

学 位 論 文 題 名

Studies on the Structure-Function Relationship of Nucleoplasmin  
—Mechanism of Salmon Sperm Decondensation Mediated by Nucleoplasmin—

（ヌクレオプラスミンの構造と機能に関する研究  
—ヌクレオプラスミンによるサケ精子脱凝縮の機能—）

学位論文内容の要旨

ヌクレオプラスミンはヌクレオソームの構築因子として分子シャペロンと最初に名づけられ、アフリカツメガエルの卵母細胞や卵中に最も豊富に存在する蛋白質である。最近、ヌクレオプラスミンはアフリカツメガエルの精子核を脱凝縮しヌクレオソームへと変化させることが報告されておりヌクレオプラスミンが受精期のヌクレオプロタミンの脱凝縮からヌクレオソーム形成まで作用している可能性が示唆され注目されている。ヌクレオプラスミンは多くの酸性アミノ酸残基を持ちカルボキシル末端側にはポリグルタミン酸ブロックも存在する。卵中におけるヌクレオプラスミンは高度にリン酸化されており、この酸性アミノ酸やリン酸基がヒストンやプロタミンとの相互作用に関与し精子の脱凝縮やヌクレオソームの形成を調節しているものと考えられる。これまでヌクレオプラスミンの生物学的機能はある程度明らかにされてきたがその分子構造と機能の関係は全く明らかにされていない。さらにより詳細にヌクレオプラスミンの機能を明らかにするために分子レベルでの研究が必要とされている。本研究ではヌクレオプラスミンの大量精製法の確立とヌクレオプラスミンによるDNA-プロタミン（サルミン）複合体の脱凝縮のメカニズムを分光学的手法等を用いて分子レベルで検討した。

第1章では本論文の序論が述べられている。

第2章では、分光学的測定にはこれまでのような精製法によって得られたヌクレオプラスミンでは量的に不十分なのでこれまでとは改良された方法によるヌクレオプラスミンの精製法が述べられ、次にこの精製法によって得られたヌクレオプラスミンの構造に関する知見を得るために、分光学的手法による検討について述べられている。その結果この精製法によって1サイクルの精製で2-3 mgのヌクレオプラスミンを得ることができた。また構造に関しては、CDスペクトルの測定からヌクレオプラスミンの $\alpha$ -ヘリックス含量が30-40%であることが明らかとされ、蛍光スペクトルよりヌクレオプラスミンの2つのトリプトファンのうち1つはかなり疎水的環境下にありもう1つは分子表面近くのやや親水的環境下にあることが明らかとされた。

第3章では、まずヌクレオプラスミンが異種であるサケの精子核に対して脱凝縮活性を持つかどうか調べ、次にサケ精子核モデルであるDNA-プロタミン（サルミン）複合体のヌクレオプラスミンによる脱凝縮を濁度法等を用いて分子レベルで観察した。また、ヌクレオプラスミンとプロタミンの相互作用を分光学的手法を用いて調べた。その結果、ヌクレオプラスミンは両生類の精子核に対してばかりでなくサケの精子核に対しても脱凝縮活性を示すことを明らかとなった。これまでの研究でヌクレオプラスミンがヒトや貝類の精子核に対しても同様の働きをもつことや同様の働きをもつと考えられる蛋白質が見つかったことからヌクレオプラスミン（ヌクレオプラスミン様蛋白質）による精子核の脱凝縮活性は全ての生物にとって普遍的な働きであると考えられる。また濁度法やDNAに特異的に結合する色素を用いてサケ精子核モデルであるDNA-プロタミン複合体からプロタミンの引き抜きを調べたところ、明らかにサルミンが引き抜かれたことが証明されサルミンの濃度とほぼ等濃度のヌクレオプラスミンが存在すると完全にサルミンが引き抜かれることが明らかとされた。ヌクレオプラスミンとプロタミンの相互作用をや蛍光スペクトルで観察したところヌクレオプラスミンのグルタミン酸の部分がサルミンとの結合に主として関与していることが示唆され、プロタミンとヌクレオプラスミンはほぼ1:1で結合することも明らかとされた。また、CDスペクトル測定においてヌクレオプラスミンの $\alpha$ -ヘリクスの減少が見られこのことからポリグルタミン酸ブロックの部分がサルミンとの結合に関与していることを強く示唆している。

第4章ではDNA-プロタミン複合体からのプロタミンの引き抜きをヌクレオプラスミンのモデルとしてアニオン性のポリマーを用いて検討した。この結果、ポリアクリル酸はヌクレオプラスミンと同等かそれ以上の効果を示すが、ポリグルタミン酸の場合ヌクレオプラスミンのリン酸化を考慮に入れてもヌクレオプラスミンの方が効率が良いことが明らかとなった。このことはヌクレオプラスミンの5量体構造やポリグルタミン酸部分の $\alpha$ -ヘリックス形成等といったヌクレオプラスミンの構造と深く関係していると考えられる。

以上の結果より、本論文ではヌクレオプラスミン（あるいはヌクレオプラスミン様蛋白質）がヌクレオソームの構築と精子染色体の分解の相反する両方の機能を持つ因子として働き精子核の脱凝縮は主としてヌクレオプラスミンのカルボキシル末端側のポリグルタミン酸ブロックの部分が行うことが明らかとされた。また、この分子は高等生物のこの受精の過程において普遍的に働く蛋白質である可能性が示唆された。この研究はヌクレオプラスミンの更なる機能解明につながるものと考えられ、ヌクレオプラスミンの分子シャペロンとしての機能やヌクレオプラスミンによる転写因子結合促進作用の分子レベルでの機構解明にもつながるものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄  
副 査 教 授 戸 倉 清 一  
副 査 教 授 西 村 紳一郎 (大学院理学研究科)  
副 査 助教授 覚 知 豊 次  
副 査 助教授 坂 入 信 夫

## 学 位 論 文 題 名

### Studies on the Structure-Function Relationship of Nucleoplasmin —Mechanism of Salmon Sperm Decondensation Mediated by Nucleoplasmin—

(ヌクレオプラスミンの構造と機能に関する研究  
—ヌクレオプラスミンによるサケ精子脱凝縮の機能—)

ヌクレオプラスミンはヌクレオソームの構築因子として分子シャペロンと最初に名づけられた蛋白質で、アフリカツメガエルの卵中に豊富に存在している。最近、ヌクレオプラスミンはアフリカツメガエルの精子核を脱凝縮しヌクレオソームへと変化させることが報告され注目されている。ヌクレオプラスミンは多くの酸性アミノ酸残基を持ち、また、卵中におけるヌクレオプラスミンは高度にリン酸化されており、この酸性アミノ酸やリン酸基がヒストンやプロタミンとの相互作用に関与し精子の脱凝縮やヌクレオソームの形成を調節しているものと考えられる。これまでヌクレオプラスミンの生物学的機能はある程度明らかにされてきたがその分子構造と機能の関係は全く明らかにされておらず、分子レベルでの研究が必要とされている。本研究ではヌクレオプラスミンの大量精製法の確立とヌクレオプラスミンによるDNA-プロタミン（サルミン）複合体の脱凝縮のメカニズムを分光学的手法等を用いて分子レベルで検討している。

本論文は4章からなり、第1章ではヌクレオプラスミンに関する研究やその背景についての序論が述べられている。

第2章では、分光学的測定に用いるような多量の試料を得るための改良された方法によるヌクレオプラスミンの精製法が述べられ、次にこの精製法によって得られたヌクレオプラスミンの構造に関して、CDや蛍光分光法により有力な情報を得た。

第3章では、まずヌクレオプラスミンが異種であるサケの精子核に対して脱凝縮活性を持つかどうか調べ、次にサケ精子核モデルであるDNA-プロタミン（サルミン）複合体のヌクレオプラスミンによる脱凝縮を濁度法等を用いて分子レベルで観察した。また、

ヌクレオプラスミンとプロタミンの相互作用を分光学的手法を用いて調べた。その結果、ヌクレオプラスミンは両生類の精子核に対してばかりでなくサケの精子核に対しても脱凝縮活性を示すことを明らかとなった。また濁度法やDNAに特異的に結合する色素を用いてサケ精子核モデルであるDNA-プロタミン複合体からプロタミンの引き抜きを調べたところ、プロタミンの濃度とほぼ等濃度のヌクレオプラスミンが存在すると完全にサルミンが引き抜かれることが明らかとされた。ヌクレオプラスミンとプロタミンの相互作用を蛍光スペクトルで観察したところヌクレオプラスミンのグルタミン酸の部分がサルミンとの結合に主として関与していることが示唆され、プロタミンとヌクレオプラスミンはほぼ1：1で結合することも明らかとされた。

第4章ではDNA-プロタミン複合体からのプロタミンの引き抜きをヌクレオプラスミンのモデルとしてアニオン性のポリマーを用いて検討した。これらの結果とヌクレオプラスミンでの結果を比較することにより、ヌクレオプラスミンの5量体構造やポリグルタミン酸部分の $\alpha$ -ヘリックス形成等といったヌクレオプラスミンの構造とその機能は深く関係していることが示唆された。

以上の結果より、本論文ではヌクレオプラスミンがヌクレオソームの構築と精子染色体の分解の相反する両方の機能を持つ因子として働き精子核の脱凝縮は主としてヌクレオプラスミンのカルボキシル末端側のポリグルタミン酸ブロックの部分が行うことが明らかとされた。また、この分子は高等生物の受精の過程において普遍的に働く蛋白質である可能性が示唆された。この研究はヌクレオプラスミンの更なる機能解明につながるものと考えられ、ヌクレオプラスミンの分子シャペロンとしての機能やヌクレオプラスミンによる転写因子結合促進作用の分子レベルでの機構解明にもつながるものと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者は研究者として誠実かつ熱心であると考え、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。