

非ヒストン蛋白質および H1 ヒストン除去の クロマチンの鋳型活性とヌクレアーゼ 消化性への影響

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部（指導：小田琢三教授）

入 澤 實・池 田 正 五

小 田 琢 三

（昭和57年3月29日受稿）

Key words：クロマチン，RNA ポリメラーゼ，
ヌクレアーゼ

緒 言

真核細胞のクロマチンは、DNA、ヒストン、非ヒストン蛋白質の複合体であり、その基本構造は、4種のヒストン（H2A, H2B, H3, H4）の各2分子が会合した8量体（ヒストンコア）にDNAが約1.75回巻きついたヌクレオソームコアが連結DNAで数珠玉状に連なったヌクレオソーム構造の繰り返しであることが知られている¹⁾。またH1ヒストンはヌクレオソーム間の連結DNAに、クロマチンを折りたたむようにしていると考えられている^{2,3)}。非ヒストン蛋白質の分子種は数百にも及び、生物種や細胞分化の過程で特異的な変化を示すことからDNAやRNA合成の調節の主役をなすと考えられている⁴⁻⁶⁾。ヒストンと非ヒストン蛋白質を選択的に核またはクロマチンから除去することによるクロマチンの形態変化の電顕観察⁷⁾、転写鋳型活性への影響^{5,6,8,9)}、micrococcal nuclease 消化への影響¹⁰⁻¹²⁾を研究することにより、ヒストン、非ヒストン蛋白質の機能の研究がされている。特にH1ヒストン除去によるクロマチンの構造と機能の変化の研究がよく行なわれている。これらの研究でH1除去の転写活性に与える影響については、促進的に働くとする報告^{6,9)}とH1除去では影響なくクロマチンにH1を添加することにより転写活性を抑制できるとする報告⁸⁾とがある。またH1除去のmicrococcal nucle-

aseによるクロマチンDNAの消化に与える影響についても、消化DNA断片の大きさに変化があるという報告¹⁰⁾とDNA断片の大きさに変化はなく、単にヌクレアーゼ感受性が高まるだけであるとする報告^{11,12)}とがある。本研究は、塩（NaCl）処理によりクロマチンからH1ヒストン、非ヒストン蛋白質を除去し、それによるクロマチン構造と機能の変化を転写鋳型活性とmicrococcal nuclease 消化性の面から研究した。

材 料 と 方 法

1) 核の分離

核は Ehrlich 腹水癌細胞より Hershey らの方法¹³⁾に従って、10mM Tris-HCl (pH 7.8), 4 mM MgCl₂, 1mM EDTA 中で Dounce ホモゲナイザーで細胞を破壊して分離した。

2) ヒストン H1 の調製

H1ヒストンは、腹水癌細胞の核より Johns の方法¹⁴⁾によって調製した。

3) クロマチンの調製

クロマチンは、核より Zubay らの方法¹⁵⁾を一部改良して4°Cにおいて次の如く調製した。すなわち核約30gを80mlの10mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.14M NaCl, 10mM EDTA, 0.5mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 中で日立 VA-10P ブレンダーで2分間ホモゲナイズし、2,000×g, 5分間遠心した。沈渣をさら

に2回同様の操作を行ない、最終の沈渣を80mlの5mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5mM PMSFに懸濁し、2ℓの同溶液に一晩透析した。透析後ブレンダーにて5分間ホモゲナイズし、10,000×g, 30分間遠心し、その上清を粗クロマチン標品と仮称する。

4) 粗クロマチンのNaCl処理

粗クロマチン溶液からある種の蛋白質を除くために、クロマチン溶液を攪拌しながら、固形NaClを終濃度がそれぞれ0.15M, 0.35M, 0.6Mになるように加え、さらに30分間攪拌した。解離した蛋白質とクロマチンを分離するため、日立RPS-25-2A用チューブに5mlの60%蔗糖, 5mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5mM PMSFを入れ、その上に15mlの15%蔗糖, 5mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5mM PMSFにそれぞれ0.15M, 0.35M, 0.6M NaClを含む溶液をのせ、さらに先に調製した試料の0.15M, 0.35M, 0.6M溶液を等しいNaCl濃度の蔗糖液の上に重層し、74,000×g, 18時間遠心し、60%蔗糖画分を分取、2ℓの5mM Tris-HCl (pH 7.8)に対して透析した。透析後テフロンホモゲナイザーにてホモゲナイズし、10,000×g, 30分間遠心し、その上清を以後の実験に用いた。

5) DNAと蛋白質の定量

クロマチンのDNAはジフェニルアミン法¹⁶⁾によって測定した。クロマチンの蛋白含量は牛血清アルブミンを標準としてLowryらの方法¹⁷⁾によって測定した。

6) クロマチン蛋白のゲル電気泳動

全蛋白質はLaemmli¹⁸⁾による15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。

7) NaCl処理クロマチンの鑄型活性測定

クロマチンの鑄型活性は、DNAとして3.6μgを含む0.15M, 0.35M, 0.60M NaCl処理クロマチン及び0.60M NaCl処理クロマチンに0.4μgのH1ヒストンを加えた4種の溶液を37°C, 10分間前処理した後、終濃度が50mM Tris-HCl (pH 7.8), 5mM MgCl₂, 0.1mM dithiothreitol (DTT), 0.2mM ATP, 0.2mM CTP, 0.2mM GTP, 0.02mM [³H] UTP (2μCi), 1単位の大腸菌RNAポリメラーゼ (Miles Lab.)となるようにした0.25mlの反応液を用いてHidaka

らの方法¹⁹⁾によって測定した。

8) ヌクレアーゼ消化

クロマチンDNAのヌクレアーゼ感受性の測定は次のように行なった。DNAとして9.0μgを含む0.15M, 0.35M, 0.60M NaCl処理クロマチン及び0.60M NaCl処理クロマチンにH1 2.0μgを加えた4種のクロマチン溶液を37°C, 10分間前処理した後、終濃度が20mM Tris-HCl (pH 7.8), 2mM CaCl₂, 4単位のmicrococcal nuclease (Worthington Biochemical Corp.)となるようにした反応液0.25mlを37°Cで所定の時間DNAを消化させた後、等量の氷冷20% TCAを加え、さらに2mlの10% TCAを加えて、2,000×g, 1時間遠心し、沈渣を4mlの10% TCAで2回遠心洗浄し、酸不溶性画分に回収されたDNAをジフェニルアミン法により定量した。またヌクレアーゼ消化パターンの差異を観察するために別の試験管にて前述の反応を行ない、等量の20mM EDTA, 1% SDSを加え反応を停止した。それからMarmur法²⁰⁾でDNAを抽出した。ヌクレアーゼで消化されたDNA断片は、40mM Tris-HCl (pH 7.8), 20mM 酢酸ナトリウム, 2mM EDTAを含む6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

実験結果

1) 塩処理クロマチンの性状

0.15M, 0.35M, 0.6M NaClで処理したクロマチンの蛋白質/DNAの重量比は、それぞれ1.70, 1.65, 1.49で、処理するNaCl濃度が高い程クロマチンから多くの蛋白質が解離した。クロマチンを0.35M NaClで処理することにより、一部非ヒストン蛋白質とわずかのH1ヒストンが解離抽出され、0.6M NaCl処理では、クロマチンから、かなりの非ヒストン蛋白質が抽出されるとともにH1ヒストンが完全に抽出除去された(図1)。またH2A, H2B, H3, H4ヒストンは、これらの塩処理でほとんど抽出されなかった(図1)。

2) 塩処理クロマチンの転写活性

H1ヒストンのほとんどはずれていない0.35M NaCl処理クロマチン, 0.6M NaCl処理H1除

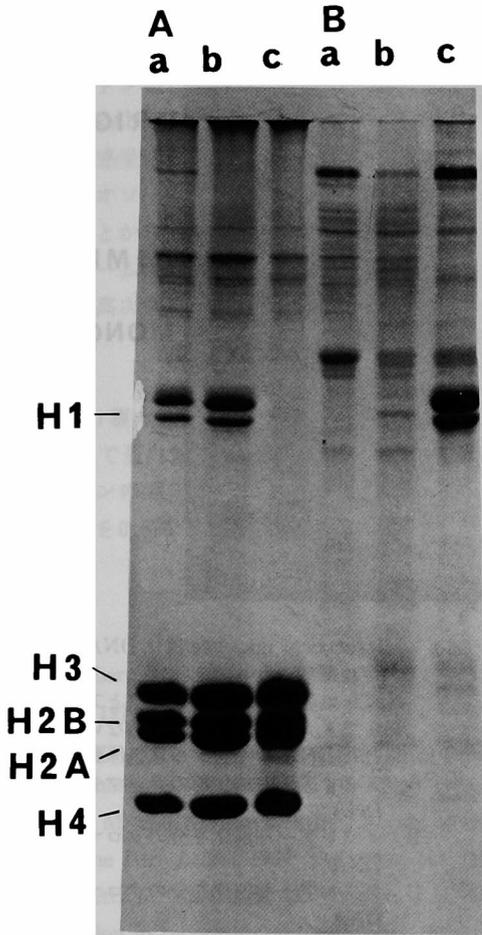


図1 塩処理クロマチンの蛋白ゲル電気泳動蛋白質の解析は材料と方法に従って行なった。
 A. 60%蔗糖分画に回収されたクロマチン蛋白質
 B. 重層した塩処理クロマチン層に残った蛋白質
 a. 0.15 NaCl処理 b. 0.35M NaCl処理
 c. 0.60M NaCl処理

去クロマチン、精製二本鎖 DNA の鋳型活性は、0.15M NaCl 処理クロマチンのそれに対して、それぞれ約 2 倍、2.5 倍、3.7 倍となった(図 2)。また H1 除去クロマチンに H1 ヒストンを H1 ヒストン/DNA 重量比 0.11 で加え、材料と方法に述べているようにして調製した再構成クロマチンの鋳型活性は、0.6M NaCl 処理 H1 除去クロマチンのそれより低かった(図 2)。
 3) 塩処理クロマチンのヌクレアーゼ消化

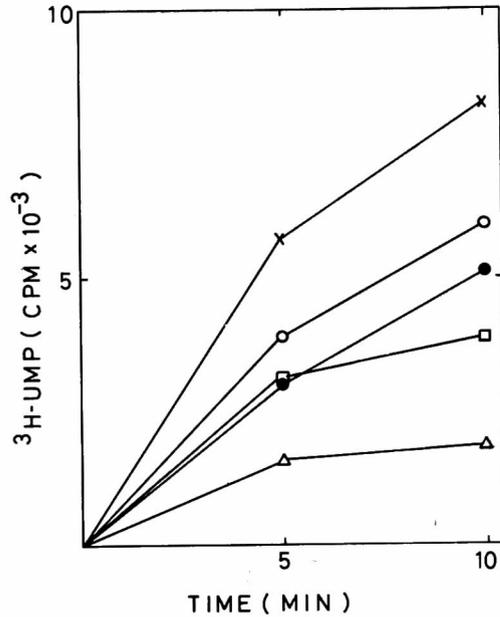


図2 塩処理クロマチンの転写鋳型活性
 材料と方法に述べてあるように DNA、NaCl 処理クロマチン (DNA として 3.6 μ g) 及び H1 除去クロマチン (DNA として 3.6 μ g) H1 ヒストン 0.4 μ g とで再構成させたクロマチンを用いて RNA 合成させ酸不溶性放射性を測定した。
 △ 0.15M NaCl 処理クロマチン
 □ 0.35M NaCl 処理クロマチン
 ○ 0.60M NaCl 処理クロマチン
 ● 0.60M NaCl 処理クロマチンと H1 とで再構成させたクロマチン
 × 精製 DNA を鋳型として用いた。

抽出精製 DNA、0.6M NaCl 処理 H1 除去クロマチン、0.6M NaCl 処理クロマチンと H1 ヒストンとで H1 ヒストン/DNA 重量比 0.22 で材料と方法に従って調製した再構成クロマチン、0.35M NaCl 処理クロマチン、0.15M 処理クロマチンの順にヌクレアーゼ感受性が高く、この実験条件で 15 分間ヌクレアーゼ消化させたときの DNA 可溶性率は、それぞれ 97, 58, 53, 48, 40% であった(図 3)。また 0.15M, 0.35M, 0.6M NaCl 処理クロマチンのヌクレアーゼで消化されてできたヌクレオソームモノマー DNA の大きさはほぼ同じであったが、その出現時間は処理する塩濃度が高い程早かった(図 4)。

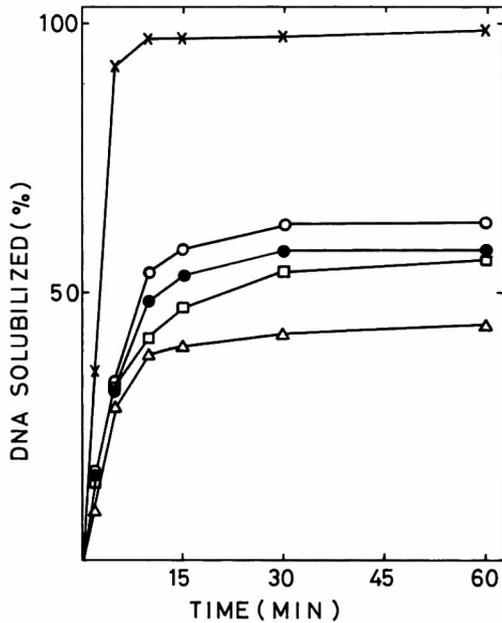


図3 NaCl 処理クロマチンのヌクレアーゼ感受性

材料と方法に述べてあるように DNA, NaCl 処理クロマチン (DNA として 9 μ g) 及び H1 除去クロマチン (DNA として 9 μ g) と H1 ヒストン 2.0 μ g とで再構成させたクロマチンをヌクレアーゼで消化し, 酸不溶性画分の DNA を定量し, 元のクロマチン DNA との差を酸可溶性 DNA として, 可溶化率を算出した.

- △ 0.15M NaCl 処理クロマチン
- 0.35M NaCl 処理クロマチン
- 0.60M NaCl 処理クロマチン
- 0.60M NaCl 処理クロマチンと H1 とで再構成させたクロマチン
- × 精製 DNA をヌクレアーゼで消化した.

考 察

ヒストンと非ヒストン蛋白質を核またはクロマチンより選択的に抽出することにより引き起こされるクロマチンの性状の変化を研究することにより, それらの機能と存在部位が研究されている⁵⁻¹²⁾. 特に H1 ヒストンに関する研究がよく行なわれており, H1 除去によるクロマチンの形態変化⁷⁾, 転写鋳型活性の変化^{5,6,8)}, micrococcal nuclease 感受性の変化¹⁰⁻¹²⁾ 等から, H1

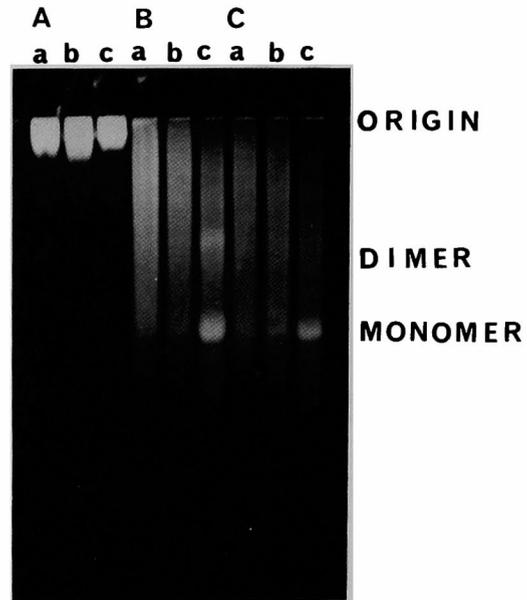


図4 Micrococcal nuclease 消化 DNA 断片のゲル電気泳動

NaCl 処理クロマチンを材料と方法に従ってヌクレアーゼ消化を行ない, 得られた DNA 断片をゲル電気泳動した.

A. ヌクレアーゼ消化前のクロマチン DNA

B. ヌクレアーゼ消化 2 分のクロマチン DNA

C. ヌクレアーゼ消化 5 分のクロマチン DNA

a. 0.15M NaCl 処理クロマチン DNA

b. 0.35M NaCl 処理クロマチン DNA

c. 0.60M NaCl 処理クロマチン DNA

ヒストンはクロマチンの凝集に関与していると推測されている.

本研究では, 0.15M, 0.35M, 0.6M NaCl 処理して H1 ヒストンと一部の非ヒストン蛋白質をクロマチンから除去することにより起こる転写鋳型活性及びヌクレアーゼ感受性の変化より, これら核蛋白質の機能を研究した. その結果, クロマチンより H1 ヒストンを完全除去することにより, 明らかに転写鋳型活性の促進とヌクレアーゼ感受性の増加がみられたが, 0.35M NaCl によるわずかの H1 ヒストンの除去と一部の非ヒストン蛋白質の除去でも, これらの促進ないし増加が認められたことから H1 ヒストンのみでなく, 0.35M NaCl で抽出される非ヒストン

蛋白質もクロマチンの高次構造に関与していることが推定された。また H1 ヒストン及び一部の非ヒストン蛋白質をクロマチンから除去し、micrococcal nuclease 消化を行なっても、ヌクレアーゼ感受性が高まるだけで、消化されてくるヌクレオソーム・コア DNA の大きさに変化がないことから、これらの蛋白質は主としてヌクレオソーム間の連結 DNA に結合して、クロマチンの高次構造に関係していると思われる。

結 論

Ehrlich 腹水癌細胞クロマチンから 0.15~0.6 M NaCl で蛋白質を抽出することにより起こるクロマチンの構造と機能の変化を研究した。クロマチンを 0.6M NaCl 溶液で処理することによ

り、ヒストンの中で H1 ヒストンが選択的に抽出された。クロマチンを高い塩濃度で処理する程、多くの蛋白質がクロマチンから抽出され、処理クロマチンの鑄型活性とヌクレアーゼ感受性が増大した。H1 ヒストンと H1 除去クロマチンとで調製した再構成クロマチンの転写活性及びヌクレアーゼ感受性は、H1 除去クロマチンのそれより低かった。処理した塩濃度に関係なくヌクレアーゼで消化されてきたヌクレオソーム・モノマー DNA の大きさは、ほぼ一定であった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御協力をいただきました教室の方々に心から感謝申し上げます。

文 献

1. Kornberg, R.D.: Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868—871, 1974.
2. Baldwin, J.P., Boseley, P.G., Bradbury, E.M. and Ibel, K.: The subunit structure of eukaryotic chromosome. *Nature* **253**, 245—249, 1975.
3. Noll, M. and Kornberg, R.D.: Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J. Mol. Biol.* **109**, 393—404, 1977.
4. Barrett, T., Maryanka, D., Hamlyn, P.H. and Gould, H. J.: Mon-histone proteins control gene expression in reconstituted chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 5057—5061, 1974.
5. Seligy, V.L. and Miyagi, M.: Comparison of template-property changes after salt extraction of avian erythrocyte and liver chromatin. *Eur. J. Biochem.* **46**, 259—264, 1974.
6. Cedar, H., Solage, A. and Zurucki, F.: Control of RNA synthesis by chromatin proteins. *Nucleic Acids Res.* **3**, 1659—1670, 1976.
7. Thoms, F. and Koller, Th.: Unravelling nucleosomes, nucleosome beads and higher order structures of chromatin: Influence of non-histone components and histone H1. *J. Mol. Biol.* **149**, 709—733, 1981.
8. Spelsbery, T.C. and Henilica, L.S.: Proteins of chromatin template restriction. I. RNA synthesis in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* **228**, 202—211, 1971.
9. Mirsky, A.E. and Silvermann, B.: Effects of selective extraction of histone template activities of chromatin by use of exogenous DNA and RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1973—1975, 1973.
10. Smerdon, M.J. and Lieberman, M.W.: Removal of histone H1 from intact nuclei alters the digestion of nucleosome core DNA by staphylococcal nuclease. *J. Biol. Chem.* **256**, 2480—2483, 1981.
11. Weischet, W.O., Allen, J.R., Riedel, G. and Van Holde, K.E.: The effects of salt concentration and H-1 depletion on the digestion of calf thymus chromatin by micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res.* **6**, 1843—1862, 1979.

12. Lawson, G.M. and Cole, R.D.: Selective displacement of histone H1 from whole HeLa nuclei: Effect on chromatin structure in situ as proved by micrococcal nuclease. *Biochemistry* **18**, 2160—2166, 1979.
13. Hershey, H.V., Stieber, J.F. and Mueller, G.C.: DNA synthesis in isolated HeLa nuclei. A system for continuation of replication in vitro. *Eur. J. Biochem.* **34**, 383—394, 1973.
14. Johns, E.W.: Studies on histones 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus. *Biochem. J.* **92**, 55—59, 1964.
15. Zubay, G. and Doty, P.: The isolation and properties of deoxyribonucleoprotein particles containing single nucleic acid molecules. *J. Mol. Biol.* **1**, 1—20, 1959.
16. Burton, K.: Determination of DNA concentration with diphenylamine. In *Methods in Enzymology*, 12B, Academic Press, New York, pp.163—1968.
17. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
18. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680—685, 1970.
19. Hidaka, H., Misumi, H. and Oda, T.: Transcription of reconstituted simian virus 40 nucleoprotein complexes. *J. Virol.* **34**, 675683, 1980.
20. Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J. Mol. Biol.* **3**, 208—218, 1961.

**Effects of stepwise extraction of nonhistone proteins
and H1 histone on template activity of chromatin and
on digestion of chromatin by micrococcal nuclease**

Minoru IRISAWA, Shogo IKEDA and Takuzo ODA

Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University

Medical School, Okayama 700, Japan

(Director: Prof. T. Oda)

Changes in the structure and function of Ehrlich ascites tumor cell chromatin induced by extracting with 0.15 to 0.6 M NaCl were analyzed. H1 histone was selectively extracted from chromatin by treating with 0.6 M NaCl. The higher the salt concentration that was applied to the chromatin, the larger the amount of proteins that was extracted, and the higher the template activity and micrococcal nuclease sensitivity that were attained. The chromatin reconstituted from H1 histone and H1-depleted chromatin showed reduced template activity and reduced nuclease sensitivity. The size of nuclease-digested DNA fragments (nucleosome monomer) were identical regardless of the depletion of H1 histone and some non-histone proteins.