

学位論文題名

Studies on purification and characterization  
of nucleoplasmin-related proteins from fish eggs  
and echinoderm ovaries

（魚類卵及び棘皮動物卵巣に含まれるヌクレオプラスミン関連タンパク質  
の精製と性質に関する研究）

学位論文内容の要旨

真核生物においてクロマチンは、ヌクレオソームと呼ばれるヒストン 8 量体（ヒストン H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ 2 分子）の周りに DNA が約 200 bp 巻き付いた構造からなっている。クロマチンの凝縮、脱凝縮の構造変化は遺伝子の発現や複製に関与していることが報告されており、脱凝縮の最初のステップにおいてヌクレオプラスミンと呼ばれる分子シャペロンが関与していることが明らかとなってきた。また、アフリカツメガエル成熟未受精卵の抽出液からヌクレオプラスミンを免疫除去したものでは、脱凝縮活性が低下することからこのタンパク質は卵抽出液中において脱凝縮に深く関与している因子であることが示された。

アフリカツメガエルの成熟未受精卵から単離されたヌクレオプラスミンは、熱に安定な 5 量体で存在している。このタンパク質の一次構造は 2 つの異なった cDNA から決定され、200 アミノ酸残基数から成ることが報告された。また、このタンパク質は C 末端に Glu が局在した配列を有し、ヌクレオソーム構造の再構築を促進する活性と精子核脱凝縮活性を有することも報告されている。アフリカツメガエル由来のヌクレオプラスミンは両生類のみならず、ヒト、軟体動物（イガイ）、魚類（サケ）の精子核をそれぞれ脱凝縮することが報告されており、ヌクレオプラスミンと同様に精子核脱凝縮活性を有するタンパク質が広く生物種に分布していることが示唆されている。そこで本研究では、これまで報告がなかった魚類（コイ *Cyprinus carpio*）成熟未受精卵からヌクレオプラスミン様タンパク質を単離・精製し、既に単離されているアフリカツメガエルのヌクレオプラスミンと比較検討することを第一の目的とした。また棘皮動物（エゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius*）卵巣中にアフリカツメガエル・ヌクレオプラスミンに対する抗血清で反応するヌクレオプラスミン関連タンパク質を見出し、そのタンパク質の構造と機能を明らかにすることを第二の目的とした。

コイ・ヌクレオプラスミン様タンパク質の精製は、コイ成熟未受精卵 (50 g) の可溶化画分を 55% の飽和硫酸で分画した後、イオン交換とゲルろ過のカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE で単一バンドとなるまで行った。この精製により約 2 mg のヌクレオプラスミン様タンパク質が単離された。このタンパク質はアフリカツメガエル・ヌクレオプラスミンに対する抗血清により認識され、オリゴマーで存在していることが HPLC を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーで示された。また部分アミノ酸配列を調べたところ、アフリカツメガエル・ヌクレオプラスミン同様、C 末端に Glu がつながった酸性領域を有し、リン酸化修飾を受けていることがアルカリフォスファターゼ処理により確認された。さらにサケ精子核を脱凝縮する活性を有していることが明らかとなった。以上の結果から単離されたヌクレオプラスミン様タンパク質はコイの成熟未受精卵中において受精や遺伝子の発現などの生命現象に重要な役割を果たしているものと考えられる。

一方、棘皮動物 (エゾバフンウニ) 卵巣の抽出液を調製し、アフリカツメガエル・ヌクレオプラスミンに対する抗血清を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、分子量 33 kDa のバンドが検出され、ウニ卵巣中にヌクレオプラスミン関連タンパク質が存在することが明らかとなった。そこでこのタンパク質の精製を試み、55% の飽和硫酸で分画した後、疎水性カラムとゲルろ過のカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE で単一バンドとなるまで精製した。この精製法により 25 g のウニ卵巣から 1.2 mg のタンパク質が精製された。33 kDa タンパク質は糖鎖修飾を受けていないことが glycopeptidase 消化により示唆された。また部分アミノ酸配列を調べたところ、neuronal cell adhesion molecule として見出された fasciclin I のファミリーのタンパク質と高い相同性を示した。決定されたアミノ酸配列中には、細胞と相互作用すると推定される配列 (Val-Asp-Leu と Leu-Arg-Glu) が検出されたため、ヒト線維芽肉腫細胞 (HT1080) を用いて細胞接着実験を行った。その結果 33 kDa タンパク質は細胞接着活性を有し、濃度依存的に細胞の接着を促進することが明らかとなった。また、EDTA とヘパリンを用いた細胞接着の阻害活性を調べたところ、EDTA では阻害を受けずヘパリンで細胞接着が阻害されることが明らかとなった。この結果から、このタンパク質の細胞接着活性にはヘパリンが重要な役割を果たしていることが示唆された。また推定される細胞接着ドメインを含む Gly17-Leu39 のペプチドを合成しその細胞接着活性を調べたところ強い接着活性を示し、その活性はヘパリンで阻害されることが明らかとなった。さらにこのペプチドにより 33 kDa タンパク質の細胞接着活性が阻害されたことから Gly17-Leu39 の領域が活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の結果から本研究により単離された 33 kDa のウニ・ヌクレオプラスミン関連タンパク質は細胞接着を介して卵巣内において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

# 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 教 授 荒 木 義 雄  
副 査 助 教 授 野 水 基 義

学 位 論 文 題 名

## Studies on purification and characterization of nucleoplasmin-related proteins from fish eggs and echinoderm ovaries

(魚類卵及び棘皮動物卵巣に含まれるヌクレオプラスミン関連タンパク質  
の精製と性質に関する研究)

真核生物においてクロマチンは、ヌクレオソームと呼ばれるヒストン 8 量体の周りに DNA が約 200 bp 巻き付いた構造からなっている。クロマチンの凝縮、脱凝縮の構造変化は遺伝子の発現や複製に関与していることが報告されており、脱凝縮の最初のステップにおいてヌクレオプラスミンと呼ばれる分子シャペロンが関与していることが明らかとなってきた。また、アフリカツメガエル成熟未受精卵の抽出液からヌクレオプラスミンを免疫除去したものでは、脱凝縮活性が低下することからこのタンパク質は卵抽出液中において脱凝縮に深く関与している因子であることが示された。

アフリカツメガエルの成熟未受精卵から単離されたヌクレオプラスミンは、熱に安定な 5 量体で存在している。このタンパク質の一次構造は 200 アミノ酸残基数から成ることが報告された。また、このタンパク質は C 末端に Glu が局在した配列を有し、ヌクレオソーム構造の再構築を促進する活性と精子核脱凝縮活性を有することも報告されている。アフリカツメガエル由来のヌクレオプラスミンは両生類のみならず、ヒト、軟体動物 (イガイ)、魚類 (サケ) の精子核をそれぞれ脱凝縮することが報告されており、ヌクレオプラスミンと同様に精子核脱凝縮活性を有するタンパク質が広く生物種に分布していることが示唆されている。そこで本研究では、これまで報告がなかった魚類 (コイ) 成熟未受精卵からヌクレオプラスミン様タンパク質を単離・精製し、既に単離されているアフリカツメガエルのヌクレオプラスミンと比較検討することを第一の目的とした。また棘皮動物 (エゾバフンウニ) 卵巣中にアフリカツメガエル・ヌクレオプラスミンに対する抗血清で反応するヌクレオプラスミン関連タンパク質を見出し、そのタンパク質の構造と機能を明らかにすることを第二の目的とした。

コイ・ヌクレオプラスミン様タンパク質の精製は、コイ成熟未受精卵の可溶化画分を55%の飽和硫酸で分画した後、イオン交換とゲルろ過のカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE で単一バンドとなるまで行った。このタンパク質はアフリカツメガエル・ヌクレオプラスミンに対する抗血清により認識され、オリゴマーで存在していることが HPLC を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーで示された。また部分アミノ酸配列を調べたところ、アフリカツメガエル・ヌクレオプラスミン同様、C 末端に Glu がつながった酸性領域を有し、リン酸化修飾を受けていることが確認された。さらにサケ精子核を脱凝縮する活性を有していることが明らかとなった。以上の結果から単離されたヌクレオプラスミン様タンパク質はコイの成熟未受精卵中において受精や遺伝子の発現などの生命現象に重要な役割を果たしているものと考えられる。

一方、棘皮動物（エゾバフンウニ） 卵巣の抽出液を調製し、アフリカツメガエル・ヌクレオプラスミンに対する抗血清を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、分子量 33 kDa のバンドが検出され、ウニ卵巣中にヌクレオプラスミン関連タンパク質が存在することが明らかとなった。そこでこのタンパク質の精製を試み、55%の飽和硫酸で分画した後、疎水性カラムとゲルろ過のカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE で単一バンドとなるまで精製した。33 kDa タンパク質は糖鎖修飾を受けていないことが示唆された。また部分アミノ酸配列を調べたところ、neuronal cell adhesion molecule として見出された fasciclin I のファミリーのタンパク質と高い相同性を示した。決定されたアミノ酸配列中には、細胞と相互作用すると推定される配列 (Val-Asp-Leu と Leu-Arg-Glu) が検出されたため、ヒト線維芽肉腫細胞 (HT1080) を用いて細胞接着実験を行った。その結果 33 kDa タンパク質は細胞接着活性を有し、濃度依存的に細胞の接着を促進することが明らかとなった。また、EDTA とヘパリンを用いた細胞接着の阻害活性を調べたところ、EDTA では阻害を受けずヘパリンで細胞接着が阻害されることが明らかとなった。この結果から、このタンパク質の細胞接着活性にはヘパリンが重要な役割を果たしていることが示唆された。また推定される細胞接着ドメインを含む Gly17-Leu39 のペプチドを合成しその細胞接着活性を調べたところ強い接着活性を示し、その活性はヘパリンで阻害されることが明らかとなった。さらにこのペプチドにより 33 kDa タンパク質の細胞接着活性が阻害されたことから Gly17-Leu39 の領域が活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の結果から本研究により単離された 33 kDa のウニ・ヌクレオプラスミン関連タンパク質は細胞接着を介して卵巣内において重要な役割を果たしている重要で興味深い可能性が示唆された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過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。