- [241] -

氏名(本籍) 宮城布明(岡山県)

学位の種類 博士(理学)

学位記番号 博 乙 第 1,174 号

学位授与年月日 平成8年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

審查研究科 生物科学研究科

学位論文題目 Studies on Structural Changes in Chromatin Associated to Nitrogenous Ion

Conditions in Heterosiama akashiwo

(Heterosigma akashiwo における窒素イオン環境に伴うクロマチン構造の変化に関する研究)

主 査 筑波大学教授 理学博士 藤 伊 正

副 査 筑波大学教授 理学博士 猪 川 倫 好

副 査 筑波大学教授 理学博士 鎌 田 博

副 查 筑波大学教授 理学博士 平 林 民 雄

論 文 の 要 旨

本論文では外界の窒素イオン環境に対する植物細胞の応答の一端を明らかにすることを目的として、単細胞性の藻類、海産ラフィド藻 Heterosigma akashiwo を用い、窒素源として硝酸またはアンモニアを用いて培養した時の細胞内での反応の解析を行っている。

まずはじめに H. akasiwo を硝酸またはアンモニアを単独窒素源として用いた時に生育速度や窒素源の取り込み速度に差がないことを確認している。そこでシリカマイクロビーズ法によりこれらの細胞の細胞分画を行い,硝酸を用いた場合にのみ細胞画分に分子量26~kDa のタンパク質が存在することを検出した。さらに,このタンパク質は N 末端アミノ酸シークエンスの比較から H1 ヒストンであること,また,アンモニアで培養した細胞では細胞膜画分中に H1 ヒストンが検出されないことを明らかにした。このことから H1 ヒストンの存在様式が窒素源によって変化する,即ち窒素源の違いに対応して H1 ヒストンあるいは核の状態が変化すると考え,単離核を用いさらに解析を行っている。

単離核あるいは単離クロマチンを 2 価カチオンのキレーターである EDTA を含む溶液に懸濁した時に,アンモニアを窒素源とした細胞の核(NH4核)においてのみ H1 ヒストンが可溶化し,先に予想したとおり H1 ヒストンあるいは核の状態が窒素源の違いによって変化していることを確認している。また,窒素源を変えてからの経時的な観察により,この現象が何らかの代謝変動を経て起こるものであることを明らかにした。

次に窒素源の違いに依存して生じる核内での変化について具体的にどのようなものか,幾つかの検討を行っている。まず二次元電気泳動によるヒストン分子の挙動の違いの原因となるようなヒストン分子の修飾や分子種の違いはないことを示した。次いでクロマチンのヌクレオソーム構造に異常をきたしている可能性について両核をmicrococcal muclease で部分切断し,ヌクレオソームサイズを比較し,クロマチンのヌクレオソーム構造に違いがないことを示した。さらに,EDTA による H1 ヒストンの可溶化がスペルミンまたは KC 1 によって抑えられることから, NH_4 核のクロマチン構造が弛緩した状態にあると推論している。 $DNase\ I$, $DNase\ II$,micrococcal nuclease 等の酵素に対する感受性は NH_4 核の方が高く,S1 nuclease を用いた場合には差が見られなかったことから, NH_4 核ではクロマチン全体にわたって弛緩していることを明らかにしている。

さらにクロマチンの構造変化に関わることが知られている既知の生体物質について本現象に関与しているかど

うか検討している。ポリアミンは液体クロマトグラフィーにより分離定量し、HMG 蛋白質は生化学的特性により単離核より抽出し、ヌクレオプラスミンは数種の抗体を用い検出を試みているが、いずれの分子も窒素源の違いによる変化は確認されなかった。しかしながら、クロマチン画分の分子量30 kD 以上の非ヒストン蛋白質がNH4核で顕著に増加していることを確認し、このことが窒素源の違いに依存したヒストン分子の挙動やクロマチン構造の変化の原因となっているであろうと結論している。

従来窒素源を硝酸あるいはアンモニアとした時に生じる細胞内の変化としては窒素および炭素の代謝系や葉緑体での光合成機能の変動等が知られていたが、本研究において新たにクロマチン構造にも変化が生じることを明らかにした。本研究で得られた結果をもとに(1)核のクロマチンを外界のイオン組成に伴い変化した細胞内環境に適した構造にし、スムーズな機能発現を維持する、(2)クロマチン構造を全体的に変化させ、窒素源変化に伴い必要となる遺伝子発現の変化を効率よく行う等、細胞のイオン環境変化への適応に寄与しているという可能性を提唱している。

審査の要旨

これまで窒素源の変動に対する反応としては窒素代謝に関わる代謝系の産物や酵素の発現レベルの変動のみが知られていたが、本研究は窒素代謝に直接関わっていない核内においてもクロマチン構造に変化が生じるということを新たに示している。また、核やクロマチンの構造に関しては、これまでの個々の狭い領域に関して構造と機能に関する研究が進められてきており、核全体にわたるクロマチン構造の変化について詳細に観察した報告はない。本研究は窒素源の変化に伴い生育に影響を与えることなくクロマチン構造が広い領域にわたり変化し得ることを示した重要なものである。さらに、イオン環境の変化に適応すべくクロマチン構造全体を変化させ機能しているという、核(クロマチン)構造と機能に関して全く新しい可能性を提唱しており、高く評価される。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。