

平成28年度卒業論文

金属イオンがDNAとヒストンの凝集構造
に与える影響

理工学部応用物理学コース

増淵研究室

学生番号 081321376

氏名 夏目 享治

要旨

真核生物の染色体は細胞内に存在し、負電荷を持つ DNA が正電荷を持つヒストンタンパク質の八量体に巻きついたヌクレオソーム構造が凝集してできている。DNA の遺伝情報は転写と呼ばれる過程によって発現する。転写率はヌクレオソーム構造の凝集度に依存するとされている。細胞内にはナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンといった様々な金属イオンが存在し、ヌクレオソーム構造はそれらの金属イオン濃度によって変化すると考えられる。

本研究では、第一にヒストン濃度による DNA とヒストンの凝集構造の変化、第二に金属イオンによる DNA とヒストンの凝集構造の変化を蛍光顕微鏡を用いて観察した。蛍光顕微鏡によって得られた DNA の形態画像の長軸長を計測することで、金属イオンが DNA とヒストンの凝集構造に与える影響について議論した。

結果、DNA とヒストンの凝集構造はヒストン濃度によって変化した。また、金属イオンによる DNA とヒストンの凝集構造の長軸長変化は、金属イオンを加える前の DNA とヒストンの凝集構造に依ることがわかった。よって本研究の結果から金属イオンがヒストンと DNA の凝集構造に与える影響はヒストン濃度が重要であることが示唆された。

目次

要旨	1
第 1 章 序論	4
1.1 真核生物の染色体の構造	4
1.2 ヌクレオソーム	5
1.3 DNA の構造	6
1.4 ヒストン	6
1.5 転写とヌクレオソームの凝集構造の関係	7
1.6 先行研究	8
1.7 目的	9
第 2 章 実験方法	10
2.1 実験の概要	10
2.2 試料	10
2.3 溶液の調整	11
2.4 プレパラートの作製	16
2.5 蛍光顕微鏡による観察	16
2.6 画像解析	18
第 3 章 結果	19
3.1 単分子 DNA の観察	19
3.2 ヒストン濃度に対する DNA の長軸長	19
3.3 金属イオンに対する DNA の長軸長	21
3.4 金属イオンに対する DNA とヒストンの凝集構造の長軸長	22
第 4 章 考察	24
4.1 ヒストン濃度と DNA の長軸長の関係	24
4.2 金属イオンとランダムコイル型 DNA の長軸長の関係	25
4.3 金属イオンとダンベル型 DNA の長軸長の関係	27
4.4 金属イオンとグロビュール型 DNA の長軸長の関係	27
4.5 先行研究との比較	28
4.6 今後の展望	28
第 5 章 結論	29

目次	3
謝辞	30
付録	31
参考文献	35

第1章

序論

1.1 真核生物の染色体の構造

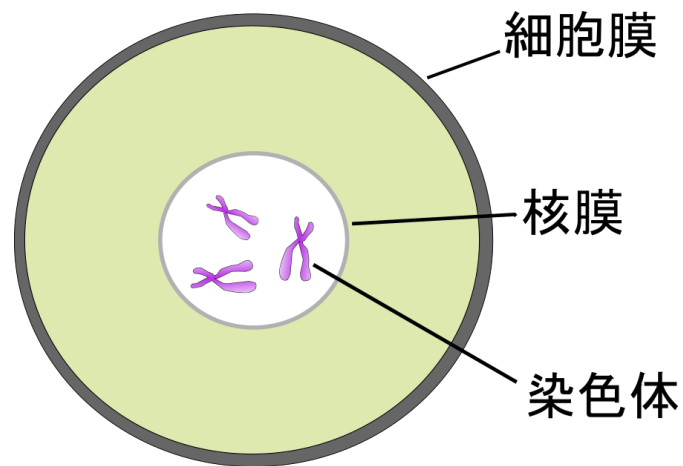


図 1.1 真核生物の細胞

すべての生物は大きく分けて原核生物と真核生物に分けることができる [1]。生物が持つ遺伝情報は DNA の塩基対に記録されているが、細菌のような原核生物では DNA が裸のまま細胞の中に収まっている [2]。一方、動物や植物のような真核生物では、図 1.1 のように、染色体は細胞内の核膜に包まれている [3]。次に染色体の構造について説明する。

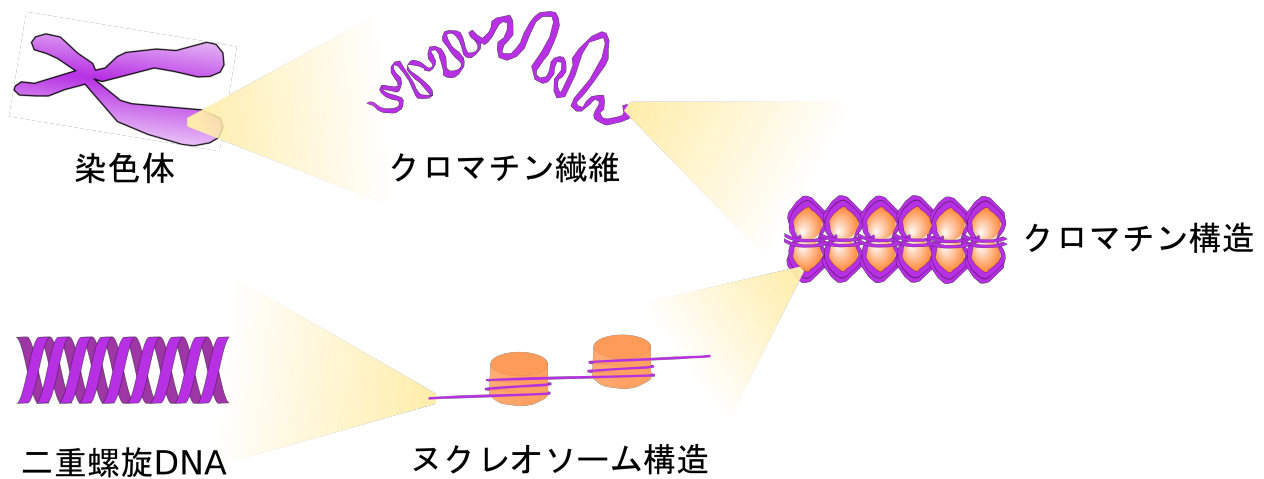


図 1.2 染色体の構造

真核生物の染色体はクロマチンと呼ばれる構造が折りたたまれてできている [4]。さらにこのクロマチン構造はヌクレオソームという構造が凝集したものである [5]。ヌクレオソームはヒストンタンパク質に DNA が巻きついた構造を持つ。ヌクレオソーム構造の詳細は 1.2 節に示す。ヒトの細胞の DNA は伸ばすと 2m 近くになるが、核膜の直径は $5 \mu\text{m}$ 程度 [6] なので DNA は伸びたままの状態では核内に収めることができない。DNA を折りたたむ役割をしているのが、クロマチンやヌクレオソームである。

1.2 ヌクレオソーム

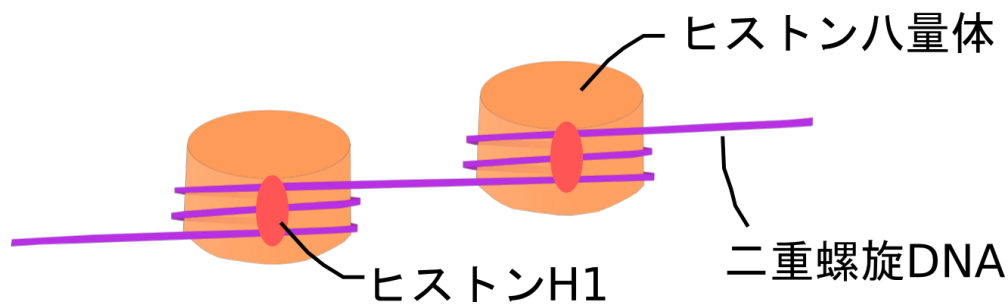


図 1.3 ヌクレオソーム構造

ヌクレオソームは図 1.3 のようにヒストンタンパク質の八量体に約 146 塩基対 (1.3 節) の DNA が 1.65 回転巻きついた構造を取っている [7]。この構造はヒストンの持つ正電荷 (1.4 節) と DNA の持つ負電荷 (1.3 章) により安定している。DNA の外側には、ヒストン八量体を構成するヒストンとは別の種類の H1 というヒストンが存在する。ヒストン H1 は DNA をヒストン八量体に固定し、ヌクレオソーム間をつなぐ働きがある [8]。ヒストンに DNA が巻きついた部分をヌクレオソームコア粒子と呼び、ヌクレオソーム間の DNA をリンカー DNA と呼ぶ。リンカー DNA の長さは平均 200 塩基対であるが、数塩基対から 80 塩基対まで伸び縮みすることが可能である。ヒストン八量体は単量体のヒストン H2A, H2B の二量体が二つとヒストン H3, H4 の四量体が結合してできている。通常、ヒストンに巻きつく約 146 塩基対分の DNA 断片は DNA 表面の負電荷 (1.3 節) による分子内反発によって硬い。よって DNA がヒストン八量

体に巻きつくには DNA の硬さを緩和する機構が存在しなければならない。

1.3 DNA の構造

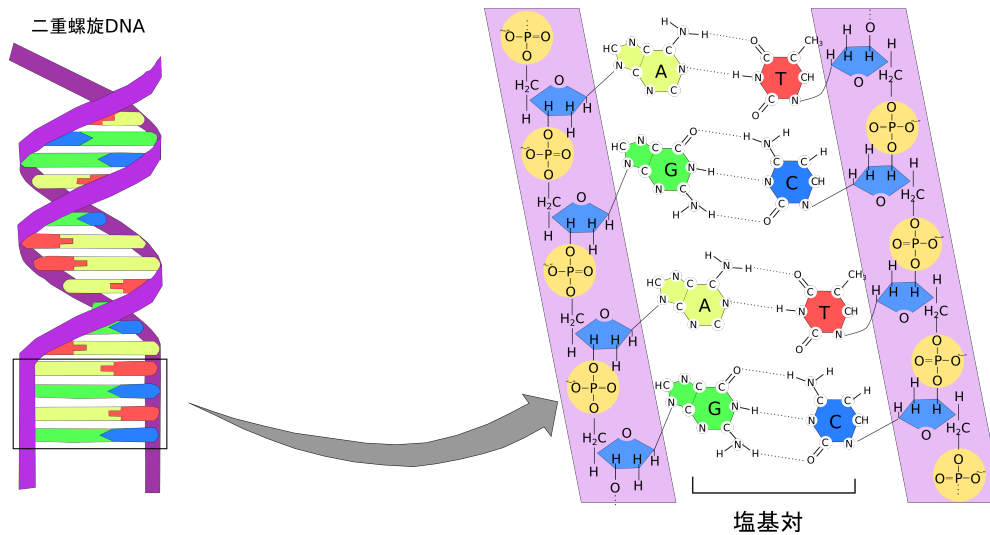


図 1.4 DNA の構造式

図 1.4 のように DNA はリン酸、五炭糖、塩基の三つの基から成る。塩基の種類には A,T,G,C の四つがあり、アデニン (A) とチミン (T), グアニン (G) とシトシン (C) がそれぞれ塩基対と呼ばれるペアになって水素結合している [9]。また、図 1.4 のように DNA は溶液中で電離してリン酸基一つあたりに一つの負電荷を持つ。

1.4 ヒストン

ヌクレオソームを構成するヒストンは H1,H2A,H2B,H3,H4 の 5 種類存在する [4]。ヒストン H1 はリジン残基、アルギニン残基 (図 1.5) を約 45%(w/w)[10]、H2A,H2B,H3,H4 は約 30~40%(w/w)[11, 12, 13, 14, 15, 16] 含むので溶液中で正電荷を持つ。

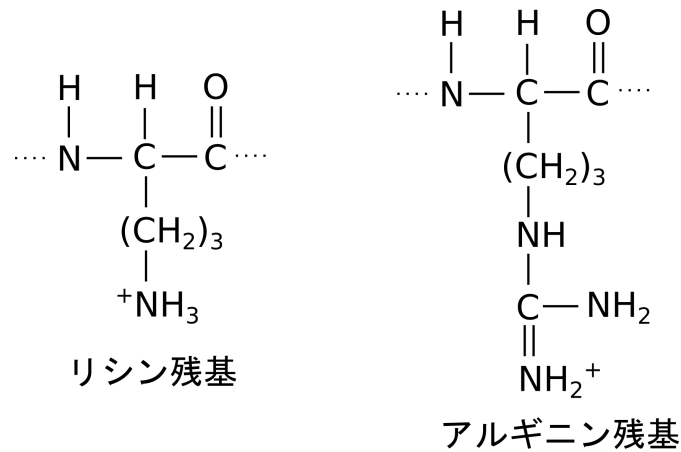


図 1.5 リジン残基とアルギニン残基

1.5 転写とヌクレオソームの凝集構造の関係



図 1.6 セントラルドグマ

DNA の塩基配列情報を RNA の塩基配列情報へと受け継ぐ過程を転写、RNA からタンパク質 (ポリペプチド鎖) を生成する過程を翻訳といい、この一連の流れをセントラルドグマ (図 1.6) と呼ぶ [17]。ここでは真核生物の転写に着目する。転写は、プロモーターと呼ばれる DNA のある領域に RNA ポリメラーゼというタンパク質が結合することで行なわれる [18]。図 1.7 の左図のようにヌクレオソーム構造が凝集していると、RNA ポリメラーゼはヒストンに妨げられ DNA に結合することができないので、転写は起こらない。一方、図 1.7 の右図のようにヌクレオソーム構造が凝集していない状態では、RNA ポリメラーゼは DNA に結合することができ (図 1.8)、転写が起こると考えられる [19]。よって転写が起こるか起こらないかはヌクレオソーム、つまりと DNA とヒストンの凝集構造に依る。

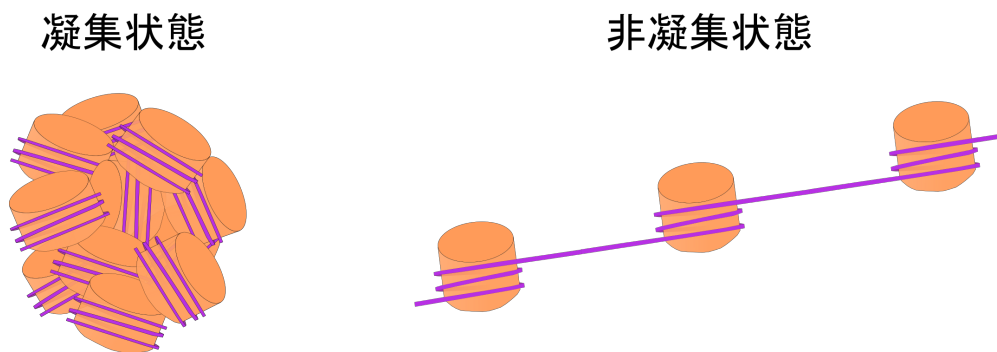


図 1.7 ヌクレオソームの凝集、非凝集

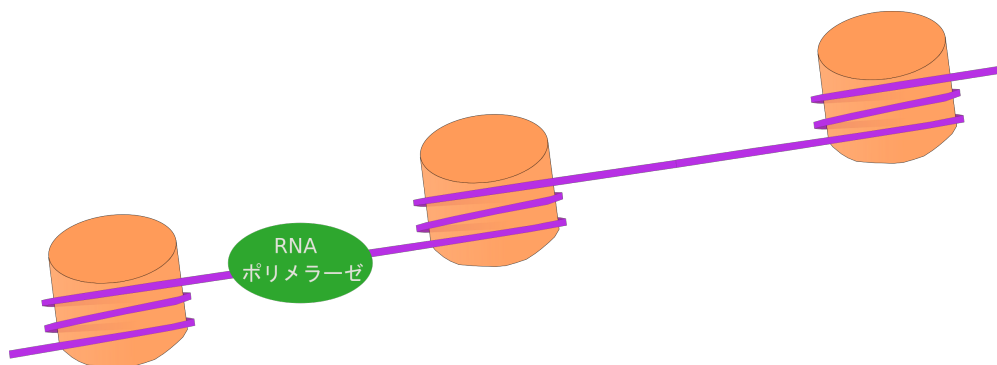


図 1.8 非凝集状態のヌクレオソームと RNA ポリメラーゼの結合

1.6 先行研究

吉川らによると、DNA とヒストン H1 の複合体の構造が溶液中の NaCl 濃度によって変化する [20]。DNA の負電荷の数とヒストンの正電荷の数が等しくなるように DNA とヒストン H1 を混合し、NaCl を加えると、NaCl 濃度が 2M では、DNA はヒストンがないときと同じランダムコイル状 (図 1.9(a)) を示し、NaCl 200mM ではダンベル状 (図 1.9(b))、NaCl 50mM ではネックレス状 (図 1.9(c)) を示す。これらの画像は原子間力顕微鏡によって得られたものである。この研究により、DNA とヒストンの凝集構造は NaCl 濃度に依存することが判明した。

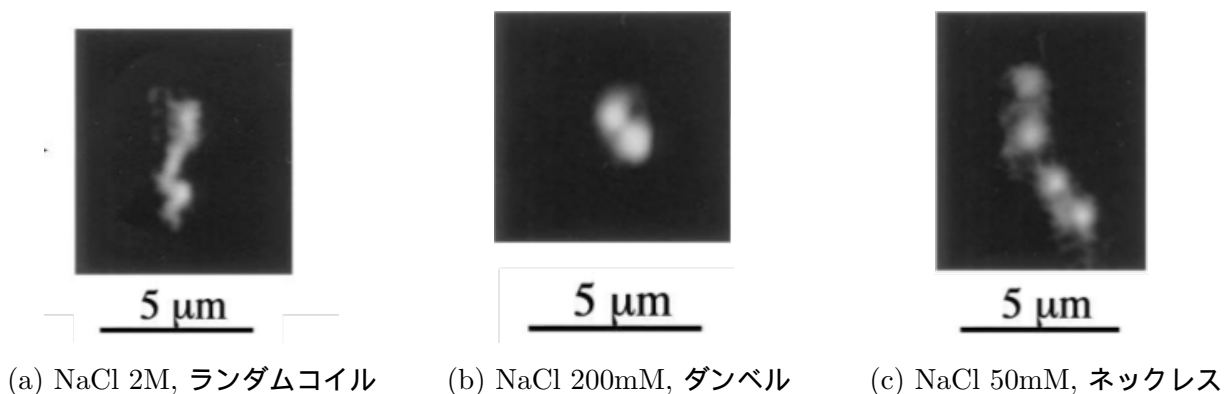


図 1.9 DNA とヒストン H1 の構造。[20] より抜粋

1.7 目的

先行研究のように DNA とヒストンの複合体は、周りの溶液の NaCl 濃度に依存する。しかし、実際の真核生物の細胞内には K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} などの多数のイオンが存在する [21]。本研究では、細胞内に存在する金属イオン種 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} とその濃度によって、DNA とヒストンの凝集構造がどのように変化するのか、蛍光顕微鏡を用いて直接観察することが本研究の目的である。

第2章

実験方法

2.1 実験の概要

本実験では単分子 DNA の観察 (2.3.1 節)、ヒストン濃度に対する DNA の形態の観察 (2.3.2 節)、金属イオン濃度と種類に対する DNA の形態の観察 (2.3.3 節)、DNA とヒストン凝集構造の金属イオンの濃度と種類に対する形態変化 (2.3.4 節) を蛍光顕微鏡を用いて行った。

2.2 試料

試料には以下のものを使用した。

- T4GT7 DNA
分子量： 1.076×10^8 (165.6kbp)
入手先：ニッポンジーン
- Histone from calf thymus
分子量：20,000
内容物：ヒストン H1,H2A,H2B,H3,H4 の混合溶液
入手先：Sigma Aldrich
- トリズマ塩酸塩溶液 (Tris-HCl)
pH：7.4
用途：緩衝液
入手先：Sigma Aldrich
- 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI)
分子量：350.25
用途：DNA の染色
入手先：ナカライテスク
- 2-メルカプトエタノール
用途：褪色防止剤
入手先：ナカライテスク
- KCl
分子量：74.55
入手先：ナカライテスク

- NaCl
分子量：58.44 入手先：ナカライテスク
- MgCl₂
分子量：95.21
入手先：ナカライテスク
- 蒸留水 (高速液体クロマトグラフ用)
入手先：ナカライテスク

以下、Histone from calf thymus は Histone、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドールは DAPI、トリズマ塩酸塩溶液は Tris-HCl と略する。

2.3 溶液の調整

溶液の調整は以下の表のようにして行った。尚、DNA とヒストンに関しては Tris-HCl 10mM で薄め、それ以外の試料は蒸留水で薄めた。混合する試料の順番は、表の上から書かれた資料の順番と同じである。温度は室温と同じになるようにしてから調整している。最終的な溶液は 3 時間以上冷暗所で保管した。DNA, DAPI, Tris-HCl, 2-メルカプトエタノールを以下の濃度にした理由は 2.3.5 節に記した。

2.3.1 DNA 溶液

初めに DNA のみで観察を行うためにサンプルを調整した。用いた試料と濃度は表 2.1 に記した。最終的な溶液の体積は 200 μ l とした。

表 2.1 DNA 溶液の調整

試料 (溶液)	最終濃度
Tris-HCl	10mM
H ₂ O	
DNA	0.1 μ Mbp
DAPI	0.1 μ M
2-メルカプトエタノール	4%(v/v)
計	200 μ l

2.3.2 DNA とヒストンの混合溶液

濃度を固定した DNA に対し、様々な濃度のヒストンを混合した。用いた試料と濃度は表 2.2 に記した。ヒストン以外の濃度は表 2.1 と同じ条件になるようにした。

表 2.2 DNA とヒストン混合溶液の調整

試料 (溶液)	最終濃度
Tris-HCl	10mM
H ₂ O	
Histone	C_{histone}
DNA	0.1 μ Mbp
DAPI	0.1 μ M
2-メルカプトエタノール	4%(v/v)
計	200 μ l

表 2.2 中のヒストン濃度 C_{histone} には 0.2nM, 0.5nM, 0.6nM, 0.7nM, 0.8nM, 0.9nM, 1nM, 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 6nM, 8nM, 10nM, 20nM を使用した。

2.3.3 DNA と金属イオンの混合溶液

濃度を固定した DNA に対し、金属イオンの濃度と種類を変化させ混合した。用いた試料と濃度は表 2.3 に記した。金属イオン以外の濃度は表 2.1 と同じ条件になるようにした。

表 2.3 DNA と金属イオン混合溶液の調整

試料 (溶液)	最終濃度
Tris-HCl	10mM
X	C_{salt}
DNA	0.1 μ Mbp
DAPI	0.1 μ M
2-メルカプトエタノール	4%(v/v)
計	200 μ l

金属イオンは塩 X を蒸留水に溶かすことで使用した。尚、塩は完全に電離しているものとしている。塩 X の種類と濃度 C_{salt} は表 2.4 に示した。

表 2.4 塩溶液の種類と濃度

X	c_{salt}
KCl	0.2mM
	2mM
	20mM
	200mM
NaCl	0.2mM
	2mM
	20mM
	200mM
MgCl ₂	0.2mM
	2mM
	20mM
	200mM

塩溶液の濃度を 200mM までとした理由は、塩濃度が高すぎると DAPI が DNA に結合できず観察が困難になったためである。

2.3.4 DNA とヒストンと金属イオンの混合溶液

続いて固定した DNA とヒストン濃度 (2nM, 5nM) に対し、金属イオンの種類と濃度を変化させ混合した。

DNA とヒストン 2nM と金属イオン混合溶液

ここでは DNA 濃度とヒストン濃度を 5nM に固定し、金属イオンの種類と濃度を変化させ混合した。用いた試料と濃度は表 2.5 に記した。ヒストン濃度を 2nM にした理由は 3.2 節に記した。金属イオンとヒストン以外の濃度は表 2.1 と同じ条件になるようにした。塩 X の種類と濃度 c_{salt} は表 2.6 に示した。

表 2.5 DNA とヒストン 2nM と金属イオン混合溶液の調整

試料 (溶液)	最終濃度
Tris-HCl	10mM
X	c_{salt}
Histone	2nM
DNA	0.1 μ Mbp
DAPI	0.1 μ M
2-メルカプトエタノール	4%(v/v)
計	200 μ l

表 2.6 塩溶液の種類と濃度

X	c_{salt}
KCl	0.2mM
	2mM
	20mM
	200mM
NaCl	0.2mM
	2mM
	20mM
	200mM
MgCl ₂	0.2mM
	2mM
	20mM

DNA とヒストン 5nM と金属イオン混合溶液

ここでは DNA 濃度とヒストン濃度を 5nM に固定し、金属イオンの種類と濃度を変化させ混合した。用いた試料と濃度は表 2.7 に記した。ヒストン濃度を 5nM にした理由は 3.2 節に示した。

表 2.7 DNA とヒストン 5nM と金属イオン混合溶液の調整

試料 (溶液)	最終濃度
Tris-HCl	10mM
X	c_{salt}
Histone	5nM
DNA	0.1 μ Mbp
DAPI	0.1 μ M
2-メルカプトエタノール	4%(v/v)
計	200 μ l

金属イオンとヒストン以外の濃度は表 2.1 と同じ条件になるようにした。塩 X の種類と濃度 c_{salt} は表 2.8 に示した。

表 2.8 塩溶液の種類と濃度

X	c_{salt}
KCl	2mM
	20mM
	200mM
NaCl	2mM
	20mM
	200mM
MgCl ₂	2mM
	20mM
	200mM

2.3.5 試料の濃度決定理由

DNA, DAPI, Tris-HCl, 2-メルカプトエタノールの濃度を上記のようにした理由を挙げる。

- DNA
溶液調整後の溶液の体積は 200 μ l であり、この場合の DNA の重なり濃度算出すると約 10mMbp であった。よって DNA 濃度 0.1 μ Mbp は重なり濃度の 10^{-5} 倍のオーダーであり、溶液は希薄溶液としてみなせる。
- DAPI
DAPI は DNA 塩基対のアミノ酸 AT 領域に結合する。つまり、DNA の 1 塩基対 (bp) に対し一つの分子が結合する。DNA の塩基対濃度に対し、10 倍までの量の DAPI では DNA の構造がほとんど変わらないとされている [22]。本研究では DNA の塩基対濃度と DAPI の濃度が 1:1 となるようにした。
- Tris-HCl
今回は pH7.4 のものを使用した。pH7.4 は細胞内 pH としてよく用いられ、濃度は先行研究 (1.6 節) と等しくした。
- 2-メルカプトエタノール
2-メルカプトエタノールは退職防止剤として使用され、濃度は [22, 23, 24] を参考とした。

2.4 プレパラートの作製

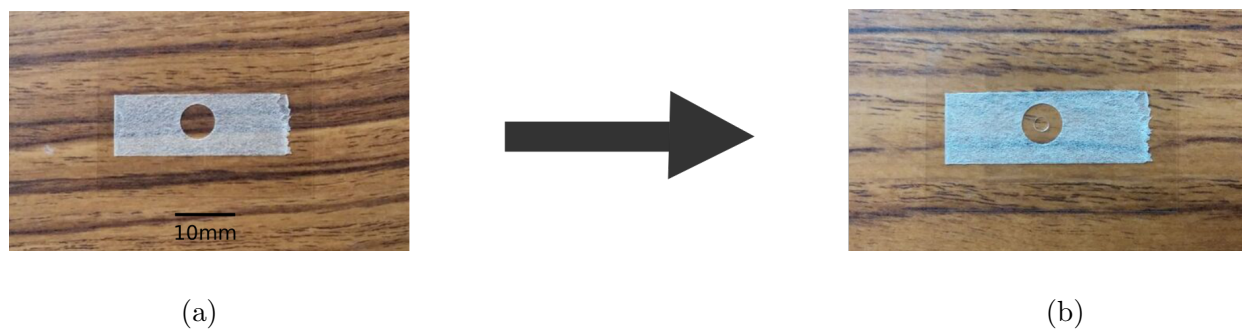


図 2.1 プレパレート

プレパラートの作製は、第一にカバーガラス (24 × 36mm) に穴あけパンチで穴 (直径 6mm) を空けた両面テープ (厚さ 0.15mm) を貼った。(図 2.1(a))。次に穴あけパンチで開けた穴に観察する溶液を 0.5 μ l ほど垂らし、カバーガラス (18 × 18mm) を被せ密閉した。これにより観察する溶液の蒸発をある程度防ぐことができる。

2.5 蛍光顕微鏡による観察

試料の観察には蛍光顕微鏡を用いた。短い波長の光を吸収し、長い波長の蛍光を発する物を蛍光物質という。蛍光物質は特定波長の光 (励起光) を吸収することで励起し、励起状態から元の状態に戻る際に蛍光としてエネルギーを放出する特性を持つ。本研究では DAPI が蛍光物質に当たる。蛍光顕微鏡は蛍光物質に励起光を照射して発生する蛍光を画像として観察、記録する顕微鏡である。蛍光顕微鏡は目的の分子のみを蛍光で光らせて観察することができることに利点がある。以下に本研究で使用した、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS IX71) と、蛍光キューブの図を示した。

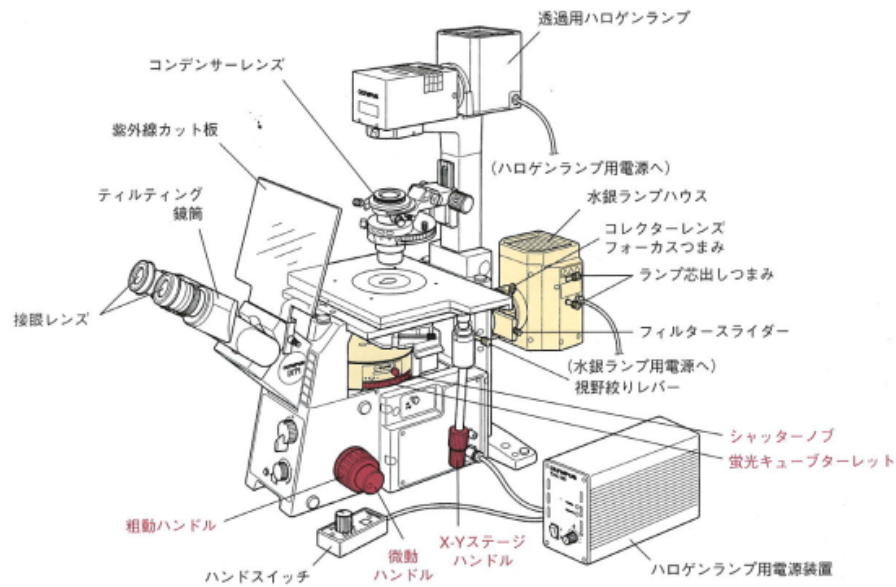


図 2.2 倒立型蛍光顕微鏡の各部名称。[25] より引用。

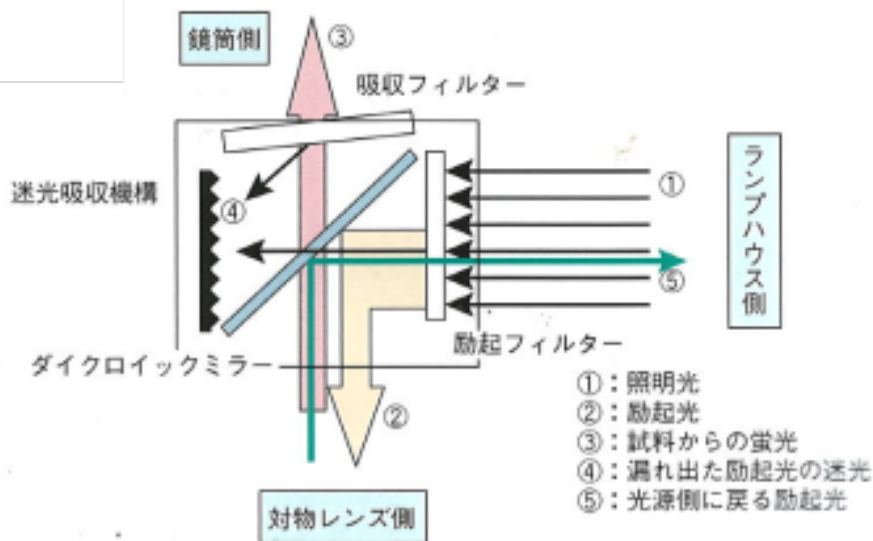


図 2.3 蛍光キューブの概略図。[25] より引用。

蛍光キューブ内の各器具の機能と使用した型番を以下に示した。

- 励起フィルター：ランプからの幅広い波長帯の光束から、蛍光色素に最適な励起波長帯の光 (励起光) だけを透過する。型番 BP-330-385 を使用。
- ダイクロックミラー：所定の波長を境にして、短波長側を反射し、長波長側を透過する。励起光を反射して対物レンズ側に送り、透過光を接眼レンズ側にする。型番 DM400 を使用。
- 吸収フィルター：ダイクロックミラーから漏れ出た励起光を完全に遮断し、蛍光だけを透過する。型番 BA420 を使用。

- 迷光吸収機構: 蛍光キューブ内の迷光を吸収し、不要な自家蛍光の発生を防ぐ。

2.5.1 蛍光顕微鏡の装置説明

水銀ランプ光源照射された光は投光管を通り蛍光キューブ内に入射する (図 2.3 ①)。蛍光キューブに入射した光は励起フィルターによって特定の波長帯に絞られ、ダイクロックミラーによって反射され対物レンズ側にある試料に照射される (図 2.3 ②)。照射された試料の蛍光はダイクロックミラーを透過して接眼レンズ光路に送られ観察が可能となる (図 2.3 ③)。

2.5.2 蛍光顕微鏡観察の流れ

水銀ランプ光源, CCD カメラ (浜松ホトニクス, C7190-43), パソコンを立ち上げる。水銀ランプ光源が安定するまで 5 分ほど待ち、2.4 章で作成したプレパラートをステージ上にセットし、シャッターを開ける。対物レンズ ($\times 100$) にイメージンオイルを垂らし試料と対物レンズを接触させる。対物レンズと観察する試料を離しながらピントを合わせる。観察している様子は CCD カメラで録画し、カメラ制御ソフトウェア AquaCosmos で保存した。

2.6 画像解析

蛍光顕微鏡によって得られた画像は、画像解析ソフト "image J" によって解析した。得られた画像は二値化し、蛍光した DNA の形態画像の最も距離が長い部分を長軸長とした (図 2.4)。長軸長の算出には 50 ~ 100 個の DNA 粒子に対してアンサンブル平均を取った。



図 2.4 解析方法

第3章

結果

3.1 単分子 DNA の観察

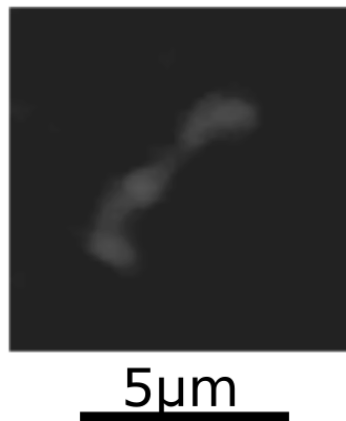


図 3.1 DNA の形態画像 (ランダムコイル型)

2.3.1 章で調整した溶液を蛍光顕微鏡で観察すると、DNA は 図 3.1 のようなランダムコイル状の形で観察された。観察された DNA 画像から長軸長を計測し、86 分子でアンサンブル平均を取った結果

$$3.3 \pm 0.7 \mu m \quad (3.1)$$

となった。誤差は標準偏差で求めた。この値は Tris-HCl10mM , DAPI 0.1 μ M, 2-メルカプトエタノール 4%(v/v) の条件の元での単分子の DNA の長軸長を表している。長軸長のヒストグラムは付録 (p31(A)) に載せた。

3.2 ヒストン濃度に対する DNA の長軸長

2.3.2 章で調整した溶液を用いて、ヒストンの濃度に対して DNA の長軸長を計測すると図 3.2 のようになった。

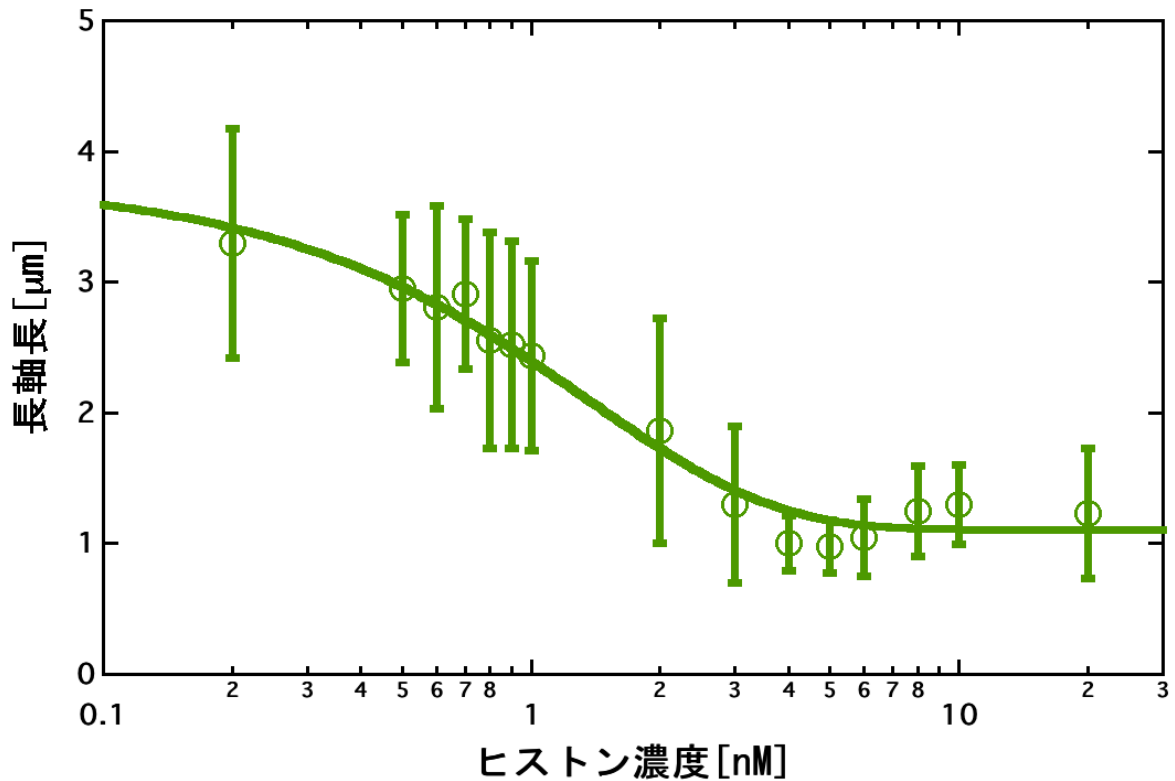


図 3.2 ヒストン濃度に対する DNA の長軸長。横軸がヒストン濃度、縦軸が DNA の長軸長 (図 2.4) を表す。DNA の濃度は $0.1 \mu \text{ Mbp}$ である。エラーバーは標準偏差を表す。長軸長のヒストグラムは付録 (p32(B)) に載せた。

ヒストン濃度を高くするにつれて DNA の長軸長が小さくなることがわかった。ヒストン 0.2 nM では図 3.1 と同様、DNA はランダムコイルとして観察された。ヒストン 2 nM を加えたとき、DNA は図 3.3(a) のようにダンベルのような形態を現し、ヒストン 5 nM を加えたとき図 3.3(b) のようにグロビュール状を現した。



(a) ヒストン 2 nM (ダンベル型)



(b) ヒストン 5 nM (グロビュール型)

図 3.3 ヒストン濃度に対する DNA の形態画像

以下、図 3.1 のようなヒストンがない時の DNA をランダムコイル型 DNA、図 3.3(a) をダンベル型 DNA、図 3.3(b) をグロビュール型 DNA と呼ぶ。50~100 個の分子で平均をとると、ダンベル型 DNA(ヒストン 2nM) の長軸長は

$$1.8 \pm 0.9 \mu m \quad (3.2)$$

グロビュール型 DNA(ヒストン 5nM) の長軸長は

$$1.0 \pm 0.2 \mu m \quad (3.3)$$

であった。誤差は標準偏差で求めた。

3.3 金属イオンに対する DNA の長軸長

ランダムコイル型 DNA に金属イオンを加えた。溶液の調整は 2.3.3 節に示した。金属イオン濃度に対して DNA の長軸長を計測すると、図 3.4 のようになった。

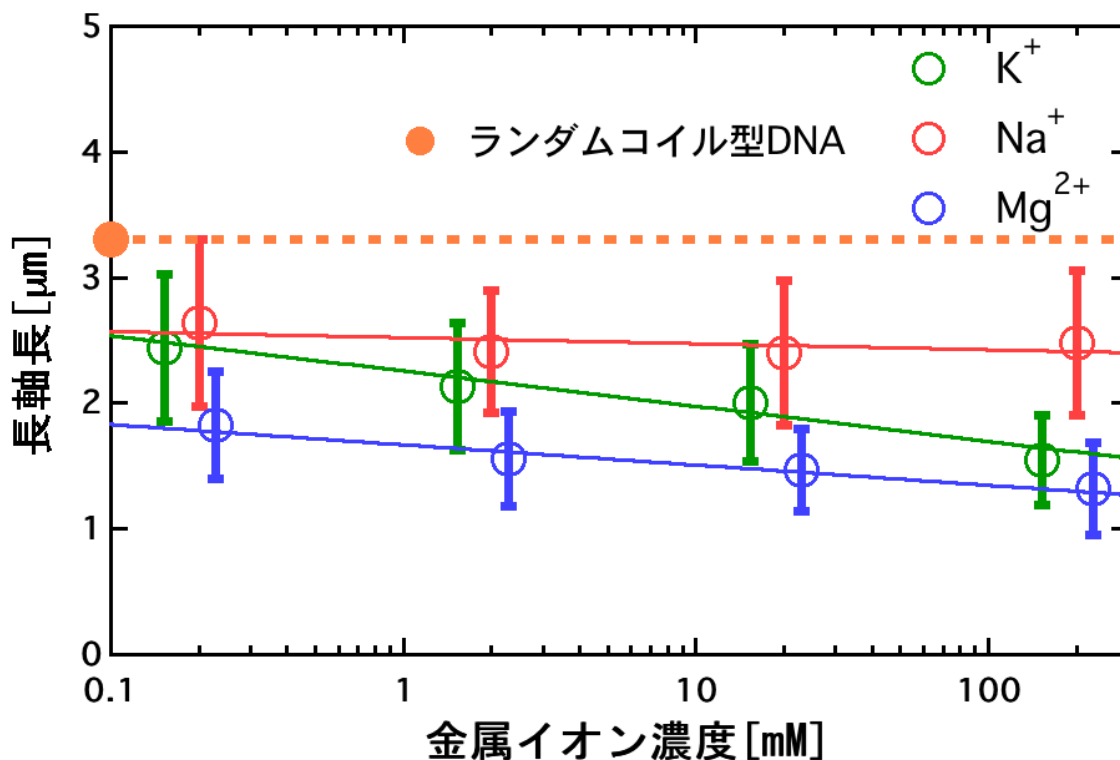


図 3.4 金属イオン濃度に対する DNA の長軸長。横軸がヒストン濃度、縦軸が DNA の長軸長 (図 2.4) を表す。DNA の濃度は $0.1 \mu \text{ Mbp}$ であり、ヒストンは加えていない。金属イオンは濃度 0.2 mM , 2 mM , 20 mM , 200 mM の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} を使用。図の緑線が K^+ 、赤線が Na^+ 、青線が Mg^{2+} を表す。また、橙線は金属イオンを加える前のランダムコイル型 DNA の長軸長を表す。エラーバーは標準偏差を表す。長軸長のヒストグラムは付録 (p33(C)) に載せた。

この結果からランダムコイル型 DNA に金属イオンを加えると、長軸長が小さくなった。DNA を縮める力は、同濃度で $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Mg}^{2+}$ であることがわかった。また、金属イオンの種類によって長軸長の変化に差が出た。

3.4 金属イオンに対する DNA とヒストンの凝集構造の長軸長

3.4.1 金属イオンに対するダンベル型 DNA の長軸長

DNA 0.1 μ Mbp にヒストン 2nM を混合した状態 (ダンベル型 DNA) に金属イオンを加えた結果は図 3.5 のようになった。

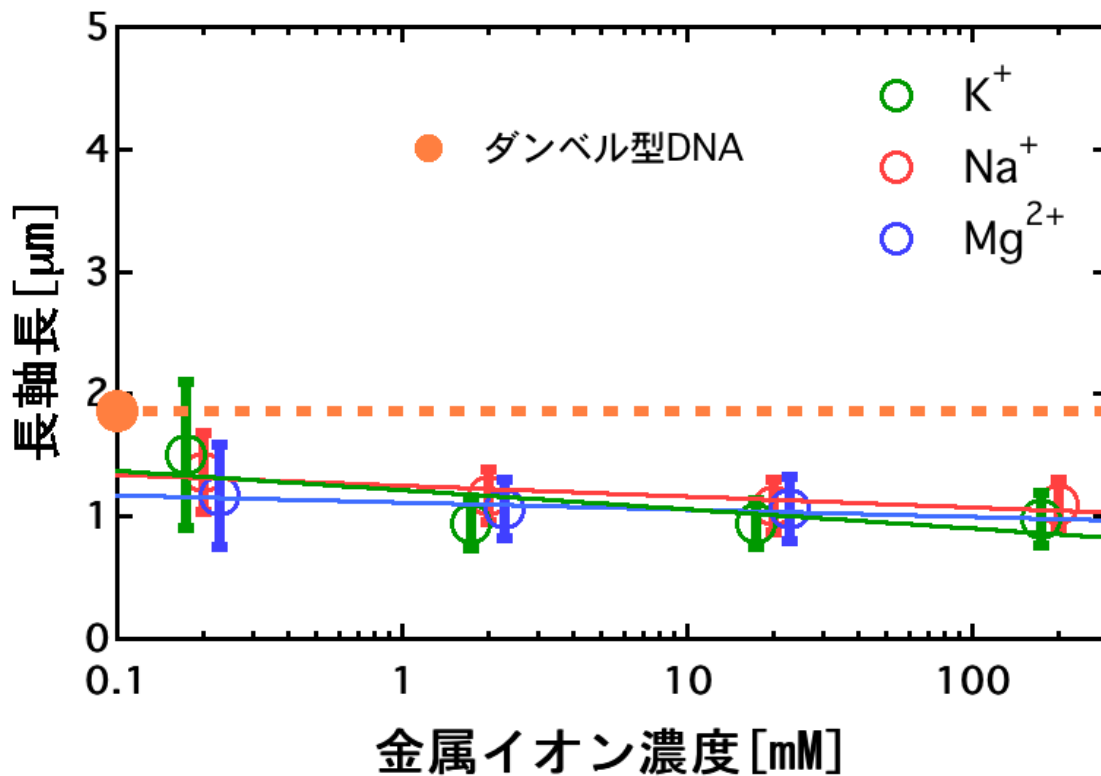


図 3.5 金属イオン濃度に対する DNA の長軸長 (ヒストン 2nM)。横軸がヒストン濃度、縦軸が DNA の長軸長 (図 2.4) を表す。DNA の濃度は 0.1 μ Mbp、ヒストン濃度は 2nM とした。金属イオンは濃度 0.2mM, 2mM, 20mM, 200mM の Na⁺, K⁺、濃度 0.2mM, 2mM, 20mM, 200mM の Mg²⁺ を使用。図の緑線が K⁺、赤線が Na⁺、青線が Mg²⁺ を表す。また、橙線は金属イオンを加える前のダンベル型 DNA の長軸長を表す。エラーバーは標準偏差を表す。長軸長のヒストグラムは付録 (p33(D)) に載せた。

3.3 節の結果と同様、ダンベル型 DNA に金属イオンを加えると DNA の長軸長が小さくなり、多くの場合でグロビュール型に転移した。ただし K⁺ の濃度 0.2nM の場合のみ、ダンベル状の構造を示した。また、金属イオンの種類による長軸長の変化の差はほとんど現れなかった。

3.4.2 金属イオンに対するグロビュール型 DNA の長軸長

DNA 0.1 μ Mbp にヒストン 5nM を混合した状態 (グロビュール型 DNA) に金属イオンを加えた結果は図 3.6 のようになった。

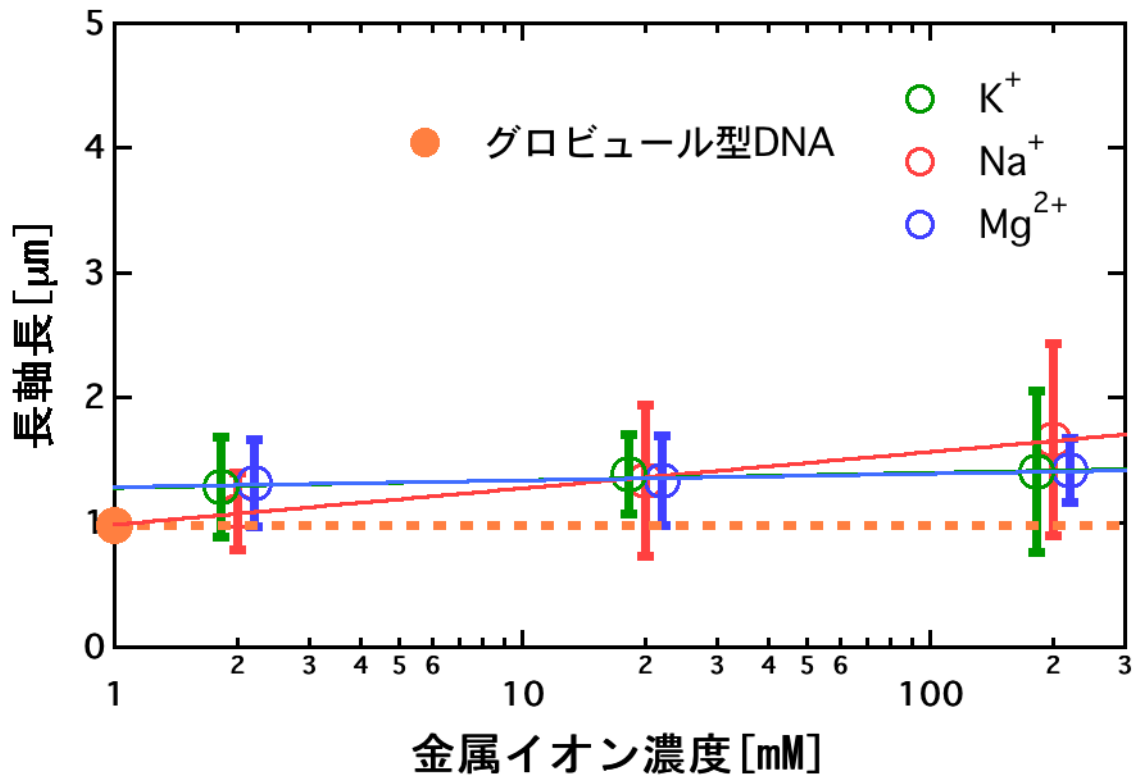


図 3.6 金属イオン濃度に対する DNA の長軸長 (ヒストン 5nM)。横軸がヒストン濃度、縦軸が DNA の長軸長 (図 2.4) を表す。DNA の濃度は 0.1 μ Mbp、ヒストン濃度は 5nM とした。金属イオンは濃度 2mM, 20mM, 200mM の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} を使用。図の緑線が K^+ 、赤線が Na^+ 、青線が Mg^{2+} を表す。また、橙線は金属イオンを加える前のグロビュール型 DNA の長軸長を表す。エラーバーは標準偏差を表す。長軸長のヒストグラムは付録 (p34(D)) に載せた。

ランダムコイル型、ダンベル型の結果とは異なり、グロビュール型 DNA に金属イオンを加えると DNA の長軸長が大きくなった。また、金属イオンの種類による長軸長の変化の差はほとんど現れなかった。

第 4 章

考察

4.1 ヒストン濃度と DNA の長軸長の関係

3.2 節の結果について考察する。図 3.2 からわかるようにヒストン濃度が高くなるにつれて DNA の長軸長が小さくなる。特にヒストン濃度が 5nM 程度で長軸長が最も小さくなった。ヒストン 1 分子に 25%(w/w) のリジン残基 (平均分子量 : 146.19) が含まれるとする。本実験で用いたヒストンの平均分子量は 20,000 であるので、一分子あたり

$$\frac{20000 \times 0.25}{146.19} = 34.2 \quad (4.1)$$

個の正電荷が含まれると予想できる。DNA は 1 塩基対 (bp) あたり 2 つの負電荷を持つので、0.1 μ Mbp の DNA の負電荷の数は 1 塩基対 (bp) あたり 0.2 μ M である。1 μ Mbp の DNA の負電荷とヒストンの正電荷の個数が等しくなるヒストン濃度は、

$$\frac{0.2}{34.2} = 5.85\text{nM} \quad (4.2)$$

この値は、図 3.2 で DNA の長軸長がヒストン濃度に依らなくなるときのヒストン濃度 5nM と近い値となった。DNA の負電荷とヒストンの正電荷の個数が等しい時、DNA はヒストンによって完全に中性化される。DNA の長軸長が小さくなり、DNA がグロビュール型を現すには DNA の負電荷をヒストンの正電荷によって中性化することが条件であると考えられる。

図 3.2 おいて、ヒストン濃度が 5nM から 20nM で、DNA の長軸長がヒストン濃度 5nM のときより大きくなったことを考察する。ヒストン濃度が高くなると DNA の長軸長が小さくなる。DNA の分子間にはクーロン力 (反発力) と分子間力が存在する。ヒストン濃度が低いときは、図 4.1(a) のように DNA 分子間に働くクーロン力 (反発力) が働く距離 (デバイ長と呼ばれる) は、分子間力 (引力) が働く距離より長い。よって二つの分子近づいてもクーロン力によって反発し分子同士で結合することはない。しかし、ヒストン濃度が高くなるにつれ、デバイ長は小さくなる。この場合、二つの DNA 分子が近づいたとき図 4.1(b) のように、クーロン力による反発力が働く前に分子間力による引力が働く。よって二つ以上の分子が結合し、長軸長が大きくなったのではないかと考えられる。

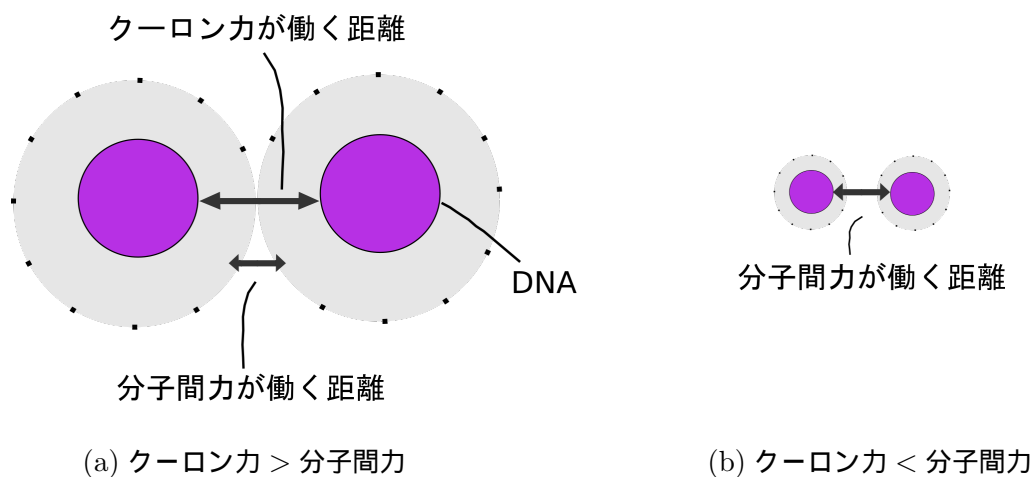


図 4.1 クーロン力と分子間力

4.2 金属イオンとランダムコイル型 DNA の長軸長の関係

ランダムコイル型 DNA に金属イオンを加えた結果 (図 3.4) について考察する。

4.2.1 イオン強度と DNA の長軸長の関係

イオン強度とは、溶液中の全てのイオン種について、それぞれのイオンのモル濃度 m_i と電荷 z_i の二乗の積を加え、1/2 倍した値である。例えば 1M の NaCl と MgCl₂ では、イオン強度を I とすると

$$I_{\text{NaCl}} = \frac{1}{2}(1 \times 1^2 + 1 \times 1^2) = 1[\text{M}] \quad (4.3)$$

$$I_{\text{MgCl}_2} = \frac{1}{2}(1 \times 2^2 + 2 \times 1^2) = 3[\text{M}] \quad (4.4)$$

となり、 I_{MgCl_2} は I_{NaCl} の三倍である。このイオン強度に関して、3.3 章の DNA の長軸長の結果をプロットすると以下のようなになった。DNA の長軸長はイオン強度のみでは表せないことがわかった。

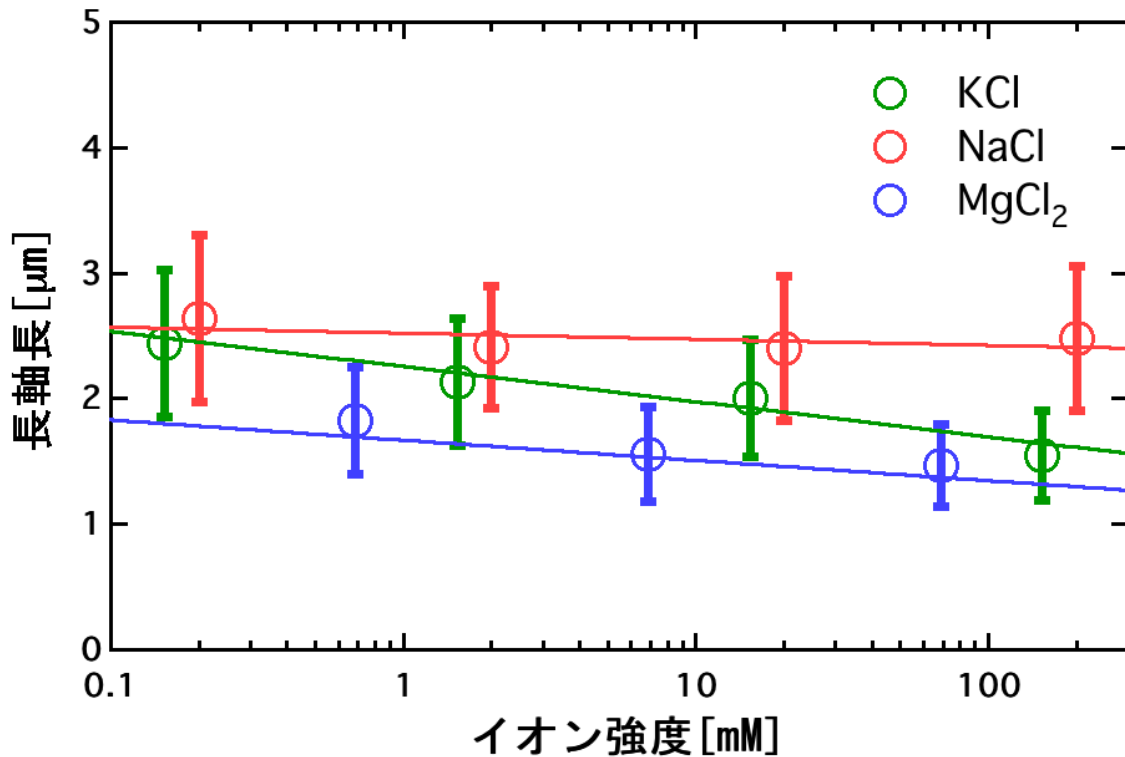


図 4.2 イオン強度に対する DNA の長軸長。緑線が KCl、赤線が NaCl、青線が MgCl₂ を表す。

4.2.2 イオンの価数と DNA の長軸長の関係

DNA と金属イオンを混合した結果 (3.3 節) について、一価のイオン (Na^+, K^+) と二価のイオン (Mg^{2+}) による長軸長の変化の違いについて考察する。簡単のため、イオンが大過剰にあり DNA はすべてのリン酸基で電離していると仮定する。図 4.3(a) のように金属イオンを混合していないとき、DNA の表面には DNA 表面の電荷とは反対の電荷を持つ正電荷のイオン (カウンターイオン) が付着する。図 4.3(b) のように一価のイオンを多量に混合したとすると、DNA 表面の負電荷周りに正電荷が集まり、DNA が中性化される。DNA 表面を覆う一価のイオンの数は DNA の負電荷の数と等しい。一方、図 4.3(c) のように二価のイオンを多量に加えたとき、DNA 表面を覆う二価のイオンの数は DNA の負電荷の数の半分となる。よって図 4.3 のように一価のカウンターイオンが DNA の表面を覆うよりも、二価のカウンターイオンが表面を覆った方がエントロピー的に得である。このエントロピーの効果はカウンターイオンの並進自由エネルギー

$$F_{\text{counterion}} = k_B T n \ln \frac{n}{N} \quad (4.5)$$

(k_B :ボルツマン定数 T :温度 n :カウンターイオンの数 N :DNA 上のイオン結合サイトの数)

に寄与し同濃度で一価のイオンより二価のイオンで長軸長が小さくなったと考えられる。

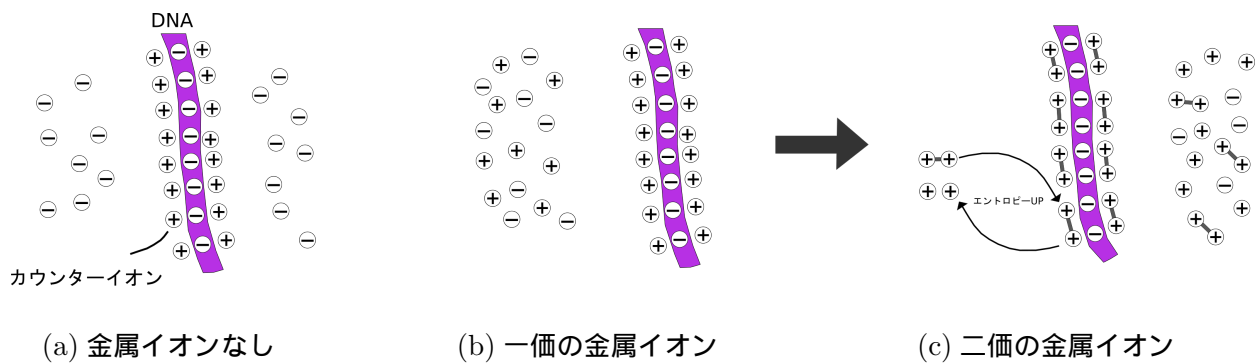


図 4.3 DNA に金属イオンを混合していないとき (a)、一価の金属イオンを多量に混合したとき (b)、二価の金属イオンを多量に混合したとき (c) の DNA とイオンの模式図

4.2.3 イオン種と DNA の長軸長の関係

Na^+ と K^+ について考える。両方とも一価のイオンであるため、4.2.2 節のようにカウンターイオンのエントロピーに差はない。 Na^+ と K^+ の物理的な違いはイオン半径の違いのみである。しかし、イオン半径の違いはせいぜい 0.7 なので、DNA の長軸長変化にはほとんど寄与しないと思われる。そこで化学的な違いである吸着エネルギーについて考える。 K^+ の DNA に対する吸着エネルギーが Na^+ の DNA に対する吸着エネルギーよりも小さいとする。このとき、同濃度で DNA 表面に吸着するイオンの数は K^+ の方が Na^+ よりも多くなる。よって K^+ の方が Na^+ より、DNA の長軸長を小さくする力が強いと考えられる。

4.3 金属イオンとダンベル型 DNA の長軸長の関係

金属イオンがないとき、ヒストン 2nM と混合した DNA はダンベル型を示していたが、図 3.5 のように金属イオンを 2mM 以上混合すると長軸長が小さくなり、グロビュール型を現すことができる。この現象について考察する。4.1 節から、DNA 1 μ Mbp の持つ負電荷の数とヒストン 2nM の持つ正電荷を比べると DNA の持つ負電荷の数の方が多い。金属イオンが加わると DNA の周りを金属イオンが覆うので、表面電荷が中性化され DNA が柔らかくなり、グロビュール型に転移したと考えられる。

4.4 金属イオンとグロビュール型 DNA の長軸長の関係

グロビュール型 DNA に金属イオンを加えると、長軸長が大きくなった現象について考察する。二つの要因が考えられる。一つ目は、4.1 章で述べたことと同様、金属イオンによってグロビュール型 DNA が縮み、分子間引力によって二つ以上の分子が結合してしまったことである。二つ目は、金属イオンがヒストンと DNA の静電的な引力を弱めることである。ヌクレオソーム構造に、塩を多量に加えると DNA がヒストンが離れるという現象がある。同様の現象が起きた可能性がある。この二つの要因を調べるには、分子同士の結合を防ぐために DNA を基盤にグラフトした DNA ブラシ (図 4.4) を用いて実験を行うことや、電子顕微鏡などで詳細な構造を観察することが必要である。

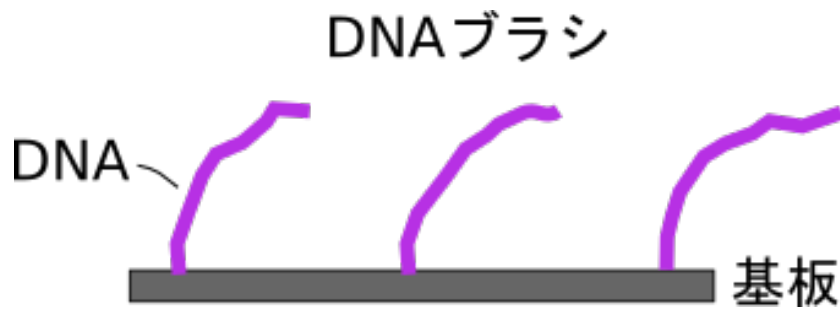


図 4.4 DNA ブラシ

4.5 先行研究との比較

4.1 節から DNA がグロビュール状態となったヒストン濃度 5nM を加えたとき、DNA の負電荷の数とヒストンの正電荷の数は等しい状態に近いと考えられる。先行研究 (1.6 節) では DNA の負電荷の数とヒストンの正電荷の数が等しいという条件下で NaCl 濃度を変えている。先行研究ではヒストンと DNA の凝集構造がランダムコイル、ダンベルコイル、ネックレスと変化するが、本実験ではそのような変化は観察できなかった。本実験と先行研究の主な違いは、使用しているヒストンの種類と観察手法の二つにある。本研究ではヒストン H1, H2A, H2B, H3, H4 の混合物を使用し、観察は蛍光顕微鏡によるものである。先行研究ではヒストン H1 のみ使用し、原子間力顕微鏡を用いて単分子の DNA (二つ以上の分子が結合していない) の観察を行っている。NaCl を用いたときに先行研究と異なる結果が現れた要因は、ヒストン H1 の特別な性質によるものと、本実験では DNA を常に単分子で観察することができない点にある。いずれにしても、先行研究との違いが出たことははっきりと解明できていないので今後の課題とする。

4.6 今後の展望

- ヒストン八量体を用いた実験

本研究で用いたヒストンはヌクレオソームを形成するヒストンの混合物 (2.2 節参照) であり、実際の細胞に存在するヒストン八量体ではない。今後はヒストン八量体を用い、ヌクレオソーム構造に近い系で実験も行うつもりである。

- 電子顕微鏡を用いた観察

本研究では、DAPI によって染色した DNA の長軸長を蛍光顕微鏡を用いて観察しているため、ヒストンと DNA を混合した時、DNA がヒストンに巻きつきヌクレオソームのような構造を形成しているのか確認することはできない。詳細な DNA とヒストンの凝集構造を観察するには電子顕微鏡などを用いる必要がある。

- RNA ポリメラーゼを加えた実験

RNA ポリメラーゼというタンパク質は転写反応を行う主な酵素として知られている。転写が起こるには RNA ポリメラーゼが不可欠であるので、DNA とヒストンの複合体に RNA ポリメラーゼを加えた実験を行いたい。

第5章

結論

本研究では細胞内に存在する主な金属イオン (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}) が DNA とヒストンの凝集構造に与える影響を DNA の長軸長を計測することで調べた。ヒストン濃度を变化させた時の DNA の長軸長を測ると、ヒストン濃度が高くなるにつれ、長軸長が小さくなった。このことからヌクレオソーム構造の形成にはヒストン濃度が重要なパラメータであることが示された。ランダムコイル型 DNA、ダンベル型 DNA に金属イオンを混合すると長軸長が小さくなり、グロビュール型 DNA に金属イオンを混合すると長軸長が大きくなる傾向が見られた。また、同濃度異種類の金属イオンをそれぞれ混合したとき、ランダムコイル型 DNA は金属イオンの種類によって長軸長が異なる結果となったが、ダンベル型、グロビュール型では長軸長は金属イオンの種類にほとんど依存しなかった。よって金属イオンが DNA とヒストンの凝集構造に与える影響はヒストン濃度に依ることが示唆された。本研究では DNA とヒストンと金属イオンという非常に単純な系で実験を行っている。実際の細胞のヌクレオソームはヒストンの八量体に DNA が巻きついている。今後は第一にヌクレオソーム構造に金属イオンが与える影響を議論すること、第二に RNA ポリメラーゼを加えて転写反応に近い系で実験することで、金属イオンが転写に与える影響を議論したい。

謝辞

本研究を行うにあたり、一貫してご指導してくださった指導教員である増淵雄一教授に厚く御礼申し上げます。

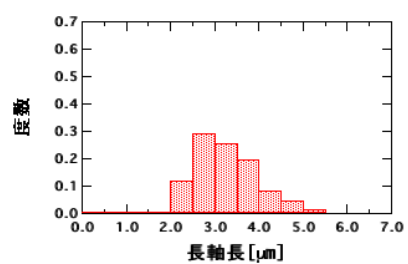
また、研究を進めるにあたり、幾多の有益な助言と示唆をいただいた山本哲也助教授、天本義史様、Ankita Pandey 様に感謝いたします。

研究室での生活をより充実なものにしてくださった磯田卓万様、高田寛人様、平山貴也様、唯一の研究室の同期として、共に勉学に励んできた久世雅大様にお礼申し上げます。

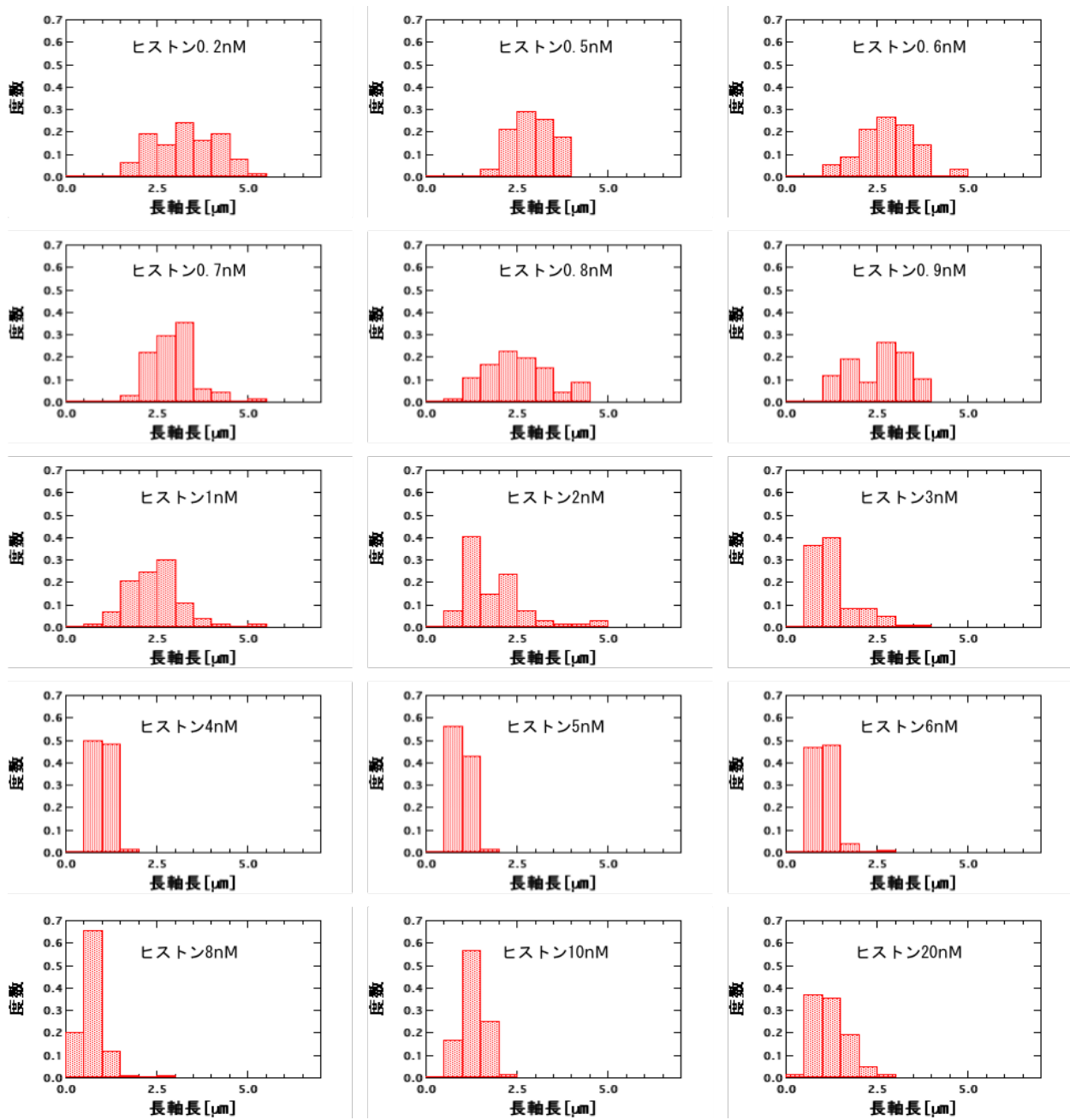
また、蛍光顕微鏡の使い方や、試料の調整の仕方などをご教示賜りました東京大学、小穴教授をはじめとする小穴研究室の方々に厚く御礼申し上げます。最後に、私の大学生活を支えてくださった、家族、友人に感謝いたします。本当にありがとうございました。

付録

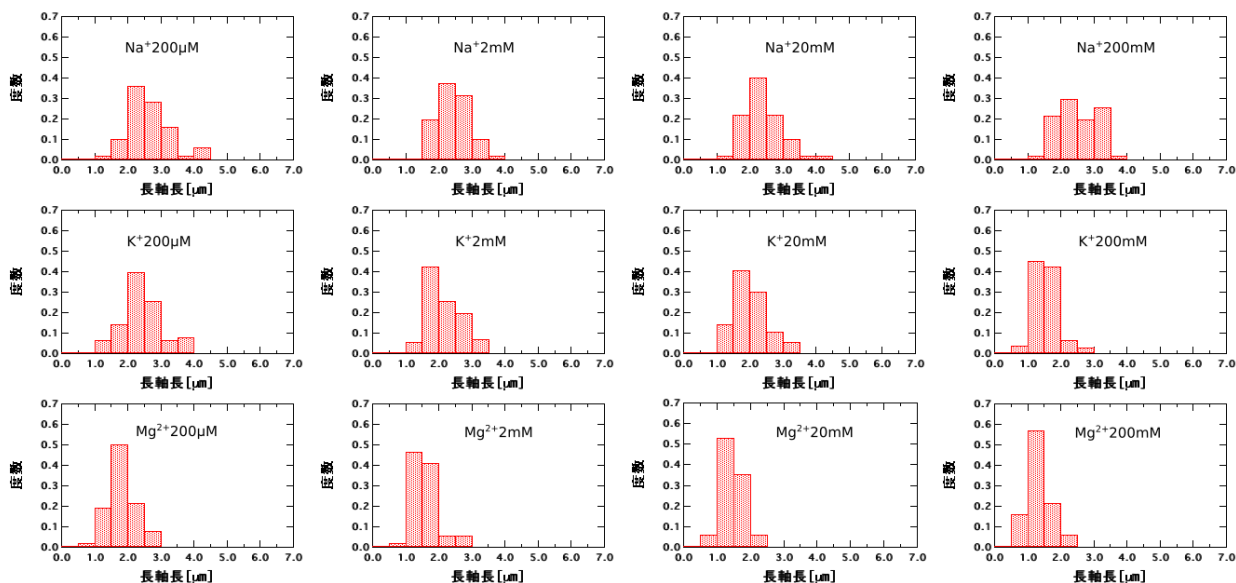
(A) 単分子 DNA の長軸長ヒストグラム



(B) ヒストン濃度に対する DNA の長軸長のヒストグラム

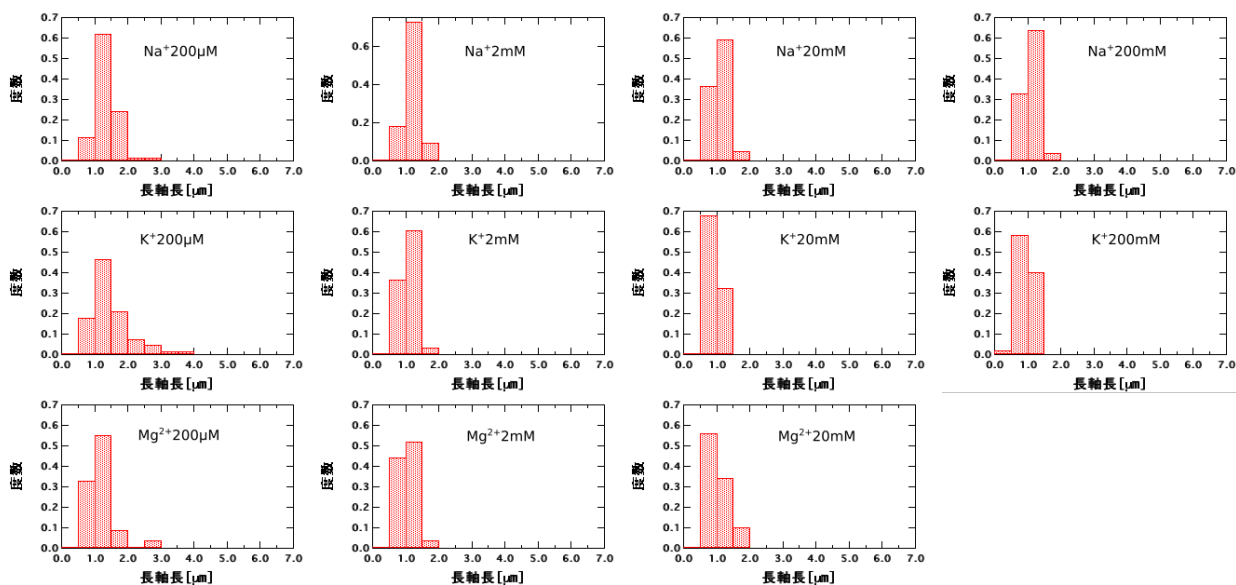


(C) 金属イオンに対する DNA の長軸長のヒストグラム

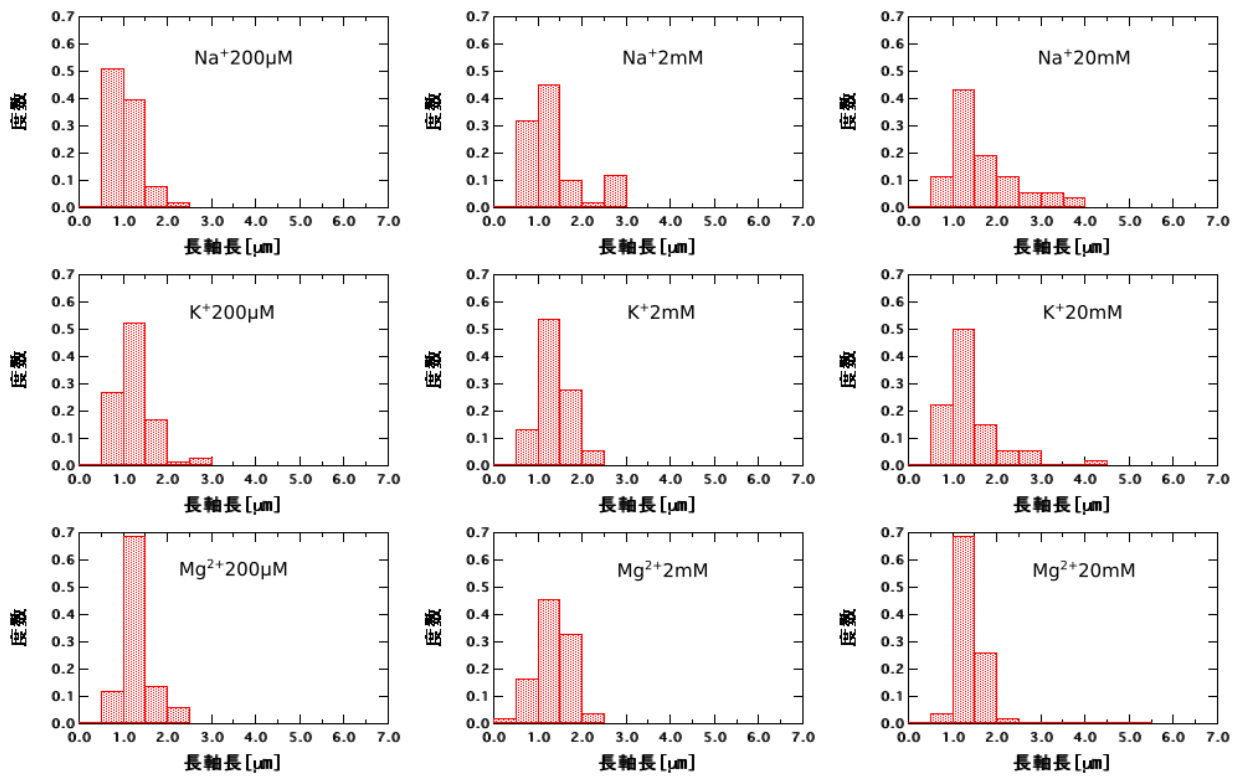


(D) 金属イオンに対する DNA とヒストンの凝集構造の長軸長のヒストグラム

・ DNA とヒストン 2nM(ダンベル型) に金属イオンを加えたとき



・ DNA とヒストン 5nM(ダンベル型) に金属イオンを加えたとき



参考文献

- [1] H. LODISH, 石浦章一訳. 分子細胞生物学 第7版. 東京化学同人, 2016.
- [2] 鈴木けん之. 実験生物学講座 7. 丸善株式会社, 1984.
- [3] 山田正篤. 細胞の運命 I. サイエンス社, 2006.
- [4] R. D. Kornberg. Chromatin structure - repeating unit of histones and dna. *Science*, Vol. 184, No. 4139, pp. 868–871, 1974.
- [5] P. Oudet, M. Grossbellard, and P. Chambon. Electron-microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, Vol. 4, No. 4, pp. 281–300, 1975.
- [6] D. サダヴァ, 石崎泰樹 丸山敬訳. カラー図解 大学生物学の教科書 第2巻 分子遺伝学. 講談社, 2014.
- [7] M. Noll and R. D. Kornberg. Action of micrococcal nuclease on chromatin and location of histone h-1. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 109, No. 3, pp. 393–404, 1977.
- [8] K. vanHolde and J. Zlatanova. What determines the folding of the chromatin fiber? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 93, No. 20, pp. 10548–10555, 1996.
- [9] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, Vol. 171, No. 4356, pp. 737–738, 1953.
- [10] A. R. Macleod, N. C. W. Wong, and G. H. Dixon. Amino-acid-sequence of trout-testis histone-h1. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 78, No. 1, pp. 281–291, 1977.
- [11] R. J. Delange, D. M. Fambrough, E. L. Smith, and J. Bonner. Calf

- and pea histone-iv .3. complete amino acid sequence of pea seedling histone iv - comparison with homologous calf thymus histone. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 244, No. 20, pp. 5669–+, 1969.
- [12] R. J. Delange, D. M. Fambrough, E. L. Smith, and J. Bonner. Calf and pea histone 4 .2. complete amino acid sequence of calf thymus histone 4 - presence of epsilon-n-acetyllysine. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 244, No. 2, pp. 319–+, 1969.
- [13] R. J. Delange, E. L. Smith, and J. A. Hooper. Complete amino-acid sequence of calf-thymus histone iii. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 69, No. 4, p. 882, 1972.
- [14] H. Hayashi and K. Iwai. Calf thymus alanine-rich, leucine-rich histone - sequences of tryptic peptides and characteristic distributions of basic and other residues in molecule. *Journal of Biochemistry*, Vol. 70, No. 3, p. 543, 1971.
- [15] K. Iwai, K. Ishikawa, and H. Hayashi. Amino-acid sequence of slightly lysine-rich histone. *Nature*, Vol. 226, No. 5250, 1970.
- [16] L. C. Yeoman, W. C. Starbuck, C. W. Taylor, N. Sugano, H. Busch, M. O. J. Olson, and J. J. Jordan. Amino-acid sequence of center of arginine-lysine-rich histone from calf thymus - total sequence. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 247, No. 19, 1972.
- [17] F. Crick. Central dogma of molecular biology. *Nature*, Vol. 227, No. 5258, 1970.
- [18] B Alberts, A Johnson, J Lewis, D Morgan, M Raff, K Roberts, and P Walter. *Molecular Biology of The CELL sixth edition*. Garland Science, 2014.
- [19] D. Henner, R. I. Kelley, and J. J. Furth. Transcription of fractionated calf thymus chromatin by rna-polymerase of calf thymus and escherichia-coli. *Biochemistry*, Vol. 14, No. 21, pp. 4764–4771, 1975.
- [20] Y. Yoshikawa, Y. S. Velichko, Y. Ichiba, and K. Yoshikawa. Self-

- assembled pearling structure of long duplex dna with histone h1. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 268, No. 9, pp. 2593–2599, 2001.
- [21] R. J. P. Williams. Biochemistry of sodium, potassium, magnesium, and calcium. *Quarterly Reviews*, Vol. 24, No. 3, pp. 331–+, 1970.
- [22] M. Matsumoto, T. Sakaguchi, H. Kimura, M. Doi, K. Minagawa, Y. Matsuzawa, and K. Yoshikawa. Direct observation of brownian-motion of macromolecules by fluorescence microscope. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, Vol. 30, No. 7, pp. 779–783, 1992.
- [23] K. Yoshikawa, Y. Matsuzawa, K. Minagawa, M. Doi, and M. Matsumoto. Opposite effect between intercalator and minor groove binding-drug on the higher-order structure of dna as is visualized by fluorescence microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 188, No. 3, pp. 1274–1279, 1992.
- [24] K. Minagawa, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, Y. Masubuchi, M. Matsumoto, M. Doi, C. Nishimura, and M. Maeda. Change of the higher-order structure of dna induced by the complexation with intercalating synthetic-polymer, as is visualized by fluorescence microscopy. *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, No. 1, pp. 37–40, 1993.
- [25] 野島博. 顕微鏡の使い方ノート. 羊土社, 2004.