

マウス腹水肉腫細胞核からの高分子量 酸可溶性蛋白質の精製とその性質

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部門（指導：小田琢三教授）

大学院 筒井 公 子

（昭和53年3月27日受稿）

序 論

クロマチンの基本構造であるヌクレオソームの存在は多くの研究者¹⁻⁴⁾により確立された。すなわち大部分の有核細胞のクロマチンは、4種類のヒストンH3, H4, H2A, H2Bが2分子ずつ会合したヒストンオクタマーの周りに約140塩基対のDNAが結合したヌクレオソームと、ヌクレオソーム間をつなぐ40-60塩基対のDNAから成る。いくつかの遺伝子DNAを含む領域のクロマチンにもこの構造が存在することが示されている^{5,6)}。大部分の非ヒストン蛋白質は、ヌクレオソームのモノマーを調製するために行うヌクレアーゼ処理の間にクロマチンから遊離するので、ヌクレオソーム間のDNAに結合しているらしい⁷⁾。

ある既知の活性を持った個々の非ヒストン蛋白質を精製して行くことは、遺伝子の調節やクロマチンの修飾におけるそれらの蛋白質の役割を明らかにする上での常套的な手段である。例えば、グロビン⁸⁾、ヒストン⁹⁾、オボアルブミン¹⁰⁾などの遺伝子からの転写を促進する非ヒストン蛋白質の分画が報告されている。しかしこれらの蛋白質はまだ現在のところ単離されていない。

一方、生物活性の不明なまま精製されている酸可溶性非ヒストン蛋白質がいくつかある。A24は分子量27,000のクロマチン蛋白質で¹¹⁾、ヒストンH2Aのカルボキシル末端に近いジジン残基に非ヒストン部分がイソペプチド結合で結合している特異な構造を持っている¹²⁾が、最近、一部のヌクレオソームではヒストンH2AがA24に置き換っていることが示唆された¹³⁾。また、Johnsのグループによって研究されているHMG蛋白質^{14,15)}も、ヌクレオソームのモノマー分画に見い出されている¹⁶⁾。ヒストンに比して少量しか存在しないこれら酸可溶性非ヒストン蛋白質の局在は、今後解明されるべきヌクレオソーム構造の不均一性や修飾への手懸を与えるものと思われる。

我々はラウス肉腫ウィルス (Schmidt-Ruppin株) で誘発されたC3H/Heマウス腹水肉腫細胞 (SR-C3H細胞) の核を α -キモトリプシンで処理し、ヒストン各分子種の消化速度を調べているうちに、分子量の大きな、キモトリプシン処理で容易に消失する蛋白質が、核からヒストンと共に0.2M硫酸で抽出されることに気付いた。この論文ではこの非ヒストン蛋白質の精製と2, 3の性格づけについて述べる。なお本文ではこの蛋白質を、HAN-1 (high molecular weight acid soluble nuclear protein-1) と略記する。

材料と方法

1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

核の酸可溶性蛋白質の解析とHAN-1の精製段階の確認には、2.5M尿素、0.9N酢酸を含む15%アクリルアミドスラブゲル¹⁷⁾を用いた。S-200カラムの分画を除き、すべてサンプルを泳動前に0.9N酢酸に対して透析した。15mA/ゲルで8-9時間泳動した。25%トリクロル酢酸に溶かした0.1%クーマシーブリリアントブルーでゲルを染色し、8%酢酸で脱色した¹⁸⁾。

精製したHAN-1の分子量は、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む7.5%ポリアクリルアミドスラブゲルの電気泳動で決定した。ゲルのシステムはLaemmli¹⁹⁾によった。分子量の標準として、グルタルアルデヒドで架橋したウシ血清アルブミン²⁰⁾を用いた。サンプルを2% SDS, 2% β -メルカプトエタノール, 0.25Mシヨ糖, 0.0625Mトリス-塩酸 (pH 6.8) に溶かし、泳動直前に100°Cで2分間加熱した。

2. 核の調製

核は接種後10日から12日の腹水細胞 (SR-C3

H細胞と Ehrlich 腹水癌細胞) または培養細胞 (XC細胞とマウス白血病細胞) から次のような手順で分離した。すべての操作は特にことわらない限り 0~4℃で行った。腹水または培養液を 600×g, 5分遠心して細胞を集めた。XC細胞は単層に培養し、トリプシン処理により回収した。ペレットになった細胞を秤量し、これに 50倍量の冷却した低張の MT 緩衝液 (5 mM MgCl₂, 10 mM トリシュー塩酸, pH 7.8) を加え、水中に 10~20 分放置した後、1,000×gで5分間遠心した。これと平行して、5 mM MgCl₂, 10 mM トリシュー塩酸 (pH 7.8) を含む 2.6 M ショ糖溶液 100 ml を Waring タイプのブレンダー (日立 VA-10P) にとり、フリーザー中で-8℃まで冷却しておく。低張処理により膨れた細胞を再び MT 緩衝液にけん濁し容量を 21~22 ml にしたのち、-8℃の 2.6 M ショ糖溶液の入ったブレンダーを回転させ、刃の中心にそそぐことにより細胞を破壊した。3~4 分間の回転後、ホモゲネートの温度は 4~5℃に上昇していた。これらの細胞、特に SR-C3H 細胞を有効に破碎するには、低張処理と 0℃以下に冷却したショ糖溶液中でホモゲナイズすることが必須であった。冷却した高粘度のショ糖溶液は温度の上昇を防ぐとともに、破壊のためのせん断力を増大させる役割をはたす。この条件下で 90% 以上の細胞が破壊された。このホモゲネートを 40,000×gで60分遠心した。ペレットになった核は 0.25 M ショ糖, 5 mM MgCl₂, 10 mM トリシュー塩酸 (pH 7.8) で 1 度洗い、使用するまで-80℃に保存した。このようにして調製した核の精製度は位相差顕微鏡により確認された。肝臓の核は上記と同様の方法で調製したが、低張処理の操作は省いた。

3. SR-C3H 細胞核からの酸可溶性蛋白質の抽出

SR-C3H 細胞の核 (DNA 量として 320 mg) に 45 ml の 0.2 M 硫酸を加えテフロンホモゲナイザーでホモゲナイズした。30,000×g で 20 分遠心した後、沈渣を再び 45 ml の 0.2 M 硫酸で抽出した。抽出液を合わせ、4 倍量のエタノールを加え、生じた蛋白質の沈殿を遠心により集めた。この沈殿をエタノールで洗った後減圧下で乾燥させた。約 480 mg の酸可溶性蛋白質が得られた。

4. HAN-1 の精製

抽出した SR-C3H の酸可溶性蛋白質 (470 mg) を 9 ml の 0.9 N 酢酸, 2 M 尿素, 0.5 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) に溶かし、遠心により不溶物を除いた後、Sephacryl S-200 のカラム (2.6×95 cm) にかけて、同じ溶液で溶出した。HAN-1 を含む分面を集め、0.2 M 食塩, 2 M 尿素, 0.5 mM PMSF, 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.4) に対して透析してから、同じ溶液で平衡化した DEAE-Sephadex のカラム (1.5×30 cm) にかけて。50 ml の溶液で未吸着の蛋白質を洗い去り、吸着した蛋白質を 0.2 M から 0.6 M の NaCl 直線濃度勾配により溶出した。HAN-1 を含む分面を集め、使用するまで-20℃に保存した。

5. 抗 HAN-1 抗血清の調製

DEAE-Sephadex の HAN-1 を含む分面を 10 mM トリシュー塩酸 (pH 7.8) に対して充分透析し、この HAN-1 溶液 (蛋白質量として 300 μg 含む) を等量の Freund 完全アジュヴァントと共に激しく攪拌した。得られたエマルジョンを 1 週間間隔で 2 度に分け、ウサギの皮下に注射した。2 回目の注射から 10 日目に抗血清を採取した。

6. アミノ酸分析

HAN-1 を含む DEAE-Sephadex の分面を蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥した。試料は 5.8 N 塩酸で 110℃, 20 時間あるいは 70 時間加水分解した。アミノ酸組成は日本電子 JLC-6AH 自動アミノ酸分析機により決定した。

7. RNA 合成

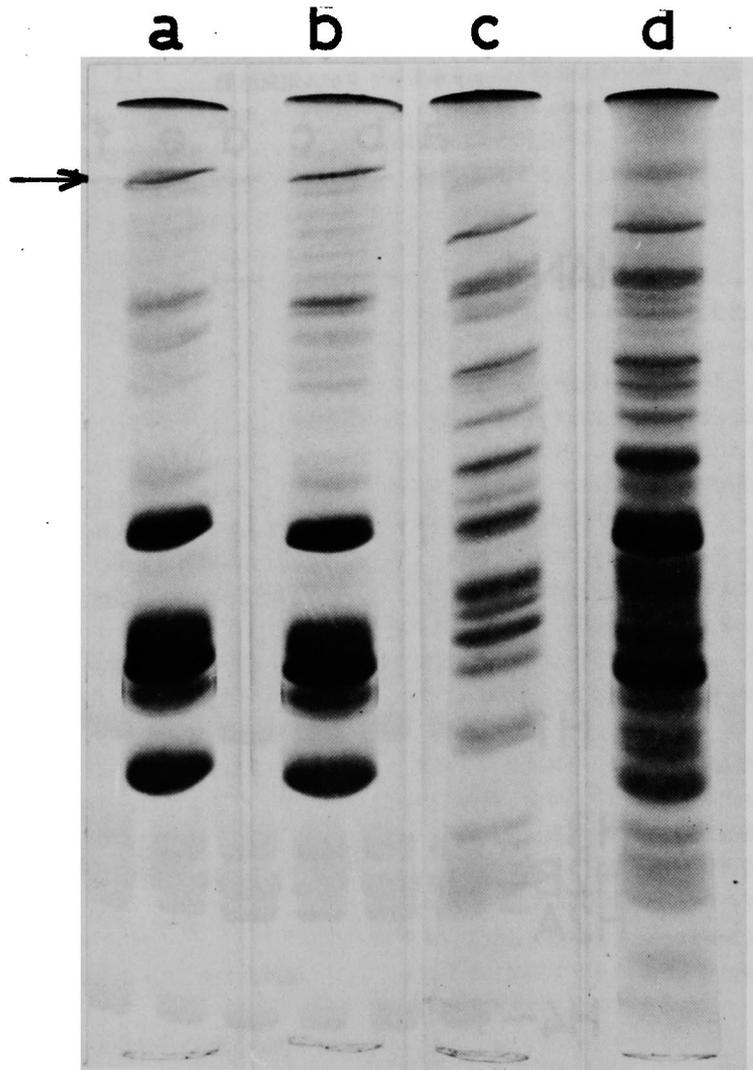
Weaver らの方法²¹⁾により DNA 依存 RNA ポリメラーゼ, I (A) 型および II (B) 型を SR-C3H 細胞の核から調製した。分離したポリメラーゼと精製 DNA による *in vitro* RNA 合成は以前に報告した²²⁾と同様に行った。すなわち、25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 0.1 mM ジチオスレイール, 40 mM トリシュー塩酸 (pH 7.9), それぞれ 0.4 mM の ATP, GTP, CTP, 0.02 mM [³H]UTP (0.5 Ci/mmol), 鋳型 DNA, そしてポリメラーゼを含む反応液 (0.2 ml) を 30℃で 20 分

インキュベートした後、3 mlの7%トリクロル酢酸、40 mM ピロリン酸ナトリウムを加えることにより反応を停止させた。酸不溶性分画に取り込まれた³Hはガラスフィルター(Whatman GF/C)上に集め、トルエン-PP0-POPOPを含むシンチレーターにより計測した。

結果

1. SR-C3H細胞と他の細胞におけるHAN-1の局在と分布

図1. SR-C3H細胞の酸可溶性蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動



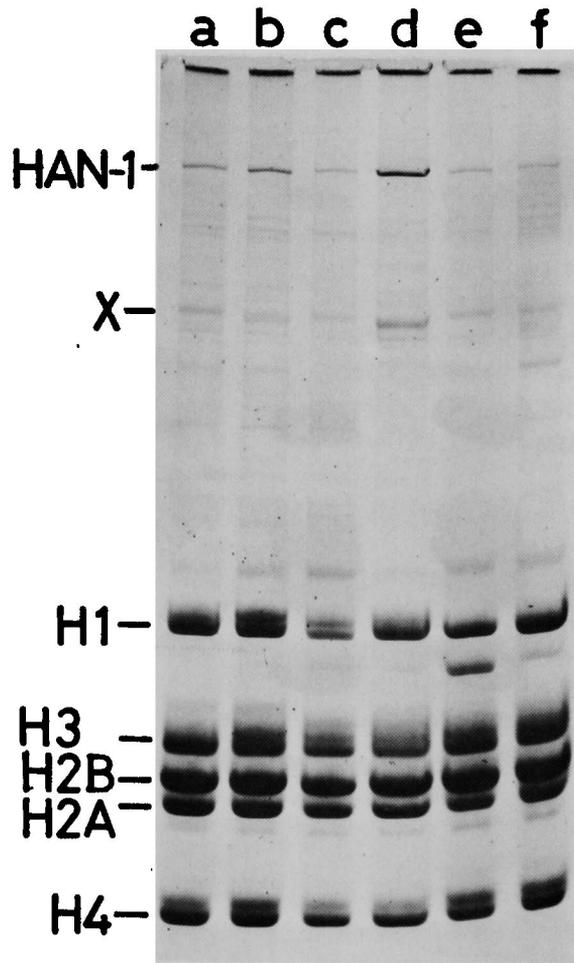
細胞全体、核分画、細胞質分画をそれぞれ0.2 M H₂SO₄で処理し遠心した後、酸可溶性蛋白質を含む上清を電気泳動した。洗浄した腹水細胞を5 mM MgCl₂, 10 mM トリス-塩酸 (pH 7.8) の中で Daunce ホモゲナイザーを使って破壊し、1,000 ×g, 5分の遠心により核と未破壊細胞を除いた上清を、細胞質分画とした。核は方法の項に書いたようにして調製した。(a)核、(b)1% Triton X-100で洗浄した核、(c)細胞質、(d)細胞全体。HAN-1を失印で示す。

SR-C3H細胞の核分画は高度に精製されており細胞質の混入はほとんどない。しかし、分離過程で界面活性剤を用いていないため核の外膜とそれに付着したリボゾームが残っているため、HAN-1はこれらのものに由来する可能性がある。この可能性は、1% Triton X-100を含む5 mM MgCl₂、0.25Mショ糖、10mMトリス塩酸 (pH 7.8) で核を洗っても HAN-1 が除かれないことから否定

された (図1b)。また、細胞質分画には HAN-1 がみられないこと (図1c) も、HAN-1 がもっぱら核内に存在する蛋白質であることを示している。

HAN-1 が SR-C3H細胞以外の細胞にも存在することを示すために、種々の細胞の分離核から酸可溶性蛋白質を調製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した (図2)。XC細胞は Prague 株でトランスフォームしたラットの細胞株²³⁾、マウ

図2. 種々の細胞核の酸可溶性蛋白質のポリアクリルアミドゲル電気泳動



0.2 M 硫酸で核を抽出し、それぞれ30 μ g の酸可溶性蛋白質を含む遠心上清を電気泳動にかけた。(a) Ehrlich 腹水癌細胞、(b) マウス白血病細胞、(c) XC 細胞、(d) SR-C3H細胞、(e) マウス肝、(f) ラット肝。X については考察の項参照。

表1

RELATIVE CONTENT OF HAN-1 PROTEIN IN VARIOUS CELL TYPES

	% of total histone
Rat liver nuclei	0.30
Mouse liver nuclei	0.56
SR-C3H nuclei	4.8
SR-C3H chromatin	0.41
XC cell nuclei	0.72
Mouse leukemia cell nuclei	1.3
Ehrlich nuclei	1.1

ス白血病細胞はGross白血病ウィルスで誘発したマウスの胸腺リンパ腫由来の細胞²⁴である。すべての細胞において酸可溶性蛋白質の主体(90%以上)はヒストンである。30~40の非ヒストン蛋白質のバンドが認められるが、このうち19本のバンドはすべての細胞種に存在する。SR-C3H細胞のHAN-1と同じ易動性を示すバンドが他の細胞すべてにみられるので、これらの細胞にもHAN-1類似の蛋白質が存在していることが示唆される。

染色したゲルの定量的デンストリー¹⁰によりこれらの細胞におけるHAN-1含量の算出が可能である(表1)。SR-C3H細胞のHAN-1含量は全5種類ヒストン含量の4.8%であり、他の細胞に比べ明らかに高い。この値は核の標品ごとに多少異なるが、5つの異なる標品から求めた値は4.3±0.6%であった。

HAN-1がクロマチンに結合した蛋白質であるかどうかを調べるため、SR-C3H細胞クロマチンからの酸可溶性蛋白質の中のHAN-1含量を調べた(表1)。その結果約1%のHAN-1はクロマチンに結合していることがわかった。

HAN-1の他に図2にXで示したバンドもSR-C3H細胞に多い。このことについては後に考察の項で述べる。

2. SR-C3H細胞核からのHAN-1の精製

ポリアクリルアミドゲルでのHAN-1の低い易動度は、HAN-1の分子量が大きいことを示しており、酸可溶性蛋白質のうち非ヒストン蛋白質の占める割合は少ないことも考え合わせると、HAN-1の精製の第一段階にはゲルろ過を適用するのが最も有効であると考えられる。図3AはSephadex G-100カラムからのSR-C3H核酸可溶性蛋白質の溶出

パターンである。溶出溶媒には、大量の蛋白質を分画するために尿素を、分画中に蛋白質分解酵素が働かないようにその阻害剤であるPMSFを加えてある。HAN-1はvoid volume 近くに溶出されるがその他の高分子量非ヒストン蛋白質やヒストンH1もこれらの分画に溶出されている(図3B)。そこでG-100よりも限界分子量の大きいSephacryl S-200を使用した。Sephacryl S-200(Pharmaciaの製品)は球状蛋白質に対して 2.5×10^6 の限界分子量を持った一種の架橋デキストラン・ビーズであり、Sephadex G-200より速い流速が得られる。図4AにSephacryl S-200カラムからの酸可溶性蛋白質の溶出パターンを示す。Sephacryl S-200を使用することによりヒストンとHAN-1を完全に分離することができた(図4B)。

次の精製段階としてCM-セルロースまたはDEAE-Sephadexを使用することにし、これらのイオン交換体へのHAN-1の吸着性を色々なpHでテストした(図5)。CM-セルロースには各pHですべての蛋白質が吸着した。DEAE-Sephadexには、pH 7.8ではすべての蛋白質が、pH 5.4ではHAN-1のみが吸着し、pH 2.7ではどの蛋白質も吸着しなかった。このことからDEAE-Sephadexを用いてpH 5.4でクロマトグラフィーを行うことが、HAN-1の精製に適当であることがわかった。

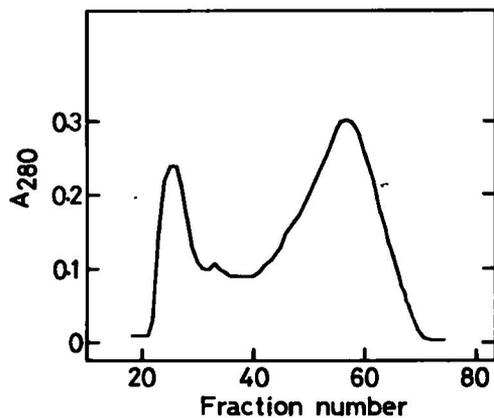
HAN-1を含むS-200カラムの分画(分画No 40~50)を集め、透析後DEAE-Sephadexのカラムで更に分画した(図6A, B)。HAN-1は食塩濃度0.35Mに、電気泳動的に均一な形で溶出された。

精製されたHAN-1の中性領域での溶解度はきわめて低い。すなわち、DEAE-SephadexのHAN-1分画を直接10mM トリス-塩酸(pH 7.8)に対して透析すると、HAN-1は析出してしまふ。しかし、一度0.1M炭酸水素ナトリウム溶液(pH 9.0)に対して透析してから10mM トリス-塩酸(pH 7.8)に戻すことにより、完全に溶けたHAN-1の溶液を得ることができた。

3. 分子量の決定

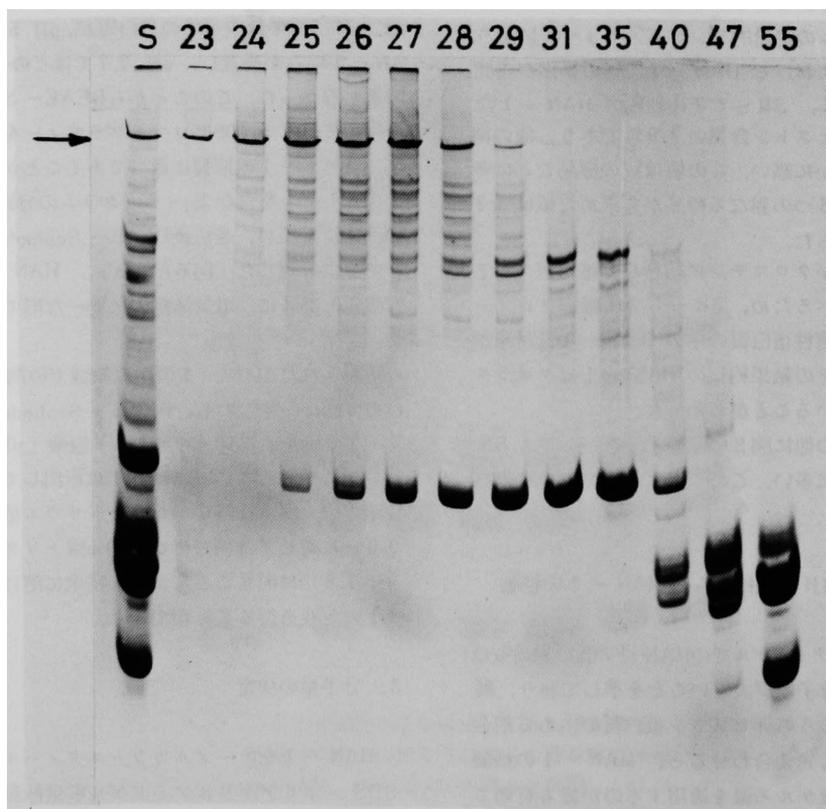
HAN-1をβ-メルカプトエタノールで処理後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、ウシ血清アルブミンとウサギ筋ミオシンの間に1本のバンドとして認められた。このことは、酸で抽出

図3. A. SR-C3H細胞核酸可溶性蛋白質の Sephadex G-100クロマトグラフィー



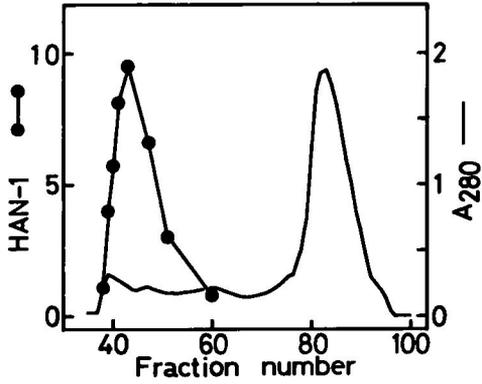
200mgの酸可溶性蛋白質に4mlの0.9N酢酸, 0.5mM PMSFを加え, 遠心して不溶物を除いてから2.6×95cmのSephadex G-100カラムにかけた. 14ml/hの流速で5mlずつに分画した.

B. Sephadex G-100分面の電気泳動



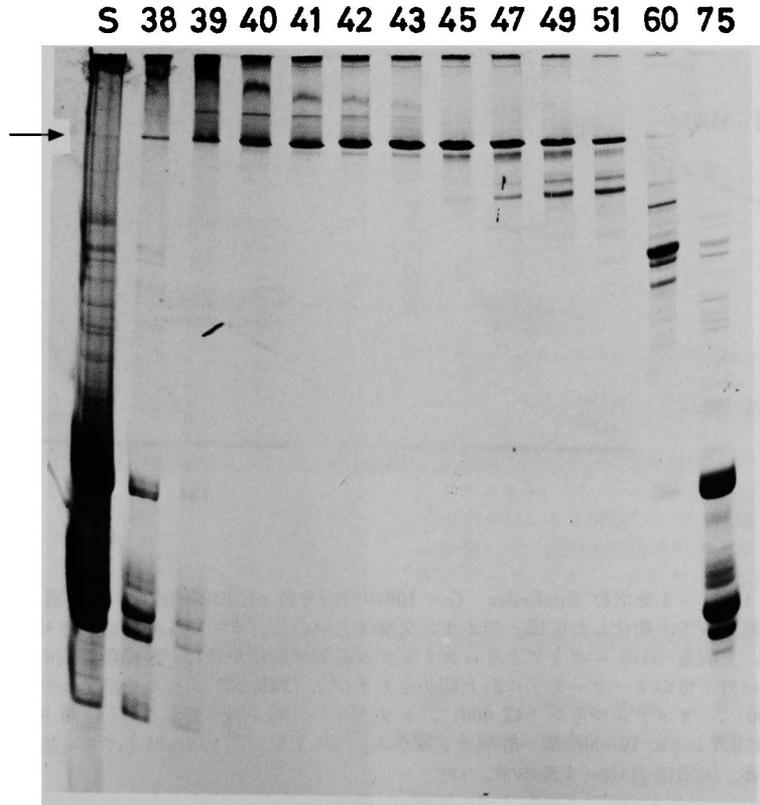
Sはカラムにかける前のサンプル, 数字は分画番号, 矢印はHAN-1を示す.

図4. A. SR-C3H細胞核酸可溶性蛋白質の
Sephacryl S-200クロマトグラフィー



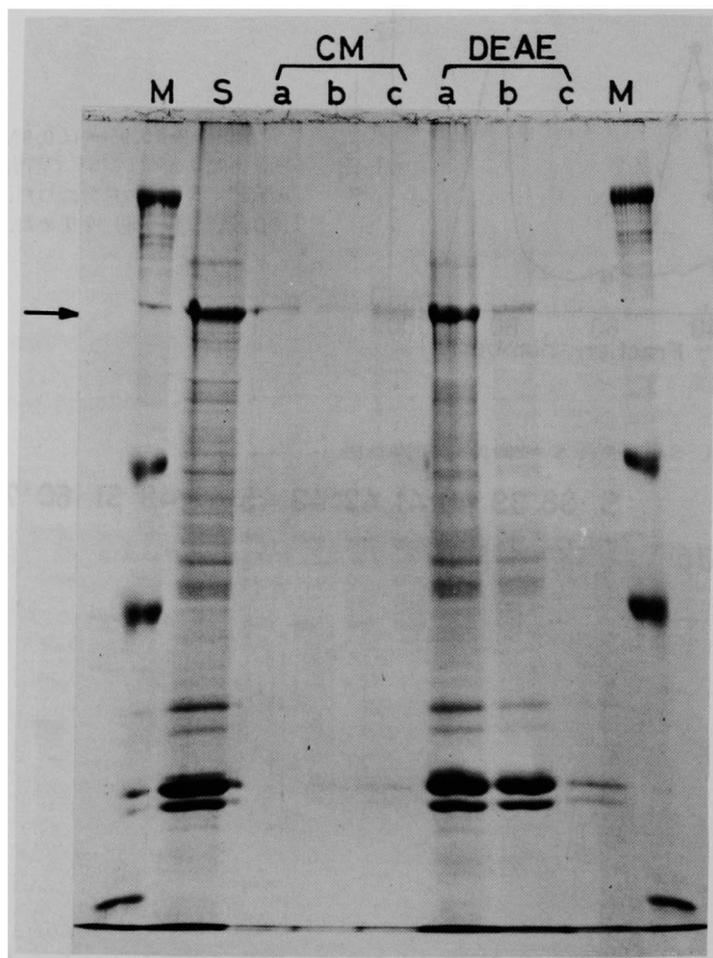
カラム(2.6×95cm)は0.9N酢酸, 2M
尿素, 0.5 mM PMSFで溶出し, 16.5ml/h
の流速で5mlずつに分画した. HAN-1を
含む分画(40-50)を集めた.

B. Sephacryl S-200分画の電気泳動



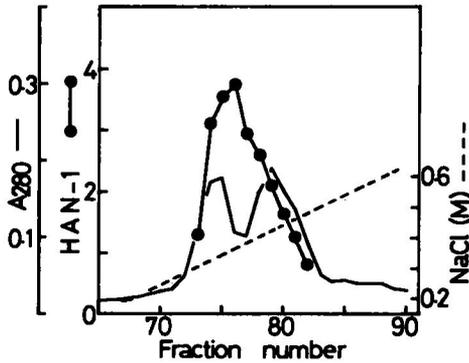
Sはカラムにかける前のサンプル, 数字は分画番号, 矢印はHAN-1を示す.

図5. 色々なpHでの酸可溶性蛋白質のCM-セルロース, DEAE-Sephadexへの吸着



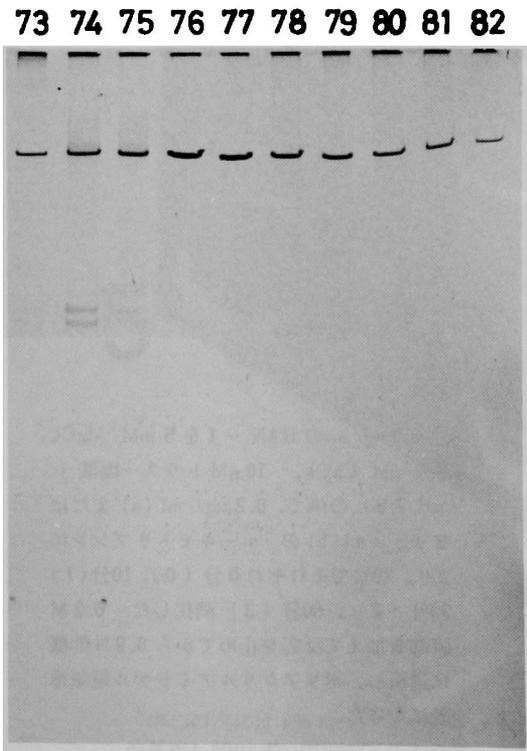
HAN-1を含む Sephadex G-100の分画を各 pH の緩衝液に対して透析し、同じ緩衝液で平衡化した0.05g のイオン交換体と混合し、4℃で1時間吸着させた。遠心後、上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。S は吸着前のサンプル、M は分子量のマーカでゲルの上端からミオシン (220,000)、ウシ血清アルブミン (68,000)、オボアルブミン (43,000)、トリプシン (25,000) である。(a) 0.9 N 酢酸, pH 2.7, (b) 10 mM 酢酸-酢酸ナトリウム, pH 5.5, (c) 10 mM トリス-塩酸, pH 7.8. 矢印は HAN-1 を示す

図6. A. DEAE- Sephadexクロマトグラフィー



Sephacryl S-200 カラムの HAN-1 を含む分画を DEAE- Sephadex のカラム (1.5 × 30cm) に吸着させた。まずカラムを 0.2 M 食塩, 2 M 尿素, 50 mM 酢酸ナトリウム, 0.5 mM PMSF (pH 5.4) で洗い, 0.2 ~ 0.6 M の食塩濃度勾配により溶出し, 2 ml ずつに分画した。

図6. B. DEAE- Sephadex分画のポリ
アクリルアミドゲル電気泳動



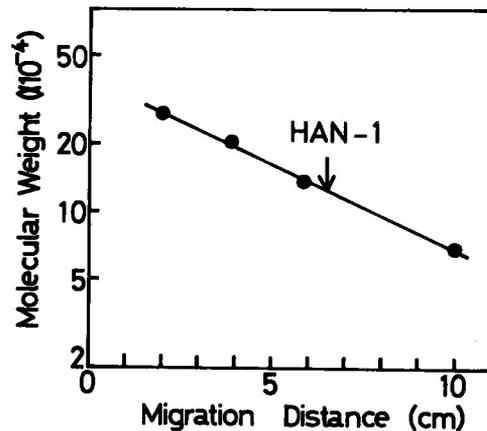
0.9 N 酢酸に対して透析してから 30 μl ずつのサンプルをゲルにかけた。数字は分画番号。

された HAN-1 は, 68×10^3 と 220×10^3 の間の分子量を持つただ1つのポリペプチドから成ることを示している。もっと正確な HAN-1 の分子量は, 架橋したウシ血清アルブミンを分子量マーカーにすることにより, 125×10^3 と決定された (図7)。

4. アミノ酸組成

アミノ酸分析の結果 (表2), HAN-1 はグルタミン酸, リジン, アスパラギン酸に富み, セリンも比較的多いことがわかった。システインは検出されなかった。酸性アミノ酸/塩基性アミノ酸比は1.84であった。トリプトファンは定量を行っていないが, HAN-1 の紫外吸収曲線には 290 nm にはっきりした shoulder があり, トリプトファンの存在を示唆している。

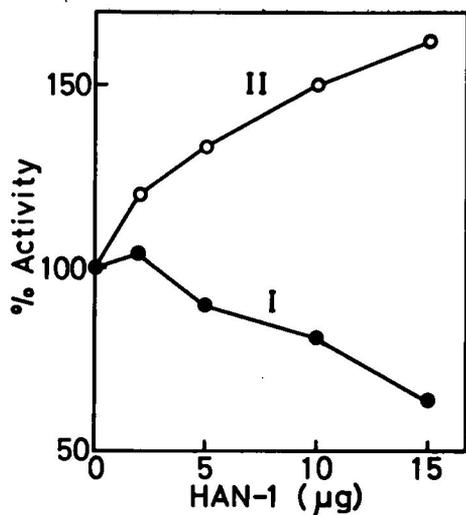
図7. HAN-1 の分子量の決定



0.1% SDS を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた。分子量の標準にはグルタルアルデヒドで架橋したウシ血清アルブミンを使った。図中の点はそれぞれモノマー, ダイマー, トリマー, テトラマーに相当する。

5. HAN-1 の *in vitro* RNA合成への影響

SR-C3H 細胞の HAN-1 は, 同じ細胞から調製した RNA ポリメラーゼの I 型と II 型による ^3H -UMP の RNA への取り込みに対して異なる作用をする (図8)。すなわち, ポリメラーゼ I 型の活性は HAN-1 の添加により阻害されたが, II 型の活性は逆に促進された。

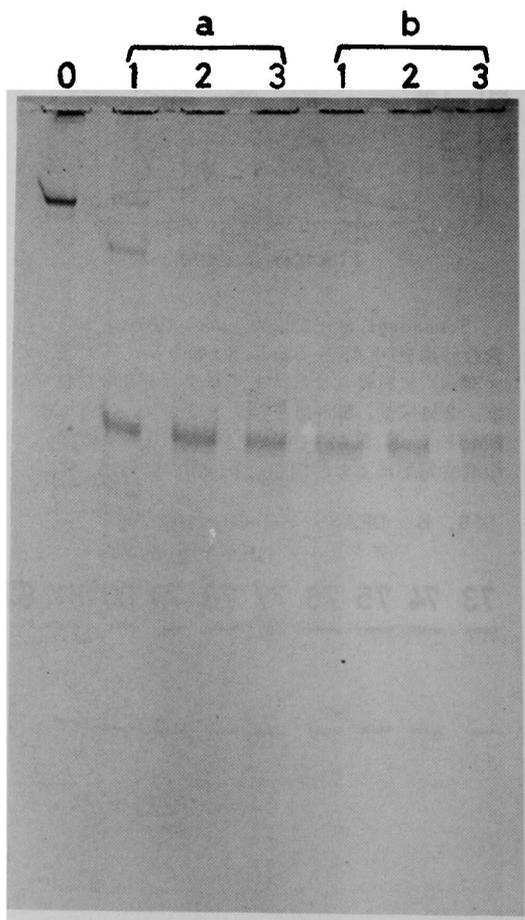
図8. *in vitro* RNA合成に対するHAN-1の影響

SR-C3H細胞から調製したRNAポリメラーゼI型とII型、20μlずつにあらかじめ色々な量のHAN-1を加えておき、これらに鋳型と基質を加えることにより反応を開始した。反応は30℃で20分行った。鋳型には10μgの仔牛胸腺DNAを用いた。HAN-1非存在下でRNAに取り込まれた³H-UMPのカウントは、I型では37,405cpm、II型では5,930cpmであった。

6. HAN-1のα-キモトリプシンによる消化

分離核をα-キモトリプシンで消化した場合、HAN-1の大部分は先に述べたようにこの酵素の作用を非常に受けやすい。しかし一部のHAN-1はかなり長い間キモトリプシンを作用させても残っている。このことは、HAN-1の約1%がクロマチンに結合している事実から推測すると、HAN-1のDNAやヒストンとの相互作用が蛋白質分解酵素に対する感受性に反映していると考えられる。ここではHAN-1の分解産物を確認するために、精製したHAN-1を用いてキモトリプシンを作用させた。HAN-1は低濃度(0.2μg/ml)のトリプシンにより速やかに分解され、1つの比較的安定な断片を生じた(図9)。

図9. HAN-1のα-キモトリプシンによる消化



400μg/mlのHAN-1を5mM MgCl₂、0.2mM CaCl₂、10mM トリス-塩酸(pH 7.8)の中で、0.2μg/ml (a)または2μg/ml (b)のα-キモトリプシンにより、30℃でそれぞれ0分(0)、10分(1)、30分(2)、60分(3)消化した。0.2M硫酸を加えて反応を止めてから0.9N酢酸に透析し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。

の酸抽出, Sephacryl S-200 および DEAE-Sephadex クロマトグラフィーにより電気泳動的に均一な状態まで精製した。この蛋白質を構成するアミノ酸にはグルタミン酸が多く、酸性アミノ酸/塩基性アミノ酸比は1.8であった。HAN-1の分子量は今までに性格づけられた核内蛋白質のうちでは最も大きいと思われる。その分子量は125,000であった。この蛋白質が現在まで注目されなかった1つの理由は、この分子量領域の酸可溶性蛋白質の含量が少なかったためであろう。HAN-1含量の高いSR-C3H細胞を材料としたためその精製は容易であった。

SR-C3H腹水肉腫は元来トリ肉腫ウィルスであるラウス肉腫ウィルスで誘発されたものである²⁵⁾。この細胞をニワトリのwing-webに接種すると感染性ウィルスが局所にできた腫瘍からrescueされるので、SR-C3H細胞のDNAには完全なウィルス・ゲノムが組み込まれていると考えられる。SR-C3H細胞のHAN-1含量が他の細胞に比べて非常に高いことは、ウィルスで引き起こされたトランスフォーメーションとの何らかの関連を示唆する。しかし、マウス胎児細胞(A31)と、マウス胎児細胞を*in vitro*でトリ肉腫ウィルス(B77)によりトランスフォームさせた細胞(A31/B77)のHAN-1含量には差がみられなかった(未発表)。

本研究でHAN-1が核に局在することは明らかになったが、核内のどこにどのような状態で存在するかについては明確にされていない。全HAN-1の約3%のみがクロマチンに結合していることは、核質内に遊離した分子と、クロマチンの特定の部位に結合した分子との間に平衡が成立していることを示唆している。クロマチンに結合したHAN-1は、0.35M食塩による洗浄でも完全には除けなかった。

これらのことから、HAN-1のクロマチンとの結合はかなり強く、平衡は結合の方向にかたよっていると考えられる。核質にもクロマチンにも存在する核内蛋白質のあることは今までにも報告されている²⁶⁾。

他の研究者によってすでに分離されている非ヒストン蛋白質^{11, 14, 27-30)}とHAN-1が別のものであることは、HAN-1の分子量とアミノ酸組成から明らかである。これらの蛋白質の分子量は大きいものでも70,000³⁰⁾である。しかし、HAN-1のアミノ酸組成はNovikoff肝癌から分離された核小体の酸可溶性蛋白質“band 15”²⁷⁾のそれと驚くほどよく似ている(表2)。どちらの蛋白質もグルタミン酸、

表2

AMINO ACID COMPOSITION OF HAN-1 PROTEIN

Amino acid	Mole percent	
	HAN-1	Band 15
Asp	10.0	11.2
Thr	5.3	5.2
Ser	8.5	8.3
Glu	17.5	15.9
Pro	4.8	4.7
Gly	8.9	10.6
Ala	10.8	9.8
Val	5.9	5.6
Met	0.9	0.8
Ile	3.1	3.3
Leu	5.3	6.9
Tyr	1.1	1.2
Phe	3.0	3.1
Lys	11.0	10.2
His	0.8	1.0
Arg	3.1	4.3

アスパラギン酸、リジン、グリシン、アラニンに富み、酸性アミノ酸/塩基性アミノ酸比も近い値を示している。さらに図1, 2のポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンと核小体からの酸可溶性蛋白質のそれ(文献27のFig. 2Aを見よ)との比較から、彼らの“band 18”と“band 15”は本研究のHAN-1とX(図2)にそれぞれ相当することが推測される。HAN-1とX(band 15)が共にSR-C3H細胞に多いことと、これらの蛋白質のアミノ酸組成が似ていることは、これらのポリペプチドが前駆体一産物の関係にあることを想像させる。

遺伝子の発現を制御する色々な蛋白質が、非ヒストン蛋白質の中に見出されるはずだと一般に信じられている。細菌のlacレプレッサーからの類推により、これら制御分子の細胞あたりの分子数は 10^4 のレベルであろうとされている³¹⁾。すでによく解析されている酸可溶性非ヒストン蛋白質であるHMG蛋白質の細胞あたりのコピー数は $10^6 \sim 10^8$ と見積られているので、HMG蛋白質はヒストンと同じようにクロマチンで構造的な役割を担っているらしい³²⁾。事実、HMG蛋白質はヌクレオソームのモノマー平面に証明されている³³⁾。HMG蛋白質はヒストンに比べると限られた数しか存在しないので、あるヌク

レオソームは HMG 蛋白質を含むが、他のヌクレオソームは全くこれを欠いているはずである。正常肝細胞核や SR-C3H 細胞核の HAN-1 で、クロマチンに結合した部分の量は全ヒストンの 0.3~0.6% だから、核あたりの HAN-1 の分子数は $10^4 \sim 10^5$ のオーダーである。このような見積りから、例えば異なった鑄型活性をもつクロマチン分画での HAN-1 の分布が明らかになれば、HAN-1 の構造的、機能的役割が解明できるのではないかという期待が生まれる。

Busch のグループは二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動により多くの核の酸可溶性蛋白質を同定して来た²²⁾。最近これらの蛋白質の 1 つ、C-14 が Novikoff 肝癌細胞から精製され、裸の DNA を鑄型にした RNA ポリメラーゼ I 型の転写を促進することが報告された²³⁾。E.coli の RNA ポリメラーゼと E.coli の DNA を用いたときにも促進が認められたので、この蛋白質が特別なポリメラーゼや鑄型を好む傾向はないと言える。これに対して、HAN-1 は同じ細胞の RNA ポリメラーゼ I 型と II 型に逆の作用を示した。このことは HAN-1 がポリメラーゼを識別していることを暗示する。しかし、ここで用いたポリメラーゼの標品はまだ十分に精製されていないので、HAN-1 がポリメラーゼと直接相互作用している可能性の他に、他の未知の因子の関与を否定できない。HAN-1 の転写における役割を明らかにするには更に研究が必要である。

結 論

クロマチンの構造をより局所的なレベルで知るために種々の細胞の核に存在する高分子量の酸可溶性非ヒストン蛋白質 HAN-1 (high molecular weight acid soluble nuclear protein-1) の精製を試み、いくつかの性質を明らかにした。

1. ラウス肉腫ウィルスで誘発されたマウス腹水肉腫細胞、SR-C3H 細胞の HAN-1 含量 (ヒス

トンに対して約 4.3%) は他の正常細胞 (例えばラット肝、マウス肝) やトランスフォーム細胞 (例えば XC 細胞、マウス白血病細胞、Ehrlich 腹水癌細胞) の 4 倍~10 倍である。

2. SR-C3H 細胞の HAN-1 は約 10% がクロマチンに結合している。

3. SR-C3H 細胞から 0.2 M 硫酸抽出、Sephacryl S-200 および DEAE-Sephadex クロマトグラフィーにより電気泳動的に均一な HAN-1 が得られた。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により求めた HAN-1 の分子量は 125,000 であった。

5. HAN-1 のアミノ酸組成はグルタミン酸、アラニン、リジン、アスパラギン酸に富んでいる。酸性アミノ酸/塩基性アミノ酸比は 1.8 であり、HAN-1 は酸性蛋白質であると考えられる。

6. 裸の DNA を鑄型とした SR-C3H 細胞の RNA ポリメラーゼによる *in vitro* RNA 合成反応で、HAN-1 は I 型ポリメラーゼに対しては阻害、II 型ポリメラーゼに対しては促進効果を示した。

7. HAN-1 は α -キモトリプシンによりかなり限定的に分解され、1 つの安定な断片が得られた。

8. 精製された SR-C3H 細胞の HAN-1 はウサギに対して抗原性を示し、抗 HAN-1 抗体が産生された。

謝 辞

稿を終えるに臨み御指導、御校閲を賜った小田塚三教授に深謝いたします。心よく細胞を提供下さった市川弘幸博士 (マウス白血病細胞)、小倉肇博士 (A 31, A 31/B 77)、田中輝和博士 (XC 細胞) に深く感謝いたします。また色々な点で御協力いただきました岡山中央病院研究室の方々、写真撮影、組織培養などに並々ならぬ技量を発揮して下さいました中村孝志技官、安井民枝さんに厚く感謝いたします。

文 献

- 1) Olins, A. L. and Olins, D. E.: Science, **183**, 330-332, 1974
- 2) Kornberg, R. D. and Thomas, J. O.: Science, **184**, 865-868, 1974
- 3) Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P.: Cell, **4**, 281-300, 1975
- 4) Kornberg, R. D.: Ann. Rev. Biochem., **46**, 931-954, 1977

- 5) Axel, R., Cedar, H. and Felsenfeld, G. : *Biochemistry*, **14**, 2489-2495, 1975
- 6) Mathis, D. J. and Martin, A. G. : *Biochemistry*, **15**, 750-755, 1976
- 7) Augenlicht, L. H. and Lipkin, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 540-544, 1976
- 8) Chiu, J. F., Tsai, Y. H., Sakuma, K. and Hnilica, L. S. : *J. Biol. Chem.*, **250**, 9431-9433, 1975
- 9) Park, W. D., Jansing, R. L., Stein, J. L. and Stein, G. S. : *Biochemistry*, **16**, 3713-3720, 1977
- 10) Tsai, S. Y., Harris, S. E., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. : *J. Biol. Chem.*, **251**, 4713-4721, 1976
- 11) Goldknopf, I. L., Taylor, C. W., Baum, R. M., Yeoman, L. C., Olson, M. O. J., Prestayko, A. M. and Busch, H. : *J. Biol. Chem.*, **250**, 7182-7187, 1975
- 12) Goldknopf, I. L. and Busch, H. : *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 864-868, 1977
- 13) Goldknopf, I. L., French, M. F., Musso, R. and Busch, H. : *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5492-5495, 1977
- 14) Goodwin, G. H. and Johns, E. W. : *Eur. J. Biochem.*, **40**, 215-219, 1973
- 15) Johns, E. W., Goodwin, G. H., Walker, J. M. and Sanders, C. : in *The Structure and Function of Chromatin* (Fitzsimons, D. W. and Wolstenholme, G. E. W., eds) pp. 95-112, Elsevier Excerpta Medica North-Holland, Amsterdam, 1975
- 16) Goodwin, G. H., Woodhead, L. and Johns, E. W. : *FEBS Lett.*, **73**, 85-88, 1977
- 17) Panyim, S. and Chalkley, R. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337-346, 1969
- 18) Kahn, R. and Rubin, R. W. : *Anal. Biochem.*, **67**, 347-352, 1975
- 19) Laemmli, U. K. : *Nature*, **227**, 680-685, 1970
- 20) Payne, J. : *Biochem. J.*, **135**, 867-873, 1973
- 21) Weaver, R. F., Blatti, S. P. and Rutter, W. J. : *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 2994-2999, 1971
- 22) Tsutsui, K., Seki, S., Tsutsui, K. and Oda T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **517**, 14-23, 1978
- 23) Svoboda, J., Chyle, P. P., Simkovic, D. and Hilgert, I. : *Folia biol. (Praha)*, **9**, 77-81, 1963
- 24) Imagawa, D. T., Issa, H. and Nakai, N. : *Cancer Res.*, **28**, 2017-2026, 1968
- 25) Yamamoto, T. and Takeuchi, M. : *Jap. J. Exp. Med.*, **37**, 37-50, 1967
- 26) Peterson, J. L. and McConkey, E. H. : *J. Biol. Chem.*, **251**, 548-554, 1976
- 27) Knecht, M. E. and Busch, H. : *Life Sciences*, **10**, 1297-1309, 1971
- 28) Patel, N. T. and Holoubek, V. : *FEBS Lett.*, **46**, 154-157, 1974
- 29) Kostraba, N. C. and Wang, T. Y. : *J. Biol. Chem.*, **250**, 8938-8942, 1975
- 30) James, G. T., Yeoman, L. C., Matsui, S., Holdberg, A. H. and Busch, H. : *Biochemistry*, **16**, 2384-2389, 1977
- 31) Linn, S. Y. and Riggs, A. D. : *Cell*, **4**, 107-111, 1975
- 32) Orrick, L., Olson, M. O. J. and Busch, H. : *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 1316-1320, 1973

**Purification and properties of a high molecular weight
acid soluble nuclear protein from mouse ascites sarcoma cells**

by

Kimiko TSUTSUI

Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Takuzo Oda)

A high molecular weight acid soluble nuclear protein (HAN-1) was isolated in a electrophoretically homogeneous state from mouse ascites sarcoma cells (SR-C3H cells) by the exclusion chromatography in Sephacryl S-200 and the DEAE-Sephadex chromatography of the nuclear 0.2 M H₂SO₄ extract. The content of HAN-1 in SR-C3H nuclei was about 4.3% per total histone, the highest among the cell types tested. The molecular weight of HAN-1 was estimated to be 125,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The amino acid composition of HAN-1 was rich in glutamic acid, alanine, lysine and aspartic acid, the acidic/basic amino acid ratio 1.8. The *in vitro* RNA synthesizing activity of SR-C3H cell RNA polymerases I and II on a naked DNA template was differentially affected by HAN-1; the reaction with polymerase I was inhibited and that with polymerase II stimulated.