

学 位 論 文 題 名

Nuclear Basic Proteins in Sperm of An Anuran Amphibian, *Rana catesbeiana*: Their Structure and Role in Condensed State of Chromatin(無尾両生類 *Rana catesbeiana* の精子核塩基性タンパク質の構造及びクロマチン凝縮における役割)

学位論文内容の要旨

通常、動物の精子核が体細胞核に比べて強く凝縮しているのは、精子核クロマチンを構成する塩基性タンパク質が体細胞核のそれとは異なるためであると考えられている。すなわち、一般に体細胞核のクロマチンが生物種を越えて普遍的なヒストン群から構成されるのとは対照的に、精子核塩基性タンパク質 (sperm nuclear basic protein, SNBP) は単にヒストンと異なるのみならず、動物種ごとにさまざまなタイプが存在するという特徴を持つ。したがって、多種多様なSNBPの性質を明らかにすることは、精子核凝縮の機構と生物学的意味を知るうえで重要である。無尾両生類のうち、ニホンヒキガエル (*Bufo japonicus*) のSNBPはアルギニンを含み40%以上含む典型的なプロタミン、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のそれはアルギニンを比較的多く含んだヒストンとプロタミンの中間型のタンパク質であることが分かっている。しかし、他の無尾両生類、例えば *Rana* 属では、電気泳動的解析や組織化学的観察からプロタミンとは著しく異なる「精巣特異的」なタンパク質が存在することが示唆されてはきたが、このタンパク質の詳細は不明であった。本研究では、ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 及び *Dicoglossus pictus* の成熟精子に含まれる塩基性タンパク質を分離、同定するとともに、ウシガエル精子核クロマチンの特性を明らかにし、また卵細胞質による体細胞型クロマチンへのリモデリングの誘導を通じてSNBPの精子核凝縮における役割の解明を試みた。

I. 無尾両生類の精子核塩基性タンパク質とクロマチン構造

ウシガエル及び *D. pictus* の成熟精子核から塩基性タンパク質を酸抽出し、酸/尿素/Triton X-100 ポリアクリルアミドゲル電気泳動により体細胞の核タンパク質と比較したところ、前者では体細胞核のコアヒストン群と同じ移動度のタンパク質及び体細胞型のヒストンH1よりもやや移動度の大きい分子からなり、後者はヒストンを含めてこれまでSNBPとして報告されているどのタンパク質とも移動度を異にする7つの成分からなることが分かった。したがって、これらのSNBPはヒキガエル、アフリカツメガエルのいずれとも異なるユニークなものであると言える。ウシガエルのSNBPを逆相クロマトグラフィーで分画後各分画についてアミノ酸組成を調べた結果、体細胞と同一の4種のコアヒストン (ヒストンH2A、H2B、H3、H4) が確認され、そのほかにヒストンH1とアミノ酸組成は類似するがリジンを25%以上含むより強塩基性の特殊なタンパク質が見出された。後者をトリプシンで消化したところ、トリプシン耐性部位を持ち、かつその耐性部位はヒストンH1ファミリーに特徴的なアミノ酸配列を示した。以上から、ウシガエルのSNBPは体細胞型コアヒストンと、リジンに富む精子特異的なヒストンH1からなると結論した。一方、*D. pictus* の

SNBPについても同様にアミノ酸組成を調べたところ、非常に多くのヒスチジンを含む大量のタンパク質とそれより比較的量が少なく塩基性アミノ酸の含量も低い6種類のタンパク質からなることが分かった。これらはどれも既知のタンパク質とは異なっており、さらに詳しい研究が必要であろう。さらに、ウシガエルの精子核についてはコアヒストンが存在することから、通常精子核には無いとされるヌクレオソーム構造を持つことが推測された。そこで精子核クロマチンをマイクロコッカスヌクレアーゼ (micrococcal nuclease, MNase) で消化し核から遊離するDNA断片を電気泳動したところ、ヒキガエルやアフリカツメガエルの精子核クロマチンはMNaseに耐性であるのに対し、約180塩基対の大きさの断片が得られたが、体細胞核クロマチンを消化した際現れる梯子状のパターンは見られなかった。また透過型電子顕微鏡によりクロマチンを観察すると、ウシガエル精子核クロマチンはヌクレオソームを持つが、体細胞核クロマチンとは異なりヌクレオソームが不規則に並んだ構造をしていた。これらのことは、ウシガエルの精子核クロマチンは体細胞のそれに近いが、リンカーヒストンの特性が特異な核凝縮をもたらしていることを示唆している。

II. ヌクレオプラズミンによる精子核クロマチンのリモデリング

受精すると、凝縮した精子核クロマチンは卵内で脱凝縮し、ヌクレオソームが等間隔に並び体細胞型クロマチンにリモデリングされる。最近このリモデリングの過程には、アフリカツメガエルやヒキガエルの卵内に大量に存在する熱耐性の酸性タンパク質、ヌクレオプラズミン (NP) が関与することが報告された。NPによって核クロマチンから除去されることがSNBPの特性であると予想されたので、NPによるSNBPの除去の有無を調べた。

ヒトの精子核を還元剤処理した後にアフリカツメガエルの卵内に注入すると、精子核は脱凝縮して前核を形成することが知られている。その際ヒトの精子核に含まれるプロタミンがどのような振る舞いをするのかを知るために、アフリカツメガエルの卵細胞質 (egg-extract) 中で還元剤処理したヒト精子核をインキュベートしたところ、ヒトプロタミンは核から完全に除去され、代わりに核にコアヒストンと卵割期特異的ヒストンH1 (H1.X) が結合した。精製したアフリカツメガエルのNP中でインキュベートすると、核から除去されてNPと複合体を形成したプロタミンが確認された。この条件にさらにコアヒストンを加えてインキュベートした後核をMNaseで消化すると、梯子状パターンが現れ、ヌクレオソームを含む体細胞型クロマチンが再構築されたことが分かった。同様に、ウシガエル精子核をヒキガエルのegg-extract中でインキュベートしたところ、精子核は脱凝縮しH1.Xが結合したが、精子特異的H1は完全には除去されなかった。このクロマチンをMNaseで消化して遊離したDNA断片を電気泳動したところ、成熟精子核とは異なり約180塩基対を基本単位とした梯子状パターンを示し、精子特異的H1を部分的に持ったままクロマチンが体細胞型へと再構築されたことが確かめられた。また、ウシガエルの精子核を高濃度の精製NP中でインキュベートすると、核の脱凝縮とともに精子特異的H1が選択的に除去されたが、このH1の除去は完全には起こらなかった。NPとSNBPの結合はNPのポリグルタミン酸領域を介すると考えられており、カエルNPにより生物種の違いを越えてヒトプロタミンが完全に除去されたのに対し、ウシガエル精子特異的H1の除去が不完全であったのは、後者の塩基性が比較的弱く前者に比べてNPに対する結合力が小さいためであると思われる。しかし、H1が部分的に除去されてはじめて精子核クロマチンの脱凝縮とリモデリングが誘導されたことは、精子核の凝縮した状態を保つためにはSNBPが不可欠であることを示しており、またSNBPが少なくとも胚の初期発生において部分的にリンカーヒストンとしての役割を持つ可能性があることを示唆している。

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

Nuclear Basic Proteins in Sperm of An Anuran Amphibian, *Rana catesbeiana*: Their Structure and Role in Condensed State of Chromatin

(無尾両生類 *Rana catesbeiana* の精子核塩基性タンパク質の構造及びクロマチン凝縮における役割)

動物の成熟精子核が著しく凝縮しているのは、体細胞核に普遍的なヒストン群を欠きしたがってヌクレオソーム構造をとらないことと共役していると信じられている。しかしこれまで断片的に報告されている精子核塩基性タンパク質 (SNBP) の多様性からみて、典型的な強塩基性核タンパク質であるプロタミンをもつ魚類、哺乳類などの精子核について提唱された上記仮説が一般性をもちうるか否かは検討を要する。伊藤 透提出の学位論文は、無尾両生類 *Rana catesbeiana* のSNBPの組成とクロマチン構造を解明し、さらにこれを体細胞型クロマチンへと転換させる試みを通じて精子核凝縮の仕組みの解析を試みており、以下の諸点から評価される。

まず、申請者はこの動物のSNBPがリジンに富む精子特異的なH1と位置づけられる塩基性タンパク質を除けば体細胞におけるそれと区別のつかないコアヒストン群を含むこと、また平行して行われた同様の解析から他の両生類 *Discoglossus pictus* のSNBPがヒスチジンに富むこれまでに報告のないユニークな塩基性タンパク質を含むことを見出した。これらの発見自体、新しいSNBPの組成を提示したという価値をもつものではあるが、申請者はさらに *R. catesbeiana* 精子のクロマチンがヌクレオソーム構造をもつことを直接証明する電子顕微鏡像を提出している。これらに基づいて提唱されている、おそらくSNBPのリンカーとしての特性のゆえにヌクレオソームコアが不規則な間隔で並びそれが精子に固有の高度の凝縮をもたらすというモデルは、精子核の凝縮の仕組みに一石を投ずるものである。ついで申請者は、精子核の脱凝縮と体細胞型クロマチンへのリモデリングの相関を無細胞系を用いて解析し、典型的なプロタミンのみからなるヒト精子では両者が強い相関を示すこと、ま

たその際ヌクレオプラスミン(NP)によるSNBPの完全な除去が伴うことを証明した。ところが*R. catesbeiana* では、脱凝縮が誘導された精子核であってもNPを非生理的濃度に高めた条件下ですら精子特異的H1は完全には除去されず、むしろ後者を部分的に残したまま完全に体細胞型クロマチンへの転換が起きる得る、という証拠を提出している。この観察は、ここで見出された精子特異的H1が精子クロマチンの凝縮および初期胚におけるリンカーとして、2重の役割をもち得ることを示唆するものとして注目される。

以上の研究成果は、新しいタイプのSNBPを提示するのみならず、それを通じて精子核に固有のクロマチン凝縮機構について新たな提案を含んでおり、精子核クロマチンの研究に重要な貢献をするものである。申請者に対する最終試験は、平成9年6月12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。