

学 位 論 文 題 名

Nucleoplasmin Regulates Nucleosome Assembly and Disassembly

（ヌクレオプラスミンによるヌクレオソーム再構築に関する研究）

学位論文内容の要旨

真核生物の遺伝情報の源である DNA はクロマチンと呼ばれる高次構造の中に折りたたまれている。クロマチンは遺伝情報を安定に保つとともに、発現の制御をおこなっている。ヌクレオソーム構造はクロマチンを形成する最小単位で、2つの H2A と H2B の 2 量体と 1 つの H3 と H4 の 4 量体で構成されるヒストン 8 量体コアのまわりを 146 bp の DNA が左巻きで 1.75 回転巻き付いている。このヌクレオソーム構造は非常に安定した構造をとっており、転写や DNA の複製の際以外は転写因子がヌクレオソーム上の DNA と結合することを抑制する。一方、精子核中の DNA はヌクレオソームとは異なるさらに密な構造を取っており、受精の際にこの構造は変換される。アフリカツメガエルの卵中から精製されたヌクレオプラスミンは、受精時に精子核の凝集構造中の DNA をヌクレオソームへと変化させる分子シャペロン蛋白質である。酸性で熱に安定な蛋白質であるヌクレオプラスミンは塩基性蛋白質であるヒストンと結合することにより、ヌクレオソーム構造を構築するものと考えられている。実際、ポリグルタミン酸などの酸性高分子がヌクレオソーム構造の再構築を促進することが知られているがその詳細な分子機構はよくわかっていない。また最近、ATP 依存性で効率よくヌクレオソーム構造を構築する因子の存在が示されてきており、ヌクレオソーム構造が複数の因子によって複雑な過程を経て構成されることが示唆されてきた。本研究では、ATP を必要としないヌクレオソーム構築因子であるヌクレオプラスミンには、酸性蛋白質であるという他に何か特別な構造や働きを持っているものと考え、ヌクレオソーム構造に対するヌクレオプラスミンの働きを総合的に検討した。

第 1 章では本論文の序論として、これまでの研究や本研究の位置づけを述べた。

第 2 章では、分光学的研究には従来の精製法によって得られるヌクレオプラスミンは微量であるため、一回の精製でヌクレオプラスミンが 1-2 mg 得ることができ効率的に大量の蛋白質を高純度で得られるよう改良した精製法について述べた。また精製されたヌクレオプラスミンが溶液中でどのような構造を取っているかを検討した。これまでの研究で α -ヘリックス構造をもっていると考えられてきたヌクレオプラスミンが生理的条件下では主に β シート構造をとっていることが示唆された。また、トリフルオロエタノール溶液を加え擬似的な疎水的環境とした場合、ヌクレオプラスミンは高度に α -ヘリックス構造をとることがわかった。これらの結果から、ヌクレオプラスミンは α -ヘリックスと β シートという異なる二次構造をとることができ、その働きが構造変化に起因する可能性が示唆された。

第 3 章では、ヌクレオプラスミンとヒストン及び DNA との相互作用を蛍光スペクトルを用いて検討した。その結果、ヌクレオプラスミンはヒストン H2A-H2B 2 量体と特異的に結合することがわかった。そこでさらに、ヒストンをその構成因子にまで分別し同様の検討を

行ったところ、ヌクレオプラスミンは5種類のヒストンに親和性があるが、特にヒストン H2A ともっとも強く結合することが明らかとなった。また、これまで DNA と相互作用をおこなわないとされてきたヌクレオプラスミンであるが、蛍光測定の結果ヒストンに対するものとは異なる形で相互作用をおこなうことがわかった。

第4章では、ヌクレオソーム構造に対するヌクレオプラスミンの働きを、CD スペクトルを用いて検討した。ヌクレオプラスミンがヌクレオソーム中のヒストンに対して等量存在するときヌクレオソーム構造が安定化されることが明らかとなった。ポリグルタミン酸を用いた対照実験でも同様な結果が得られたが、ヌクレオプラスミンの作用に比べるとその働きは弱くヌクレオソームの安定化は酸性度だけに因らないことがわかった。さらに、ヌクレオプラスミンが大量に存在する系での検討を行ったところ、ヌクレオプラスミンはヌクレオソーム構造中のヒストン及び DNA に自由度を持たせることが示唆された。アガロース電気泳動にて DNA の挙動をみたところヌクレオプラスミンが大量に存在する系でのヌクレオソーム中の DNA は DNA 分解酵素によって簡単に断片化されることから、大量のヌクレオプラスミンがヌクレオソーム構造に自由度を与え DNA とヒストンのとの強固な結合をやわらげていることが分かった。また SDS を用いない系での酸性緩衝液系電気泳動と等電点電気泳動では、ヌクレオヒストンからヒストンを押し出すことが観察された。このことから、大量にヌクレオプラスミンがある場合ヌクレオソーム中のヒストンもまた DNA 同様その自由度を増していることがわかった。ポリグルタミン酸を大量に添加した系ではヌクレオヒストンは強いバンドを1つだけ示すのに対し、ヌクレオプラスミンを添加した系ではヌクレオソーム、ヌクレオプラスミンともにそのバンドが弱まるように広がることからお互いが相互作用をしていることが示唆された。これらの結果から、ポリグルタミン酸によるヌクレオソームの安定化は塩基性電荷をもつヒストンに対する単なる凝集と考えられるが、ヌクレオプラスミンはヌクレオソーム構造を安定化させるとともに、ヌクレオソームを構成するヒストン、DNA に自由度を与えていることが明らかとなった。

以上の結果より、ヌクレオプラスミンはヌクレオソーム構造を単に構築させるだけでなく、DNA やヒストンにある程度の自由度を持たせつつ安定したヌクレオソームを作ることが示唆された。これは ATP を用いないでヌクレオソーム構造を構築し、核内に豊富に存在するヌクレオプラスミンが、物理的にヌクレオソームを安定させつつ生体中で起こる様々な反応に対して遺伝情報の源である DNA を活性化している可能性を示唆するものである。この研究は、分子シャペロン蛋白質としてのヌクレオプラスミンの働きを基盤とした DNA の活性化という生体中での根幹をなす反応を解明するための第一歩になると考えられる。また、ヌクレオソーム構造の構築・分解の段階での DNA の制御機構の解明は様々な疾病の原因解明、予防、治療に対して、また生体に関連した環境問題の分子レベルでの解明においても重要な知見を与えるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄

副 査 教 授 坂 入 信 夫

副 査 助 教 授 野 水 基 義

副 査 教 授 田 中 勲 (理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Nucleoplasmin Regulates Nucleosome Assembly and Disassembly

(ヌクレオプラスミンによるヌクレオソーム再構築に関する研究)

真核生物の遺伝情報の源である DNA はクロマチンと呼ばれる高次構造の中に折りたたまれている。クロマチンは遺伝情報を安定に保つとともに、発現の制御をおこなっている。ヌクレオソーム構造はクロマチンを形成する最小単位で、ヒストン H2A, H2B, H3 及び H4 で構成されるヒストン 8 量体コアのまわりを 146 bp の DNA が左巻きで 1.75 回転巻き付いている。このヌクレオソーム構造は非常に安定した構造をとっており、転写や DNA の複製の際以外は転写因子がヌクレオソーム上の DNA と結合することを抑制する。一方、精子核中の DNA はヌクレオソームとは異なるさらに密な構造を取っており、受精の際にこの構造は変換される。アフリカツメガエルの卵中から精製されたヌクレオプラスミンは、受精時に精子核の凝集構造中の DNA をヌクレオソームへと変化させる分子シャペロン蛋白質である。酸性で熱に安定な蛋白質であるヌクレオプラスミンは塩基性蛋白質であるヒストンと結合することにより、ヌクレオソーム構造を構築するものと考えられている。実際、ポリグルタミン酸などの酸性高分子がヌクレオソーム構造の再構築を促進することが知られているがその詳細な分子機構はよくわかっていない。本研究では、ATP を必要としないヌクレオソーム構築因子であるヌクレオプラスミンには、酸性蛋白質であるという他に何か特別な構造や働きを持っているものとの考えのもとにヌクレオソーム構造に対するヌクレオプラスミンの働きを総合的に検討された。

第 1 章では本論文の序論として、これまでの研究や本研究の位置づけが述べられている。

第 2 章では、大量 (mg 規模) のヌクレオプラスミンを高純度で得られるよう改良した精製法について述べられている。またヌクレオプラスミンの溶液中での構造が調べられた。これまでの研究で α -ヘリックス構造をもっていると考えられてきたヌクレオプラスミンが生理的条件下では主に β シート構造をとっていることが示唆された。また、トリフルオロエタノール溶液を加え疎水的環境とした場合、ヌクレオプラスミンは高度に α -ヘリックス構造をとることがわかった。これらの結果から、ヌクレオプラスミンは α -ヘリックスと β シートという異なる二次構造をとることができ、その働きが構造変化に起因する可能性が示唆された。

第 3 章では、ヌクレオプラスミンとヒストン及び DNA との相互作用を蛍光スペクトル

を用いて検討された。その結果、ヌクレオプラスミンはヒストン H2A-H2B 2 量体と特異的に結合することがわかった。そこでさらに、ヒストンをその構成因子にまで分別し同様の検討を行ったところ、ヌクレオプラスミンは5種類のヒストンに親和性があるが、特にヒストン H2A ともっとも強く結合することが明らかとなった。また、これまで DNA と相互作用しないとされてきたヌクレオプラスミンであるが、蛍光測定の結果ヒストンに対するものとは異なる形で相互作用することがわかった。

第4章では、ヌクレオソーム構造に対するヌクレオプラスミンの働きを、CD スペクトルを用いて検討されている。ヌクレオプラスミンがヌクレオソーム中のヒストンに対して等量存在するときヌクレオソーム構造が安定化されることが明らかとなった。ポリグルタミン酸を用いた対照実験でも同様な結果が得られたが、ヌクレオプラスミンの作用に比べるとその働きは弱くヌクレオソームの安定化は酸性度だけに因らないことがわかった。さらに、ヌクレオプラスミンが大量に存在する系での検討を行ったところ、ヌクレオプラスミンはヌクレオソーム構造中のヒストン及び DNA に自由度を持たせることが示唆された。アガロース電気泳動にて DNA の挙動をみたところヌクレオプラスミンが大量に存在する系でのヌクレオソーム中の DNA は DNA 分解酵素によって簡単に断片化されることから、大量のヌクレオプラスミンがヌクレオソーム構造に自由度を与え DNA とヒストンのとの強固な結合をやわらげていることが分かった。また SDS を用いない系での酸性緩衝液系電気泳動と等電点電気泳動では、ヌクレオヒストンからのヒストンを押し出すことが観察された。このことから、大量にヌクレオプラスミンがある場合ヌクレオソーム中のヒストンもまた DNA 同様その自由度を増していることがわかった。ポリグルタミン酸を大量に添加した系ではヌクレオヒストンは強いバンドを1つだけ示すのに対し、ヌクレオプラスミンを添加した系ではヌクレオソーム、ヌクレオプラスミンともにそのバンドが弱まるように広がることからお互いが相互作用をしていることが示唆された。これらの結果から、ポリグルタミン酸によるヌクレオソームの安定化は塩基性電荷をもつヒストンに対する単なる凝集と考えられるが、ヌクレオプラスミンはヌクレオソーム構造を安定化させるとともに、ヌクレオソームを構成するヒストン、DNA に自由度を与えていることが明らかとなった。

以上の結果より、ヌクレオプラスミンはヌクレオソーム構造を単に構築させるだけでなく、DNA やヒストンにある程度の自由度を持たせつつ安定したヌクレオソームを作ることが示唆された。これは ATP を用いないでヌクレオソーム構造を構築し、核内に豊富に存在するヌクレオプラスミンが、物理的にヌクレオソームを安定させつつ生体中で起こる様々な反応に対して遺伝情報の源である DNA を活性化している可能性を示唆するものである。この研究は、分子シャペロン蛋白質としてのヌクレオプラスミンの働きを基盤とした DNA の活性化という生体中での根幹をなす反応を解明するための第一歩になると考えられる。また、ヌクレオソーム構造の構築・分解の段階での DNA の制御機構の解明は様々な疾病の原因解明、予防、治療に対して、また生体に関連した環境問題の分子レベルでの解明においても重要な知見を与えるものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。