

「ヒストンを探究する」 第2報

－ 真核生物の共通性の探究とタンパク質の解析法 －

奈良 尚久

昨年度の研究紀要^{*1)}で牛レバーからタンパク質であるヒストンを抽出し、電気泳動法で分離して、ヒストンを可視化することができた。今年度は、ブロッコリーとサケの精巣からヒストンを抽出して電気泳動で分離し、真核生物におけるヒストンの共通性を確認することができた。また、電気泳動法によって分離したヒストンを抗原抗体反応を用いて検出するウエスタンブロッティングの分析法を行った。さらに、本教材を学校で活用しやすいように、科学的に探究する学習プログラムを作成したので紹介する。

[キーワード] ヒストン DNA 電気泳動 エピジェネティクス 抗原抗体反応
ウエスタンブロッティング

はじめに

高等学校生物の教科書では、現代生物学の成果が取り入れられ、高度な内容まで取り扱われているが、学習活動と関連させながら観察・実験を行い、生物学的に探究させるには不十分な状況である。そこで、「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に巻き付いているタンパク質であるヒストンに着目した。ヒストンは全ての教科書に記載があること、進化の過程で変化せず、真核生物において共通性があること、タンパク質の抽出や電気泳動、抗原抗体反応を用いたウエスタンブロッティングなどタンパク質に関する分析手法を学習することができることから、教材化を行ってみた。

1 ヒストンとは

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、酸性のDNAとの間で静電的結合をしている^{*2)}。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、H4において、ウシとソラマメではアミノ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、10億年あたりのアミ

ノ酸の置換数は0.01個である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から、アミノ酸を変化させる変異は自淘汰されてきたと考えられる^{*3)}。また、1個体を構成している細胞には同じDNAが存在しているが、それぞれの細胞で特有の遺伝子が発現している。この発現調節にDNAに結合しているヒストンが関わっている。

DNAの塩基配列に変化がない状態で、ヒストンなどの修飾により遺伝子発現が制御され維持される仕組みのことをエピジェネティックな制御といい、三毛猫のような身近な例からがんなどの疾患まで、さまざまな生命現象に関わっており、その重要性が高まりつつある。

2 ヒストンの抽出

(1) 実験器具

試料として、DNA含有量が多いブロッコリー、サケの白子を用いた。ブロッコリーの花芽の部分は成長の活発な部分であり、サケの白子はサケの精巣部分で精子を大量に含んでいる。また、成熟したサケの精巣にはプロタミンという別のタンパク質が含まれていることから、その確認も併せて行った。実験器具の詳細については、昨年度の研究紀要を参照していただきたい。

(2) 実験方法

昨年度からの改良点として、ヒストンの抽出量を向上させるために、予め冷凍しておいた試料をすりがね器で直接すり下ろした後、抽出バッファーを入れてろ過した。実験方法の詳細については、前年度の研究紀要を参照していただきたい。

3 電気泳動^{※4)}

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。予めタンパク質に陰イオン界面活性剤であるSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を結合させた、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）を行った。

また、未重合のアクリルアミドは神経毒があることから、ゲルの作製は行わず、市販のプレキャストゲルを用いた。詳細は昨年度の研究紀要を参照していただきたい。

4 抽出したヒストンの電気泳動の実験結果

抽出したヒストンの電気泳動の実験結果の写真を図1に示す。

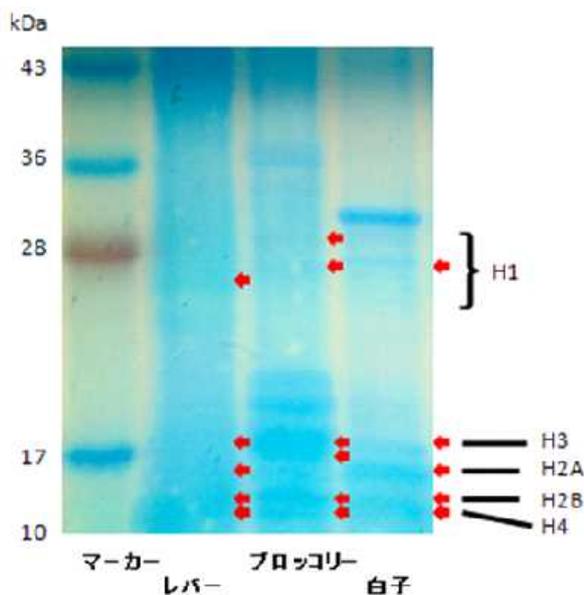


図1 電気泳動の実験結果

左が分子量のマーカーで右がレバー、ブロッコリー、白子から抽出したサンプルである。分子量マーカーの28kDa付近に複数のH1のバンドが確認できる。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。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。H1は表1^{※5)}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。

また、サケの白子については、H1のバンドの上に濃く現れているが、ヒストンから置き換わった別の塩基性タンパク質であるプロタミンであると考えられる。ヒストンのバンドも確認できたことから、サケ白子には、成熟した精子にはプロタミンが、成熟していない部分にはヒストンが存在していることが考えられる。

表1 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

図1より、15kDa付近にH3、H2A及びH2B、H4の4本バンドが染め出されている。写真では鮮明に写っていないが、H3とH4は、レバー、ブロッコリー、白子ともにほぼ同じ位置にバンドを確認することができ、真核生物におけるヒストンの共通性を確認することができた。

5 ウェスタンブロッティング^{※6)}

電気泳動によって得られたヒストンのバンドは、分子量と合っているかどうかでほぼ見当はつくが、抗原抗体反応を用いたウェスタンブロッティング法で科学的に証明することができる。

ウェスタンブロッティングは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動のゲルからタンパク質をメンブレンに転写し、ブロッティング装置を使ってタンパク質を電氣的に移動させる。次に、注目しているタンパク質のバンドを抗体を用いてメンブレン上で検出させる。この方法は感度が高く、抗原抗体反応の特異性も高いことから様々なタンパク質から特定のタンパク質を高感度で

検出できる方法である。

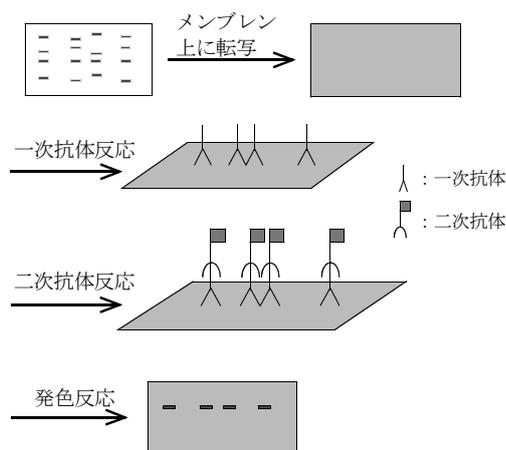


図2 ウェスタンブロットの模式図

6 ウェスタンブロットによるH3の確認

電気泳動によって得られたH3をウェスタンブロットによって確認してみた。

(1) 実験器具

コテ、ニトロセルロースメンブレン、プラスチックケース、ろ紙、ピンセット、ブロットティングバッファー、セミドライブロットティング装置、電源装置、Tween-TBS溶液、ブロットティング溶液、マウス由来抗H3モノクローナル抗体、標識二次抗体（HRP標識ヤギ抗体マウスIgG）、サラップラップ、化学発光基質（SuperSignal West Pico Substrate, The rmo社）、高感度CCDカメラ

(2) 実験方法

- ① 電気泳動終了後、プレキャストゲルからコテを用いてゲルを外す。
- ② 図3のように、プラスチックケースの中で、ろ紙3枚をブロットティングバッファー（表2）に浸し、+電極の上に泡が入らないように重ねる。

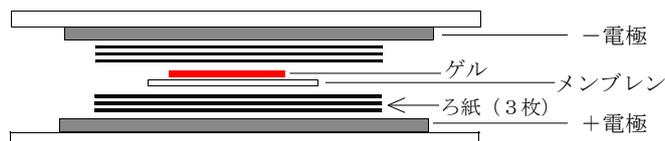


図3 ブロットティング装置にセットしたゲル、ろ紙、メンブレンの模式図^{※6)}

- ③ 図3のように、メンブレンをろ紙の上ののせ、その上にゲル、ブロットティング

バッファーに浸したろ紙を3枚のせる。最後に-電極をのせてブロットティング装置をセットする。

表2 ブロットティングバッファーの調製

ブロットティングバッファーの組成	添加量
20mmol/L グリシン	14.4g
25 mmol/L Tris	3.0g
メタノール	200mL
蒸留水に溶かして1000mLにメスアップする。	

- ④ 図4のように15Vで45分通電する。

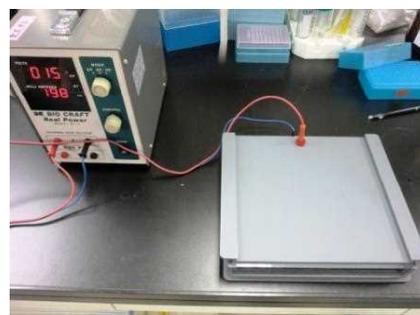


図4 ブロットティング装置と電源装置

- ⑤ 電源を切ってメンブレンを取り出し、蒸留水につける。
- ⑥ Tween-TBS（表3）で5分間洗浄する。これを3回繰り返す。



図5 Tween-TBSで洗浄中のメンブレン

表3 Tween-TBSの調製

Tween-TBSの組成	添加量
NaCl	8.1g
KCl	0.2g
Tris-HCl	6.2g
Tween-20	1g
HClを用いてpHを7.4に調製した後、蒸留水に溶かして1000mLにメスアップする。	

- ⑦ プラスチックケースにブロッキング溶液(表4)を100mL入れ、1時間振盪させ、抗体が他のタンパク質と非特異的に結合しないようにブロッキング処理を行う。

表4 ブロッキング溶液の調製

ブロッキング溶液の組成	添加量
スキムミルク	5.0g
Tween-TBS	100mL

- ⑧ ブロッキング溶液を捨て、Tween-TBSで10分間洗浄する。これを3回繰り返す。
 ⑨ Tween-TBSで2000倍に希釈したマウス由来抗H3モノクローナル抗体5mLをメンブレンにのせ、1時間振盪して反応させる。
 ⑩ 一次抗体の液を捨て、Tween-TBSで20分間振盪して洗浄する。これを3回繰り返す。
 ⑪ 1000倍に希釈した二次抗体をTween-TBS 1mLをメンブレンにのせ、1時間振盪して反応させる。
 ⑫ Tween-TBSで10分間洗浄する。これを3回繰り返す。
 ⑬ サランラップの上にメンブレンを置き、化学発光基質を入れ、CCDカメラを用いて検出する。

7 ウェスタンブロッティングの実験結果

ウェスタンブロッティングの実験結果の写真を図6に示す。

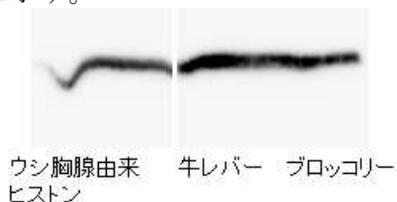


図6 ウェスタンブロッティングの実験結果

マウス由来抗H3モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによって、電気泳動によって得られた15.3kDa付近のタンパク質がH3であることが非常に高いことがわかった。今後は、ネガティブコントロールと、サケの白子を含めたウェスタンブロッティングの追実験を行い、ウェスタンブロッティングによる

H3の検出法を確立していく。

おわりに

本教材の普及を図るために、学校で活用しやすいように探究的な学習プログラムを作成したものを図7に示す。今後は、本教材のホームページに掲載や、研修講座等での紹介を行っていく。



図7 生徒用実験プロトコルと教員用説明資料

本教材が、生物の授業における探究活動や理科課題研究のテーマと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。

最後に、本研究を進めるにあたり、徳島文理大学理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) 「ヒストンを探究する」高等学校生物の教材化 奈良尚久 北海道立教育研究所附属理科教育センター
- 2) 小林 興 キャンベル生物学 丸善株式会社
- 3) 井出利憲 分子生物学講義中継 part1 羊土社
- 4) 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
- 5) 泉麻紀子ほか カイコヒストンの翻訳後修飾の解析 Entomotech 32:pp.67-69, 2008.
- 6) 岡田雅人 無敵のバイオテクニカルシリーズ タンパク質実験ノート 羊土社

(なら なおひさ 生物研究班)

