

学 位 論 文 題 名

Chromatin condensation and histone proteins
in the gametes of some brown algae

(褐藻植物数種における配偶子のクロマチン凝縮と
ヒストンタンパク質について)

学位論文内容の要旨

褐藻植物には同形配偶子接合、異形配偶子接合、卵生殖の3種類の有性生殖のパターンが見られる。蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いた研究では、同形・異形配偶子接合の雌雄配偶子と、卵生殖の精子では核のクロマチン凝縮の程度に大きな違いが観察される。同形配偶子接合では核の大きさ、クロマチン凝縮の程度は雄性配偶子核と雌性配偶子核で同じである。異形配偶子接合では、雌性配偶子核と比べ雄性配偶子核は小型化し、クロマチン凝縮の程度は強くなる。卵生殖では、雄性配偶子核(精子核)のクロマチン凝縮の程度はさらに進み、ヒバマタ目植物の精子は核の変形を伴った著しいクロマチン凝縮が観察される。動物の精子では、精子核のクロマチン凝縮に関連し、核内塩基性タンパク質が体細胞型ヒストンタンパク質から精子核特異的なプロタミンやプロタミン様タンパク質に変化することが報告されている。褐藻植物ではヒストンタンパク質を始めとする核内塩基性タンパク質、及び精子核のクロマチン凝縮機構についての研究は行なわれていない。本研究では褐藻植物の精子核の形態変化とクロマチン凝縮機構を解明するため、精子核のクロマチン凝縮過程の観察と褐藻植物数種を対象としたヒストンタンパク質の生化学的な解析を行なった。

第一章では、ヒバマタ目植物ウガノモクの精子形成過程を精子核の変形とクロマチン凝縮に焦点をあて蛍光顕微鏡と電子顕微鏡による観察を行なった。ウガノモクの精子形成過程では減数分裂終了後、4回の核分裂が起こり造精器内に64個の核が形成される。造精器内に形成された64個の球形の核はクロマチン凝縮を伴いながら最終的にわん曲した細長い核に変形する。精子形成過程における核の大きさを計測すると、精子核の大きさは精子母細胞核の10分の1以下であること、核の大きさの減少は64核形成までの核分裂を伴った大きさの減少と、核分裂終了後の球形の核が細長い核に変形することによる減少の2つの過程からなることが示された。精子核のクロマチン凝縮は球形の核の核膜周辺部分から開始される。クロマチン凝縮の進行と共に核膜周辺部にクロマチンの顕著な偏在が見られるようになり、核の中央部分にクロマチンをほとんど含まない部分が形成される。その後、核中央のクロマチンをほとんど含まない部分が押し潰されるように核の変形が起こり均一に凝縮したクロマチンから成る細長い核が形成される。これらのことから、核膜周辺部分でおこる局所的なクロマチン凝縮が精子核の形態変化の要因であることが示唆された。またウガノモクの精子核変形過程においては、動物や植物で報告されているような精子核

の変形に関与する微小管束は認められなかった。

第二章では、褐藻植物数種におけるクロマチン凝縮と核内塩基性タンパク質の関係を調べるため同形配偶子接合を行うワタモ、マツモ、異形配偶子接合を行うムチモの雌雄配偶子核、卵生殖を行うウガノモク、フシスジモクの精子核のヌクレオソーム構造解析と核内塩基性タンパク質の同定と比較を行なった。マイクロコッカルヌクレアーゼを用いたワタモ、マツモ配偶子核、ウガノモク精子核のヌクレオソームの単位 DNA 長の測定では、配偶子核と精子核でクロマチン凝縮に顕著な違いが見られるにも関わらず、ヌクレオソームの単位 DNA 長はワタモ、マツモ、ウガノモクの3種とも約 200 塩基対であることが示された。このことは、ウガノモク精子核のクロマチン凝縮はヌクレオソーム構造の消失や変化により引き起こされるものではないことを示している。次に配偶子（精子）から核内塩基性タンパク質を抽出し、一次元電気泳動（SDS-PAGE）を行った。褐藻植物配偶子の核内塩基性タンパク質は同形配偶子接合のマツモ、ワタモ、異形配偶子接合のムチモの雌雄配偶子核だけでなく、卵生殖のウガノモク、フシスジモクの精子核もヒストンタンパク質で構成されており、多くの動物やシダ、コケ植物、車軸藻類の精子核で特異的に見らるプロタミンやプロタミン様タンパク質は含まないことが示された。また同形・異形配偶子接合のそれぞれの種内においては、雄性配偶子と雌性配偶子でヒストンタンパク質の違いは見られなかった。

さらにヒストンタンパク質のより詳細な同定を行うため、二次元電気泳動法（AUT-PAGE 及び SDS-PAGE）で分離したヒストンタンパク質について、アミノ酸配列分析、V8 プロテアーゼを用いたペプチドマッピングを行なった。その結果、褐藻植物配偶子核（精子核）はヒストン H1 とコアヒストン H2A, H2B, H3, H4 に加え、H2A と H3 の副成分を含んでいること、コアヒストンタンパク質の N 末端アミノ酸配列は、種をこえて高い保存性が知られているヒストン H3 だけでなく、変異が多い H2B でもほとんど違いが見られないことが明らかになった。ヒストンタンパク質の同定結果をもとにした、ワタモ、マツモ、ムチモの雌雄配偶子核とウガノモク、フシスジモクの精子核のヒストンタンパク質の比較により、コアヒストンは同形・異形配偶子接合の雌雄配偶子核と卵生殖の精子核の間で相違は見られないが、ヌクレオソームの高次構造形成に関与すると考えられているヒストン H1 は、ウガノモク、フシスジモクの精子核と、マツモ、ワタモ、ムチモの雌雄配偶子核では、分子量等で大きく異なっていることが示された。また、精子核に含まれるヒストン H1 は、リン酸化やメチル化等の修飾を受けている可能性が示唆された。

第三章では精子核のヒストン H1 とクロマチン凝縮の関係をさらに明確にするため、ワタモ、フシスジモクの体細胞核のヒストンタンパク質とそれぞれの配偶子核、精子核のヒストンタンパク質の比較を行なった。その結果、同形配偶子接合のワタモのヒストン H1 は体細胞と配偶子核で違いは見られないが、フシスジモクの精子核に含まれるヒストン H1 はその種類数や分子量で体細胞のそれと異なっていることが示された。

本研究では初めて褐藻植物のヌクレオソーム構造とヒストンタンパク質を明らかにすると共に、同形・異形配偶子接合の配偶子核とは異なり、卵生殖を行うヒバマタ目植物の精子は精子核特異的なヒストン H1 を含むことが示された。そのため精子核の顕著なクロマチン凝縮は精子核特異的なヒストン H1 により誘発されると考えられる。加えて、精子核のクロマチン凝縮は、核の変形を誘発する役割もになっていることが示唆された。現在までの動物を用いた研究で、ヒストン H1 の分化がクロマチン凝縮に関与することが報告されてきた。系統的に大きく異なった、褐藻植物において精子核特異的なヒストン H1 が見

みられたことは、精子核のクロマチン凝縮に関連した核内塩基性タンパク質の収斂進化を示すものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 村 泰 三
副 査 教 授 市 村 輝 宜
副 査 教 授 増 田 道 夫
副 査 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Chromatin condensation and histone proteins in the gametes of some brown algae

(褐藻植物数種における配偶子のクロマチン凝縮と
ヒストンタンパク質について)

動物あるいは陸上植物の有性生殖は卵と精子による卵生殖によって行われるのに対して、褐藻植物では同形配偶子接合、異形配偶子接合、卵生殖の3種類の有性生殖パターンが観察できる。本論文は褐藻植物という同一系統群においてこれら有性生殖での雄性配偶子核のクロマチン凝縮の程度に着目し、核内塩基性タンパク質であるヒストンについて生化学的に解析するとともに、蛍光顕微鏡さらには電子顕微鏡を用いた核の形態学的な観察も詳細に行った。

まずヒバマタ目植物ウガノモクの精子形成過程を精子核の変形とクロマチン凝縮に焦点をあて蛍光顕微鏡と電子顕微鏡による観察を行った。ウガノモクの精子形成過程では減数分裂終了後、4回の核分裂が起こり64個の核が形成される。その後、球形の核はクロマチン凝縮を伴いながら最終的にわん曲した細長い核に変形する。精子形成過程における核の大きさを計測すると、精子核の大きさは精子母細胞核の10分の1以下であり、核の大きさの減少は64核形成までの核分裂を伴った大きさの減少と、核分裂終了後の核の変形による減少の2つの過程からなることが示された。またウガノモクの精子核変形過程においては、動物や植物で報告されているような精子核の変形に関与する微小管束は認められなかった。

さらに褐藻植物数種におけるクロマチン凝縮と核内塩基性タンパク質の関係を調べるため、同形配偶子接合を行うワタモ、マツモ、異形配偶子接合を行うムチモの雌雄配偶子核、卵生殖を行うウガノモク、フシスジモク精子核のヌクレオソーム構造の解析とヒストンタンパク質の同定と比較を行った。その結果、すべての種類の配偶子核においてクロマチンは単位DNA長約200塩基対のヌクレオソーム構造をとることが明らかになった。すなわち、褐藻植物におけるクロマチン凝縮はヌクレオソーム構造の消失や変化により引き起こされるものではないことが示された。また多くの動物やシダ、コケ植物、車軸藻類の精子核で特異的に見られるプロタミンやプロタミン様タンパク質は含まれないことも示された。

ヒストンタンパク質のより詳細な同定のため、二次元電気泳動法 (AUT-PAGE 及び SDS-PAGE) で分離したヒストンタンパク質について、アミノ酸配列分析、V8 プロテアーゼを用いたペプチドマッピングを行った。その結果、褐藻植物配偶子核 (精子核) はヒストン H1 とコアヒストン H2A, H2B, H3, H4 に加え、H2A と H3 の副成分を含んでいること、コアヒストンタンパク質の N 末端アミノ酸配列は、種をこえて高い保存性が知られているヒストン H3 だけでなく、変異が多い H2B でもほとんど違いが見られないことが明らかになった。これをもとに、同形・異形配偶子接合のワタモ、マツモ、ムチモの雌雄配偶子核と卵生殖のウガノモク、フシスジモクの精子核のヒストンタンパク質を比較することにより、これら配偶子間ではコアヒストンにおいて相違は見られないが、ヒストン H1 は分子量等で大きく異なっていることが示された。また、精子核に含まれるヒストン H1 は、リン酸化やメチル化等の修飾を受けている可能性が示唆された。

最後に、精子核のヒストン H1 とクロマチン凝縮の関係をさらに明確にするため、ワタモ、フシスジモクの体細胞核のヒストンタンパク質とそれぞれの配偶子核、精子核のヒストンタンパク質の比較を行なった。その結果、同形配偶子接合のワタモのヒストン H1 は体細胞と配偶子核で違いは見られないが、フシスジモクの精子核に含まれるヒストン H1 はその種類数や分子量で体細胞のそれと異なっていることが示された。

これを要するに、著者は、褐藻植物配偶子核においてヒストンタンパク質とヌクレオソーム構造についてはじめて明らかにすると共に、卵生殖を行うヒバマタ目植物の精子においては精子核特異的なヒストン H1 により、精子核の顕著なクロマチン凝縮が誘発される可能性を明確に示したものであり、生物学、特に藻類の生殖進化の問題に貢献するところは大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。