アフリカツメガエルSP4遺伝子が第一次精母細胞期（減数分裂前期）に転写が開始されるのはどのような転写調節機構に基づくのかを知るため、上流域を含むSP4遺伝子の構造解析を行った。32Pで標識したSP4 cDNAをプローブに用いて純系アフリカツメガエルJ系統の肝臓より精製したゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、12.0kbp、4.3kbpおよび2.0kbpのEcoRI断片にシグナルが検出された。そこで12.0kbp-EcoRI断片のゲノムライブラリーを作成し、SP4 cDNAをプローブにしてスクリーニングを行い、SP4遺伝子を含むゲノムクローンλXLSP4を得た。シーケシングの結果、この12.0kbp断片には約500bpのイントロンを持つ3個のSP4遺伝子がおおよそ3kbpおきに存在していた。また、イメージアナライザーを用いてサザンハイブリダイゼーションで示されたシグナルの放射線量を測定した結果、4.3kbpと2.0kbp断片はいずれも12.0kbp断片の3分の1であり、それぞれ1個ずつのSP4遺伝子が存在していることが示唆された。そこでプライマーをSP4のコード領域の両端に設定して4.3kbpと2.0kbpのEcoRI断片でPCRを行った結果、いずれからも738bpの断片が増幅され、それらは塩基配列からどちらもSP4遺伝子であることが確認された。ただし2.0kbp-EcoRI断片にある遺伝子は翻訳領域の塩基に置換があり、N末端から69番目のアミノ酸がAlaからSerへと変異していた。この変異型のSP4は成熟精子から抽出した蛋白質にも確かに存在することが確認されている。EcoRI、HindII、PvuIIおよびそれらを組合せて行ったサザン解析の結果を総合して、2.0kb、12.0kb、4.3kbのEcoRI断片はゲノム上で連続しており、5個のSP4遺伝子（うち最も上流に位置するものは変異型）が互いにおおよそ3kbpを隔ててタンデムに並んでいると結論された。SBP遺伝子がこのように単純重複配列をとるという事実は今までに報告されておらず、ツメガエルSP4遺伝子はユニークな構造をしているといえる。次に第2-4番目のSP4遺伝子を含む領域10,165bpの全塩基配列を決定したところ、これらの遺伝子のいずれでも5'側上流域にCCAAT-box（転写開始点より73bp上流）とTATA配列（同13bp上流）およびTATA類似配列（同47または87bp上流）が、3'側下流域（終止コドンより135または137bp下流）にはポリA付加シグナルが存在しており互いに高い相同性を示した。ハープロット解析の結果、その他にもこれら3つの遺伝子の上流域にはおおよそ200bpにわたり80%以上の相同性をもつ領域が2カ所存在することが明らかとなった。しかし、これらの配列にはこれまでに精巢特異的あるいは精母細胞特異的の発現をする遺伝子の転写調節エレメントとして候補に挙げられている配列と同一なものは見られない。本研究で見出されたこれらのよく保存されている領域は組織特異的かつ時期特異的なSP4遺伝子の転写調節に関わっている可能性があり、今後の詳しい機能的な解析が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 桐 千 明

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 高 橋 孝 行

学 位 論 文 題 名

Studies on Structure and Expressin of the Genes for
sperm-specific Nuclear Basic Protein SP4 in *Xenopus laevis*

(アフリカツメガエル精子特異的塩基性核蛋白質 SP4 遺伝子の
構造と発現に関する研究)

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、精子形成および受精過程で 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、精子核に固有のクロマチンリモデリングに関する興味深い問題を提起するが、もともと SBP がいちじるしく多様であることも起因してこれらの問題には不明な点が多い。箕田康一提出の学位論文は、無尾両生類を用いて第 1 のリモデリング、すなわち精子形成過程における SBP 遺伝子の転写時期を特定し、また同遺伝子の詳細にわたる構造解析を通じてその特異な発現調節機構を論じたものである。論文は主論文と参考論文 2 篇から成る。

申請者は最近 cDNA が得られたニホンヒキガエルのプロタミンおよびアフリカツメガエルの主要な SBP である SP4 について、それらの遺伝子が転写される時期をノザン解析および in situ ハイブリダイゼーションにより調べ、ヒキガエルのプロタミン遺伝子が哺乳類や魚類で従来知られていたように精細胞（半数体）ではじめて転写されるのに対し、ツメガエルの SP4 遺伝子は第一次精母細胞の中期パキテン期（4 倍体）に転写が始まることを見出した。この発見は、SP4 蛋白質そのものはプロタミンと同じく精子形成過程の最終段階である核の凝縮期に合成されるという最近の知見に照らして、この遺伝子がきわめて特異な転写および翻訳の調節機構のもとにあることを示す興味ある問題提起である。そこで申請者はこの SP4 遺伝子の転写調節機構を知るための手がかりを遺伝子の構造自体に求めるべく、この遺伝子の

構造解析を行っている。純系ツメガエルJ系統から精製したゲノムDNAを用いて種々の制限酵素による切断とサザンハイブリダイゼーションの結果を総合した結果、ゲノム上の18 kbにわたる領域に5ケのSP4遺伝子が互いに約3 kbを隔ててタンデムに並んでいるという、これまでSBP遺伝子としては報告のなかった単純重複配列をとることが明らかとなった。これら5ケの遺伝子はいずれも1ケのイントロンをもち、最も5'側に位置するものが78ケのアミノ酸中1ケの置換を示す他は互いにきわめて相同であるのみならず、中央部12 kbの範囲に並ぶ3つの遺伝子について行われた全塩基配列の決定結果は、各遺伝子が5'上流および3'下流域に転写開始およびポリA付加シグナルをもつとともに、5'上流域200bpにわたって互いに80%以上の相同性を示す箇所をもつことを示した。これら5'領域の特徴的な塩基配列は、データ検索および従来の精子形成過程における遺伝子発現の研究では見いだされていない新たな発見で、精巣または精母細胞に特異的な発現調節にかかわるシスエレメントである可能性が高い。

以上の成果は、塩基性核蛋白質の遺伝子に減数分裂前期に発現するものがあることを発見したこと、複数からなるSBP遺伝子の特異なゲノム構造を明らかにしたこと、およびその時期特異的発現に関わる可能性の高い調節エレメントを提示したことなど、精子形成過程における遺伝子発現機構の研究に新たな問題提起をするものとして評価される。参考論文2篇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て、その一部は最近刊の「精子形成の分子機構」に関するモノグラフに引用されるなど国際的に高い評価を受けている。申請者に対する最終試験は、1月30日に多数の大学院担当教官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。したがって審査員一同は、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。