

氏 名 (本籍)	よこ 横	つか 塚	こう 弘	き 毅 (栃木県)
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農博第	72	号	
学位授与年月日	昭和45年	3月	25日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻			
学位論文題目	ヒストンの分別と1次構造に関する 研究			

	(主 査)			
論文審査委員	教授 志村憲助	教授 玉利勤治郎		
		教授 山下恭平		

論文内容要旨

第 1 章 序 論

細胞分化を特徴づける遺伝子活性は、リボソーム上で特定のタンパク質を合成するための特定の情報を、DNAからm-RNAに転写するDNA依存RNA合成によって発現される。しかし、1つの生物のすべての細胞には、同等の遺伝情報が含まれているとするならば、特定の情報を発現するためには、遺伝子の活性を特異的に制御する機構が存在せねばならない。

この様な見地から、1950年、Stedmanらは、「DNAと結合した形で存在する塩基性タンパク質“ヒストン”に遺伝子抑制体としての役割」を与え、遺伝情報が発現する機構を説明する1つの仮説を提出した。

このStedmanらの仮説提出以来、ヒストンが生体内で果たす役割を追求する試みが多数の研究者によってなされてきた。しかし高等生物のヒストンはいずれも数種以上の分子種よりなり、本研究開始当時は、各種ヒストン間の構造上の差異はもちろん、いかなる種類のヒストンも純粋にとりだされておらず、ヒストンの構能を知る上で大きな障害の1つとなっていた。

それ故に、本研究ではまず、均一なヒストン成分を単離するための分別手段の開発を目的とし、向流分配法による分別手段を確立した後、この方法を用いて子ウシ胸腺、カイコ後部及び中部絹糸腺ヒストンを分別して得られるヒストン成分につき、その化学的性質を明らかにする事によって、種及び組織間のヒストンの関係や一般的性質を明らかにする事を試み、最後に、精製されたヒストン成分中から、高Arg型(子ウシ)ヒストン成分を選んで、その1次構造決定を進めた。

第 2 章 向流分配法のヒストンの分別に対する適用

序論で述べた様に、ヒストンは不均一で多成分よりなるタンパク質であるが、本研究以前にもいくつかのヒストン成分の分別がクロマト系でなされていた。しかし、均一なヒストン成分を得るには至らず、分別手段の開発が重要な目標の1つとなっていた。

そこで、ヒストンが比較的低分子で酸性条件下では高濃度の有機溶媒を含む水溶液中でも溶存する事に注目し、ヒストンの分別手段の1つとして向流分配法の適用を試みた。種々の溶媒系を検索した結果、尿素とトリクロル酢酸(TCA)を含む水-ブタノール-2溶媒系が、ヒストンの分別に適当である事を見出した。

前記溶媒系においてヒストンの分配係数に及ぼす尿素とTCAの影響を調べてみると、分配係数は、TCAの濃度を上げると上昇し、逆に尿素の濃度を上げると減少した。これらの関係は、CM-セルロースクロマトグラフィー(又は分別抽出)を用いて全ヒストンより分別して得た4つのヒストン画分(F1, F2a, F2b, F3)についても同様であった。

図1は、各ヒストン画分に対する尿素とTCAの影響を示したものであるが、F1以外の各区分は

いずれもその影響がみられ、TCAと尿素の濃度を適当に定める事によって、各画分の分別に適した溶媒系を選択する事が出来た。

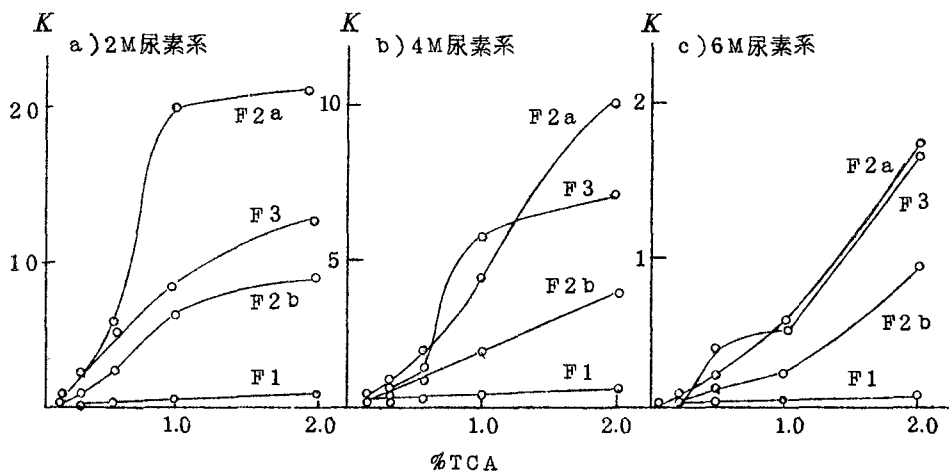


図1 各ヒストン画分(子ウシ胸腺)の分配係数に及ぼすTCAと尿素の影響

第3章 向流分配法による各ヒストン画分の分別

向流分配法によるヒストンの分別は、前記の溶媒系を用い、25°Cで基本操作を行なう事によってなされた。

図2は、2M尿素-2%TCA系によって、高Lys型C-F1、PS^{*}及びMS-F1aを分別したものであるが、いずれも単一の主ピークを与え、分別困難であったので、Amberlite CG-50クロマトグラフィーによってL1及びL2ヒストン成分を得た。

ややLys型C-F2aは、4M尿素-0.5%TCA系で向流分配すると、2つの主要なピーク、SL1、A1を与え、一方カイコPS^{*}及びMS-F1bは、それぞれ3つの主成分SL1、SL2、SL3に分別できた(図3)。

*C-, PS-, 及びMS-は、それぞれ子ウシ、カイコ・後部及び中部絹糸腺ヒストンを示した。

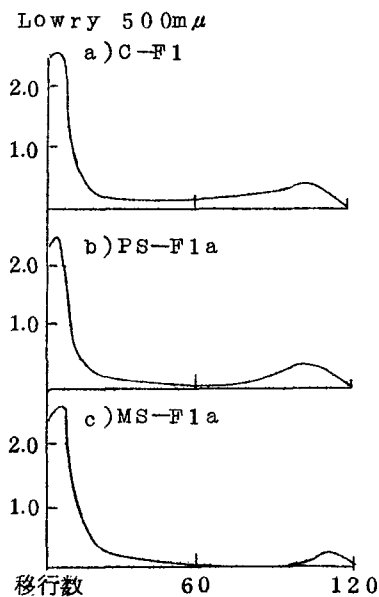


図2 高Lys型(F1)ヒストンの分配

もう1つのややLys型ヒストンであるC-F2b, PS-及びMS-F2は, 3M尿素-0.5% TCA系によって分別すると, 図4に示す様な成分が得られたが, カイコ・ヒストンでは, 3つの主成分に分離した。しかし, 得られた各成分を分析してみると, アミノ酸組成, 電気泳動の移動度, N-及びC-末端アミノ酸において, F1bに含まれるSL2及びSL3と一致した成分が分別されている事が判明した。従って, F2画分にはA1成分のみが含まれていると結論するのが妥当であると考えた。同様の理由から子ウシC-F2bには, SL2, SL3, A2の他にC-F2aの主成分であるA1が混在した。

高Arg型F3は, 4M尿素-0.5% TCA系で更に2つの主成分に分別された。図5の管系列の最初の主ピークは, ややLys型ヒストンSL4であり, 2番目のピークは, 高Arg型A2成分と微量のA1成分を含んでいた。

この様にして得られたヒストン成分は, アクリルアミドゲル電気泳動, アミノ酸分析, N-及びC-末端アミノ酸分析がなされ, 比較検討の結果, いずれの組織からのヒストンでも, 2種の高Lys型ヒストン, 4種のややLys型ヒストン, 2種の高Arg型ヒストンを含み, これは高等生物における主要なヒストン成分の普遍性を示唆したものと考えられ。又, 全ヒストンを電気泳動してみられる主要な泳動帯を, これら8種のヒストン成分で説明できる事から, ヒストンの不均一性は, 限られた数のヒストン分子種より成り立っていると思われる。

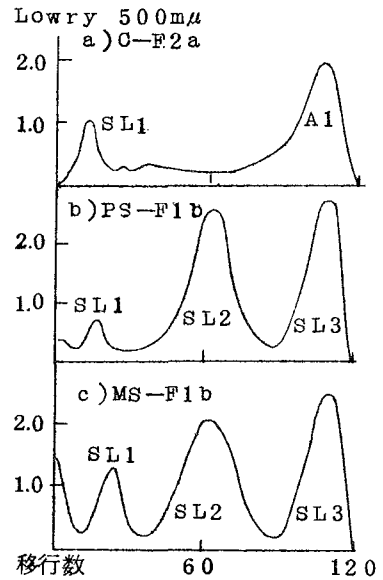


図3 ややLys型ヒストン(F2a, F1b)の分配

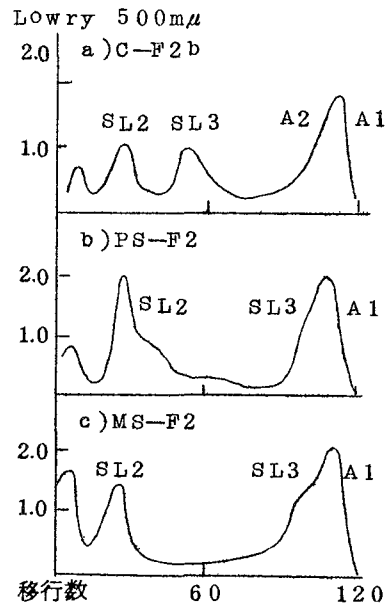


図4 ややLys型ヒストン(F2b, F2)の分配

表1は、得られたヒストン成分の分類を試みたものであるが、8種のヒストン成分の化学的性質は、非常に特徴的であると同時に、異なった組織間のヒストンでも類似性が存在する事が明らかとなった。しかし、異なった種のヒストン間では、その類似性は減少し、特に高Lys型ヒストンのアミノ酸組成及び各種ヒストン成分の末端アミノ酸にみられるように、種特異性が確認できた。

第4章 子ウシ胸腺ヒストン成分の1次構造

1. ヒストン成分の精製

前章で示した様に、子ウシ胸腺F3画分から高Arg型A2成分が得られた。この成分中にはA1成分が混在し、更に精製する必要がある。そこで、A2成分を4M尿素-0.3% TCA系で向流分配し、更に6M尿素-2% TCA系で再分配するか、或いはSephadex G-75を用いたゲルろ過法によって、高度に精製されたA2成分を得た。本ヒストン成分は、電気泳動的にも、末端分析でも均一なヒストンと認められた。表2はこのヒストン成分のアミノ酸組成を示したものであるが、Glu, Arg, Ala含量が多く、CySH及びLys(Me)が含まれている点が他のヒストン成分と異なる点である。又、分子量は、アミノ酸組成からの計算値では、16,332又N-及びC-末端基分析もほぼ同様な値を示した。

2. ヒストン成分のトリプシン分解

表2に示した様に、ヒストン1分子中には1分子(或いは2)のCySHが存在する。そこでこのCySHを β -メルカプトエタノールで還元後、ヨード酢酸でアルキル化する事によって保護し、S-カルボキシメチル化(S-CM化)ヒストンを得た。S-CMヒストンのアミノ酸分析の結果は、CySHのアルキル化が完全であり、他のアミノ酸はほとんど影響を受けていない事を示した。

この様にして得られたS-CMヒストン68.3mg(約4.18 μ モル)を、S/E 100で37°C、6時間トリプシン分解し、分解開始後数分で生じた不溶性Coreを除去後、可溶性ペプチドを精製するために、Dowex 50X-2, S/E-Sephadex C-25, Dowex 1X-2, ペーパークロマトグラフィーなどを用いて分別を行なった。

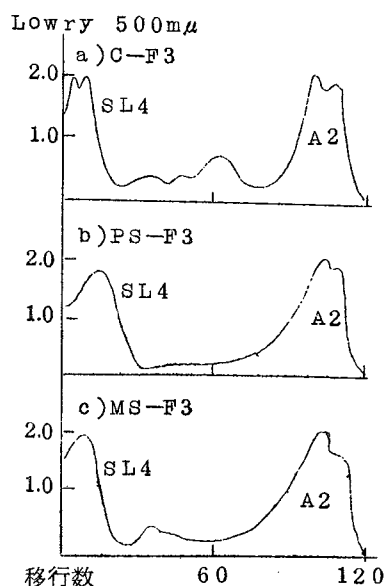


図5 高Arg型(F3)ヒストンの分配

Summary of Characteristics of Calf Thymus
and Silkglad Histones

Component	CCD	Lys/Arg	Electro- phoresis	N-	C-	Amino acid composition
Histone L1						
Calf	2M Urea	12.0		x	-	>Lys, Ala, Pro
P-Silk	-2% TCA	-	Slow	-	-	<His, Met, Tyr, Phe
M-Silk		8.5		x	Ala	Silk; 15% Ser
Histone L2						
Calf	2M Urea	12.0		x	-	>Lys, Ser, Ala, Pro
P-Silk	-2% TCA	8.4	Slow	x	Ala	<His, Met, Phe
M-Silk		-		-	-	
Histone SL1						
Calf	3~4M Urea	1.2		x	-	Calf; >Gly, Ala, Leu
P-Silk	-0.5~0.7%	2.3	Interme- diate	-	-	Silk; 8~9% Ser
M-Silk	TCA	2.5		x	Ala	
Histone SL2						
Calf	3M Urea-	2.7		Pro	-	Calf; 18% Lys, 11% Ala, 11% Ser
P-Silk	0.5% TCA	3.6	Interme- diate	x	Lys	Silk; Lys, Arg, Gly
M-Silk		3.3		x	Lys	Ala, Leu, Lys(Me)
Histone SL3						
Calf	3~4M Urea-	2.9		Pro	-	Calf; 18% Lys, 11% Ala, Silk; 11%
P-Silk	0.5~0.7% TCA	1.1	Interme- diate	Ala	Ala	Ser, Lys, Arg, Gly
M-Silk		1.0		Ala	Ala	Ala, Leu, Lys(Me)
Histone SL4						
Calf	4M Urea-	2.3		-	-	Calf; 16% Lys, 17% Ala, 8% Pro
P-Silk	0.5% TCA	1.0	Slow	Ala	Lys	Silk; Lys, Arg, Glu,
M-Silk		1.6		Ala	Lys	Ala P-Silk; Lys(Me)
Histone A1						
Calf	3~4M Urea-	0.7		x	-	12-15% Ala, 2-3%
P-Silk	0.5% TCA	0.9	Fast	Ala	Ala	Pro, Ser
M-Silk		0.9		Ala	Ala	Calf; 1% Lys(Me)
Histone A2						
Calf	4M Urea-	0.7		Ala	Ala	CySH Lys(Me) Calf; Arg, Glu, Ala
P-Silk	0.5% TCA	0.9	Interme- diate	Ala	Ala	Silk; 6~11% Gly,
M-Silk		0.8		Ala	Ala	10~12% Ala, 9~10% Leu

x ; Blocked

一方、不溶性Coreは水、酢酸等に溶解しなかつたので、99%ギ酸に溶解してからSephadex G-25につけ、10%ギ酸で溶出する事によって分別した。しかし単一のピークしか与えなかつたので、アミノ酸分析を行なってみると、1.6モル%のMetが存在したので、Met部位でのペプチドの化学的切断を試み、ブロムシアンで処理後、Sephadex G-50によって再分別を試み、2つの主要なピークを得た。各々のピークは更にゲルろ過法によって精製を行なった。以上の様にして得られたトリブシン分解ペプチドは、通常のエドマン分解法(消去法)及びカルボキシペプチダーゼ法によって構造決定を行なったが、それらの結果は、表3に示した。表3のペプチドのアミノ酸組成から検討すると、ヒストンのアミノ酸組成のほとんどを説明する事ができた。

3. ヒストン成分のキモトリブシン分解

タンパク質の構造決定は数種の異なった分解酵素によって切断したペプチドの構造決定を行ない、各々のペプチドを組み合わせる事によってなされる。それ故に、トリブシン分解ペプチドの構造決定と並行して、キモトリブシンによる分解を試みた。分解には、ヒストン29mg(約1.8 μ モル)を用い、S/E100, pH8.0, 37Cで90分の消化を試みた。不溶性Coreは前回と同様に生じたが、pHを3.0とする事によって消失したので、そのままSephadex G-25カラムにつけ、0.2N酢酸で溶出して分別した。

その結果、2つの主ピークが得られたので、それぞれをゲルろ過法によって精製後、ペーパークロマトグラフィーによって分別を行ない、5つのペプチドを得た。これらのうち、2つはTyrを含むペプチド、1つはC末端由来のTyr及びPheを含まないペプチド、残りの2つは、各々2個のPheを含むペプチドである事がわかり、トリブシン分解ペプチドの場合と同様に、ヒストン成分のアミノ酸組成をほぼ説明できた。これらのペプチドのアミノ酸組成は表3に示した。

4. 全1次構造の推定

前項に述べた様に、キモトリブシン分解によって、Tyrを含むペプチド2種、Tyr及びPheを含まないペプチド1種、2個のPheを含むペプチド2種が得られた。Tyr及びPheを含ま

表2 ヒストン成分のアミノ酸組成

Residue	Ratio	Number
Lys	12.2	12
Lys(Me)	1.4	1
His	1.8	2
Arg	19.0	19
Asp	6.7	7
Glu	16.6	17
Thr	12.0	12
Ser	4.7	5
Met	1.8	2
Cy α H	1.5	1(2)
Pro	7.0	7
Gly	7.2	7
Ala	20.1	20
Val	6.3	6
Ileu	6.9	7
Leu	12.9	13
Phe	2.3	2
Tyr	4.0	4
Total		144(145)
M. W. : Calcd. 16,332		
Found 17,000 \pm 3,000/N-Ala		
16,700 \pm 2,000/C-Ala		

表 3 トリプシン分解ペプチド(上)とキモトリプシン分解ペプチド(下)のアミノ組成及び構造

Ala(T1), Glx-Thr-Ala-Arg(T2), (Arg1.00, Ala0.55, Glu0.29)(T3-1), (Asx 0.94, Thr0.97, Glx1.44, Pro1.17, Ala1.44, Val1.08, Met0.58, Ileu1.97, Leu0.86, Arg1.00)(T3-2), Lys(T3-3), Asx-Ileu-Glx-Leu-Ala-Arg(T5-1), Ser-Ala-Pro-Ala-(Thr, Gly2)-Val-Lys(T5-2), Val-Thr-Ileu-(Met, Pro)-Lys(T6-1), Glx-Ileu-Ala-Glx-Asx-Phe-Lys(T6-2), (Ala, Thr, Ser, Glx, Gly, Leu)Lys(T7), Glx-Thr-(Ileu, Leu2)-Arg(T8-1), Thr-Asx-Leu-Arg(T8-2), Arg(T9-1), Glx-Ala-Thr-Arg(T9-2), Thr-Lys(T10), Ala-Pro-Arg(T11-1)Ala-Ala-Arg(T11-2), Lys(Me)-Ser-Ala-Pro-Ala-(Thr, Gly2)-Val-Lys(T11-3), Ala-Arg(T12), Glx-Lys(T13), Leu-Val-Arg(T14-1), (Thr, Ser, Gly2)Lys(T14-2), Ileu-Arg(T15-1), (Thr, Glx, Ala, Leu)Lys2(T17), (Glx, Gly)Arg(T18);(Lys, Arg2, Asx, Glx3, Thr, Ser, Met, CysH, Pro, Gly2, Ala2, Val, Ileu, Leu3, Tyr, Phe)(Tc1), (Lys, His2, Arg2, Asx, Glx3, Thr, Ser, Pro, Gly, Ala2, Val, Ileu, Leu3, Tyr, Phe)(Tc2)

(Lys2, Arg4, Asx3, Thr2, Ser2, Glx7, Pro, Ala4, Val2, Met, Ileu, Leu4, Phe)Phe(Ch3-3);(Lys2, Arg, Asx, Thr2, Ser2, Glx6, Gly, Ala4, Val, Met, Ileu2, Leu2)Tyr(Ch3-2);(Lys2, Arg5, Thr2, Glx2, Gly, Ala3, Ileu)(Ch3-1);(Lys2, Arg4, Asx, Thr2, Ser, Glx3, Pro3, Gly2, Ala3, Val2, Ileu2, Leu5, Phe)Phe(Ch3-4);(Lys6, Lys(Me), His2, Arg5, Thr4, Ser2, Glx2, Pro4, Gly5, Ala9, Val2, Leu)Tyr(Ch2a-1)

いペプチドは明らかにC末端ペプチドと考えられるが、残りの4種のペプチドのヒストン分子における配列を考えると計24通りの組み合わせが期待できる。しかし、不溶性Coreには、各々1個ずつのTyr及びPheがあり、更にアミノ酸残基数を考えると、可能な組み合わせは4通りに限られる。

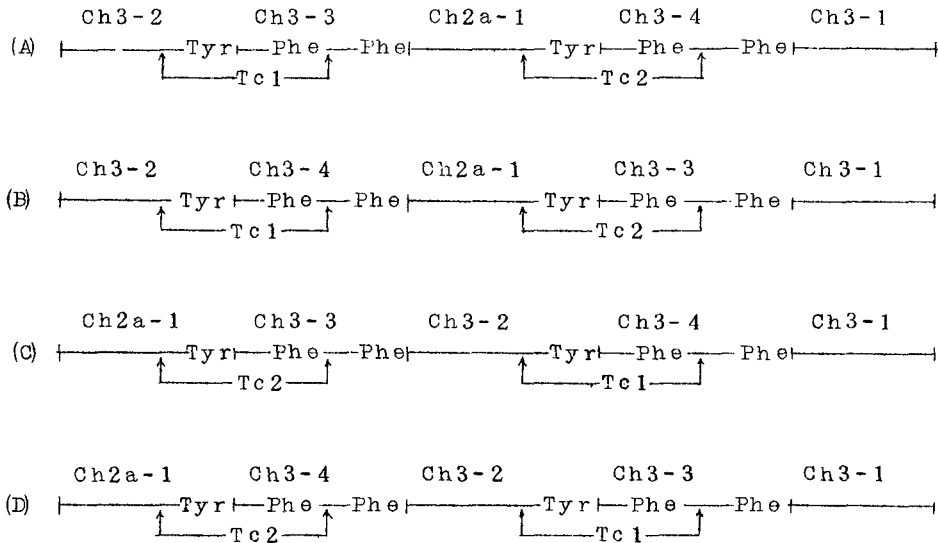


図6 トリプシン分解・Coreを考慮したキモトリプシン分解ペプチドの組合わせの推定

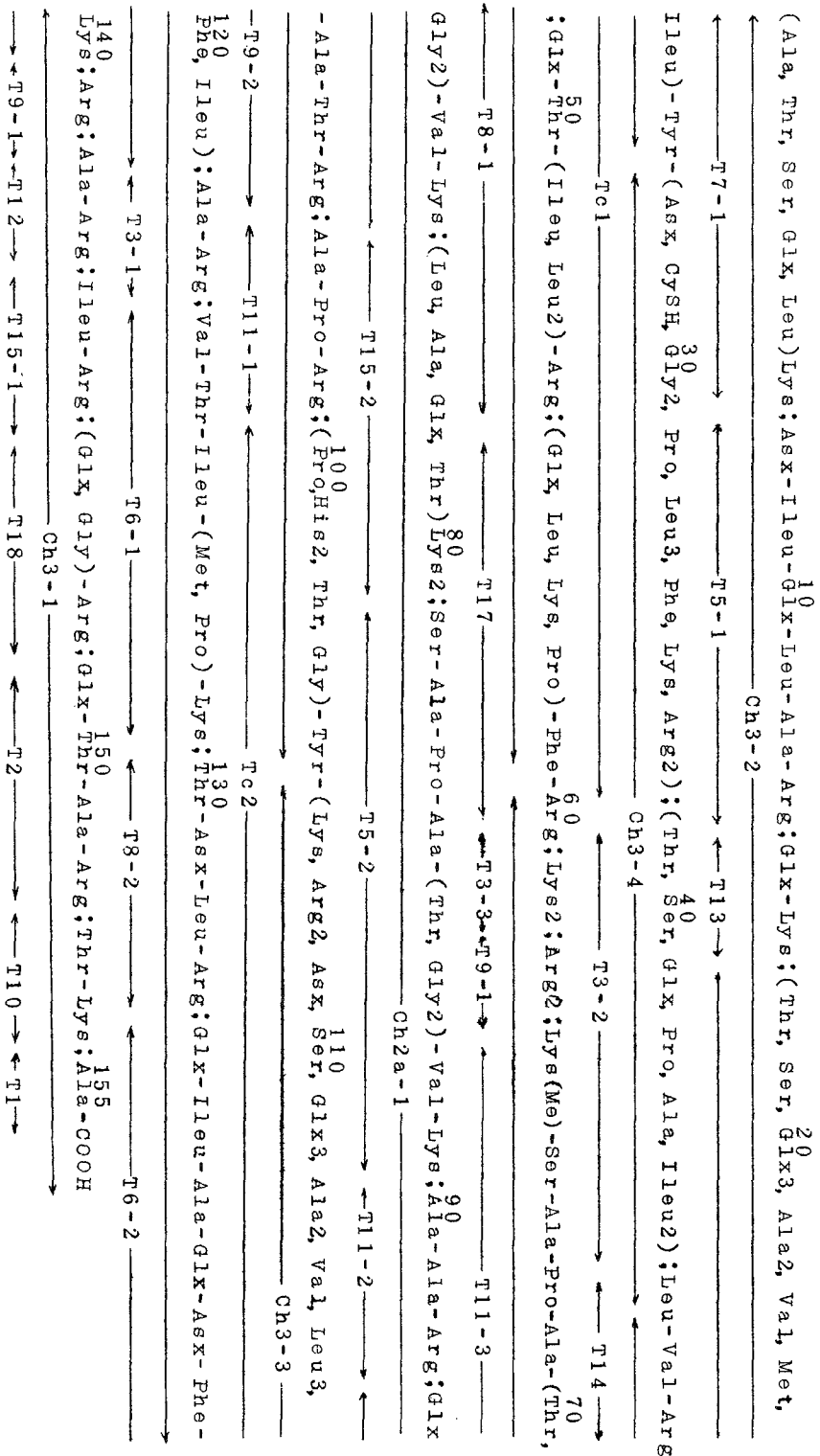
図6は、可能な組合わせ(A),(B),(C),(D)を示したものであるが、Coreの位置は、次の理由から定められる。すなわち、Tc1にはHisはなく、Metが1個含まれ、Tc2には、逆に、MetがなくHisは2個含まれる。するとHisが含まれるのは、Ch2a-1のみであり、Ch3-2はMetを含むので、図6に示した位置以外にCoreが入る事はできない。

しかも(A)と(D)は、(Ch3-2)-(Ch3-3)ペプチド中に、1個のGlyを含むだけであるが、Tc1には、Glyが2個含まれているので、これら組合わせは否定できた。次にCh3-3ペプチドには1個のMet及びProを含む。これに相当するペプチド(トリプシン分解)は、T6-1のみである。従ってT6-1をCh3-3に組入れると、Proが1個含まれるので、Pheを含むT17はCh3-4のC末端ペプチドとなり得る。

この様を推定をくり返す事によって図7に示した様な可能な1つの全1次構造を推定できた。

要 約

1. 子ウシ胸腺、カイコ後部及び中部絹糸腺から抽出したヒストンをCM-セルロースカラム(又は分別抽出法)によって、高Lys型ヒストン、ややLys型ヒストン2種、高Arg型ヒストンの4群に大別した。これらのヒストンは、アクリルアミドゲル電気泳動で更に数成分に分離し、いずれも不均一であった。



7 Tentative Amino Acid Sequence of Calf Thymus Histone A2

2. そこで、これらの不均一なヒストンに対して向流分配法の適用を試み、尿素-TCA-水-ブタノール-2より成る溶媒系を用いての向流分配が、ヒストンの分離精製的手段として有効であり、しかも尿素とTCAの濃度を変化させる事によって、目的にあった分配係数を持つ溶媒系を選択する事が可能である事を見出し、種々のヒストンの分別に対して向流分配法が試みられた。

3. その結果、子ウシ胸腺、カイコ後部及び中部絹糸腺ヒストンは、高Lys型ヒストン成分2種、ややLys型ヒストン成分4種、高Arg型ヒストン成分2種の計8種のヒストン成分をそれぞれ含む事を見出した。各々のヒストン成分を分析した結果、各組織には対応するヒストン成分が存在し、類似性が示されたが、種間のヒストンには著しい差異がみられ、種特異性が認められた。

4. この様にして得た8種のヒストン成分から、子ウシ胸腺・高Arg型ヒストン成分を選び、1次構造決定がなされた。このヒストン成分は、分子量約16,500, AlaをN-及びC末端アミノ酸とする単純タンパク質である。

ヒストン成分はまず、トリプシン分解し、得られたペプチドの構造を決定した後、キモトリプシン分解ペプチドを検討する事によって、全1次構造を推定したが、これらペプチドのアミノ酸組成は、ヒストン成分のアミノ酸組成を良く説明し、高度に精製されたヒストン成分が向流分配法によって得られた事を示した。

本研究に関連して発表した論文名

- 1) K. Yokotsuka, M. Yoshida and K. Shimura, J. Biochem., 60, 595 (1966) "Fractionation of Histones by Counter-Current Distribution"
- 2) M. Yoshida, K. Yokotsuka and K. Shimura, J. Biochem., 60, 586 (1966) "Amino Acid Composition and Heterogeneity of Histones from Posterior Silk gland"
- 3) K. Yokotsuka, M. Yoshida, H. Nagayama, IV Inten. Congr. Biochem. Abst., p581(1967) "Counter-Current Distribution of Histones: Fractionation of Histone Fractions from Silk gland and Calf Thymus."
- 4) K. Yokotsuka, M. Yoshida and K. Shimura, J. Biochem., 64, 129 (1968) "Fractionation of Histones from Calf Thymus and Posterior Silk glands by Countercurrent Distribution"

- 5) 横塚弘毅, 志村憲助, 第19回タンパク質構造討論会予講集 p. 5 (昭和43年10月) “向流分配による子ウシ胸腺ヒストンの分離精製”
- 6) K. Yokotsuka and K. Shimura, [Histones and Gene Function] p. 20 The Research Group of Histones and Gene Function in Japan(1969) "Fractionation of Histones by Countercurrent Distribution and Structure of Arginine-Rich Histone from Calf Thymus".
- 7) K. Yokotsuka and K. Shimura, Biochim. Biophys. Acta, 投稿中
"Comparative Studies of Calf Thymus and Insect Histones"

審査結果の要旨

細胞分化を特徴づける遺伝子活性は、リボソーム上で特定のタンパク質を合成するための特定の情報を、DNA から m RNA に転写する DNA 依存性 RNA 合成によって発現される。一つの生物のすべての細胞には、同一の DNA が含まれていると仮定すると、特定の情報を発現するためには、遺伝子活性を特異的に制御する機構が存在する筈である。この調節機能を担う物質の一つとしてヒストンを推定し、本研究では、主としてヒストンの分離・精製とその一次構造の研究に重点をおいた。

従来よりヒストンの均一な成分を得る適当な方法が確立されていなかったため、著者は向流分配法の適用を考え、種々の溶媒系を検索した結果、尿素-TCA-Butanol-2 溶媒系によってヒストンの分別が可能であることをはじめて明らかにした。この方法は、尿素および TCA の濃度を変化させることにより、ヒストンの分配係数を連続的に変化させうる特徴がある。

この新しい方法を仔牛胸腺ヒストンの分別に適用した結果、8種の主要ヒストン成分を得た。カイコ後部絹糸腺および中部絹糸腺ヒストンよりも8種の主要成分が得られ、高等生物における主要ヒストン成分の普遍性を明らかにした。しかし、これら8種のヒストンはそれぞれ種特異性および組織特異性を有することがN-末端アミノ酸分析より明らかにされた。

ついで、仔牛胸腺ヒストン中の高アルギニン型ヒストンの一成分をえらび、その一次構造決定の研究を行った。ヒストンの一次構造は、本研究が着手された当時は全く明らかにされていなかったが、著者の研究と平行して他の2種のヒストン成分についても一次構造の研究が競争的に進行し、本研究の結果を含めて3種のヒストンの構造が明らかになった。3種のヒストンのアミノ酸配列は基本的には全く異っておるが、一方いくつかの共通的な特徴点も認められ、今後ヒストンの生化学的機能を解析していく上において重要な知見を与えるものである。

以上の如く、本研究は、ヒストンの分離・精製に向流分配法を新しく導入してヒストンの研究に重要な実験方法を確立し、さらにこの方法を用いて得た高純度のヒストン成分について一次構造を推定することができる段階にまで研究を進展させた。本研究は生化学の分野において寄与するところが大きく、農学博士の学位を授与するに充分の価値あるものと認める。