

「ヒストンを探究する」高等学校生物の教材化

－ヒストンの可視化による真核生物の共通性の探究－

奈良 尚久

真核生物のDNAはヒストンと結合し、ヌクレオソーム構造を形成している。ヒストンは低分子・強塩基性のタンパク質で、真核生物の進化の過程で非常に良く保存されていることや、遺伝子の発現に強く関与しているなど非常に興味深い。そこで、身近な生物材料から簡便な方法でヒストンを抽出して可視化することで、真核生物のDNAが核内でどのような状態で存在しているのかを確認するための教材の開発を行ったので、報告する。

[キーワード] ヒストン DNA 電気泳動 遺伝子のはたらき

はじめに

学習指導要領の改訂に伴い、高等学校の生物の教科書の内容も大きく変わり、現代生物学の成果を取り入れたものとなっている。平成25年度から実施される「生物」では、新しい生物学の知見を踏まえて内容の充実が図られ、これまでは大学の教養課程で学習していた高度な内容まで取り扱われている。しかし、現状では内容に対応した観察・実験が整っておらず、学習活動と関連させながら、観察・実験を行い、分析・解釈させ、総合的に考察させるなど生物学的に探究させるには不十分な状況である。そこで、高等学校生物の「遺伝子のはたらき」に関する内容の教材として、真核生物においてDNAが巻き付いているヒストンを抽出し、電気泳動を行ってタンパク質を分離し、ヒストンを可視化する教材の開発を試みた。

1 ヒストンとは

DNAは分裂期では高度に折りたたまれて染色体(分裂期染色体)を形成し、光学顕微鏡でも観察が可能となるが、分裂間期では核内で糸状にほぐれて存在している。この糸は、DNAとタンパク質の複合体で、クロマチンと呼ばれている。クロマチンの基本構造はヌクレオソームであり、ヒストンのヘテロ8量体からなるヌ

クレオソームコアの外側にDNAが2回巻き付いていて、それが延々とつながっている。ヒストンは、ヌクレオソームコアを形成するH2A、H2B、H3、H4とリンカータイプのH1の5種類に大別される、分子量の小さい強塩基性のタンパク質である。塩基性のヒストンと酸性のDNAとの間で静電氣的結合をしている^{*1)}。ヒストンは生物種間での構造、アミノ酸配列が非常によく似ている特徴があり、構造的に保守的であると言われている。例えば、ウシとソラマメではH3ではアミノ酸の残数は135で同じでアミノ酸は4個しか変わらないことや、H4ではアミノ酸残基数は同じでわずか2つのアミノ酸しか変わらないことからわかるように、他の遺伝子に比べて進化の過程で非常に変化しにくいことが明らかになっている^{*2)}。

2 ヒストンの抽出

(1) 実験器具

牛レバー(市販)、ホモジナイザー、遠心分離器、ガーゼ、ビーカー、漏斗、サンプリングチューブ、抽出バッファー(トライトンX-100を5%含むリン酸緩衝生理食塩水)、0.2mol/L HCl、2×SDSサンプルバッファー、10×泳動バッファー

(2) 実験方法

細胞を破碎すると、細胞内のタンパク質分解酵素の働きでヒストンも分解されるため、以下の操作はできるだけ低温に保ち、分解酵素の働きを抑えて行う。

- 1 試料を 5 g 計量し、すり潰しやすくするために細かく切る。
- 2 ホモジナイザーに抽出バッファーを10mL 入れて細胞を破壊し（図 1），3 枚重ねのガーゼでろ過する。



図 1 ホモジナイザー

- 3 ろ過液を600×Gで10分間遠心して、核を含む画分を沈殿させ、上澄みを捨てる。
- 4 3で得られた沈殿に、0.2mol/L HClを少量（約0.5mL）加えてよく懸濁し、氷中に30分静置することで、塩基性であるヒストンを核から酸抽出する。
- 5 小型の遠心分離器を用いて6500×Gで5分間遠心して、可溶化していないタンパク質や核酸を沈殿させて上澄を回収する。
- 6 回収した上澄から10μL取り、表1で示した2×SDSサンプルバッファーを10μL加える。

表 1 2×サンプルバッファーの調製

2×サンプルバッファーの組成	添加量
1mol/L Tris-HCl (pH6.8)	2 mL
Glycerol	2 mL
2-mercaptoethanol	1.2mL
SDS	4g
1% BPB	20μL

蒸留水に溶かして最終的に10mlにメスアップする	

- 7 S-S結合を切断してタンパク質の立体構造を壊し、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を結合させるため、95℃で5分間煮る。

3 電気泳動^{*3)}

電気泳動はタンパク質の分子量の測定やDNAの塩基配列の分析等に広く用いられる手法であることから、タンパク質の電気泳動で代表的な手法の1つであるSDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）を行い、本教材で使用を試みた。

（1）SDS-PAGEについて

タンパク質は両性電解質で、電場に置くとその電荷に従って陽極または陰極に移動する。網目状の支持体の中でタンパク質を移動させると、移動の速さは、タンパク質の荷電量、大きさ、立体構造に影響される。このとき、βメルカプトエタノールなどの還元剤によってS-S結合を切断して直鎖状にしたタンパク質に、陰イオン界面活性剤であるSDSを結合させると、タンパク質が内在する荷電量はSDSにより与えられる荷電量に対して無視しうるため、タンパク質の分子量のみに規定される（一般的なタンパク質であれば、1 gのタンパク質に約1.4 gのSDS分子が結合する）。

未重合のアクリルアミドは神経毒があり、粉末の肺からの吸入だけでなく、溶液の皮膚からの浸透に対しても注意する必要があることから、教師が事前に泳動板を作製しておき、生徒は組織からのヒストンの抽出、電気泳動装置へのサンプルのアプライ、染色のみ行うなど実験方法に工夫が必要である。

（2）SDS-PAGEを用いた電気泳動の実験方法

①ゲルの作製

- 1 2枚のガラス板シリコンのガスケットを挟んでクリップで固定する。
- 2 図2のように泳動板をセットする。分離ゲルを流し込む目安にするためコームを当てて、コームの下から1 cm

程度のところにマジックで印をつける（ゲル注入時は，コームを外した）。

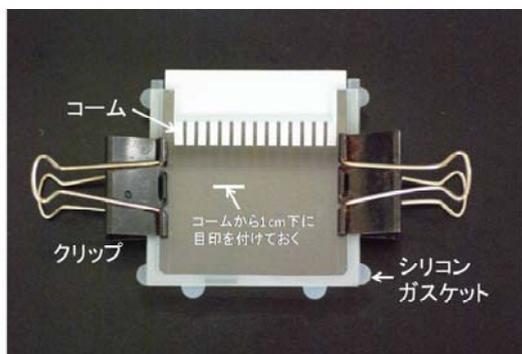


図2 電気泳動板

- TEMEDを加えると重合が始まるので，表2に示した分離ゲルの組成のうち，TEMEDを除く他の溶液を泡立たないように気をつけてよく混合する。

表2 分離ゲルの調製

分離ゲル (20%) の組成	ミニゲル1枚 (8ml)
蒸留水	0.52mL
30%アクリルアミド溶液	5.4mL
1.5M Tris-HCl (pH=8.8)	2.0mL
10%SDS	80 μ L
25%APS	20 μ L
TEMED	5 μ L

- TEMEDを加えたら直ちに泳動板の隙間から目印の位置までゲルを流し込む。液面を乱さないように蒸留水をゲルの上に重層し，泳動板を水平に保ってゲルを固める。
- 分離ゲルが固まった後，重層した水を捨てて表3に示した濃縮ゲルを流し込む。空気の泡が入らないように気を付けてコームを差し込み，濃縮ゲルが固まるまで静置する。
- ゲルが固まったら，コームとガスケットを抜き取って泳動装置にセットする。

表3 濃縮ゲルの調製

濃縮ゲルの組成	ミニゲル1枚 (2.5ml)
蒸留水	1.44mL
30%アクリルアミド溶液	0.4mL
1.5M Tris-HCl (pH=6.8)	0.625mL
10%SDS	25 μ L
25%APS	8.3 μ L
TEMED	2.5 μ L

②電気泳動の実験方法

- 10 \times 泳動バッファーを蒸留水で10倍希釈する（泳動装置1台当たり約250mL）。
- 泳動装置の下のバッファー槽に1/3の深さまで表4に示した泳動バッファーを入れる。

表4 10 \times 泳動バッファーの調製

10 \times 泳動バッファーの組成	添加量
Tris	30.3g
Glycine	144g
SDS	10g

蒸留水に溶かして最終的に1Lにメスアップする

- ゲルと下部とバッファーの間に空気が入らないように注意して泳動板を装置に固定する。
- 上のバッファー槽にこぼれない程度に泳動バッファーを入れる。
- 調製したサンプル10 μ Lを泳動層のウェルに注入し，さらに隣接するウェルに分子量マーカー10 μ Lを注入する。
- 10mAの定電流で泳動を開始する。

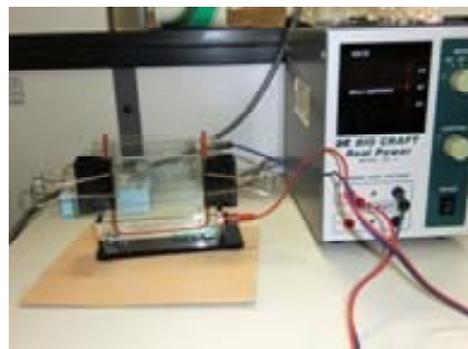


図3 電気泳動装置

- 7 サンプルバッファの青い色素が分離ゲルまで達したら、20mAに電流を上げる。
- 8 サンプルの青い色素が泳動板の下まで達したら通電を止め、電源装置を泳動槽から外す。

電気泳動を終えたタンパク質の検出には、最も一般的であるクマシーブリリアントブルー（CBB）染色を用いる。

4 実験結果

電気泳動の実験結果の写真を図4に示す。

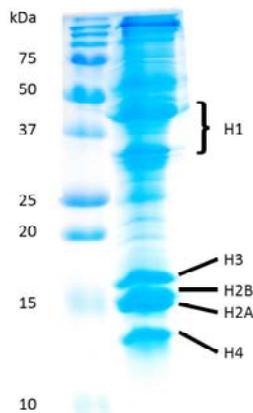


図4 電気泳動の実験結果

左が分子量のマーカーで右がレバーから抽出したサンプルである。分子量マーカーの37kDa付近に複数のH1のバンドが、15kDa付近にH3、H2A及びH2B、H4の4本バンドが濃く染め出されている。粗抽出であるためヒストン以外にも様々なバンドが検出されたが、ヒストンは濃く表れている。また、ヒストンは低分子でリシン、アルギニンの割合が多く強塩基性であるために、SDS-PAGEでは移動距離は正しい分子量を示さないことが知られている。特に、H1は表5^{*4)}と比較して、実際の分子量とは大きく異なっていることがわかる。H1は様々な化学修飾を受けていることが知られており、その違いから複数のバンドが検出されたと考えられる。

表5 ヒトとウシのヒストンの分子量

	ヒト	ウシ
H 1	20.7kDa	21.5kDa
H 2 A	14.0kDa	14.0kDa
H 2 B	13.8kDa	13.8kDa
H 3	15.3kDa	15.3kDa
H 4	11.3kDa	11.3kDa

おわりに

スーパーで入手可能な牛レバーからヒストンを抽出して、SDS-PAGEで分離して、ヒストンを可視化することができた。真核生物の細胞核でDNAはヒストンと複合体を形成して存在していることを実験により自らの目で確認することは、高等学校生物の「遺伝子のはたらき」に関する内容の理解に有効であると考えられる。今後は、他の生物材料からもヒストンを抽出して電気泳動を行い、真核生物のヒストンの共通性についても調べていきたい。さらに、哺乳類やサケの成熟精子ではヒストンが他の塩基性タンパク質（プロタミン）に置き換えられていることや、H3には複数のサブタイプあること、ヒストンの化学的修飾が遺伝子の発現に強く関与しているなど、最近明らかになっていることも多いことから、本教材を探究活動や理科課題研究のテーマとし、研究を通して科学的に探究する能力や態度を育むとともに、創造性の基礎を培うことができると考えている。さらに、この実験を取り入れた学習プログラムについても検討していきたい。

最後に、本研究を進めるにあたり、徳島文理大学工学部箕田康一教授、香川薬学部伊藤悦朗教授に御指導いただいた。心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 小林 興 キャンベル生物学 丸善株式会社
- 2) 井出利憲 分子生物学講義中継 part1 羊土社
- 3) 西方敬人 細胞工学別冊 目で見える実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド 秀潤社
- 4) 泉麻紀子ほか カイコヒストンの翻訳後修飾の解析 Entomotech 32:67-69, 2008

(なら なおひさ 生物研究班)

