

複製型および非複製型 SV40 クロマチン蛋白質 の解析

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・中村孝志・渡辺晰子

小田 琢三

（昭和57年3月29日受稿）

Key words: SV40, replication

緒 言

クロマチン DNA の複製と遺伝情報の発現は、クロマチンに結合する蛋白質によって制御されていると考えられている¹⁻³⁾。しかし細胞核クロマチンは極めて大きいために、S 期における DNA 複製においても、複製型クロマチンと非複製型クロマチンとが混在するようになる。そのため両者を分離して複製におけるクロマチン蛋白質の変化を究明することが難しい。

Simian virus 40 (SV40) は、5243 塩基対の環状二本鎖 DNA を持つウイルスであり、感染したサル腎臓細胞内で、それぞれ SV40 クロマチン（ミニクロモゾーム）と成熟ウイルス粒子と呼ばれる二種類の DNA-蛋白質複合体として存在している⁴⁻⁶⁾。そして前者は、細胞核クロマチンと同様に 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 で数珠状に連ったヌクレオソーム構造を呈しており、それに HI ヒストンが結合している⁶⁾。また SV40 クロマチンは、ヌクレオソーム構造はそのまま保ちながら、HI ヒストンを失いながら、VP1, VP2, VP3 と呼ばれる 3 種のウイルス蛋白質を結合させて、成熟ウイルス粒子となっていく。この SV40 クロマチンは単純な遺伝子構造をもつ均一な複製単位（レプリコン）であるために、複製型 SV40 クロマチンは、クロマチン複製の有用なモデルである。近年、細胞をそのままの状態で

ホルムアルデヒド固定することにより、少しの蛋白質をも解離させることなくクロマチンを分離する方法が開発されている⁷⁻⁹⁾。それらの報告によると複製型クロマチンは、非複製型クロマチンよりも密度が小さく、この密度の差を利用して両者の分離が可能である。そこで本研究では、SV40 クロマチンの複製時におけるクロマチン結合蛋白質の変化を調べるために、SV40 感染細胞を細胞ごとホルムアルデヒド固定し、SV40 クロマチンの複製型と非複製型とを密度の差を利用して分離した後、クロマチン結合蛋白質の変化を解析することにより、クロマチン複製時に必要な蛋白質を明らかにしようとした。

材 料 と 方 法

1) 細胞培養と SV40 クロマチンの固定

アフリカミドリザル腎臓細胞(CV-1)を 10% ウシ血清添加 Eagle minimum essential medium (MEM) で、プラスチック製ペトリ皿を用い、37°C で培養した。細胞が密な状態になったときに小プラック型 SV40 (777 株) を MOI50 ~ 100 で感染させ、40 時間後に 20 μ Ci/ml [³H] チミジン (48 Ci/mmole Radiochemical Center) (2 ml 培養液/ディッシュ) で 5 枚づつ 3 回培養液を回収しながら 3 分間感染細胞をパルス標識した。また同様にして感染細胞を 15 分間バルク標識し、さらに 15 分間の chase を行なった。標識終了後直ちにディッシュを氷冷し、シリコン擦過子を用いて細胞をディッシュから剝離し、

遠心管に集めた。Carrier として非標識感染細胞を20枚のディッシュより集めて、それぞれの遠心管に加えて $1,000\times g$ 、3分間遠心し、沈渣に5 ml の1%ホルムアルデヒドを含むMEMを加えて、 4°C 、18時間固定した⁹⁾。

2) 固定 SV40 クロマチンの分離

固定液中の細胞をMEMで2回遠心洗浄した後、8 ml のMEMに懸濁し、Ultra Sonic Osc. (Kaijo Denki) を用い最高出力で30秒づつ6回、細胞を超音波破壊した⁹⁾。このSV40 クロマチン抽出液を $10,000\times g$ 、30分間遠心し、上清にRNaseAを終濃度 $50\mu\text{g/ml}$ になるように加え、 37°C 、30分間処理した。さらに細胞クロマチンとウイルス粒子を除くために、7~25%蔗糖、100mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH 7.8) の密度勾配を作り、日立 RPS-25-2A で $74,000\times g$ 、4時間遠心後、各々の遠心管の底部から分画分取し、各分画の10% trichloroacetic acid (TCA) 不溶性の放射活性を測定した。蔗糖密度勾配遠心の沈渣を10mM Tris-HCl (pH 7.8) に懸濁し、negative stainingを行ない、電顕観察を行なった。

3) CsCl/塩酸グアニジンによる平衡密度勾配遠心

蔗糖密度勾配遠心で分取したSV40 クロマチン分画を10mM Tris-HCl (pH 7.3) に対して透析した。透析後 Amicon membrane filter を用いてSV40 クロマチン溶液を濃縮し、塩酸グアニジン 1.7g、CsCl 1.2g を加えて最終容量を4.6mlとし、日立 RPS-65 TA で $150,000\times g$ 、72時間遠心し、分画した。各分画の一部(パルス標識SV40 クロマチンは $75\mu\text{l}$ 、バルク標識SV40 クロマチンは $25\mu\text{l}$)の10% TCA 不溶性の放射活性を測定した。また平衡密度勾配遠心後のSV40 クロマチン分画を水に透析した。透析後白金-パラジウムで回転陰影を行ない、電顕にて観察した。

4) SV40 クロマチン蛋白質のゲル電気泳動

各分画 $200\mu\text{l}$ に対して β -メルカプトエタノールを $30\mu\text{l}$ になるように加え、 100°C 、30分間加熱した⁷⁻⁹⁾。その後、試料を10mM β -メルカプトエタノールに対して透析し、Laemmliの方法¹⁰⁾により12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動を行ない、Oakley らの方法¹¹⁾ により銀染色を行なって、SV40 クロマチン蛋白質を解析した。

実験結果

1) SV40 クロマチンの蔗糖密度勾配遠心

1%ホルムアルデヒド固定した感染細胞より超音波を用いて得たSV40 クロマチンを7~25%蔗糖密度勾配遠心法で底部より分画すると、7~13番のフラクションにSV40 クロマチンのピークが得られた(図1)。また沈渣の懸濁液を電顕観察すると、成熟ウイルス粒子及び細胞クロマチンがみられた(写真1)。

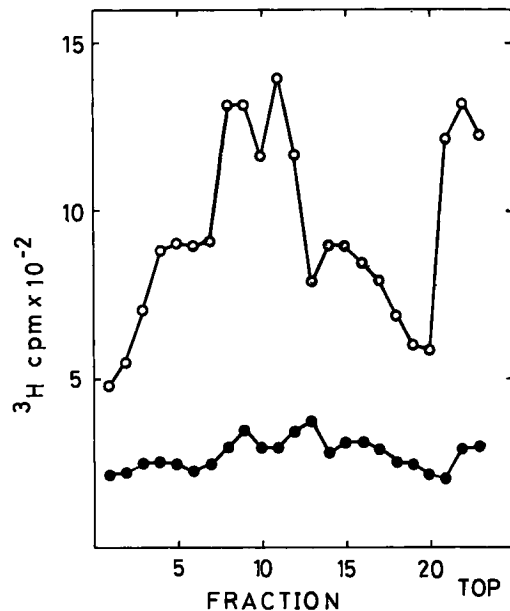


図1 SV40 クロマチンの蔗糖密度勾配遠心分画
SV40 感染40時間後、材料と方法に述べてあるように ^3H チミジンで3分間のパルス標識(○)と15分間のバルク標識、15分間のchaseを行なった(●)。

2) 分離 SV40 クロマチンの CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配遠心

蔗糖密度勾配遠心分画の7~13番のフラクションを集め、CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配遠心により分取した各分画の放射活性を測定してみると、SV40 クロマチン DNA を3分間パルス標識した複製型クロマチンの方が、15分間バルク標識、15分間 chaseした非複製型クロ

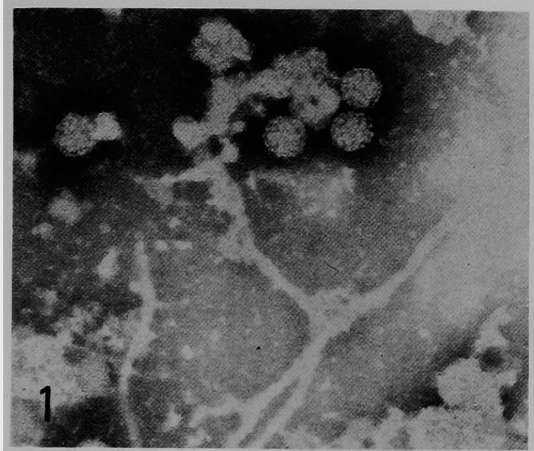


写真1. 成熟ウイルスと細胞核クロマチンの電子顕微鏡像
蔗糖密度勾配遠心の沈渣を懸濁し, negative staining を行なった ($\times 120,000$).

マチンより軽い密度分画にあった (図2). すなわち複製型 SV40 クロマチンにより多くの蛋白質が結合していることが示された. またフラク

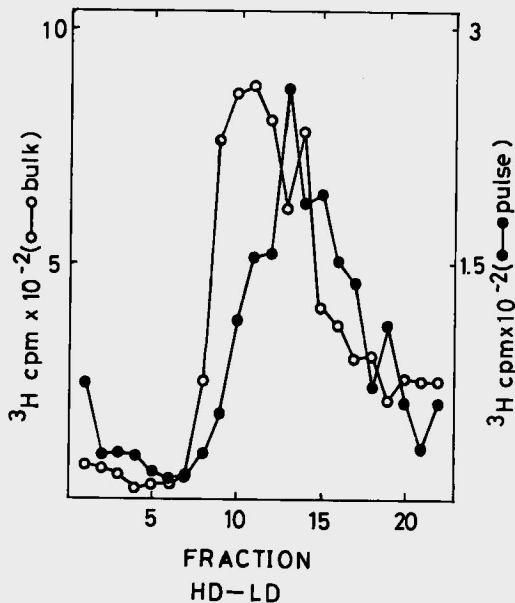


図2. SV40 クロマチンの CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配遠心分画
蔗糖密度勾配遠心の SV40 クロマチン画分を材料と方法に従って CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配遠心を行なった. ^3H チミジンで3分間パルス標識 (○) と15分間のバルク標識, 15分間の chase を行なった (●).

ション番号9と14を水に対して透析後, 電顕観察すると, かなり均一の大きさの SV40 クロマチンが認められた (写真2). すなわち平衡密度勾配遠心によりできた ^3H チミジン放射活性のピークは SV40 クロマチン DNA によることが明らかとなった.

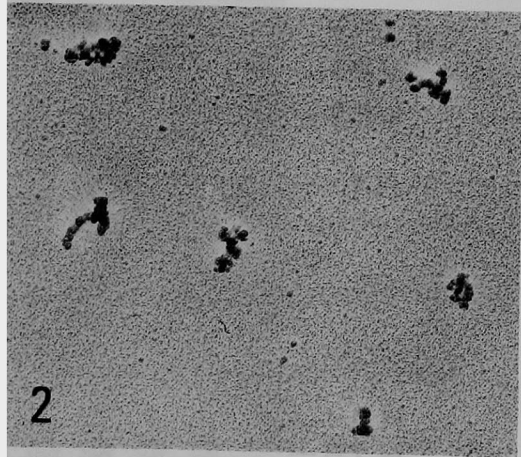


写真2. SV40 クロマチンの電子顕微鏡像
CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配遠心の SV40 画分を水に対して透析後, 回転陰影を行なった ($\times 30,000$).

3) SV40 クロマチン蛋白質のゲル電気泳動

ホルムアルデヒド固定した SV40 クロマチンから蛋白質と DNA を, 塩酸グアニジンと β -メルカプトエタノールの存在下で30分間, 100°C 加熱することにより解離させることができた (図3). また非複製型 SV40 クロマチンのピーク画分 (フラクション番号11) は, 複製型 SV40 クロマチンのピーク画分 (フラクション番号13) に比べて H1 ヒストンの割合が多かった (図3). さらにウイルス蛋白質の VP1, VP2 は, 非複製型クロマチン画分には, ほとんどみられず, 軽い比重の分画にいくに従って増加がみられた.

考 察

近年, 細胞をホルムアルデヒド固定した後, 超音波処理して固定クロマチンを溶出させ, CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配遠心を用いて, 複製型と非複製型 DNA とを分離する方法が開発された⁷⁻⁹⁾. この方法には, どんな弱い結合を

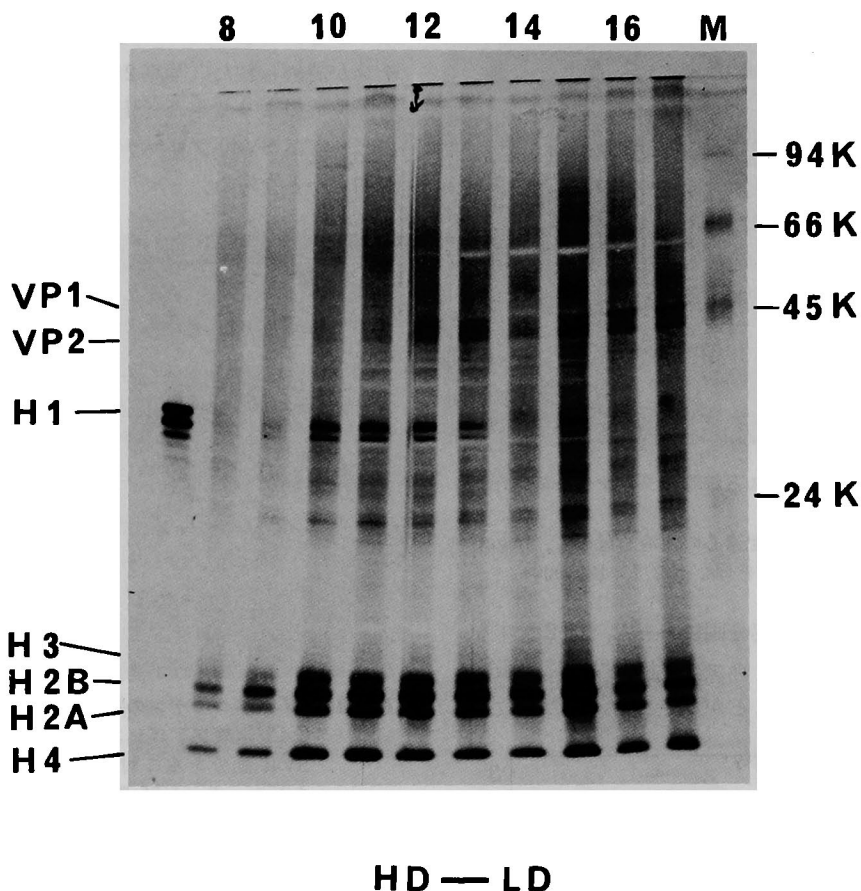


図3. SV40クロマチンの蛋白ゲル電気泳動
CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配の各分画を材
料と方法に従って銀染色を行なった。

している蛋白質をもクロマチンから解離させないという利点がある。さらにホルムアルデヒド固定クロマチンを容易にDNAと蛋白質とに解離させることが出来るために、それらを解析することができる⁷⁻⁹⁾。

本研究では、SV40感染 CV-1 細胞をホルムアルデヒドで固定し、超音波処理によりSV40クロマチンを細胞から抽出し、CsCl/塩酸グアニジン平衡密度勾配遠心を用いて、複製型と非複製型SV40クロマチンを分離して、その結合蛋白質の変化を研究した。そして複製型SV40クロマチンは、非複製型のそれよりも小さい密度の分画にくること、すなわち結合している蛋白質が多いことが明らかになった。複製型クロマチンには、DNAポリメラーゼ α が、結合していることが明らかに

されており¹²⁾、またSV40初期遺伝子産物のT抗原(分子量約94,000)も、複製型SV40クロマチンに結合しているという報告¹³⁾もあるが、今回の研究では、複製型の画分に9万前後の蛋白質は検出されなかった。しかし、このことはSV40クロマチンに結合するT抗原の量が少ないためのものであり、必ずしもT抗原が複製型SV40クロマチンに結合していないことを証明するものではない。複製型SV40クロマチン画分のH1含量は、非複製型のそれよりも少なかった。この結果と、これまで報告されているH1ヒストンのSV40クロマチンに与える影響^{14,15)}とを総合してみると、SV40クロマチン複製時にH1ヒストンが離れて、SV40クロマチンを弛緩させるものと考えられる。

結 論

ホルムアルデヒド固定した simian virus 40 (SV40) 感染細胞から、超音波処理により、SV 40 クロマチンと成熟ウイルスを抽出することができた。成熟ウイルスは、蔗糖密度勾配遠心により SV40 クロマチンから分離できた。ホルムアルデヒド固定された複製型 SV40 クロマチンと非複製型 SV40 クロマチンを CsCl/塩酸グア

ニジン平衡密度勾配遠心法により分離され、前者は後者よりも小さい密度分画に回収された。また各分画の蛋白質を解析すると、複製型 SV 40 クロマチンの H1 含量は、非複製型のそれよりも少なかった。

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. Barret, T., Maryanka, D., Hamlyn, P.H. and Gould, H.J.: Nonhistone proteins control gene expression in reconstituted chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 5057—5061, 1974.
2. 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.
3. Cedar, H., Solage, A. and Zurucki, F.: Control of RNA synthesis by chromatin proteins. *Nucleic Acids Res.* 3, 1659—1670, 1976.
4. Griffith, J.: Chromatin structure: deduced from a minichromosome. *Science* 187, 1202—1203, 1975.
5. Bellard, M., Oudet, P., Germond, J.E. and Chambon, P.: Subunit structure of simian-virus 40 minichromosome. *Eur. J. Biochem.* 70, 543—553, 1976.
6. Varshavsky, A.J., Bakayev, V., Chumackov, P.M. and Georgiev, G.P.: Minichromosome of simian virus 40: presence of histone H1. *Nucleic Acids Res.* 3, 2101—2113, 1976.
7. Jackson, V. and Chalkley, R.: A new method for the isolation of replicative chromatin: Selective deposition of histone on both new and old DNA. *Cell* 23, 121—134, 1981.
8. Jackson, V. and Chalkley, R.: A reevaluation of new histone deposition on replicating chromatin. *J. Biol. Chem.* 256, 5095—5103, 1981.
9. Jackson, V. and Chalkley, R.: Use of whole-cell fixation to visualize replicating and maturing simian virus 40: Identification of new gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6081—6085, 1981.
10. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680—685, 1970.
11. Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Marris, N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analy. Biochem.* 105, 361—363, 1980.
12. Otto, B. and Fanning, E.: DNA polymerase α is associated with replicating nucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* 5, 1715—1728, 1978.
13. Segawa, M., Sugano, S. and Yamaguchi, Y.: Association of simian virus 40 T antigen with replicating nucleoprotein complexes of simian virus 40. *J. Virol.* 35, 320—330, 1980.
14. Griffith, J.H. and Christiansen, G.: The multifunctional role of histone H1, probed with the SV40 minichromosome. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Vol.42 pp. 215—226, 1978.
15. Hidaka, H., Misumi, H. and Oda, T.: Transcription of reconstituted simian virus 40 nucleoprotein complexes. *J. Virol.* 34, 675—683, 1980.

**An analysis of nucleoproteins of replicating and
nonreplicating simian virus 40**

**Minoru IRISAWA, Takashi NAKAMURA, Sekiko WATANABE
and Takuzo ODA**

Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University

Medical School, Okayama 700, Japan

(Director: Prof. T. Oda)

Simian virus 40 (SV40) chromatin and mature virion were extracted from formaldehyde-fixed SV40-infected CV-1 cells. Mature virion was eliminated from SV40 chromatin by sucrose density gradient centrifugation. Replicating and nonreplicating SV40 chromatin were separated on CsCl/ guanidine-HCl density gradients. Replicating SV40 chromatin was lower in density than the nonreplicating form. The analysis of chromatin proteins by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining revealed that replicating chromatin has less H1 histone than the nonreplicating form.