

電顕用切片からのヒストン H1A 欠如 DNase 感受性クロマチンについて

奈良県立医科大学第2解剖学教室

奥田 喜一

DNASE SENSITIVE CHROMATIN FROM SECTIONS OF LR WHITE RESIN EMBEDDED BLOCK IS DEFICIENT HISTONE H1A

YOSHIKAZU OKUDA

The 2nd Department of Anatomy, Nara Medical University

Received November 29, 1993

Abstract: In this study of transcribed active chromatin, DNase sensitive chromatin was isolated from tissue block embedded in LR White Resin using TEM observation. The DNase sensitive chromatin showed that high-mobility group protein(HMG)17 localized in them with immunoelectron microscopic study, so that they may be included as transcribed active genes. The reasons for the mechanism of chromatin dissociation from embedded resin are not yet known. SDS-PAGE analysis of chromatin proteins from sections showed a lack of histone H1A, H2A and H2B. This result is consistent with other laboratories as to transcribed active chromatin except for histone H1A and H1B, but with respect to histone H1, it is proposed that CTF/NF-1 and H1 in inactive chromatin act to change chromatin structure for transcription(see ref. 26), so that in our Laboratory, one of them, eg. histone H1B, may play an important role in acting for transcription.

Index Terms

DNase sensitive chromatin, H1A deficient chromatin, anti-HMG 17 antibody, platinum rotary shadowing

緒 言

真核生物の核はDNA, histone, nonhistone chromatin protein, RNAなどにより構成されたchromatinから成り立っており, このchromatinには転写活性な状態と不活性な状態とがあることが分かっている. この両者には構造上に大きな違いがあることが, Weintraubら¹⁾により報告された. 即ち, ニワトリ有核赤血球細胞核でglobin genesを持つ転写活性の高いchromatinと不活性chromatinのDNase I感受性を比較してみると, 機能しているglobin genesを持つchromatinの方がDNase I感受性が高いことを示した. また転写活性の高いchromatinのヌクレオソームの繰

り返し単位の長さを比較すると不活性chromatinよりも転写活性のchromatinの方が塩基の長さで11~14bpほど長くなっており, これがDNase I感受性の増加の原因²⁾ではないかとも言われている. さらにLawsonら³⁾はDNase I感受性部位が遺伝子の上・下流にわたって約100 kbの広範囲にあることや, このDNase I感受性部位の中でも超高・高感受性部位が存在^{4,5)}することが報告されている. この様な転写活性を有するchromatinにDNase I感受性部位が存在することについて, 例えば, 転写調節因子であるTF II Dが結合するTATA box⁶⁾の存在, DNA topoisomerase IIの作用による負のsupercoilの形成^{7,8)}, あるいはchromatinを構成するcore histoneの中でH3, H4, H2Bの高アセチル化⁹⁾

などが原因ではないかと考えられている。

現在、転写活性を有する chromatin を調製する方法は DNase, MNase や制限酵素などにより行われているが、得られた標品中の転写活性 chromatin が含まれる割合は少なく、これを用いてその構成を検索しても正確な chromatin 構造を推測することは困難であると考えられる。Tecott ら¹⁰⁾は固定組織切片内で reverse transcriptase による mRNA 合成が可能であると報告し、中山ら¹¹⁾が LR White resin 包埋したブロックからの切片に、DNase I や protease 処理が、固定・包埋された条件下でも可能であることを示した。そこで精巢切片を DNase I 処理した後、この酵素処理液をホルムパール膜張りメッシュに展開して、白金蒸着後、電顕観察した所 chromatin 構造が観察された。これは限定された超薄切片領域から DNase I により転写活性 chromatin を多く含む分画が得られ、これをタンパク質分析すれば、より正確な転写活性 chromatin 構造が把握できる可能性が考えられた。そこで以下に述べる実験を行った結果、DNase I により超薄切片から遊離してきた chromatin には特定の core histone や histone H 1 が欠如していることがわかり、この研究結果について報告する。

次に形態的側面からは、この活性 chromatin の立体構造の提示と共に免疫電子顕微鏡的に活性 chromatin であることを示すことができないものかと考え、従来から DNA や chromatin の電顕観察に用いられている platinum rotary shadowing method と抗原の局在を免疫電顕で用いられている Protein A-colloidal gold method あるいは colloidal gold labeled immunoglobulin method を結合させて転写活性 chromatin を観察した結果についても報告する。

材 料 と 方 法

材料

Wister rat (7 週令) および MRL/Mpj lpr(+) mice (6 週令) はオリエンタルバイオサービス(株)より購入し、繁殖飼育させて実験に用いた。25% glutaraldehyde は TAAB Co. より、LR White resin は London Resin Co., Basings toke, Hants., U. K. より、DNase I (type II from bovine pancreas), DNase II (type II from bovine spleen) は Sigma Chemical Co. より購入した。その他の試薬類は試薬特級、電子顕微鏡用試薬を用いた。

方法

(1) ポリクローナル抗核抗体の作成

(a-1) 抗原の精製

High-mobility group proteins(HMG)は Goodwin

ら¹²⁾の方法により得た。約 100 gr のラット肝臓を 3 倍量 (v/v) の 5% (w/v) perchloric acid (PCA) を加え、氷冷しながらワーリングブレンダーで 1 分間 maximum speed で細切り、2 分間氷冷した後、1 分間さらに細切した。これを 3 回繰り返して日立 SCR-20 高速冷却遠心機で 2,500×g 4℃ 30 分遠心し、生じた沈渣を同じ方法で 3 回繰り返して 5% PCA 抽出を行った。この上清を集めて外科用ガーゼとガラスフィルターで濾過し、最終濃度 18% になるように 100% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) を加えて 4,500×g 4℃ 15 分間遠心した。沈渣を acetone/conc.-HCl(400:1, v/v) で溶かし、3 倍量の acetone を加えて 4,500×g -10℃ 15 分遠心し洗淨した。沈渣に混在する histone H1 を除くために 0.1 N HCl で 10 mg/ml になるように溶かし、3 倍量の acetone を加え、4,500×g 10 分遠心し、沈渣を pellet-1 (大部分 histone H1) とし、上清にはさらに 3 倍量の acetone を加え 4,500×g 10 分遠心して沈渣とし、これを pellet-2 (HMG proteins) とした。

(a-2) イオン交換およびゲルクロマトグラフィー

pellet-1 および pellet-2 をそれぞれ 7.5 mM sodium borate buffer (pH 8.8) に溶かし、同じ緩衝液で平衡化した Mono S 陽イオン交換樹脂カラムに吸着させ、FPLC system (Pharmacia Co.) で塩濃度を上げてタンパク質を溶出させた。各 peak を、同じ緩衝液で平衡化した superose™ 12 gel column で FPLC system を用いて分画し、得られた各 peak を 12% SDS-PAGE で泳動(方法は下記の(2)-b に記載)して、純度及び成分を確認した。この方法により純度の高い histone H1, HMG 14/17 の各成分を精製した。

(b) 抗体の作成

ラット核からの各精製抗原を 1 mg/ml になるように PBS (pH 7.4) に溶かし、Reichlin ら¹³⁾の方法により抗原を重合させ、カリウムミョウバン法(菌体不含)で MRL mice に週一回足底に免疫した。抗体出現を確認して、一カ月後、眼窩静脈より採血し、硫酸分画により部分精製した。これを PBS (pH 7.4) で平衡化した superose™ 12 で、FPLC system (Pharmacia Co.) によりゲル濾過し、抗体を精製した。

(c) ウェスタンブロットティングによる抗体の確認

Pellet-1 および pellet-2 を一緒にして 12% SDS-PAGE で泳動し、ゲルと nitrocellulose membrane (BA-83) (Scheicher & Schuell Co.) を 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% methanol のブロットティング緩衝液に 15 分浸し、毛細管式ブロットティング法により室温下で約 20 時間転写した。各レーンを 0.05% Tween-20-PBS

(pH 7.4)で15分ブロッキングし、希釈した各抗血清を一晚(約20時間)4°Cで反応させた。次にブロッキング液で15分3回洗浄し、3,000倍にPBS(pH 7.4)で希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体(MBL Co.)を5時間、室温で反応させた。PBS(pH 7.4)で3分、2回洗浄後、0.05 M Tris-HCl(pH 7.6)で2分洗浄した。これを0.02% 3, 3'-diaminobenzidine(DAB)-0.05% H₂O₂-0.05 M Tris-HCl(pH 7.6)と反応させ、発色した時点で水道水で洗浄し停止した。

(d) 免疫染色による抗体の確認

*Drosophila Hydi*の幼虫の唾液腺を2% glutaraldehyde-0.01 M phosphate buffer(pH 7.4)で約20時間固定し、上昇アルコールシリーズで脱水後、LR White resinで60°C 20時間重合包埋した。これより切片を作成した。ポリクロナル抗 HMG 17 抗体 10 μl を5 nm コロイド金溶液 10 ml に加え、3分後に0.15 ml の5% polyethylene glycolを加えて、24,000 rpm 4°C 30分日立 RPS 65 T rotor で遠心した。pellet を5% glycerin-0.5% polyethylene glycol-0.005% NaN₃に溶かして、これをコロイド金標識抗 HMG 17 抗体とした。D. Hydi からの超薄切片を0.05% Triton X-100-PBS(pH 7.4)で洗浄し、PBS(pH 7.4)で希釈したコロイド金標識抗 HMG 17 抗体で4°C 20時間反応させた。これを0.05% Triton X-100-PBS(pH 7.4)で15分3回洗浄後、再蒸留水で5分3回洗浄し、ウラニール染色後、透過型電子顕微鏡観察をした。

(2) 酵素処理と変成ゲル電気泳動

(a) 切片、固定組織、裸核の酵素処理

ラットの精巣を2% glutaraldehyde-0.01 M phosphate buffer(pH 7.4)で4°C 20時間固定し、脱水後、LR White resinで、60°C 20時間重合包埋し、これより超薄切片を作成した。

一方包埋せずに固定後、PBS(pH 7.4)で洗浄し、乳鉢によりPBS(pH 7.4)溶液ですりつぶし、3,000×g 4°C 15分遠心し、沈渣を固定核として用いた。

未固定標本として chauveau¹⁴⁾らの方法でシュークロース裸核を作成した。

次にこれら超薄切片、固定核及び未固定裸核をそれぞれ DNase I (10 mM Tris-HCl(pH 7.4)-5 mM MgCl₂-1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)に10,000 units/mlの濃度に溶かしたもの)、及び DNase II (10 mM Tris-HCl(pH 6.0)-1 mM PMSFに10,000 units/mlの濃度に溶かしたもの)を室温下、30分間の酵素消化を基準として行った。加えた液量は以下の手順に記載してある。

(b) 切片、固定組織、裸核からの chromatin proteins の変成ゲル電気泳動

変成ゲル電気泳動(SDS-PAGE)は Laemmli ら¹⁵⁾の方法で行った。Stacking gel は1.1 ml の44.4% polyacrylamide-1.2% bisacrylamide, 2.5 ml の0.5 M Tris-HCl(pH 6.8), 6.2 ml の再蒸留水, 10% SDS と10% ammonium persulfate は各々100 μl を加え、脱気後、楕形を入れて重合させた。Running gel は12% polyacrylamide gel を作成した。4.9 ml の44.4% polyacrylamide-1.2% bisacrylamide, 4.5 ml の1.5 M Tris-HCl(pH 8.8), 8.25 ml の再蒸留水, 10% SDS と10% ammonium persulfate は各々180 μl を加え、脱気後、18 μl の N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)を加えて、1 mm 厚の slab gel を作成した。泳動緩衝液は0.05 M Tris-HCl-0.4 M glycine-1% SDS(pH 8.8)を使用し、泳動は泳動マーカー(bromophenol blue, BPB)がゲル下端に来たときに終了した。染色は2.5% Coomassie brilliant blue(R-250)-50% methanol-10% acetic acid で一晚染色し、10% methanol-5% acetic acid で十分に脱染後、40% methanol-10% acetic acid に30分間浸し、silver stain kit(Bio Rad Co.)で銀染色した。

(b-1)

切片からの泳動試料は約100枚のメッシュに拾い、酵素液各々10 μl を parafilm 上に置き、floating により室温下、30分間反応させた。この液を集めて3倍量の冷 acetone を加え、-30°C に一晚放置後、10,000×g -10°C 30分遠心した。この沈渣を SDS-PAGE 用 sample 溶解液(10 mM Tris-HCl(pH 8.0)-1 mM EDTA-1% SDS-5 mM β-mercaptoethanol)に溶かした。不溶性のものがあれば固形尿素を加えて溶かし、90°C 90秒間で変成させ、泳動試料とした。

(b-2)

約1 gr の固定組織を PBS(pH 7.4)で十分に洗浄後、乳鉢で10倍量の PBS(pH 7.4)を加えてすりつぶし、10,000×g 4°C 15分間遠心した。上清を捨てて沈渣に酵素液0.4 ml 加え、室温下、30分間反応後、10,000×g 4°C 30分遠心した。この上清に3倍量の冷 acetone を加え、一晚 -30°C に放置後、10,000×g -10°C 30分遠心した。この沈渣を SDS-PAGE sample 溶解液に溶かした。不溶性のものがあれば上記と同様の操作を行った。

(b-3)

約0.2 gr のシュークロース裸核を10倍量の PBS(pH 7.4)を加え、テフロンホモゲナイザーで懸濁し、

1,500×g 4℃ 10分遠心した。沈査に0.4 mlの酵素液を加え、固定組織の酵素処理液と同様の操作を行った。

(3)切片から遊離したDNase感受性クロマチンの免疫電顕

メッシュに拾った免疫電顕用切片をparafilm上にドロップしたDNase I酵素液20 μl上に浮かせ、30分間反応させた。この反応液(DNase感受性chromatin)を親水処理したホルムバル膜張りメッシュに直接すくい、室温乾燥後、ポリクローナル抗H1 histone抗体、抗HMG 17抗体で4℃、20時間反応後、5 nmコロイド金標識プロテインAで室温下で30分間反応させるか、または直接5 nmコロイド金標識抗体(抗H1, 抗HMG 17抗体)を4℃、20時間反応させた。これをPBS(pH 7.4)と再蒸留水でそれぞれ5分3回洗浄後、1分間ウラニール酢酸(50%アルコール飽和水溶液)で染色した。再蒸留水で洗浄後、乾燥させた。この試料を角度8~10°, 電流は30 mA, 15~30秒間 蒸着装置(JEE-4 B, JEOL)でロータリーシャドウイングを行い、透過型電子顕微鏡(JE-1200 C, JEOL)にて観察した。

DNase II酵素処理液も同様の操作を行った。

結 果

ラット精巣組織をglutaraldehydeによる単独固定後、LR White resin包埋したブロックより得た超薄切片をDNase処理した結果をFig. 1に示した。方法はラット精巣切片をDNase I処理した後、メッシュをPBS(pH 7.4)、再蒸留水で洗浄後、95%アルコールに1分間浸し、ウラニール染色後、白金ロータリーシャドウイングを行って、電顕観察した。Fig. 1-aはcontrolでDNase処理を行っていない切片である。Fig. 1-a, 1-bの細胞はspermatidである。

両者の細胞核を比較すると、DNase処理の方は電子密度の低い領域が未処理の切片より広い範囲を占め、chromatinが切片上から抜けていることが明瞭であると考えられる結果を得た(Fig. 1-b, arrow)。一方、Fig. 1-bの核内に残っているchromatin(arrow headで示す)は、Fig. 1-aのarrow headで示したchromatinと同程度の電子密度を示した。したがって切片をDNase処理するとFig. 1-bに示す様に、chromatinが切片中より遊離すると考えられる結果を得た。この様にLR White resin包埋した試料ではDNaseのような酵素処理が可能である。この理由をまだ明確に説明できないが、その理由の一つに切片を蒸着すると樹脂表面から試料が突出していることが観察され(datą not shown)、この突出した部分のDNAに酵素が作用し³⁾、試料の離脱が可能で

はないかと考えている。

この切片より遊離したDNase sensitive chromatinが転写活性chromatinであるかどうかを確認するために、抗核抗体で検索した。作成した抗体は抗H1抗体と抗HMG 17抗体である。MRLマウスで作成したラットに対する抗histone H1抗体(Fig. 2, lane 2)、および抗HMG 17抗体(Fig. 2, lane 3)をwestern blotで確認した。泳動した核タンパク質はpellet-1とpellet-2、即ち、histoneとHMG両画分が一緒に泳動されている。両抗体とも特異的に染色し、H1及びHMG 17をそれぞれ認識していることが解ったが、このミュータントマウスは自身で抗核抗体を作るため、抗原を投与しても異なる抗核抗体が混入してくる可能性がある。しかしFig. 2に示すように精製H1抗原を投与したマウスの血清にはhis-

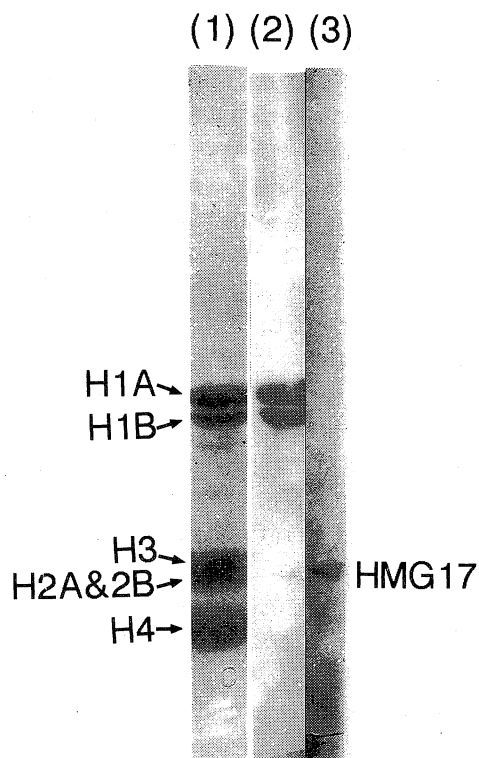


Fig. 2. Western blot analysis of anti-nuclear antibodies. Nuclear proteins (all histones and high-mobility group proteins) are blotted on nitrocellulose membrane after gel electrophoresis and stains with Coomassie brilliant blue (lane 1). Anti-HMG 17 antibody reacted with antigen on a slit reveals brown precipitates at the site of HMG 17 antigen (lane 3), and lane 2 shows the reaction of anti-H1 antibody against both histone H1A and H1B.

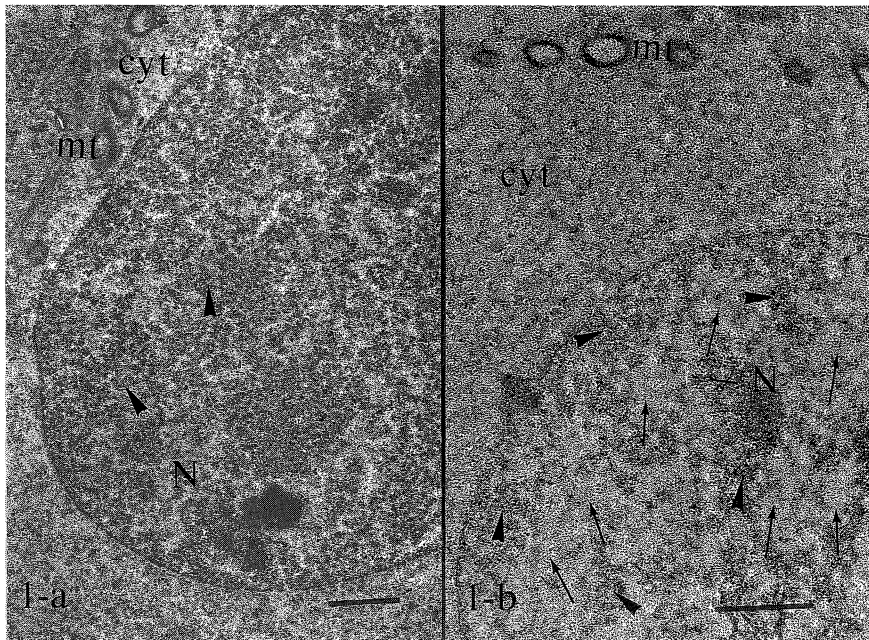


Fig. 1. Electron micrograph of spermatid of rat testis section which stained with uranyl and shadowed with platinum.

Fig. 1-a is not treated with DNase I. Fig. 1-b is treated with DNase I and in nucleus, widely deletions of chromatin fibers are observed (arrow) and there are leavings in nucleus in spite of DNase I treatment (arrow head). N : nucleus, cyt : cytoplasm, mt : mitochondria. Bar represents 1 μ m.

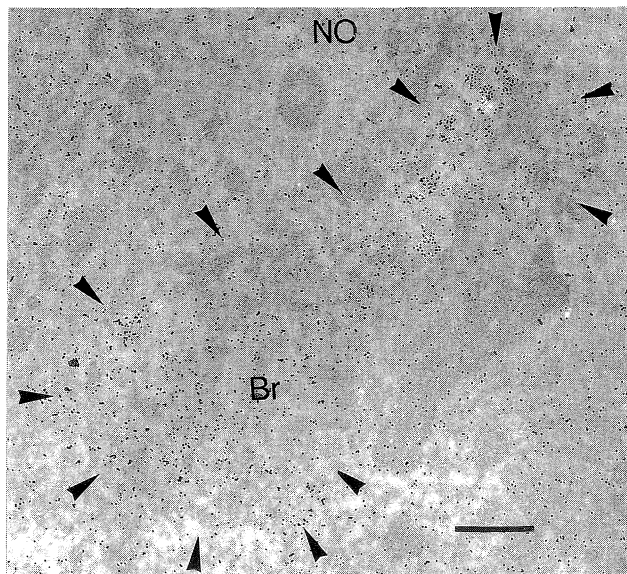


Fig. 3. Electron micrograph of postembedd stain with colloidal gold labeled anti HMG 17 antibody to polytene chromosome of salivary gland of *Drosophila Hydi*. Gold particles aggregate in a area of Balbiani ring (Br) in the polytene chromosomes. In this Balbiani ring area, HMG proteins are specifically localized (see ref. 16). NO : nucleolus. Bar represents 1 μ m.

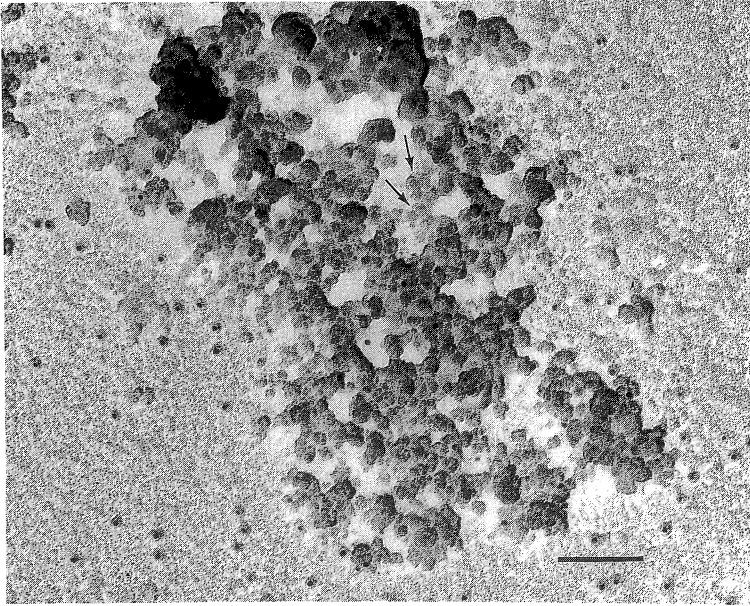


Fig. 4. Chromatin, freed from sections with DNase I treatment, is stained with 5 nm colloidal gold labeled anti-H1 antibody and shadowed with platinum. In spite of rotary shadowing, colloidal gold particles are visualized same as usual TEM observation. Chromatin core particles are visible among aggregated chromatin fibers (arrow). Bar represents 100 nm.

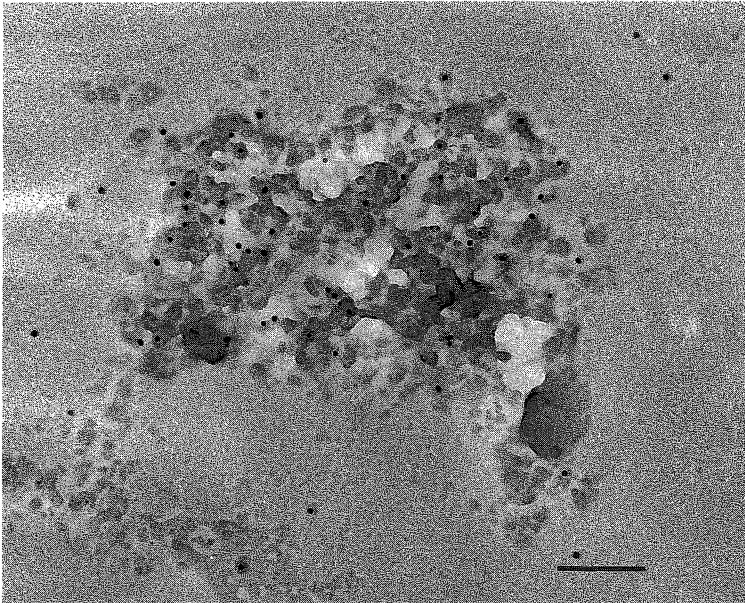


Fig. 5. Chromatin same as in fig. 4 instead of stain with 5 nm colloidal gold labeled anti-HMG 17 antibody. DNase I sensitive chromatin have HMG 17 protein and they are thought to be transcriptional active regions. Bar represents 100 nm.

tone H1A および H1B と反応する抗体しか含まれていなかった。また抗 HMG 17 抗体も同様の特異性を示した。しかし、この HMG 17 抗原は移動度が histone H2A, H2B とほぼ同じであるので、これが抗 HMG 17 抗体であるかどうか疑わしい点が問題とされるので、Westermann ら¹⁹⁾が HMG 14/17 が *Drosophila Hydi* の salivary gland の polytene chromosome の Balbiani ring と active locus にのみ局在することを抗 HMG 14/17 抗体で証明したので、*D. Hydi* の salivary gland の polytene chromosome をこの作成した抗 HMG 17 抗体で免疫染色すると Fig. 3 に示すように核小体の近傍に見られる Balbiani ring 領域が強く染色され、この転写活性領域特有の抗原の存在は、この抗体が HMG 17 に対するものであることを強く示唆していると考えられる。しかし、nuclear sap にも多くの金粒子を見られたが、この抗 HMG 17 抗体で rat tissue を同条件で染色してもこのような非特異的染色は見られないことから (data not shown), nuclear sap に見られる金粒子の存在は非特異的な染色によるものではなく種間の違いによるものと考えられる。この両抗核抗体を用いて切片から遊離した chromatin 様構造物に免疫電顕を行った結果が Fig. 4 と Fig. 5 に示してある。切片から遊離した chromatin は約 10 nm の径の core 粒子が数珠状に観察され、この core 粒子へ金粒子が観察された。しかし、この展開法 (界面活性剤を用いない方法) では beads on a string 状の chromatin は観察されなかった。Fig. 4 に示すように抗 H1 抗体では金粒子は少ないが、Fig. 5 の抗 HMG 17 抗体染色では多くの金粒子が見られ、電顕レベルで切片より遊離した chromatin に high-mobility group proteins の存在を示すことができ、転写活性 chromatin であると考えられる結果を得た。しかし HMG 14/17 が nucleosome に結合した状態を電子顕微鏡観察しても特別な構造変化は見られないと報告¹⁷⁾されているように、切片から遊離した chromatin も、裸核から得た chromatin と同様に差は見られなかった。

次にこの DNase sensitive chromatin のタンパク質構成成分を検索した。Fig. 6 には精巣切片から DNase 処理して得た chromatin 分画の SDS-PAGE の泳動結果が示してある。Fig. 6 の lane 1 は切片処理に加えたと同量の DNase I 酵素タンパク質の泳動結果が示されており、その出現バンドは histone H1 より移動度が小さい 2 本のバンドと、HMG 1&2 と同じ移動度付近に存在するがそれとは明らかに区別可能な微小の 2 本のバンド、さらに histone H4 の移動度と同程度付近の 3 本のバンドが観察された。これら DNase I 酵素に含まれるタンパク質

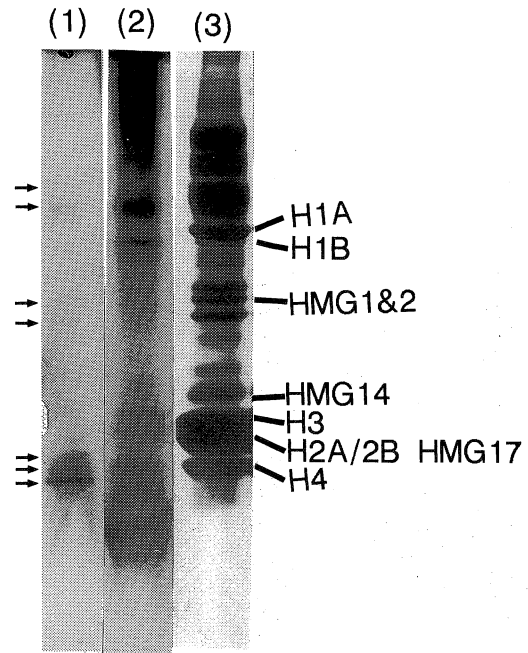


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of DNase I sensitive chromatin derived from testis sections. DNase I enzyme, as same mass of DNase I contents treated with sections, are precipitated with acetone and its precipitates are loaded (lane 1). DNase I sensitive chromatin from rat testis sections are treated with same procedure as described in DNase I enzyme and loaded (lane 2). Control loading of nuclear proteins (lane 3). Each protein of DNase I sensitive chromatin and nuclei can be distinguishable from that DNase I. DNase I sensitive chromatin is mainly consisted of H1B, H3, H4, HMG 1 & 2, and 14 & 17, H3, H4.

は今回問題としている histone や nonhistone proteins と移動度が異なり、明瞭に区別可能であった。一方 Fig. 6 の lane 2 に示すように、切片から遊離した DNase sensitive chromatin のタンパク質バンドは histone H1 では H1 B が、core histone では H3, H4 が、high-mobility group proteins では HMG 1&2, HMG 14&17 が確認された。ここで問題となるのは glutaraldehyde により固定された chromatin proteins が DNase I 抽出後、Fig. 6 の lane 2 に示した様に SDS-PAGE でそれぞれのタンパク質に分離するかどうかである。そこで精巣を同条件で固定した未包埋のものから DNase I により抽出したのが Fig. 7 の lane 3 である。Fig. 7 の lane 1 は control として未固定のシュクロース裸核を同様に DNase I

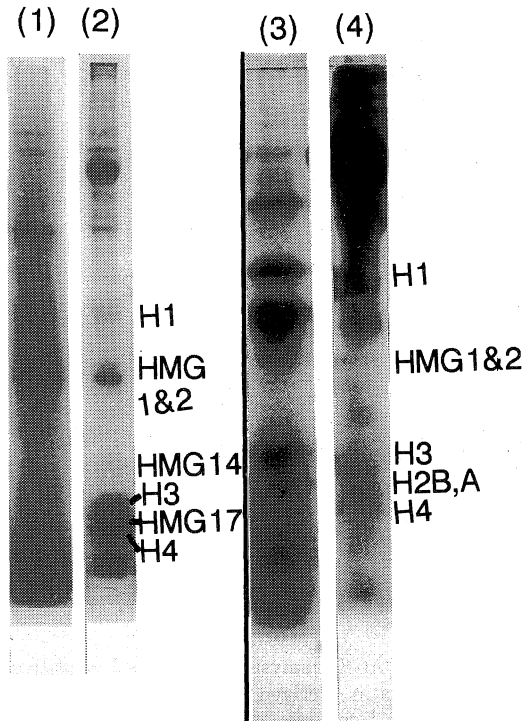


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of DNase sensitive chromatin of fixed rat testis specimen and unfixed nuclei. In unfixed nuclei, same results of protein constitutions were obtained in fig. 6 except H1A and core histones both treatment with DNase I (lane 1) and II (lane 2), and in fixed specimen, same results are thought to be obtained from sections with DNase I (lane 3) and DNase II (lane 4) treatment.

処理して得たクロマチンタンパク質を泳動した。固定した未包埋の精巣からは histone H1 は H1A&B の両方が、core histone では全てのものが、また HMG では HMG 1&2, 14&17 が観察された。従って glutaraldehyde 固定しても DNase I 処理により遊離してきた chromatin proteins の SDS-PAGE 分析は未固定の場合と同じ様に同定が可能であることがわかった。Fig. 7 の lane 2&4 は裸核および切片を DNase II 処理により得た chromatin の泳動結果で両者ともほとんど DNase I の場合と差のない結果が得られたが、切片と組織からの DNase I 抽出と chromatin とでは異なる結果が得られた。

この Fig. 6&7 の結果をまとめたものが Table 1 である。切片から遊離してきた DNase I 感受性 chromatin の特徴としては H1 では histone H1A, core histone では H2B, H2A が欠如していることである。裸核からは core

Table 1. Comparison of DNase treated chromatin proteins from sections, fixed and unfixed specimen

	SEC.	FIXED SPE.		NUCL 1	
	DN- I	DN- I	DN- II	DN- I	DN- II
H1A	-	++	++	+	+
H1B	++	+	++	+	+
H3	++	+	±	++	++
H2B	-	+	±	++	++
H2A	-	+	±	+	++
H4	++	±	+	++	++
HMG1&2	+	±	+	+	+
HMG14	+	±	+	+	+
HMG17	+	?	±	?	?

histone の部分的欠如は見られなかったし、H1 の欠如も見られなかった。これは転写活性 chromatin の含有率が低いことによる結果と思われる。

切片から得た DNase I 感受性 chromatin タンパク質分析の結果から、転写活性 chromatin 構造モデルの一例を Fig. 8 に示した。core histone を形成する H3-H4 dimer はラセン軸の中心部に位置し、H2A-H2B dimer はその外側で H3-H4 と DNA と数点で結合¹⁸⁾している。histone H1 は core histone を取り巻いた DNA の会合部に結合し、C 末端部を linker DNA¹⁹⁾へ、N 末端部を core histone を取り巻く DNA へ延ばしている。30 nm fiber は core histone - HI - DNA の 1 単位 (chromatosome, Fig. 8 の左) が内側に H1 を配置するように 6 個の chromatosome が取り囲んでいるが、この際の histone H1 は H1A と考えている。これが転写活性 chromatin へ転移するには、30 nm fiber がほどけると同時に H1A が H1B (H1A がリン酸化のような修飾されたものと考えられる) に入れ替わり、10 nm fiber が形成される。その際に H3-H4 dimer と DNA に軽く結合していた H2A-H2B dimer が除去され、HMG 14&17 が core histone を取り巻く DNA の会合部近くの DNA と、さらに H3 または H4 へそれぞれ 1 分子結合^{17,20,21)}した状態を形成すると考えられる。

考 察

この論文では電顕用包埋ブロックの切片から DNase 処理により chromatin を抽出し、SDS-PAGE 分析の結果、histone H1A, H2A と H2B が欠如していることを示し、転写活性 chromatin 構造のひとつの形態について報告した。

INACTIVE CHROMATIN

ACTIVE CHROMATIN

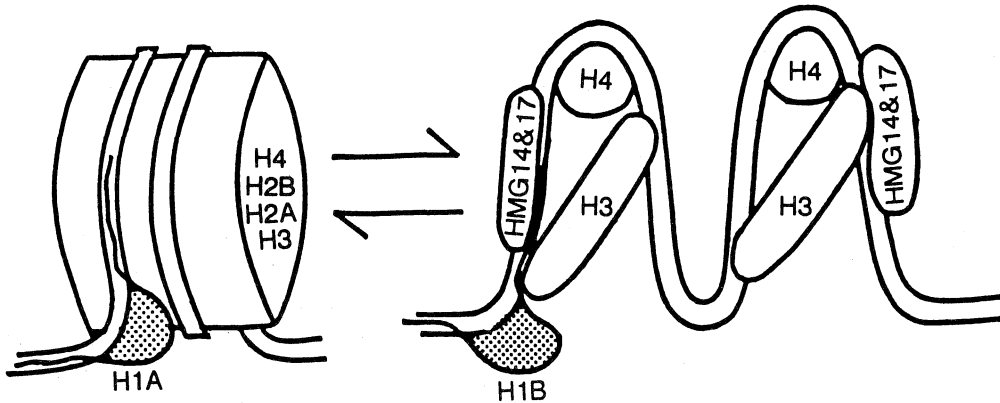


Fig. 8. Transcriptional model, on the basis of this results, is proposed that active chromatin may be replaced of HMG 14 & 17 from H2A-H2B, and of H1B from H1A constructed inactive chromatin whose H3-H4 dimer of core histones are in central region among double helix of DNA, and H2A-H2B dimer of them bind to both DNA and H3-H4. In this characteristic model, H1A resides in spacer/hinge region of DNA in inactive chromatin, and H1B, which may be phosphorylated with H1A, may reside in extended nucleosome in active chromatin.

電顕用包埋ブロックの切片から chromatin を抽出したという報告はこれまでにないが、固定した光顕用切片を用いて mRNA の合成を行い、PCR 法に使用できることが報告¹⁰⁾されており、固定状態でも酵素の作用が可能であると考えられる。また glutaraldehyde の DNA への作用は DNA を構成する塩基中、guanine のみが free の amino acid residue を持っているが、この部位が固定されても、DNase に対する阻害効果は少ないと考えられる。一方 Fig. 1-b で示したように、樹脂包埋された組織から組織の一部が酵素により遊離するのは、切片を白金蒸着してみると切片表面から組織の一部が顔を出しており、DNA 分解酵素の作用を受けやすくなっていると考えられる。

chromatin に対する DNase I の作用は DNA への核タンパク質の masking の程度や種類により異なる。さらにここでは樹脂による masking も影響してくると思われる。例えば Albright ら²²⁾は chromatin に high mobility group proteins(HMG 14&17)が存在する場合、DNase I で遊離してくる DNA のサイズは histone-DNA 複合体の場合よりも、160~220 塩基対のより長いものが切り出されると報告している。

さらに樹脂の覆われ方によっては、DNase I による切断部位が裸核の場合と異なって数倍の長さにもなる場合も考えられるので、大きな chromatin block が切片から遊離しても不思議ではないと考えられる。

MRL/Mpj lpr/lpr は自己免疫疾患発症マウスとしてよく知られており、生後 8 週を過ぎる頃からリンパ節の腫脹が起こり、血中に抗 DNA 抗体や抗 Sm 抗体などが出現してくる。これまで牛肝臓より得た histone タンパク質を BALB/c mice に投与して抗核抗体を得ていたが、これから monoclonal 抗体を作成した際にラットへは染まらない抗体などが得られ、問題があった。そこで MRL mice へ、ラット核抗原を投与して抗核抗体 (polyclonal および monoclonal) が得られないかと考え、精製抗原を 5 週令♀マウスへ投与すると、約 3 週間後には血中に抗 HMG 抗体や、抗 H1 抗体が出現してきた。幸いにも血中には他の抗核抗体は出現せず、これを polyclonal 抗体として使用可能であった。

切片からの DNase sensitive chromatin proteins の分析から転写活性 chromatin には histone H1 のうち H1A が、core histone のうち H2A, H2B histone が欠如し、H1B, H3, H4, HMG1&2, 14&17 が存在していたことがわかった。

転写活性 chromatin の形態で、core histone の H2A-H2B が 1 分子ずつ欠如し、core 粒子からこの H2A-H2B がはずれる事が RNA polymerase II の DNA への結合に必要なではないかとの報告²³⁾や、Ryoji ら²⁴⁾が転写活性を有する chromatin は topoisomerase II により負の supercoil を形成するが、その際に H3-H4 か、あるいは H2A-H2B が chromatin に結合した状態で nu-

clesome が半分に分割した構造を取っているのではないかという報告, さらに最近では Hayes ら²⁶⁾が H2A-H2B が core histone を形成していると転写調節因子の TF III A が 5S RNA の転写に対して抑制的に働くことなどを報告していることから, 転写活性 chromatin には H2A-H2B の monomer, あるいは dimer が欠如していることが考えられる. 今回の切片からの DNase sensitive chromatin の SDS-PAGE 分析結果はこれを支持していると考えられ, この chromatin は転写活性を有する chromatin が得られていると思われる. 従って転写不活性な chromatin core 粒子は H3-H4, H2A-H2B core histone が octamer を形成しているが, 転写活性な chromatin のそれはひとつの形態として H2A-H2B monomer ないしは dimer が欠如した構造をとっているものと今回の結果から考えられる.

さらに histone H1 のうち, H1A が欠如し H1B が存在する結果について, 現在の所, histone H1 は定説として転写抑制因子として受け入れられているが, 最近, histone H1 にも chromatin に対して positive な作用をしていることが報告されている. 即ち, Oikarinen²⁶⁾は histone H1 が転写活性因子である CTF/NF-1 と AP-1 (fos/jun)のうち CTF/NE-1 が histone H1 に対して修飾作用を及ぼし, 修飾された histone H1 は chromatin 構造を変化させ核内 receptor (steroid hormone などの) の遺伝子発現に対して促進的に働き, 一方 AP-1 の方は HI を抑制的に働かせているのではないかと報告している. また Laybourn & Kadonaga²⁷⁾は H1 で抑制された chromatin の場合に, 転写活性因子である SP1 と GAL4-VPI6 を加えると転写活性は histone H1 欠如 chromatin にこれを加えた場合に対して, 200 倍以上になることを報告している. この結果は H1 が chromatin に対して単に抑制的に働き, 取り除かれることによって転写活性 chromatin 状態にするのではなく, 転写活性因子により修飾を受けた histone H1 が chromatin 構造に対して能動的に転写活性に作用していると考えられる. この点に立って切片からの chromatin proteins に histone H1 の一種(H1B)が存在することは, 転写活性因子と共に chromatin の構造変化に働いて chromatin 活性化にかかわっているのではないかと考えられる. この histone H1 は約 5~6 種類の subtype からなり, 細胞の生理的役割を果たす中でリン酸化, ADP-ribosyl 化, アセチル化などをうけ, 機能していると考えられるが, この修飾と subtype との関係もまだ不明である. 切片から得られた histone H2A-H2B 欠如転写活性 chromatin と考えられる DNase 感受性 chromatin に histone H1A

が欠如し, H1B が存在していたことは興味あることである.

文 献

- 1) Weintraub, H. and Groudine, M. : Science 193 : 848, 1976.
- 2) Smith, R. D., Seale, R. L. and Yu, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80 : 505, 1983.
- 3) Lawson, G. M., Knoll, B. J., Rarch, C. J., Woo, S. L., Tsai, M. J. and O'Malley, C. J. : J. Biol. Chem. 257 : 1501, 1982.
- 4) Fritton, H. P., Sippel, A. E. and Igo-Kemenes, T. : Nucleic Acids Res. 11 : 3467, 1983.
- 5) Smith, R. D. and Yu, J. : J. Biol. Chem. 259 : 4609, 1984.
- 6) Serfling, E., Jasin, M. and Schaffner, W. : Trends. Genet. 1 : 224, 1985.
- 7) Cockerrill, P. N. and Garrard, W. T. : Cell 44 : 273, 1986.
- 8) Villeponteau, B., Lundell, M. and Martinson, H. : Cell 39 : 469, 1984.
- 9) Vidali, G., Boffa, L. C., Bradbury, E. M. and Allfrey, V. G. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 : 2239, 1978.
- 10) Tecott, L. H., Brachas, J. D. and Eberwine, J. H. : Science 24 : 1661, 1988.
- 11) 中山正成, 橋本研二, 奥田喜一, 山本浩司 : 奈医誌. 40 : 441, 1989.
- 12) Goodwin, G. H., Rabbani, A., Nicolas, R. H. and Johns, E. W. : FEBS Lett. 80 : 413, 1977.
- 13) Reichlin, M., Nisonoff, A. and Margoliash, E. : J. Biol. Chem. 245 : 947, 1970.
- 14) Chauveau, J., Moule, Y. and Rouiller, C. : Exp. Cell Res. 11 : 317, 1956.
- 15) Laemmli, U. K. : Nature 227 : 681, 1970.
- 16) Westermann, R. and Grossbach, U. : Chromosoma 90 : 355, 1984.
- 17) Paton, A. E., Singley, E. W. and Olins, D. E. : J. Biol. Chem. 258 : 13221, 1983.
- 18) Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. and Klug, A. : Nature 311 : 532, 1984.
- 19) Noll, M. and Kornberg, R. D. : J. Mol. Biol. 109 : 393, 1977.
- 20) Sandeen, G., Wood, W. I. and Felsenfeld, G. : Nucleic Acids Res. 8 : 3757, 1980.

- 21) **Brawley, J. and Martinson, H. G.** : *Biochemistry* **31** : 364, 1982.
- 22) **Albright, S. C., Wiseman, J. M., Langer, R. A. and Garrad, W. T.** : *J. Biol. Chem.* **255** : 3673, 1980
- 23) **Baer, B. W. and Rhodes, D.** : *Nature* **301** : 482, 1983.
- 24) **Ryoji, M. and Worcel, A.** : *Cell* **40** : 923, 1985.
- 25) **Hayes, J. J. and Wolfe, A. P.** : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89** : 1229, 1992.
- 26) **Oikarinen, J.** : *FEBS Lett.* **294** : 6, 1991.
- 27) **Laybourn, P. J. and Kadonaga, J. T.** : *Science* **254** : 238, 1991.
- 28) **Linder, H., Helliger, W., Dirschlmaier, A., Talasz, H., Wurn, M., Sarg, B., Jaquemar, M. and Puschendorf, B.** : *J. Chromatography* **608** : 211, 1992.