

氏 名 (本籍) ふか 深 ざわ 沢 ちか 親 ぶさ 房 (山梨県)

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 9 1 号

学位授与年月日 昭 和 4 6 年 3 月 2 5 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 ヒストンの種および組織特異性に  
関する研究  
－その免疫化学的解析－

論文審査委員 (主 査)  
教授 志 村 憲 助 教授 玉 利 勤 治 郎

教授 高 橋 甫

# 論文内容要旨

## 第一章 序 論

個体の各細胞は、等しくその生物の遺伝情報を有していると考えられている。従って、細胞がその環境に応じて示す形質表現の変化を説明するには、遺伝子活性の特異的制御機構の存在を設定せねばならない。

以上のような概念のもとに、高等生物の系に於いては、“遺伝子抑制因子としてのヒストン”説が1950年に Stedmanらにより提案された。

以来、この不均一で比較的 low molecular weight の塩基性核蛋白質は、蛋白質化学、分子生物学の興味ある対象として構造と機能の両側面から種々追究されて来た。

しかし、多くの研究にもかかわらず、Stedman らの仮説成立の要因である種属間あるいは組織間でのヒストンの差については、ほとんど明確な結論を得るには至らなかった。この為、遺伝子調節因子の特異性を、ヒストン自身よりむしろ他のクロマチン要素に求める仮説も提案されるに至り、高等生物に於ける遺伝子調節像は全く混沌としているのが現状である。

このようなヒストン研究の流れの中で、これまでに示されて来たヒストン分子種の著しい特異性の欠如はその特異性解析の方法論的要素にも起因しているとの立場から、蛋白質の特異性解析法である免疫化学的手法を用いる事によりヒストンの特異性を検討し、もって遺伝子調節機構解明の方向を定かにする事が本研究の目的である。

従って、本論文は先ずヒストンのウサギに対する免疫原性について述べた後、免疫化学的手法による子ウシ胸腺ヒストン、カイコ後部および中部絹糸腺ヒストン間の種および組織特異性について論じた。次いで免疫特異吸着剤を用いて組織特異ヒストン画分を分離し、そのヒストン分子種数および各々の化学的性質について言及した。

## 第二章 全ヒストンの抽出精製とその性質

本研究を遂行するに当り、重要な事は、抽出過程でのヒストンの酵素的分解および非ヒストン性蛋白のヒストン画分への夾雑の可能性を除去する事である。この為、組織ホモジネート中のプロテアーゼ活性および DNase 活性を抑える為に亜硫酸水素ソーダ、クエン酸ソーダを含んだ食塩洗浄液により十分精製した核および核蛋白から酸抽出法によりヒストンを調製し本研究に供した。また、必要な場合は DEAE - セルロースを用い更に精製した。

得られた子ウシ胸腺全ヒストン (CWH と略記する)、後部絹糸腺全ヒストン (PWH) および中部絹糸腺全ヒストン (MWH) の各々について、アミノ酸分析、カラムクロマトグラフィーおよびゲル電気泳動を行ない、その特異性を検討した。その結果、子ウシ胸腺ヒストンと絹糸ヒストンの間での電気泳動像に幾分相違が見られた他は、全くよく類似しており、これらの方法ではヒストンの特異性は、ほとんど見出し得なかった。

## 第三章 ヒストンの抗原性

免疫化学的手法をヒストンの特異性検討に適用する為、その抗原性について免疫方法を種々変えて検討した結果、Freund の完全アジュバント法による長期免疫により抗体稀釈重層法による抗体価が 32 ~ 64 を示す、抗絹糸腺ヒストン血清をウサギに対してつくらせる事に成功した。ちなみにヒストンの抗原性に関しては、これまで否定的な見解が多かった。

この抗体は免疫グロブリン G 画分に属し、抗体価 64 の場合、抗原として用いたカイコ絹糸腺全ヒストンの 85 ~ 90 % と反応した。

図 1 はプロモアセチルセルロース結合抗カイコ絹糸腺ヒストン抗体カラムによるカイコ全ヒストンの分画図である。素通り画分 (抗原性のないか、または弱い

画分)である  $Ab(P)-Fil(P)$  は全ヒストンの10~15%であった。また、図2は全ヒストン、抗体カラム素通り画分、抗体カラム吸着画分(抗原性のあるヒストン画分:  $Ab(P)-Ab(P)$ )のディスク電気泳動図である。これらの泳動像の比較からも、絹糸腺全ヒストン成分の大部分に対し抗体が出来ている事は明らかである。更に全ヒストンをCM-セルロースで5つの画分に分画し、その各々の画分の抗原性についてゲル内二重拡散法で検討した結果、図3に示されたように各画分に各々特異的なヒストンの存在が明らかとなった。以上の結果より、得られた抗絹糸腺ヒストン抗体はヒストンの特異性解析に十分用い得る事が明らかにされた。

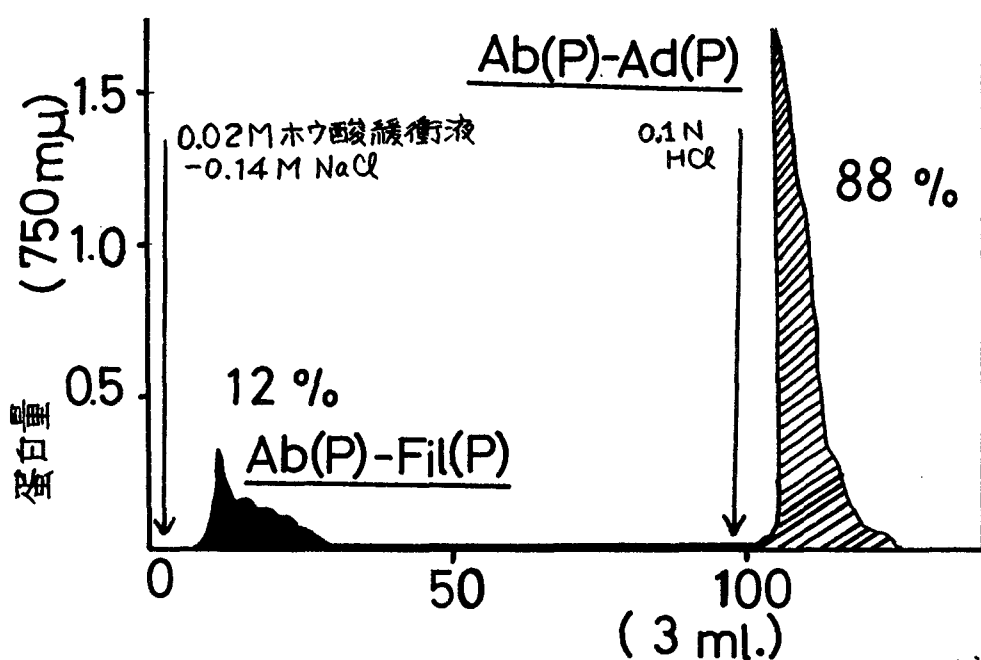


図1. 抗後部絹糸腺全ヒストン抗体結合アロモアセチルセルロースによる後部絹糸腺全ヒストンの分画図

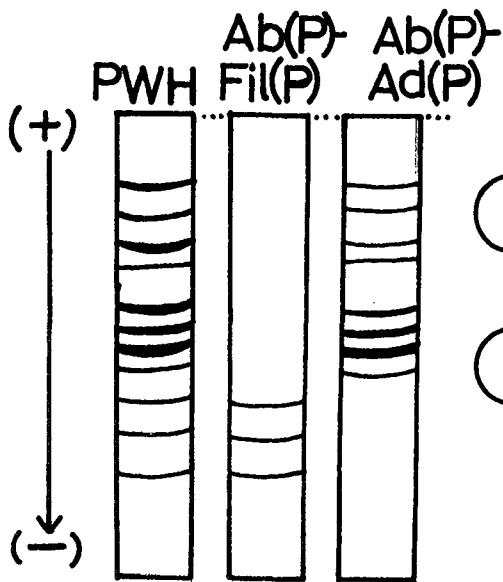
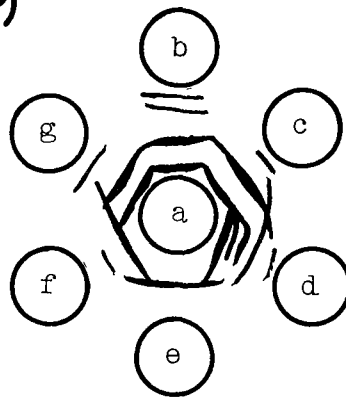


図2. PWH, Ab(p)-Fil(p) および Ab(p)-Ad(p) 画分のデキス電気泳動像の比較.



- Ⓐ Anti-PWH serum
- Ⓑ PWH
- Ⓒ F1 a
- Ⓓ F1 b
- Ⓔ F2
- Ⓕ F3
- Ⓖ F4

図3. 二重拡散法によるCM-セルロース分画各ヒストン画分の抗原解析図.

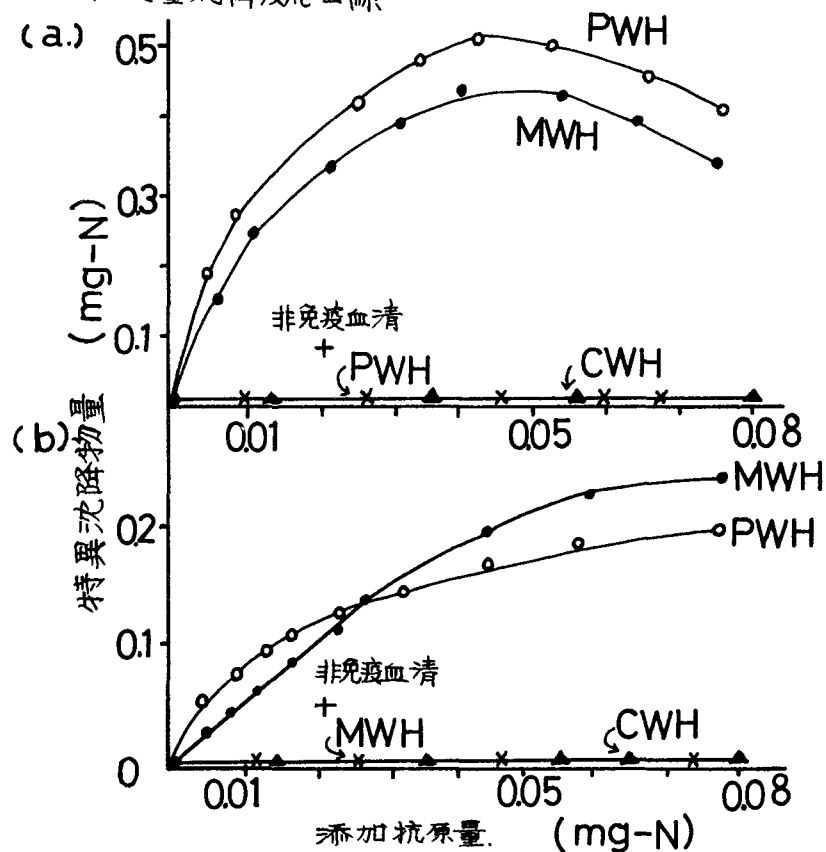
#### 第四章 ヒストンの種および組織特異性の免疫化学的検討

第三章に於いて得た抗カイコ絹糸腺ヒストン抗体を用い、子ウシ胸腺ヒストン、後部絹糸腺ヒストンおよび中部絹糸腺ヒストンの間の特異性について検討した。用いた方法はゲル内二重拡散法、免疫電気泳動法、定量沈降反応および吸収試験である。いずれの方法によっても、子ウシ胸腺ヒストンとカイコ絹糸腺ヒストンの間には著しい抗原性の差異がある事が明らかにされた。更にまた、両絹糸腺間に各々特異的なヒストンが存在する事も示された。図4は抗後部および中部絹糸腺ヒストン抗体を用いて定量沈降反応によるCWH, PWH およびMWHの抗原解析を行なったものである。図4-aから明らかなように、抗後部絹糸腺ヒストン血清を用いた場合は、PWHの特異沈降物量はMWHとの反応による沈降量よりも、当量点(0.043 mg-N)で約10%多い。また逆に抗中部絹糸腺ヒストン血清の場合はMWHの特異沈降量がPWHとのそれよりも0.042 mg-N付近で約

13% 程度多くなっており、両絹糸腺に各々特異的な抗原が存在する事を示している。一方CWHの場合は抗カイコ絹糸腺ヒストン抗体と全く交叉反応せず、抗原的にPWHおよびMWHと異なる事が示された。また、組織特異ヒストンはCM-セルロースによって全ヒストンを分画して得られる画分のうち、F1a、F1b、F3という主としてリジン型ヒストン画分に見い出され複数存在する事が明らかにされた。

図4

抗後部および抗中部絹糸腺ヒストン抗体によるPWH, MWHおよびCWHの定量沈降反応曲線



備考

4(a)に於ける使用抗体は抗後部絹糸腺ヒストン抗体(抗体価64)。

4(b)に於ける使用抗体は抗中部絹糸腺ヒストン抗体(抗体価32)。

## 第五章 組織特異ヒストンの分離精製の検討

前章に於いて、両絹糸腺間に各々複数個の組織特異ヒストンが存在する事が示されたが、これらの特異ヒストンの存在意義を解明するには、各組織の特異ヒストン分子種数を知り、その各成分を分離精製した上で各々の生物学的化学的性質を検討する必要がある。

本章では上記のような観点に基づき、免疫特異吸着剤による特異ヒストン画分の分離を試みた。免疫吸着剤は、(1)ポリアミノポリスチレン樹脂(PAS)、(2)蛋白不溶性重合体、(3)プロモアセチルセルロース樹脂(BAC)の3種について検討し、その特異性、吸着容量および回収率の点から、本研究には(3)が適している事を明らかにした。

図5はこれらの免疫吸着剤による特異ヒストン分離方法を示したものである。また図6および図7は中部特異ヒストン画分の分離過程に於ける抗体カラムの溶出図を示したものである。この結果、用いた免疫吸着剤の特異性は高く、非特異的吸着は6%以下であった。また、用いた全ヒストンの12%前後が抗原性がないかまたは弱いヒストン画分、85%前後が両絹糸腺に共通なヒストン画分で残り2~5%が組織特異ヒストン画分であった。また後部絹糸腺ヒストンの場合もほぼ同様な結果が得られた。次に組織特異ヒストン分子種数を知るため、得られた各特異ヒストン画分をディスク電気泳動により解析したところ、後部絹糸腺特異ヒストン画分は3本、中部絹糸腺特異ヒストン画分は4本の泳動帯が認められ、また、両特異ヒストン画分のアミノ酸分析の結果は、いずれもリジン型ヒストン画分に属する事が明らかにされた。以上の結果は第四章で得られた結果とよく一致していた。

図5. 免疫特異吸着剤による絹糸腺特異ヒストンの分離方法

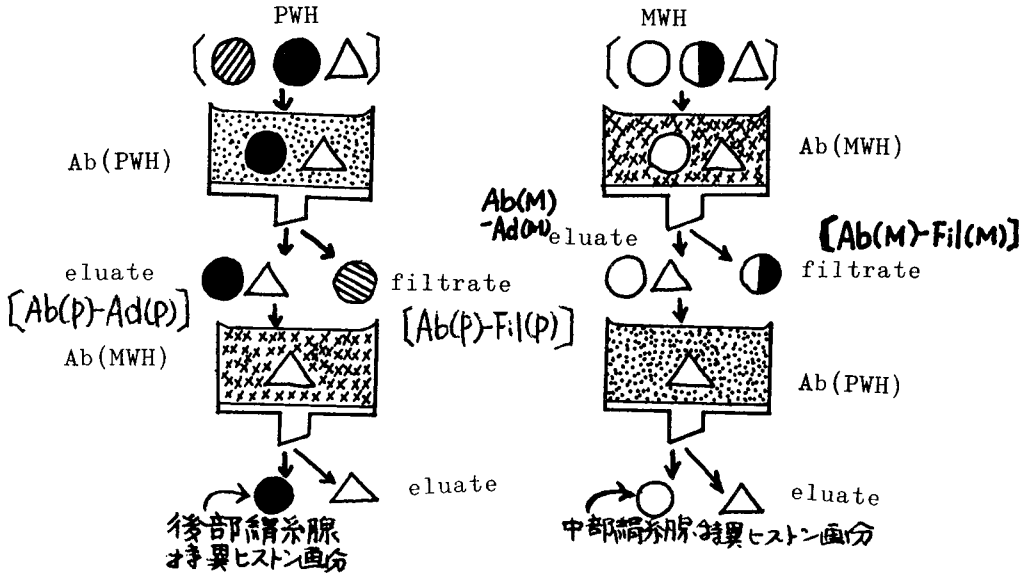


図6. 抗中部絹糸腺抗体カラムによるMWHの分画図

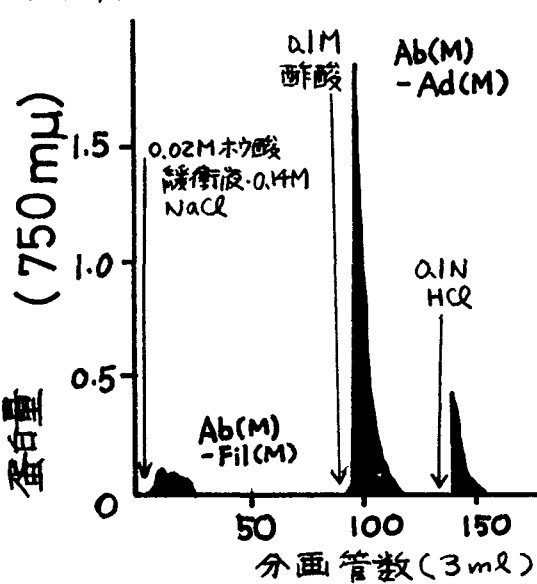
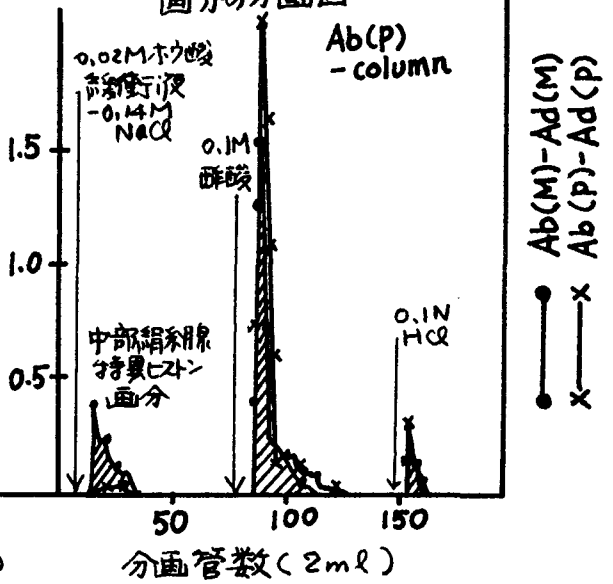


図7. 抗後部絹糸腺抗体カラムによる  $Ab(M)$ - $Ad(M)$ および  $Ab(P)$ - $Ad(P)$  画分の分画図



備考. 使用免疫吸着剤はプロモアセチルセルロース



## 第六章 組織特異ヒストン画分とリボソーム蛋白との関係

組織特異ヒストンの存在については、今までほとんどその報告がない。従ってこのような背景のもとでのカイコ絹糸腺特異ヒストンの分離は、ヒストン抽出操作中に、非核由来の塩基性蛋白、例えばリボソーム蛋白、リボヌクレアーゼ等のヒストン画分中への夾雑によるのではないかとの懸念も出てくる。それ故本章では、カイコリボヌクレアーゼおよびリボソーム蛋白とヒストン蛋白との関連性について検討した。その結果、リボソーム蛋白の約19%が抗カイコ絹糸腺ヒストンと交叉反応を示す事が明らかにされた。しかしながらリボソーム蛋白吸収カイコ絹糸腺ヒストン抗体と両絹糸腺特異ヒストンが反応する事から、絹糸腺特異ヒストンはリボソーム様蛋白ではない事が示された。また、カイコヌクレアーゼとは抗絹糸腺ヒストン抗体は全く反応しなかった。従って絹糸腺特異ヒストン分子種は核由来の塩基性蛋白であると結論した。

## 第七章 組織特異ヒストン各分子種の分離精製

前章までの検討の結果、得られた特異画分の分子種数の概要および核由来性が明らかになったが、本章では更に特異画分々子種数を明確にし、各分子種の化学的性質を検討する為、調製用ゲル電気泳動により各分子種の分離を行なった。図8はその電気泳動溶出図である。易動度の小さい順に後部絹糸腺特異ヒストン各分子種はPS-1, PS-2 およびPS-3, また中部絹糸腺特異ヒストン各分子種はMS-1, MS-2, MS-3 およびMS-4 と各々表記した。

次いで上記各分子種の組織特異性の検討を補体結合反応を用いて行なった(表1, 2)。また化学的性質をアミノ酸分析により調べた。この結果、後部絹糸腺特異ヒストン分子種は3分子種よりなり、いずれもリジン型ヒストンに属する。一方中部絹糸腺特異ヒストン画分は少なくとも3分子種存在し、いずれもリジン型

ヒストンであった。

図8. 調製用ディスク電気泳動による中部および後部特異ヒストン画分の分離

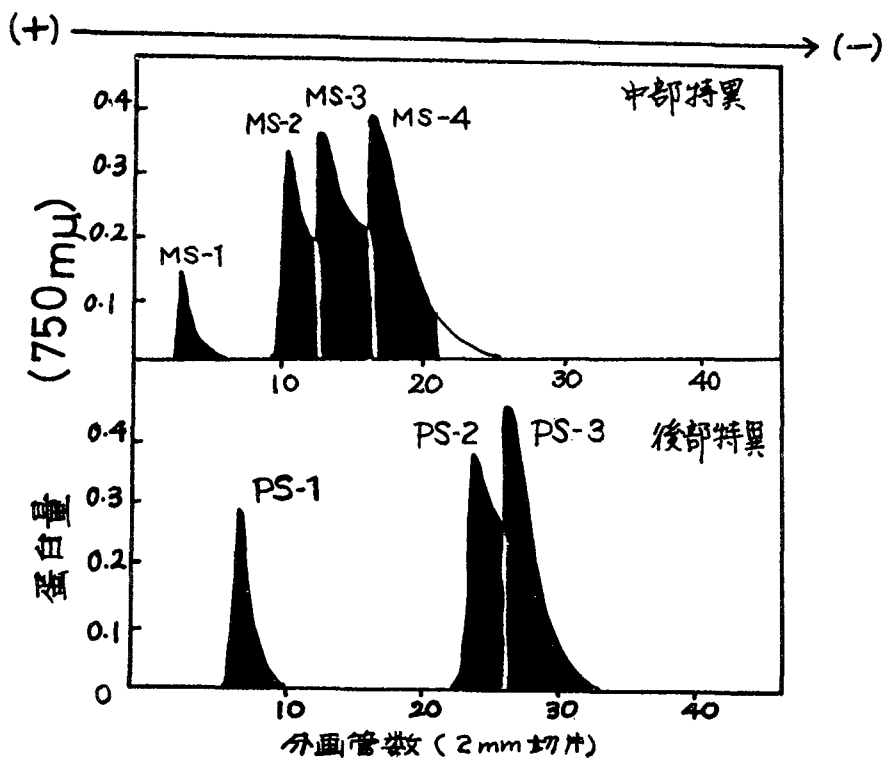


表1 抗後部絹糸腺ヒストン抗体による絹糸腺特異ヒストン各分子種との補体結合反応

Ab \ Ag	(1) 1 : 8	(2) 1 : 16	(3) 1 : 32	(4) 1 : 64	(5) 1 : 128	(6) 1 : 256	(7) 1 : 512	(8) 1 : 1024
PS-1	100%	100%	100%	93%	45%	0%	0%	0%
PS-2	100	100	100	74	1	0	0	0
PS-3	100	100	100	71	0	0	0	0
MS-1	0	0	0	0				
MS-2	0	0						
MS-3	0	0						
MS-4	0	0						

表2 抗中部絹糸腺ヒストン抗体による絹糸腺特異ヒストン各分子種との補体結合反応

Ab \ Ag	(1) 1:8	(2) 1:16	(3) 1:32	(4) 1:64	(5) 1:128	(6) 1:256	(7) 1:512	(8) 1:1024
MS-1	0%	0%	0%	0%	%	%	%	%
MS-2	100	100	100	100	68	61	0	0
MS-3	100	100	100	94	55	0	0	0
MS-4	100	100	100	96	83	45	0	0
PS-1	0	0	0					
PS-2	0	0	0					
PS-3	17	0	0					

備考 使用抗血清の抗体価は 64 であった。百分率は各稀釈抗体に対する一定抗原量 (0.9 μg 蛋白) での溶血阻止率を表わす。

### 要 約

1. これまでほとんど明らかでなかったヒストンの抗原性について検討し、カイコ絹糸腺ヒストンは Freund の完全アジュバント法による長期免疫により、ウサギに対して抗原性を有する事を明らかにした。
2. 得られた抗カイコ絹糸腺ヒストン抗体は抗体稀釈重層法による抗体価が 32 ~ 64 倍であり、免疫グロブリン G 画分に属する。また用いた絹糸腺全ヒストンの約 88% と特異的に反応した。
3. 上記性状の抗体を用いて、子ウシ胸腺ヒストン、両絹糸腺ヒストン間の特異性に関して免疫化学的に検討した。その結果、アミノ酸分析、カラムクロマトグラフィーおよび電気泳動などの従来 of 分析手段ではほとんど明確に出来な

ったが、カイコ絹糸腺ヒストンと子ウシ胸腺ヒストンの間に著しい種特異性の存在が認められた。

更に両絹糸腺ヒストンの間にも互いに組織特異性が存在し、その組織特異ヒストンは各々リジン型ヒストン画分に属し複数個存在する事が明らかにされた。

4. 次いで、これら組織特異ヒストンの性質を検討する為、免疫吸着剤によるこれら画分の分離精製を試みた。免疫吸着剤は種々検討の結果、特異性、抗原吸着容量および回収率などの点で、プロモアセチルセルロース樹脂が優れていることを認めた。
5. この免疫吸着剤を用いた結果、両絹糸腺に各々その全ヒストンの2~5%に相当する組織特異ヒストン画分を分離する事に成功した。
6. そこで特異ヒストン分子種数を明らかにし、それらの化学的性質を検討する為、免疫吸着剤により得られた両絹糸腺特異画分をさらに電気泳動により、それぞれ3~4種の成分に分画できた。その各々について補体結合反応による特異性の検討およびアミノ酸分析を行なった。
7. その結果、後部絹糸腺には3分子種の組織特異ヒストンが存在し、それらはいずれもリジン型ヒストンであった。一方カイコ中部絹糸腺に於いても、後部絹糸腺に於けるそれとは抗原的に全く異なる組織特異ヒストンが少なくとも3分子種(いずれもリジン型ヒストン)存在する事が明らかにされた。

#### 本 研 究 の 関 連 論 文

- 1) C. Fukazawa and K. Shimura, *Biochem. Biophys. Acta*, 154, 618 (1968)

“The Demonstration of Species Specificity of Histones by Immunological Techniques”

- 2) C. Fukazawa and K. Shimura, J. Biochem., 投稿中  
"Studies on the Species and Organ Specificity of Histones"
- 3) C. Fukazawa and K. Shimura, "Histones and Gene Function", p20,  
The Research Group of Histones and Gene Function in Japan  
(1969)  
"Isolation of Organ-Specific Histones from Silk Glands"

## 審査結果の要旨

ヒストンは、細胞核内において遺伝子DNAと複合体を形成して存在する蛋白質で、遺伝情報の発現に何等かの役割を演じているものと推定されながら、その機構は全く不明であった。その理由の一つは、いくつかの異った種類の生物から分離したヒストン間の差異というものが、従来の実験方法では明瞭に検出することができなかったことにある。

本研究は、上のような研究の隘路を開く目的で、ヒストンの種および組織特異性を免疫化学的解析方法により明らかにしようとして行ったものである。

本研究が開始された当時は、ヒストンに対しては抗体が極めて生成し難く、果してヒストンの免疫学的解析が可能であるか否か疑問とされていた。本論文の著者は、カイコの後部および中部絹糸腺より分離したヒストンを用いて、ウキギに対し免疫操作を慎重に行った結果、抗体稀釈重層法による抗体価が32~64を示す抗絹糸腺ヒストン血清をつくることに成功した。ヒストンの明瞭な抗体を得たのは本研究がはじめてである。

ついで著者は、本抗血清を用いコウソウ胸腺ヒストンと絹糸腺ヒストンを比較したところ、免疫学的には全く異なる種であることを明らかにした。すなわち、ヒストンの種特異性がはじめて証明された。

次に後部絹糸腺ヒストンと中部絹糸腺ヒストンについて、それぞれの抗体カラムを調製して、組織特異性ヒストンの分離を試みた結果、後部および中部絹糸腺ヒストン中に、組織特異性ヒストンが存在することが明らかとなり、抗体カラムにより得られた両絹糸腺特異ヒストンをさらに電気泳動法により分別し、両絹糸腺特異ヒストンとして、それぞれ3分子種を得た。これらはいずれもリジン型ヒストンであった。

以上、本研究は、従来困難とされていたヒストンの抗体をつくらせることにはじめて成功し、その抗血清を用いて、ヒストンの種および組織特異性の存在を明らかにし、ヒストンの生化学的研究に新しい道を開いたものである。農学博士の学位を授与するに十分な価値あるものと認める。