高等動物の細胞核——その構造と機能はどこまで明らかにされているか

水野重樹*

光学顕微鏡の発明は微細な生物の構造単位である細胞の存在を確認し、さらに真核細胞では有糸分裂の精巧な仕組みに驚かされた。電子顕微鏡はさらに微細構造を知る手掛りを与えたが、その構造体がいかなる仕組みでプログラム化された過程の中で機能しているかを知るには別のアプローチが必要となる。微細な構造の組合せをさらに細かく分解してゆくことは、機能との関連を知る上で基本的な行き方であろう。

真核細胞の核の構造の特徴として、2層の核膜、核孔、核小体、ヘテロクロマチンなどに関する記載は大抵の細胞学や生物学の教科書にのっている。しかし、顕微鏡観察で知る構造とその変化が、どのような機能の発現に与っているのかは明確にされていない。

たとえばヒトの2倍体ゲノムの場合、約 6×10^{-12} g (56 億塩基対) の DNA が 46 本の染色体に分かれて存在しているが、これらの DNA が細胞分裂間期の核内でどのような配置状態をとって複製や情報発現を行なっているのか、分裂間期のクロマチン (chromatin; 次頁カコミ欄に解説) と呼ばれる DNA-タンパク質複合体構造と分裂期の染色体との相互変換に際して、核内の構造との結びつきはどのように変化するのか、分裂中期に核膜が消失し、分裂終期に再び核膜が形成されるが、核膜の分解、再形成の機構はどのようなになっているのか、分裂間期の大部分を通じて凝縮状態を維持しているヘテロクロマチンは通常、核膜内膜に近接した部分や核小体周辺部に多く存在するが、これはクロマチン成分と核内の構造体とのどのような結びつきによるのか、DNA 中の転写単位から RNA ポリメラーゼ II によって転写された核内の不均一 RNA (hnRNA) は、転写途上からタンパク質と結合して hnRNA-タンパク質複合体 (hnRNP) を形成する。そして、この hnRNP 中で RNA のスプライシング反応を受けて mRNA を完成して、恐らくは mRNA-タ

ンパク質複合体 (mRNP) として核内から細胞質へ移行するものと考えられているが、hnRNP や mRNP がある時間経過と方向性をもって処理され、移行する一連の過程が核内の構造体とどのような関係をもって進行するのか、といった数多くの問題が未解決で残されている。

このように、遺伝情報の貯蔵、複製、発現、移行の場としての核構造、あるいは、これらの諸反応に、より積極的に関与している核構造の研究は現在多くの研究者の注目を集めており、1981、1982 両年のアメリカ細胞生物学会のシンポジウム課題としてもとり上げられているが、我が国ではこの問題に関する研究者の数が少ないことは残念に思われる。また、構造と機能を結びつける研究法自体に未確立な面が多く、細胞生物学と分子生物学の接点としての興味ある重要な問題でありながら、なかなか両者の手法がうまく噛み合わないという面もあるように思われる。ここでは、核内の DNA の存在様式と核構造との関係を中心に、この分野の最近の進歩について紹介することにした。

1. 核の単離に際して留意すべき問題点

核を単離してその構造と機能を研究するにあたっては、まず第一に細胞質の混入のない核を得ること、第二に核内の構造体とその構成成分を破壊しないことの2点に注意する必要がある。

第一の点については、Blobel & Potter (1966)⁽¹⁾ がラット肝臓の核を単離後、0.5~2% Triton X-

* Shigeki MIZUNO, 東北大学農学部生物化学講座

100 で洗うことにより核膜の外膜が除かれることを電顕観察によって示して以来、Triton X-100 や Nonidet P-40 のような非イオン性界面活性剤を含む緩衝液に核を懸濁したのち、種々の濃度 (0.88M から 2.3M) のショ糖を含む緩衝液上に上層して遠心分離を行ない、核を沈澱させる方法が一般に用いられている。

非イオン性界面活性剤の濃度や処理時間によって核膜の内膜も除去される場合があるが、後に述べる核ラミナと核マトリックスという核内構造体のために、核の形態はほぼ保たれているのが普通である。しかし、細胞質 RNA の混入のない核 RNA の研究を行なうような場合には、核の形態

は損われるが、いわゆる double detergent 法といって非イオン性界面活性剤と弱いイオン性界面活性剤の組み合わせ (たとえば 1% Tween 40 + 0.5% Na-deoxycholate) で単離核を洗うことが多い。

ところが、最近問題となっていることは、このような double detergent 処理後も核内に細胞質骨格 (cytoskeleton) の構成成分であるアクチン (分子量 45,000) やヴィメンチン (vimentin, 分子量 57,000) が残存していることで⁽²⁾、これらが細胞質骨格の混入を意味するののか、核内構造体の真の成分であるのかについては現在まだはっきりとした答は得られていない。ただ、Lebkowski

ク ロ マ チ ン

核内で DNA はタンパク質と複合体を形成して存在している。この状態は有糸分裂期に認められる染色体 (chromosome) よりは分散したもので、クロマチン (chromatin) と総称されている。クロマチンの基本構造は 2 本鎖 DNA とヒストン (histone) と呼ばれる数種の塩基性タンパク質との規則的な複合体であり、その基本単位はヌクレオソーム (nucleosome) と呼ばれている。

1973 年 以 来 の 多 くの 研 究 に よ っ て、ヌクレオソームは H2A, H2B, H3, H4 という 4 種のヒストンの各 2 分子が H2A・H2B-(H3)₂・(H4)₂-H2A・H2B のような構成の 8 量体を形成し、その周囲に 2 本鎖 DNA が約 2 回転巻きついた構造であることが明らかにされている (図 i-a 参照)。8 量体を形成する 4 種のヒストンはコア・ヒストンと呼ばれ、真核生物の進化の過程を通じてきわめて安定に保たれてきていることが知られている。各ヒストンのいくつかの性質が右表に示されている。コア・ヒストンが形成する 8 量体 (ヒストン・オクタマーまたはヌクレオソーム・コア) は直径約 70 Å, 厚さ約 56 Å の平らな円筒状の構造をとり、この周囲に図 i のように 2 本鎖 DNA が巻きついて直径約 110 Å, 厚さ約 56 Å のヌクレオ

図 i ヌクレオソーム構造のモデル⁽³⁹⁾

ソーム単位 (ヌクレオソーム・モノマーまたはモノヌクレオソーム) が形成されていることが、X線回折、中性子散乱、電子顕微鏡などの方法によって明らかにされている。

各ヌクレオソーム単位の間にはヒストンと結合していない 2 本鎖 DNA 部分 (リンカー) があり、いわゆる beads-on-a-string と呼ばれるファイバー構造が電子顕

主要ヒストンの性質^a

ヒストンの種類	H1	H2A	H2B	H3	H4
クロマチン中の存在部位	リンカー	ヌクレオソーム・コア	ヌクレオソーム・コア	ヌクレオソーム・コア	ヌクレオソーム・コア
アミノ酸組成からみた特徴	リジン含量が特に大	リジン含量が大	リジン含量が大	アルギニン含量が大	アルギニン含量が大
分子重量		21,500	14,000	13,770	15,320
アミノ酸残基数		215	129	125	135
リジン/アルギニン		22.0	1.17	2.50	0.72
塩基性アミノ酸/酸性アミノ酸		5.9	1.5	1.9	1.7
N 末端アミノ酸	アセチルセリン	アセチルセリン	プロリン	アラニン	アセチルセリン
C 末端アミノ酸	リジン	リジン	リジン	アラニン	グリシン

^aH1 はウサギ胸腺の 1 成分, 他は仔ウシ胸腺由来のヒストン種の分析例

& Laemmli (1982)⁽³⁾ は HeLa 細胞から核を分離する際、低張処理を行なった細胞を 0.1% (w/v) digitonin (非イオン性界面活性剤) と 20% (v/v) Percoll (コロイド状シリカ) の存在下にホモジュナイズすると、細胞質骨格の繊維成分が核に附着するのが妨げられること、次いで高濃度の Percoll を加えて遠心分離を行なうと Percoll の密度勾配が形成され、核は高密度側に、細胞質骨格成分は低密度側に分離されることを報告している。

このように、核の単離法の一つをとってみても、未だ確立された方法がなく、化学組成と電顕観察の両面から、より純粋な核の単離条件が検討

微鏡で観察されている。このリンカー部分の DNA は micrococcal nuclease による分解を受けやすく、クロマチンを低温で短時間、この酵素によって処理したのち、DNA を抽出してそのサイズを電気泳動で調べると、約 200 塩基対 (生物種や組織間で多少異なる) の整数倍の分解断片が得られる。一方、ヌクレオソーム 1 単位あたり 1 分子の H1 ヒストンが通常クロマチンには含まれており、この H1 ヒストンの存在部位に関して多くの研究がなされてきた。約 200 塩基対の DNA を含むヌクレオソーム+リンカーに対して、さらに 37°C で、micrococcal nuclease を作用させると、最終的には 146 ± 1 塩基対の DNA を含むヌクレオソーム・コアが得られる。この際、DNA 断片のサイズの減少を経時的に分析すると、166 塩基対まで減少した点で分解反応の遅滞が認められること、166 から 146 塩基対への分解に伴って H1 ヒストンが遊離することが認められ、H1 ヒストンはリンカー部分の DNA の 20 塩基対と結合していることが示された。この結合はヌクレオソーム・コアへの DNA の巻き始めと巻き終りの 10 塩基対ずつに対するものであると考えられている (図 i-b)。

ヌクレオソーム、H1 ヒストン、リンカー DNA からなるクロマチンの基本構造 (100 Å ファイバー: 本文参照) は核内のイオン環境下ではさらに高次の構造体 (250 ~ 300 Å ファイバー: 本文参照) を形成している。その様式については、図 ii のような連続的なラセン (ソレノイド) モデルと本文中に述べられているような不連続的なスーパービーズモデルが出されている。いずれにせよ、このような高次構造の形成には、H1 ヒストンの存在が不可欠である。また、分裂間期の大部分を通じて高度に凝縮したクロマチン構造を維持しているヘテロクロマチンの分子構造については、本文中に述べられている

される必要がある。

核内のクロマチン構造の面から核の単離条件を考える時、やはりいくつかの考慮すべき問題がある。それは、主としてクロマチンの高次構造の維持に 1 価、2 価の陽イオン濃度が影響を与えることと関連している。クロマチンの高次構造形成の出発段階は最大直径約 110 Å の通称 100 Å (10 nm) ファイバーで、これはヌクレオソーム単位がリンカー DNA を介して連なった、いわゆる beads-on-a-string 構造にヌクレオソーム 1 単位あたり 1 分子の H1 ヒストンが加わり、各ヌクレオソーム単位を固定化すると同時に遊離のリンカー部分を短縮する形となったものである (カコミ

図 ii 250 Å クロマチンファイバー形成のソレノイドモデル⁽⁶⁾

ように不明の点が多く、現在、研究が進められている。

本来、高次構造の形成に有利な核内のイオン環境下で如何にして情報発現部位とその活性レベルが決定、維持、制御されているのかというクロマチンレベルの情報発現調節の問題が現在の分子生物学の中心課題の一つとなっている。クロマチン中には恐らく数百種類にも及ぶ非ヒストン性のタンパク質が存在している上、ヒストンもこれらの非ヒストン性タンパク質もリン酸化、アセチル化、ADP-リボシル化などの修飾の対象となっており、これらはクロマチンレベルの情報発現調節と深く関わっているものと予想されるが、未だ十分な理解は得られていない。

クロマチンの構造については文献 4, 5, 6, 38, 39, 40 が参考になる。

欄の解説参照)^(4~6).

100Å ファイバーは数十~100nm の Na^+ または K^+ の存在下に、さらに高次の folding 状態を形成して直径 250~300Å のファイバーを形成することが知られている。この構造に関しては、100Å ファイバーがコイル状に巻いたソレノイド構造⁽⁶⁾や 100Å ファイバー中のスクレオソームが数個ないし 30 個程度 H1 を介して会合したスーパービーズ構造が不連続的に連なった状態を考えているグループもある⁽⁷⁾。ヘテロクロマチンの分子構造は現在のところ不明であるが、一応 250Å ファイバーがさらに高次の folding をとっているものと考えてよからう。250Å ファイバーの形成は、少なくとも試験管内では 1 価陽イオンが存在しなくても、数 mm の Mg^{2+} が存在すれば形成されることが知られている⁽⁶⁾。

したがって、クロマチンの高次構造を維持した核を分離するためには、100 nm 前後の 1 価陽イオン存在下に細胞を破壊すればよいわけであるが、この塩濃度下では細胞がなかなか完全には破壊されず、細胞質と核の分離が悪いことが多い。そこで、1 価陽イオンの濃度を下げ、5~10 mm 程度の Mg^{2+} , Ca^{2+} を加えた低張緩衝液を作り、これに細胞を懸濁して膨潤させたのちホモジェナイズすることがよく行なわれる。 Ca^{2+} は核や核小体の形態維持に役立つので加えられることが多い⁽⁸⁾。ところが、核内には Mg^{2+} , Ca^{2+} で活性化されるヌクレアーゼが存在し、このような条件下ではクロマチンの高次構造の弛んだ活性クロマチン部分のリンカー DNA が分解を受ける危険性がある⁽⁹⁾。

このように、すべてを満足するような核の単離条件を見いだすことは難しい問題である。また、ヌクレアーゼのみならず、核内のプロテアーゼ活性を如何に抑制するかがクロマチンタンパク質の研究に際して重要な問題となる。0.1~1 mm 程度のフェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) 存在下に核を分離する 경우가多いが、筆者らは核の分離やクロマチンの分画の際に、異なったタイプの活性中心をもつプロテアーゼに対処するため 5 種類のペプチド性プロテアーゼ阻害剤

(アンチパイン、キモスタチン、エラスタチナール、ロイペプチン、ペプスタチン A、各 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて良い結果を得ている。

2. 核ラミナと核マトリックス

Aaronson & Blobel (1974)⁽¹⁰⁾は、ラット肝臓の単離核を 2~5% の Triton X-100 で洗って 98% 以上の膜りん脂質を可溶化させたのち、電子顕微鏡で観察したところ、核膜の外膜、内膜ともにほぼ完全に除去されているにもかかわらず核の形態が保たれ、核孔 (nuclear pore complex) の構造も保持されていることを認めた。彼らは、この核孔を含む核の表層構造体を分離するため、単離核を pH8.5 および pH7.5 における DNase I 処理、2% Triton X-100 処理、0.3 M MgCl_2 抽出して、タンパク質を主成分とする残存構造 (nuclear ghost) を得た。この残存構造を電子顕微鏡で観察したところ、直径 700~900Å、高さ約 650Å の核孔が厚さ約 150Å の無定形のシート構造 (amorphous lamina) の上に数多く付着している様子が観察された⁽¹¹⁾。

図1 ラット肝臓核から分離された核ラミナ-核孔構造体⁽¹²⁾

核ラミナ (1a) と側面 (1本の矢印) および正面 (2本の矢印) から見た核孔を示す。サイズマーカーは 0.1 μm 。

図2 核の表層構造の模式図⁽¹¹⁾

核膜の外膜 (om)、内膜 (im) とその間のスペース (ps)、リボゾーム (r)、核孔 (pc)、核ラミナ (pl)、ヘテロクロマチン (hc) が示されている。核膜、核孔、核ラミナを合わせて、nuclear envelope (NE) と呼ばれている。図の左側ではヘテロクロマチンによって核ラミナの存在が明らかでない場合が示されている。

Dwyer & Blobel (1976)⁽¹²⁾ は、この核ラミナー核孔構造の分画法をさらに検討して、0.3M MgCl₂ 抽出の代わりに 1M NaCl 抽出を行なうと、図1に示したように連続性の良いラミナー構造が得られることを示した。図2には Aaronson & Blobel (1975)⁽¹¹⁾ による核の表層構造のモデルを示した。このモデルでは、核膜の内膜に接してシート状の核ラミナー構造が広がり、核孔はこの構造の一部として組込まれており、非イオン性界面活性剤で核膜を除去したのちはこの核ラミナー層の存在によって核の形態が保たれるものと考えられている。また、ヘテロクロマチンと核ラミナーとの相互作用も考慮されている。このモデルは、以下に述べる核マトリックスの存在を除けば大筋は現在でも支持されるものといえよう。

Dwyer & Blobel (1976)⁽¹²⁾ は、核ラミナー-核孔構造体のタンパク質組成を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で調べ、分子量 60,000~70,000 の領域に3本のバンドが主成分として含まれることを示した(図3)。その後、Gerace & Blobel (1980)⁽¹³⁾ によってこれらの3成分は lamin A, B, C と名付けられ、分子量は 70,000, 67,000,

60,000 と決定された。lamin A, B, C は間期には重合して核ラミナーを形成し、分裂期には解離して存在するものと推定されている。

この点を支持する結果が、lamin の蛍光抗体を用いた蛍光顕微鏡観察から得られている。ヒトの HeLa 細胞、チャイニーズハムスターの CHO 細胞、ラットカンガルーの PTK₂ 細胞などの培養細胞を用いた実験から、lamin は間期細胞核では核の表層部に集中して存在するが、有糸分裂の前期から中期にかけて核膜の消失と呼応して細胞質中に分散し、分裂終期に再び染色体周辺から次第に核の表層部に集中し始め、細胞質から核の表層部への移行は G1 期の初期まで継続するという観察がなされている⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。免疫パーオキシダーゼ法による電顕観察によると、3成分の lamin の抗体はいずれも核ラミナー層とのみ反応し、核孔部分とは反応しない⁽¹⁴⁾。また、以下に述べる核マトリックス部分とも反応しないことが蛍光抗体法で示されている^(14,15)。

Lamin A, B, C の免疫学的性質は類似しており、それぞれの抗体が各成分と反応することが示されている^(13,14)。lamin は進化上保存性の高いタンパク質らしく、ラット肝臓の lamin A または B に対して得られたニワトリの抗血清は他の齧歯類やヒトの lamin とも反応する^(13,15,16)。ペプチドマップの比較から、lamin A と C は類似性が高く、C は A の部分分解物である可能性も考えられているが⁽¹⁷⁾、lamin A と B については、異なった性質も認められている。たとえば、単離核から核ラミナー-核孔構造体を分画する際に 0.5M KCl または NaCl 処理を行なうと、lamin A, C は少し可溶化する傾向があるが、B は構造体との結合性が強い。また、有糸分裂中期に細胞を分画すると、lamin A, C は 40,000 rpm, 15 分間の上澄にそれぞれモノマーとして回収されるが、lamin B は沈殿に残り、2% Triton X-100 処理で初めてモノマーとして可溶化される⁽¹³⁾。これらの結果から、lamin B と核膜との結合性が示唆されている。この他、有糸分裂期には lamin 各成分のりん酸化の程度が増加することも認められており⁽¹⁸⁾、lamin の重合、解離とりん酸化との関係

図3 ラット肝臓の核および核マトリックスのタンパク質組成 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分析)⁽¹²⁾

1: 核, 2: 核を DNase I 処理, Triton X-100 処理後の沈殿画分, 3: 2をさらに 2M NaCl 抽出後の上澄画分, 4: 3の沈殿画分 (核マトリックス)。1の白点を付けたバンドはヒストン成分、ヒストンは 2M NaCl 抽出で上澄(3)に遊離し、核マトリックス(4)には分子量 67,000 前後の3種の主要タンパク質成分(傍線)が含まれる。左側の数字は分子量(kd)を示す。

図4 ラット肝臓核の核マトリックス構造⁽¹⁹⁾

核内に広がるマトリックス構造 (IM), マトリックス粒子の集合 (破線で囲まれた部分), 残存核小体 (RN), 残存する表層構造 (RE) が認められる。矢印の空所は核小体周辺のヘテロクロマチンが占めていた部分と考えられる。

にも興味をもたれている。このりん酸化の問題は、後に述べる lamin と DNA との結合性にも影響を与える可能性がある。

さて, Blobel らが核ラミナの存在を明らかにしたと同じ頃, 同じラット肝臓核を材料として Berezney & Coffey (1974)⁽¹⁸⁾ は, 核内部に網目様に広がるタンパク質性の核マトリックス (nuclear matrix) の存在を示した (図4)。彼らの用いた方法は, 単離核を 0.2mM MgCl₂ 抽出, 2M NaCl 抽出, 1% Triton X-100 処理, 200 μg/ml DNase I + 200 μg/ml RNaseA 処理と順次処理して残存構造体を得るというもので, 本質的には Blobel らの核ラミナ-核孔構造体の分画条件と類似している。Blobel らの標品には核マトリックス構造が認められない理由は, 恐らく各処理段階で核の残存構造体を沈澱させる遠心分離の条件が強いこと, 懸濁にボルテックスを使用していることなどによる機械的な破壊によるものではないかと考えられる。

核マトリックス構造を残した標品の場合, 当然核ラミナも含まれていることになり, そのタンパク質組成の主成分は分子量 69,000, 66,000, 62,000 の3種のタンパク質で, これらは lamin A, B, C に対応するものと考えられる^(18,19)。ただ, 核マトリックスを残した構造体の場合, 分子量 50,000 附近および 100,000~200,000 附近に不均一な非ヒストン性タンパク質成分の存在が認められ⁽¹⁹⁾, プロテアーゼ阻害剤を加えて調製した場合, 分子量 100,000 以上の高分子タンパク質成分の存在割合が増加することが報告されている⁽²⁰⁾。核マトリックス構造はコラゲナーゼやヒアルロニダーゼ処理では破壊されず, トリプシンまたはプロナーゼで破壊される⁽¹⁹⁾。

しかし, 現在のところ, 出発材料としての単離核の純度 (特に細胞質骨格成分の混入の程度) や核マトリックス画分の純度 (hnRNP や mRNP の混入の程度など) の問題があり, 核マトリックスの構成タンパク質がいずれであるのかは明らかにされていない。超薄切片の電子顕微鏡観察によると, 核マトリックスは直径 150~250 Å の粒子状の構造 (matrix particle) と直径 30~50 Å 程度の細い繊維状の構造 (matrix fiber) からなり, 両構造に対応する構造が単離核切片の電顕像においてクロマチン繊維の間に認められると主張されている⁽¹⁹⁾。しかし, matrix particle と直径約 250 Å のクロマチンの高次構造体との識別は難しいものと思われる。また, 核マトリックスをヒアルロニダーゼ処理すると, 直径 250~300 Å の粒子状構造が会合状態から解離して得られるという, Berezney & Coffey (1977)⁽¹⁹⁾ の結果と矛盾するような報告もある⁽²¹⁾。

Capco ら (1982)⁽²²⁾ は, マウスの 3T3 細胞や

ヒトの HeLa 細胞をホルムパール-カーボン支持膜を有する電顕観察用のグリッド上で培養し、この状態の細胞に対して直接 0.25 M 硫酸アンモニウム抽出, 0.5% Triton X-100 処理, 400 μ g/ml RNase A + 400 μ g/ml DNase I 処理などを行なったのち, 固定, 染色, 脱水して, そのまま, whole mount 標品として電顕観察を行ない, 核マトリックスの 3 次元構造を調べた。このような方法によると, 従来の包埋, 超薄切片化によっては観察の妨げられていた核マトリックスの繊維構造の詳細が観察され, 核マトリックスは直径 30 ~ 220 Å の不均一の繊維構造からなり, これらが複雑なネットワークを形成し, バスケット様に見える核ラミナ層に接し, 一方, 細胞質骨格繊維も核ラミナ層と連絡しているような観察結果が得られている。

3. 核内の DNA の存在様式

1) 非クロマチン性の folding

Lebkowski & Laemmli (1982)⁽²²⁾ は, ^3H -チミジン存在下に培養された HeLa 細胞からジギトニン処理, Percoll 密度勾配遠心分離によって核を単離したのち, 2M NaCl または 2mg/ml 硫酸デキストリン + 0.2mg/ml ヘパリンを加えて核内のクロマチンからヒストンを除去して, いわゆる histone-depleted nuclei を調製した。エチジウムブロマイド蛍光染色を行なって観察すると, ヒストン除去前の核が輪郭のはっきりとした直径約 4 μ m の球状であるのに対し, histone-depleted nuclei は直径約 6 μ m で, 周辺が蛍光のハローで少しぼけた球状を示した。この結果は, クロマチンからヒストンが除去されたのち, DNA は恐らく核内の構造体との何らかの結合によって, folding を受けた状態にあり, 不規則に分散することはないことを示している。histone-depleted nuclei はショ糖密度勾配遠心分離によって単一成分として分画され, その沈降定数は 15,000 ~ 18,000 S と推定され, Type I 構造と呼ばれている。

Histone-depleted nuclei における DNA の folding は 1975 年頃からいくつかのグループに

図 5 ヒストンを除去された HeLa 細胞の核における DNA の folding⁽²²⁾

いずれも 2M NaCl 抽出でヒストンを除去した核をショ糖密度勾配遠心分離によって分画。沈降方向は右から左。DNA は細胞培養時に ^3H -チミジンを取り込ませて標識してある。

A: Type I 構造 (●), Type I を 14mM 2-メルカプトエタノール (β Me) 処理して得られた Type II 構造 (○), Type I を 50 μ g/ml プロナーゼ処理した場合 (◇)。B: Type I を 25 mM NaBH₄ 処理した場合 (■) で, Type II への変換は認められない。Type I を 14mM β Me 処理して得られた Type II (○)。C: Type I (●) と Type I を 3mM 1, 10-フェナンスロリン処理して得られた Type II (▼)。D: 14mM β Me 処理して得られた Type II (○), β Me 処理後, 1 mM CuSO₄ 4°C 10 min 処理によって再形成された Type I (●), 同様の処理を 1mM ZnCl₂ で行なった場合 (■) は大部分が Type II として残っている。

よって認められていたが, この DNA の folding が核ラミナや核マトリックスと如何なる関係のもとにあるかは明らかでなかった。Lebkowski & Laemmli (1982)⁽²²⁾ は, 上記の Type I 構造に pH 9.0 で 14mM 2-メルカプトエタノールまたは 3mM 1, 10-フェナンスロリンを加えて, ショ糖密度勾配遠心分離を行なうと, 沈降速度の遅い約

8,500 S の Type II 構造に変わることを見いだした (図 5)。

Type II 構造をエチジウムブロマイド蛍光染色で観察すると、Type I 構造よりさらに蛍光ハローの広がった直径約 $12\mu\text{m}$ の球状構造が認められ、Type I よりさらにゆるんだ DNA の folding 状態であることが示唆された。Type I から Type II 構造への変化は NaBH_4 によっては引き起こされないため、2-メルカプトエタノールの作用は S-S 結合の還元によるものではなく、重金属イオンのキレート作用によるものと考えられている (図 5)。実際、単離核を 14 mM 2-メルカプトエタノール処理後、メルカプトエタノールを洗い去り、これに $1 \times 10^{-6}\text{M}$ という低濃度の CuSO_4 を加え 4°C で 10 分間おいたのち、10 mM EDTA 処理、2M NaCl によるヒストン抽出を行なうと、Type I 構造が回復することが示された (図 5)。 Cu^{2+} の代わりに Zn^{2+} , Mn^{2+} では回復せず、 Ca^{2+} の場合には 37°C 、30 分間の処理で Type I 構造の回復が認められた。ただし、 Cu^{2+} 処理の場合には、引き続きこれを上廻る濃度の 1,10-フェナンスロリンを加えれば再び Type II 構造が得られるのに対し、 Ca^{2+} 処理後はキレーターを加えても Type II 構造は得られず、Type I 構造が不可逆的に固定されてしまうらしい。Type II 構造はプロナーゼ処理によって破壊されるため、タンパク質を介した DNA の folding であると考えられている (図 5)。

Type I, II 両構造とも核の骨格構造 (nuclear scaffold) による DNA の folding と考えられている。Type I 構造には核内の全タンパク質の 10~15% が含まれ、その内容は lamin A, B, C と、主として lamin より高分子の多数の非ヒストン性タンパク質からなっている。Type II 構造には核内の全タンパク質の 3~5% が残存しており、その内容は lamin A, B, C が主成分で、その他に分子量 64,000, 200,000 の成分も検出されている。これらのタンパク質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、ニトロセルロースメンブランフィルターに移し、これに ^{32}P -標識した HeLa 細胞 DNA を反応させたところ、Type I 構造で

は 12 種、Type II 構造では 4 種のタンパク質成分が DNA 結合性を示したが、いずれの場合も lamin A, B, C が主要な DNA 結合性タンパク質であった⁽³⁾。

以上の結果は、核内の非クロマチン性の DNA の folding には少なくとも 2 段階のレベルがあり、一つは核ラミナと DNA の結合によるもの、他は恐らくその他の非ヒストン性タンパク質と Cu^{2+} または Ca^{2+} のような金属イオンの関与する folding であることを示している。後者については、核マトリックスと DNA との結合が関係するものと予想され、Type I 構造中の lamin 以外の DNA 結合性タンパク質と核マトリックスの構成タンパク質との対応関係に興味をもたれる。キレーター処理によって多種類の非ヒストン性タンパク質が nuclear scaffold から可溶化され、同時に DNA の unfolding が進行することを考えると、核マトリックスの高次構造の形成自体に金属イオンが関与している可能性も考慮する必要がある。

Lewis & Laemmli (1982)⁽²³⁾ は、HeLa S3 細胞の分裂中期染色体を単離して、これからヒストンを除去したのちの DNA の folding について報告しているが、nuclear scaffold の場合ときわめて類似した Cu^{2+} または Ca^{2+} と非ヒストン性タンパク質の関与する DNA の folding を認め、chromosome scaffold と呼んでいる。この chromosome scaffold は 2 種のタンパク質 SC-1, SC-2 (分子量 170,000 と 135,000) を主成分とするが、これら両成分が間期の核では Type I 構造の nuclear scaffold の構成成分として存在するのかどうか、明確な答は得られていない。

2) クロマチンレベルの folding

ここでは、核内のクロマチンの高次構造の中で、細胞学的に特に顕著に観察されるヘテロクロマチンの構造について筆者らの研究を中心に簡単に触れてみたい。

ヘテロクロマチンに関して興味ある問題点の一つは、そのクロマチン凝縮の分子機構であり、第二点は、核膜の内膜近接部や核小体周辺部に分布

する仕組みに関するものである。第一点については、ヘテロクロマチンを純粹に単離して、そのDNA、タンパク質成分の特異性を調べ、それらの相互作用をクロマチンの再構成実験などを通して明らかにする必要がある。特にヘテロクロマチンに多く含まれていることの知られている反復DNA塩基配列や、そのシトシン残基のメチル化がクロマチンの凝縮と如何に関わっているかを明らかにすることが一つのポイントであろう。現在まで、ヘテロクロマチンを純粹に単離する方法は確立されておらず、核ラミナや核マトリックスとの確実な分離法を考案する必要がある。また、特定のDNAプローブを利用して、特定のヘテロクロマチン部分を分離、精製する試みも重要と思われる。

第二点については、ヘテロクロマチンと核ラミナなどの核内構造体との相互作用を研究する必要があるが、この問題はまったく未解決といってよい。たとえば、lamin とヘテロクロマチンとの結合が考えられるとすれば、一般にDNA結合能を示すlaminが特にヘテロクロマチンに含まれるDNAと親和性が高いという事実があるのか、ヘテロクロマチンを構成する特異的なタンパク質成分とlaminなどの構造タンパク質との間のタンパク質間相互作用は関与していないのか、金属イオンの関与はどうかなど、一つ一つはっきりと

答を出してゆく必要があろう。

筆者らは、ニワトリの肝臓や脾臓の核を材料としてヘテロクロマチンの凝縮機構の研究を行なっているが、クロマチン凝縮について二つの特徴を捉えている^(24, 25)。一つは、0.35M NaCl という比較的低い塩濃度下でクロマチンの凝縮状態が破壊される点で、図6の電顕像に示すように単離核を0.35M NaClを含む緩衝液に懸濁後、遠心分離で沈澱として回収してみると、ヘテロクロマチンはほとんど完全に消失しており、核ラミナ層の内部に不完全な核マトリックスと部分的に残存した核小体を残すのみとなっている。0.35M NaClの条件下ではDNAと5種のヒストン(H1, H2A, H2B, H3, H4)との結合は保たれ、HMG (high mobility group) タンパク質のような比較的低イオン性相互作用でDNAに結合していた非ヒストン性タンパク質がクロマチンから解離することが知られている。したがってこの結果は、ヘテロクロマチンの凝縮にクロマチンタンパク質間の、またはDNAと非ヒストン性タンパク質間の比較的弱いイオン性相互作用が関与していることを示唆している。

同様な結果は、単離核をDNase I 処理、非イオン性界面活性剤 Nonidet P-40 処理、超音波破壊、再度のDNase I 処理のちに、10,000×g、10分間の遠心分離によって沈澱として回収された

DNase I 抵抗性クロマチン画分(DRC)についても認められている。図7のようにDRC画分に含まれる凝縮したヘテロクロマチンは、DRCを0.35Mあるいは0.60M NaClに懸濁後、10,000×g、10分間の沈澱として得られた画分には認められない。DRCを種々の条件下に再懸濁後、10,000×g、10分間の沈澱として回収されるDNA量をクロマチン凝縮の指標として調べてみると、表のようにクロマチンの凝縮は尿素、キレーター、非イオン性界面活性剤によ

図6 ニワトリ脾臓核のヘテロクロマチン構造に対する塩濃度の影響
0.15M NaCl(A) または 0.35M NaCl(B) を含む緩衝液に4℃、30分間懸濁後、遠心分離によって沈澱させた核の超薄切片電顕像(東京理科大、恒松康彦博士提供)。サイゾマーは2.5μm。

図7 ニワトリ脾臓核から得られた DNase I 抵抗性クロマチン画分 (DRC) に含まれるヘテロクロマチン構造に対する塩濃度の影響

0.15M NaCl(A), 0.35M NaCl(B), 0.60M NaCl(C) を含む緩衝液に 4°C, 30 分間懸濁後, 10,000×g, 10 分間の遠心分離で沈澱させた画分の超薄切片電顕像 (東京理科大, 恒松康彦博士提供). サイズマーカーは 2μm.

ニワトリ脾臓の DNase I 抵抗性クロマチン (DRC) の可溶化条件

DRC を再懸濁する条件 (標準緩衝液 ^a への添加物の最終濃度)	再懸濁された DRC を 10,000×g, 10 分間の遠心分離後, 沈澱画分に回収された DNA 量	
	(μg)	(%)
標準緩衝液のみ	56	100.0
0.40M NaCl	14	25.0
0.65M NaCl	9	16.1
2.05M NaCl	6	10.7
3.0M 尿素	55	98.2
3.0M 尿素+2.05M NaCl	5	8.9
0.01M EDTA	56	100.0
0.01M EGTA	59	105.4
0.01M 1, 10-フェナンスロリン	61	108.9
1% Triton X-100	62	110.7
1% Nonidet P-40	57	101.8
1% Tween-80	58	103.6

^a 標準緩衝液: 0.05M Tris-HCl (pH7.5)-0.05M KCl-0.10M NaCl. 各 2.5μg/ml アンテパイン, キモスタチン, エラスタチナール, ロイペプチン, ペプスタチンA.

って影響されず, 塩濃度の上昇によってのみ破壊されることが示されている. クロマチンの凝縮が 0.15M の 1 価陽イオン濃度では保たれているが, 0.40M に上昇すると著しく破壊されることは, 図6の単離核を用いた実験結果と対応する結果といえよう. 塩濃度を 0.65M まで上昇させた際に 10,000×g, 10 分間の上澄部分に遊離するクロマチンはほぼモノヌクレオソームに相当する沈降定数を示すこと, DRC から抽出された DNA のサ

イズは約 140 塩基対で, 再度の DNase I 処理によってほぼモノヌクレオソームに含まれる DNA のサイズにまで切断されていることが認められている. ただし, 通常, クロマチンを DNase I によって分解すると, スクレオソーム上の DNA が約 10 塩基対単位で切断されるので⁽²⁶⁾, ヘテロクロマチン中のスクレオソームの場合, スクレオソーム・コアに巻きついている DNA 部分が特に DNase I に抵抗性を示すといえるのかもしれない.

これらの結果は, ヘテロクロマチン構造の第二の特徴として, クロマチンの凝縮状態は DNA の高分子性なしに, 恐らくはモノヌクレオソーム間の会合によって保持されうること, この会合には弱いイオン性相互作用が関与することを示すものと考えられる. 1,10-フェナンスロリンを含めてキレーター処理によってはヘテロクロマチンの分散が引き起こされないことは, このクロマチンレベルの folding には非クロマチン性の folding の場合に認められているような Cu²⁺ や Ca²⁺ の関与はないことを示すものであろう.

最近, 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の染色体の動原体 (centromere) 部分の DNA がクロン化され, それらの塩基配列が明らかにされているが, これらの DNA 中の 220~250 塩基対部分

が micrococcal nuclease では分解されないクロマチン構造をとっており、通常のヌクレオソーム構造とは異なった DNA-タンパク質複合体として存在している可能性が示唆されている⁽²⁷⁾。非ヌクレオソーム性の DNA-タンパク質複合体の存在は、原生動物 *Tetrahymena* (繊毛虫の一種) の大核中のリボソーム RNA 遺伝子を含む DNA 断片の両端部分⁽²⁸⁾ や変形菌類 *Physarum polycephalum* のやはりリボソーム RNA 遺伝子を含む小型 DNA の両末端部⁽²⁹⁾ に認められている。筆者らが研究しているヘテロクロマチン画分のタンパク質構成は 4 種のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) を主体とするが、H1 ヒストンについては異なったサブタイプの存在が認められ⁽²⁵⁾、ヌクレオソーム構造を基本とするが、ヌクレオソーム間の相互作用による高次の会合体の形成にこのような変形 H1 ヒストンが関与している可能性も考えている。

4. DNA の複製、転写と核マトリックスの関係

ラットの再生肝、マウスの 3T3 繊維芽細胞、変形菌類の *Physarum polycephalum* などの異なった材料で、DNA 複製時に放射性標識チミジンを 1 分間程度の短時間与えたのち核を分離し、核マトリックスを調製すると、核マトリックス画分に残存している DNA (全 DNA の約 1% 程度) の比放射能が全 DNA の比放射能に比べて 10 倍近く高いという結果が得られている⁽³⁰⁻³³⁾。そして、このような結果は分画の過程で標識 DNA が単に非特異的に核マトリックスに結合することによるものではないことも確かめられている。標識時間を 30 分間程度まで延長したり、核マトリックス調製時の DNase I 処理の条件を変えて、核マトリックス画分に残存する DNA 量を増加させると、次第に核マトリックス DNA の比放射能は全 DNA の比放射能に接近することが示されている。このような結果から、DNA 複製が核マトリックスと何らかの緊密な構造的関係を示す固定した複製点において進行するというモデルが考えられている。

また、産卵期の鶏の輸卵管と肝臓の核から全

DNA と核マトリックス結合 DNA を抽出して、これらの DNA に対するオバルブミン cDNA (mRNA を鋳型として逆転写酵素によって合成された相補的 DNA) あるいは β -グロビン cDNA のハイブリッド形成量を調べたところ、オバルブミン遺伝子が輸卵管の核マトリックス結合 DNA 中に約 4 倍濃縮されていたという報告もある⁽³⁴⁾。この場合、肝臓の核マトリックス結合 DNA にオバルブミン遺伝子の濃縮はなく、また輸卵管の核マトリックス結合 DNA に β -グロビン遺伝子の濃縮は認められなかった。この結果から、転写活性の高い遺伝子部分が核マトリックスと構造的に接近して存在していることが推定されている。しかし、hnRNP^(35,36) や snRNP⁽³⁷⁾ (低分子量の核 RNA とタンパク質の複合体) の多くがやはり核マトリックスと結合して得られるという結果を考えると、活性遺伝子が転写途上の RNA 鎖と複合体を形成したタンパク質を介して核マトリックスに結合している可能性も考えられよう。

このように、DNA の複製や転写の過程、また生成した RNA-タンパク質複合体と核マトリックスとの構造的結びつきを示唆する結果がいろいろ得られているが、これらの過程における核マトリックスの役割を論じることは、核マトリックスの分子構成が明らかにされていない現在、時期尚早といわざるをえない。しかし、近い将来、これらの核内の構造と機能との関係が次第に明確に説明されるようになることが期待される。

文 献

(太字の文献番号は本稿の主題と関連して特に重要と考えられるもの)

- 1) G. Blobel & V. R. Potter : *Science*, 154, 1662 (1966).
- 2) D. G. Capco, K. M. Wan & S. Penman : *Cell*, 29, 847 (1982).
- 3) J. S. Lebkowski & U. K. Laemmli : *J. Mol. Biol.*, 156, 325 (1982).
- 4) 水野重樹 : 生化学, 51, 65 (1979).
- 5) A. Klug, D. Rhodes, J. Smith, J. T. Finch & J. O. Thomas : *Nature*, 287, 509 (1980).
- 6) F. Thoma, T. Koller & A. Klug : *J. Cell Biol.*, 83, 403 (1979).
- 7) J. L. Jorcano, G. Meyer, L. A. Day & M. Renz : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6443 (1980).
- 8) M. Muramatsu & T. Onishi : *Methods in Cell Biology*, 15, 221 (1977).
- 9) D. R. Hewish & L. A. Burgoyne : *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.*, 52, 504 (1973).
- 10) R.P. Aaronson & G. Blobel : *J. Cell Biol.*, 62, 746 (1974).
 - 11) R.P. Aaronson & G. Blobel : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1007 (1975).
 - 12) N. Dwyer & G. Blobel : *J. Cell Biol.*, 70, 581 (1976).
 - 13) L. Gerace & G. Blobel : *Cell*, 19, 277 (1980).
 - 14) L. Gerace, A. Blum & G. Blobel : *J. Cell Biol.*, 79, 546 (1978).
 - 15) S. Ely, A. D'Arcy & E. Jost : *Exp. Cell Res.*, 116, 325 (1978).
 - 16) E. Jost & R. T. Johnson : *J. Cell Sci.*, 47, 25 (1981).
 - 17) K. R. Shelton, L. L. Higgins, D. L. Cochran, J. J. Ruffolo, Jr. & P. M. Egle : *J. Biol. Chem.*, 255, 10978 (1980).
 - 18) R. Berezney & D. S. Coffey : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1410 (1974).
 - 19) R. Berezney & D. S. Coffey : *J. Cell Biol.*, 73, 616 (1977).
 - 20) R. Berezney : *Exp. Cell Res.*, 123, 411 (1979).
 - 21) P. Engelhardt, U. Plagens, I. B. Zbarsky & L. S. Filatova : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6937 (1982).
 - 22) J. S. Lebkowski & U. K. Laemmli : *J. Mol. Biol.*, 156, 309 (1982).
 - 23) C. D. Lewis & U. K. Laemmli : *Cell*, 29, 171 (1982).
 - 24) 水野重樹, 竹村一男, 上崎利昭 : 第54回日本生化学会大会抄録, 生化学, 53, 761 (1981).
 - 25) 水野重樹, 上崎利昭, 刀襦正英, 恒松康彦, 志村憲助 : 第55回日本生化学会大会抄録, 生化学, 54, 830 (1982).
 - 26) B. Sollner-Webb & G. Felsenfeld : *Cell*, 10, 537 (1977).
 - 27) K. S. Bloom & J. Carbon : *Cell*, 29, 305 (1982).
 - 28) E. H. Blackburn & S.-S. Chiou : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2263 (1981).
 - 29) M. K. Cheung, D. T. Drivas, V. C. Littau & E. M. Johnson : *J. Cell Biol.*, 91, 309 (1981).
 - 30) R. Berezney & D. S. Coffey : *Science*, 189, 291 (1975).
 - 31) R. Berezney & L. A. Buchholtz : *Biochemistry*, 20, 4995 (1981).
 - 32) D. M. Pardoll, B. Vogelstein & D. S. Coffey : *Cell*, 19, 527 (1980).
 - 33) B. F. Hunt & B. Vogelstein : *Nucl. Acids Res.*, 9, 349 (1981).
 - 34) S. I. Robinson, B. D. Nelkin & B. Vogelstein : *Cell*, 28, 99 (1982).
 - 35) R. Herman, L. Weymouth & S. Penman : *J. Cell Biol.*, 78, 663 (1978).
 - 36) C. A. G. van Eekelen & W. J. van Venrooij : *J. Cell Biol.*, 88, 554 (1981).
 - 37) H. Nakayasu, H. Mori & K. Ueda : *Cell Struct. Funct.*, 7, 253 (1982).
 - 38) G. Felsenfeld : *Nature*, 271, 115 (1978).
 - 39) R. D. Kornberg & A. Klug : *Sci. Am.*, 244, 52 (1981).
 - 40) T. Igo-Kemenes, W. Hörz & H. G. Zachau : *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 89 (1982).

プロフィール

石川 幸男 (Yukio Ishikawa) 昭和29年3月3日生<略歴>昭和52年東京大学農学部農芸生物学科卒業/54年同大学大学院農学系研究科修士課程修了(農業生物)/同年同大学農学部害虫学研究室助手, 現在にいたる<研究テーマと抱負>昆虫と植物間の情報伝達物質の解明<趣味>パソコン

井上謙一郎 (Kenichiro Inoue) 昭和16年2月4日生<略歴>昭和40年大阪市立大学理学部化学科卒業/45年同大学大学院理学研究科博士課程修了/同年京都大学薬学部技官/47年同大学助手(薬用植物化学講座), 現在にいたる. この間, 50~51年スウェーデン・カロリンスカ研究所留学<研究テーマと抱負>植物成分の構造決定・生合成. 最近ラジオイムノアッセイによる微量成分の検出・定量ならびに多糖類の化学などに関する研究も手がけている. また酵素反応およびそのモデル反応に興味をもっている<趣味>読書

井上 博之 (Hiroyuki Inouye) 大正11年3月5日生<略歴>昭和19年京都帝国大学医学部薬学科卒業/26年同大学医学部助手/30年同助教授/36年同教授,

現在にいたる<研究テーマと抱負>植物化学<趣味>読書

臼倉 治郎 (Jiro Usukura) 昭和23年12月12日生<略歴>昭和56年東京大学大学院医学研究科修了/同年同大学医学部助手<研究テーマと抱負>光受容細胞の超微細構造<趣味>昆虫採集(現在はあまりしていないが)

加納 康彦 (Yasuhiko Kanō) 大正14年1月8日生<略歴>昭和25年東京大学農学部畜産獣医学科卒業/同年日本冷蔵株式会社研究所研究員/28年東京大学農学部助手(附属牧場)/51年同教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>広い意味の環境要因と家畜の繁殖性との関連, 季節繁殖の発現機構, 肥満と繁殖性の因果関係<趣味>音楽を聞くこと, 奏すること, 乗馬

小西 茂毅 (Shigeki Konishi) Vol. 16, No. 1, p. 9 参照

近藤 矩朗 (Noriaki Kondo) 昭和17年6月13日生<略歴>昭和41年東京大学教養学部基礎科学科卒業/46年同大学大学院理学系研究科博士課程修了/47年

(株)帝人入社/50年環境庁国立公害研究所勤務, 現在にいたる<研究テーマと抱負>気孔の開閉運動の制御機構, 大気汚染ガスに対する植物の防御機構<趣味>テレビの野球観戦, 音楽鑑賞

島崎 研一郎 (Kenichiro Shimazaki) 昭和24年12月1日生<略歴>昭和48年九州大学理学部生物学科卒業/51年同大学大学院理学研究科博士課程中退/同年環境庁国立公害研究所生物環境部研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>孔辺細胞のエネルギー代謝, 緑葉に対する大気汚染物質の影響の非破壊計測<趣味>野球, 川を眺めること

武田 宏 (Hiroshi Takeda) 昭和9年5月15日生<略歴>昭和33年新潟大学理学部生物学科卒業/38年東京教育大学大学院博士課程修了(理博)/40年新潟大学教養部助手/42年同助教授, 現在にいたる. この間, 38~40年カナダ国立科学研究所(NRC)留学<研究テーマと抱負>植物の細胞壁代謝を多角的に研究したいと思っています. また, 細胞壁による化学分類に興味をもっています<趣味>40歳記念にチェロを手習っています