

「活性クロマチンドメインのin vitro再構成」

平成5年度

博士(理学)

大羽 玲子

総合研究大学院大学

目次

第1章	要約.....	P1
第2章	序論	P2-P3
第3章	活性クロマチンドメインの構築	P4-P17
第4章	アセチル化ヒストンを用いたヌクレオソーム形成と 転写への影響	P18-P23
第5章	総合考察	P24
第6章	謝辞	P25
第7章	引用文献	P26-P29
図1-15	P30-P45

第1章 要約

真核生物のクロマチンDNAは互いに独立なトポロジータクノロジーをとりうる多数のループ状の構造を形成している。こうしたクロマチンのループ構造は、ゲノム内の異なる領域を種々の程度に超らせん化することを可能にしており、それによって転写が調節を受けていると考えられる。この考えを検証するため、私は、いろいろなトポロジータクノロジーをもつDNAから *in vitro* でヌクレオソームを再構成し、その転写活性を調べ、以下の結果を得た。

(1) アデノウイルス後期主要プロモーターDNA上にヌクレオソームを形成させるとRNAポリメラーゼIIによる転写開始が阻害された。

(2) ヌクレオソーム形成に先立ち転写開始複合体をプロモーター領域に形成させておくと、ヌクレオソームを形成したDNAを鋳型として転写が進行した。

(3) 転写開始複合体の形成とヌクレオソームの形成を競合させると、線状DNAと弛緩型環状DNAではプロモーター領域へのヌクレオソーム形成により転写が阻害された。一方、適度に超らせん化したDNA（超らせん化密度-0.036）では、プロモーター領域でのヌクレオソームの形成に先行して速やかに転写開始複合体の形成が起こり、転写が進行した。

(4) ショウジョウバエHSP70プロモーターDNA上にヌクレオソームを形成させるとRNAポリメラーゼIIによる転写開始が阻害された。

(5) ヌクレオソーム形成に先立ち転写開始複合体をプロモーター領域に形成させておくと、HSP70プロモーターDNAにおいてもヌクレオソームを形成したDNAを鋳型として転写が進行した。

(6) 転写開始複合体の形成とヌクレオソームの形成を競合させると、HSP70プロモーターDNAでは、線状DNA、弛緩型環状DNA、超らせん化したDNAのいずれにおいてもプロモーター領域でのヌクレオソームの形成に先行して速やかに転写開始複合体の形成が起こり、転写が進行した。

(7) H1ヒストンを除いたヒストンをヌクレオソーム形成に用いてもH1ヒストンを含むヒストンを用いた場合と同様の結果が得られた。

(8) アセチル化ヒストンをヌクレオソーム形成に用いても普通のヒストンを用いた場合と同様、ヌクレオソーム形成によって転写開始が阻害された。

これらの結果は活性クロマチンドメインの形成にDNAの超らせんが重要な役割を果たしている遺伝子とそうでない遺伝子が存在することを示唆している。

第2章 序論

真核生物の核では、DNAは、ヒストンオクタマーの周囲に巻きついてヌクレオソーム構造をとり、それが更に巻き上がって30nmクロマチンファイバーとなり、それが更に折り畳まれてクロマチンループを形成し、最終的には染色体に至る何段階にもわたる高次構造をとって存在している。こうしたDNAの高次構造は、物理的に巨大なDNAを核の限られた容積のなかに収容するという役割のみならず、各々の段階において機能的に多様な役割を果たしている。遺伝情報という観点から見ると、DNAの高次構造は膨大な遺伝情報を効率良くパッケージすると共に必要に応じて遺伝子発現を抑える役割を担っていると考えられている。しかし、そうしたDNAの高次構造の機能を分子レベルで解析する研究は、遺伝子のクローニング、遺伝子導入技術、*in vitro*転写系の開発などをまわって、近年になりようやく着手された段階である。このような状況を踏まえ、私は、DNAの高次構造、特にクロマチンの機能を分子レベルで明らかにするために、まずヌクレオソーム構造に注目し、*in vitro*でヌクレオソームを再構成したDNAを用いてヌクレオソーム構造と遺伝子発現との関わりを調べることにした。

ヌクレオソーム構造が遺伝子発現の抑制に関わっていることを示唆する結果は*in vivo*においても*in vitro*においても報告されている。カイコのフィブロイン遺伝子をサルのCOS細胞に導入すると、一過性の転写がみられる(Tokunaga *et al.*, 1984)。また、ヒトのHeLa細胞由来の*in vitro*転写系に裸のフィブロイン遺伝子DNAを加えると転写されてしまう(Tujimoto and Suzuki, 1984)。これらの事実は、本来その遺伝子が発現されていない細胞でプロモーター活性を抑えるために、クロマチン構造が重要な役割を果たしていることを示唆している。最近、酵母でヒストンH4の発現を止めると、それまで抑制されていた一群の遺伝子が転写されてしまうことが明らかとなった(Kim *et al.*, 1988)(Han and Grunstein, 1988)が、このことも、ヌクレオソーム構造が遺伝子発現の抑制に関わっていることを示唆している。

*in vitro*の転写系において、DNA上にヌクレオソームを形成させると転写が阻害されることがアデノウイルス後期主要プロモーター(Knezetic and Luse, 1986)(Lorch *et al.*, 1987)(Matsui, 1987)(Workman and Roeder, 1987)、5SRNAプロモーター(Brown, 1984)(Wolffe and Brown, 1988)などで報告されている。しかし、プロモーター上に転写開始前複合体を予め形成させておくとそのあとでヌクレオソームを形成させても転写が進行する(Matsui, 1987)(Workman and Roeder, 1987)(Knezetic *et al.*, 1988)。通常の*in vitro*の転写系でヌクレオソームの形成と転写開始前複合体の形成を競合させるとヌクレオソームの形成が転写開始前複合体の形成に先行し、転写は起こらないが、対応する転写活性化

因子をそれぞれの系に加えると転写が進行することが、シュードラビーズウイルスの初期蛋白(IE)、アデノウイルス後期主要プロモーターの上流因子(USF或はMLTF)、酵母の転写因子GAL4などの系で報告されている(Workman and Roeder, 1987)(Workman *et al.*, 1990)(Workman *et al.*, 1991)。

プロモーターの活性はDNAの超らせん構造によっても調節を受けている。ヌクレオソーム構造をとらない裸のDNAを鋳型に用いた*in vitro*の転写系での実験では、多くの遺伝子について、超らせんDNAは弛緩したDNAに比べ高い転写活性を示すことが知られている(Hirose *et al.*, 1985)(Hirose and Suzuki, 1988)(Handa *et al.*, 1989)(Hirose and Ohta, 1990)。フィブロイン遺伝子とアデノウイルス後期主要プロモーターではDNA上に負の超らせんを入れると転写開始前複合体の形成が促進され転写が活性化されるが、ショウジョウバエの熱ショック蛋白遺伝子HSP70のプロモーターではDNAのトポロジーに関わらず、転写開始前複合体が速やかに形成され、転写が進行する(Tabuchi and Hirose, 1988)(Mizutani *et al.*, 1991a)(Mizutani *et al.*, 1991b)。もし、ヌクレオソームの形成がDNAのトポロジーにより大きく変動しないならば、ヌクレオソーム形成と転写開始前複合体形成を競合させた際、以下の結果が期待される。(1)アデノウイルス後期主要プロモーターの場合：超らせんDNAではヌクレオソーム形成に先立って転写開始前複合体が速やかに形成されるため、転写が起きるが、弛緩型DNAでは転写開始前複合体形成が遅いため、ヌクレオソームが先に形成されて転写が抑えられる。(2)ショウジョウバエの熱ショック蛋白遺伝子HSP70プロモーターの場合：DNAのトポロジーに関わらず、ヌクレオソーム形成に先立って転写開始前複合体が速やかに形成されるため、転写が起きる。これらの予想を実験的に検討した結果、DNAの超らせんがクロマチンDNAの転写調節に関わっていることを支持するデータが得られた(Ohba *et al.*, 1992)。

第3章 活性クロマチンドメインの構築

3.1 材料と方法

3.1.1 DNA

ヌクレオソーム形成実験、および転写実験にはアデノウイルス後期主要プロモーターとショウジョウバエの熱ショック蛋白遺伝子70のプロモーター(以下、HSP70プロモーターと記す)を使用した。

アデノウイルス後期主要プロモーターの-400から+10までの塩基配列を、グアノシンを含まない385bpの長さのフラグメントの直前につないだプラスミドDNA、pML(C2AT) (全長3.5kbp) を用意した(Sawadogo and Roeder, 1985)。弛緩型環状DNAと適度に超らせん化したDNAはエチジウムブロマイド存在下にトポイソメラーゼIで処理して作成した(Mizutani *et al.*, 1991b)。超らせん型環状DNAの超らせん化の程度は裸のDNAで転写が最大になることが知られている平均超らせん密度 -0.036に設定した。線状DNAは制限酵素 HindIIIで切断して作成した。

ショウジョウバエHSP70プロモーターの-91から-72までと-6から+14までに相当する各々20merのオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーに用いて-91から+14までの領域をPCRで作製し、グアノシンを含まない385bpのC2ATフラグメントの上流につないでベクターpUC13にのせ、全長3.2kbpの閉環状DNAを作製した(図1)。このDNAをトポイソメラーゼIで処理して弛緩型環状DNAを、HindIIIで処理して線状DNAを、それぞれ作製した。超らせん型環状DNAとして、大腸菌から得られたプラスミドDNAをそのままの形で用いた(平均超らせん密度 -0.06)。これは、HSP70プロモーターの転写は裸のDNAでは超らせん化の程度によって影響を受けないことが知られているので、プラスミドDNAを超らせん型環状DNAとして選択することができるためである。こうして得られた線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAを用いてヌクレオソームを再構成し、これを鋳型に用いて転写を行わせた。

3.1.2 基本転写因子画分とRNAポリメラーゼII

基本転写因子画分とRNAポリメラーゼIIはHeLa細胞の核抽出液から部分精製して調製した(Mizutani *et al.*, 1991b)。HeLa細胞S3株をスピナーフラスコでMEM培地(ニッスイ4型、5%ウマ血清含有)を用いて培養し、数リッターごとに細胞を集めて核抽出液を調製した。最終細胞密度は 4×10^5 /ml以下に抑えた。培養液にして50リッター分のHeLa細胞核抽出液を基本転写因子画分調製のための出発材料として用いた。

核抽出液をヘパリン-セファロースカラムにかけ、0.2M、0.4M、0.6MのKClを含むバッファーH (1mM EDTA, 50mM HEPES-NaOH pH7.9, 20% glycerol, 12.5mM MgCl₂, 1mM DTT)で溶出した。0.2Mの画分をさらにDEAE-セファロースカラムにかけ、0.1M、0.35M、1.0MのKClを含むバッファーT (バッファーHのHEPES-NaOH pH7.9の代わりにTris-HCl pH7.9を用いたもの)で溶出した。0.4Mの画分はさらにDEAE-セファロースカラムにかけて0.1M、0.225M、0.5MのKClを含むバッファーTで溶出した。得られた画分をマグネシウムを含まないバッファーA (1mM EDTA, 20mM HEPES-NaOH pH7.9, 20% glycerol, 0.1M KCl, 1mM DTT)に透析し、基本転写因子画分及びRNAポリメラーゼII画分として転写実験に用いた。これらのカラムを通す事により、実験に必要な画分中のトポイソメラーゼの活性は概ね除けたが、ヘパリン-セファロースカラムの0.4M KCl溶出画分をDEAE-セファロースカラムにかけて0.1MのKClで溶出した画分(H.4D.1)にはトポイソメラーゼIの活性が混入してきたので、さらにホスホセルロースカラムにかけ、0.1M、0.3M、0.5M、1.0MのKClを含むバッファーAで溶出し、トポイソメラーゼIの活性を除いてからバッファーAに透析して転写実験に用いた。ヘパリン-セファロースカラムの0.4M KCl溶出画分をDEAE-セファロースカラムにかけて0.225MのKClで溶出した画分(H.4D.225)は、さらにホスホセルロースカラムにかけ、0.1M、0.35M、0.5M、1.0MのKClを含むバッファーAで溶出し、バッファーAに透析して、得られた画分にRNAポリメラーゼII、TFIIIE、TFIIDの相互混入のないことを確認してから転写実験に用いた。精製のスキームと、最終的に得られた画分に含まれる基本的転写因子とRNAポリメラーゼIIを図2に示す。

3.1.3 ヒストン

ヒストンは以下に述べる 2 つの方法で調製した。

A. 硫酸抽出法

HeLa細胞の核を 0.21Mの硫酸で処理してヒストンを抽出し、アセトン沈澱して0.5mM塩酸に溶解した。使用時にヒストンをHAバッファー (20mM Tris-HCl pH7.5, 120mM KCl, 2mM MgCl₂) で希釈して反応系に加えた。ヒストン H1、H2A、H2B、H3、H4の量比が核内における量比と変わらないことをポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認して実験に用いた。

B. ハイドロキシアパタイトカラムによる精製

本実験を行うに当たり、ヒストンの調製方法を変更した(Simon, 1979, より改変)。0.35MのNaClを含むバッファーで基本的転写因子とRNAポリメラーゼ IIを抽出した後のHeLa細胞核をTEバッファー (10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1mM EDTA) に懸濁し、パーティスホモジェナイザーで90ボルトで90秒ホモジェナイズし、遠心上清を0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH6.8), 0.4M NaClに対して透析した。この遠心上清を0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH6.8), 0.4M NaClで平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(Bio-gel HTP, BioRad) にかき、0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH6.8), 2M NaClで溶出した。この場合はH1を含むすべてのヒストンが溶出された。H1を含まないヒストンの画分を得るためには、遠心上清をカラムにかけた後、0.4M、0.63M、2.0MのNaClを含む0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH6.8)の溶液で順に溶出した。この場合はH1ヒストンのみが0.63M NaClで、その他のヒストンが2M NaClで溶出された。得られたヒストン画分をHEKバッファー(10mM Hepes-NaOH pH7.9, 0.1mM EDTA, 100mM KCl) に透析して実験に用いた。この方法の利点は、溶出に用いるバッファーの塩濃度を変えることにより、H1ヒストンを他のヒストンと任意に分けられること、及び、シアードクロマチンの形でカラムにかけて精製するのでヒストン以外の塩基性タンパクを除くことができ、より不純物の少ないヒストンを得ることができることである(図3)。実際、この方法で調製したヒストンは硫酸抽出法で調製したヒストンより純度が高く、ヌクレオソーム再構成に用いた場合においても効率が良く、理論値に近いDNA:ヒストン比率でヌクレオソーム再構成を行わせることができた。また、H1ヒストンの有無によるヌクレオソーム再構成への影響を考察できるデータも得られた。

3.1.4 ヌクレオソームアセンブリーファクター

A.1. ヌクレオソームアセンブリーファクターの調製

アフリカツメガエル卵母細胞からヌクレオソームアセンブリーファクターを調製した(Laskey *et al.*, 1978)。アフリカツメガエル卵母細胞を0.66倍量のHAバッファーに懸濁してホモジェナイズし、1,800 x gで遠心して遠心上清をとり、更に145,000 x gで30分ずつ2回遠心して遠心上清をとり、80°Cで120分熱処理した後遠心して遠心上清をとり、これをヌクレオソームアセンブリーファクター画分とした。画分中の有効成分はヌクレオプラスミンである。ヌクレオプラスミンの存在をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した後、ヌクレオソーム再構成実験に用いた。

A.2. ヌクレオソーム再構成の反応条件

最初に、HAバッファーで希釈したヒストン0.5 μ l (0-1.2 μ gのヒストンを含む)と4.0 μ lのヌクレオソームアセンブリーファクター画分を25°Cで15分インキュベートし、ヒストンとヌクレオソームアセンブリーファクターを結合させた。これに、1.0 μ lの25%ポリビニルアルコール(以下、PVAと記す)、100ng DNA, 8.4mM MgCl₂, 300mM KClを含む0.5 μ lの溶液を加えてヌクレオソームを形成させた。転写因子存在下にヌクレオソーム形成を行わせる場合は1 μ lの25%PVA、4.5 μ lの基本転写因子画分(1.0 μ l TFIIB, 1.5 μ l TFIID, 1.5 μ l TFIIE, 0.5 μ l RNAポリメラーゼII)、100ng DNAと21mMのMgCl₂を含む0.5 μ lの溶液を加えた。MgCl₂とKClの最終濃度はそれぞれ1.4mMと67mMであった。ヌクレオソーム形成に先立ちDNAを転写因子画分とインキュベートする実験の場合は100ngのDNAを1 μ lの25%PVAと4.5 μ lの転写因子画分(1.0 μ l TFIIB, 1.5 μ l TFIID, 1.5 μ l TFIIE, 0.5 μ l RNAポリメラーゼII)と1.75mM MgCl₂を含む6 μ lの反応液中で25°Cで40分インキュベートした後、4.5 μ lのプレインキュベートしたヒストンとヌクレオソームアセンブリーファクター反応液を加えて以下同じように処理した。

B.1 ポリグルタミン酸

後半の実験では、アフリカツメガエル卵母細胞から調製したヌクレオソームアセンブリーファクターの代わりにポリグルタミン酸を用いることにした(Stein, 1979)。理由は、アフリカツメガエル卵母細胞由来のヌクレオソームアセンブリーファクターは個体による活性の変動が大きく、ロット差による実

験結果のふれを懸念したこと、及び、卵母細胞粗抽出液を熱処理したものをそのままヌクレオソームアセンブリーファクターの供給源として用いる限り粗抽出液中の不純物が実験系に入り込む可能性を排除できないこと、の2点である。ポリグルタミン酸 (分子量 100K) はMiles-Yeda Ltdから購入して使用した。ポリグルタミン酸は酸性タンパクであり、塩基性タンパクであるヒストンの電荷を中和することによりヒストンの各サブユニットの会合を助けるという作用機序はアフリカツメガエル卵母細胞由来のヌクレオソームアセンブリーファクターであるヌクレオプラスミンと変わらない。そして合成化合物であるポリグルタミン酸にはロット差や不純物の問題も少ない。ポリグルタミン酸を用いてヌクレオソーム再構成の条件を検討し、アフリカツメガエル卵母細胞由来のヌクレオソームアセンブリーファクターを用いた場合とほぼ同じ程度のヌクレオソームをDNA上に作らせることができたので、以後の実験にはこの系を用いた。

B.2 ヌクレオソーム再構成の反応条件

ポリグルタミン酸とヒストンをHEKバッファー (10mM Hepes-NaOH pH7.9, 0.1mMEDTA, 100mM KCl) 中で37°C、16時間インキュベートしてヒストンオクタマーを形成させた。分注して液体窒素で急速凍結したものを-80°Cで保存し、これをヌクレオソームの再構成に用いた。100ngのDNAと0-400ngのヒストンオクタマーを4.0 μ lのバッファー中で30°C、2時間インキュベートしてヌクレオソームを形成させた。この際のバッファーの最終的な組成は7.5mM Hepes-NaOH pH7.9, 75mM KCl, 2% PVA, 1mM MgCl₂である。

3.1.5 その他の試薬

仔牛胸腺DNAトポイソメラーゼIはBethesda Research Laboratoriesから購入した。3'-O-methyl-GTPはPharmacia-LKB Biotechnologyから購入した。他のヌクレオチド、ポリビニルアルコール (平均分子量 10,000)、マイクロコックカルヌクレアーゼはSigmaから購入した。HindIIIは宝酒造、RNase T1は生化学工業、Proteinase KはBoehringer Mannheim, [α -³²P] CTPはICN Biomedicalsからそれぞれ購入した。

3.1.6 転写反応

ヌクレオソームを形成させた鋳型DNAで転写を行わせるために、20mM Hepes-NaOH pH7.9, 40mM MgCl₂, 3.75mM ATP, 3.75mM UTP, 0.5mM 3'-O-methyl-GTP, 62.5μM [α -³²P] CTP (8-16 x 10⁴cpm / pmol), 5 units RNase T1, 2 units 仔牛胸腺DNAトポイソメラーゼIを含む2.0μlの溶液を鋳型DNAを含む反応液に加えて、25°Cで60分インキュベートした。DNAトポイソメラーゼIはヌクレオソーム形成により閉環状DNAに生じた正の超らせんを弛緩し、全てのDNAを同じ状態で転写するために加えた。生成するRNAを7M Ureaを含む6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、シグナルをオートラジオグラフィー或はイメージアナライザーで検出した(Mizutani *et al.*, 1991b)。なお、ヌクレオソーム再構成にポリグルタミン酸を用いた場合は、転写開始前複合体形成と転写の反応温度をそれぞれ30°Cにした。これは、本来転写の反応条件としては30°Cが至適であるところをアフリカツメガエル卵母細胞由来のヌクレオソームアセンブリーファクターによるヌクレオソーム再構成の反応条件にあわせて25°Cを採用していたが、ポリグルタミン酸によるヌクレオソーム再構成反応は低温で行う必要がないことから元の条件に戻したものである。

3.1.7 ヌクレオソーム形成量の測定

A. マイクロコッカルヌクレアーゼ消化法

ヌクレオソームを形成させた後、50mMのCaCl₂と8.5 units/μlのマイクロコッカルヌクレアーゼを含む溶液を1.5μl加えて25°C、15分インキュベートした。0.18M EDTA (pH8.0) と5%SDSを含む溶液を1μl加えて反応を停止させ、10μg/μlのProteinase Kを2μl加えて更に37°Cで30分インキュベートした。フェノール処理、エタノール沈澱した後DNAを回収し、2%アガロースゲル(TAE: 40mM Tris-酢酸 pH8.0, 20mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA)で電気泳動した。DNAをニトロセルロースフィルター(Hybond-N, Amersham)上にブロットイングし、HindIIIで切断したpML(C₂AT)DNA或はpHSP(C₂AT)DNAをランダムプライマー法により³²Pでラベルしたものをプローブにしてハイブリダイゼーション法で検出した(Sambrook *et al.*, 1989)。

B. トポイソメラーゼI処理法

100ngの閉環状DNAにヌクレオソームを形成させる時に、1.8unitsのDNAトポイソメラーゼIを共存させてDNA上に生じた正の超らせんを解消させ、次いで0.18M EDTA pH8.0 と5% SDSを含む溶液を0.5 μ l加えて反応を停止させ、10 μ g/ μ lのProteinaseKを2 μ l加えて更に37°Cで30分インキュベートした。得られたDNAを1%アガロースゲル(TAE : 40mM Tris-酢酸 pH8.0, 20mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA)で60ボルトで6.5時間電気泳動した。ゲルを0.5 μ g/mlエチジウムブロマイドで染色し、DNAの負の超らせんによって生じるDNAのラダーを検出した。クロロキンゲルでの解析のためには7.5 μ g/mlクロロキンを含む1%アガロースゲル(TBE : 89mM Tris-Borate, 2mM EDTA pH8.0)で62.5ボルトで17時間電気泳動した。ゲルをTBEに30分浸してクロロキンを抜いたのち、0.5 μ g/mlエチジウムブロマイドで染色し、DNAの負の超らせんによって生じるDNAのラダーを検出した。

3.2 結果

3.2.1 アデノウイルス後期主要プロモーターを含む線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAにおけるヌクレオソーム形成

ヌクレオソーム形成と転写開始におけるDNAのトポロジーの影響を調べるためには、ヌクレオソーム形成と転写開始前複合体の形成の間、DNAのリンキングナンバーが保たれていることが重要である。このため、私は、ヌクレオソーム形成に必要な、アフリカツメガエル卵母細胞抽出液は熱処理して、HeLa細胞の基本転写因子とRNAポリメラーゼIIは部分精製して、DNAトポイソメラーゼ活性を除いてから使用した。

ヌクレオソームは、線状DNAでも、環状DNAでも、同じように形成され得るがヌクレオソーム形成に対するDNAのトポロジーの影響を詳しく調べた報告はない。従って、私は最初に、線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAにおけるヌクレオソーム形成を比較した。超らせん化の程度はアデノウイルス後期主要プロモーターで最も転写活性が高くなる、平均超らせん密度-0.036に設定した(Mizutani *et al.*, 1991b)。100ngのDNAとヌクレオソームアセンブリーファクターをいろいろな量のヒストンと60分インキュベートした後、マイクロコッカルヌクレアーゼで処理し、電気泳動後、DNAをサザンブロットハイブリダイゼーションで検出した。実験結果を図4に示す。ヒストンの濃度を上げていくと、モノヌクレオソームの大きさのDNAフラグメントの量が増加した。しかし、ヒストンの濃度が高くなりすぎるとDNAフラグメントの量はかえって減少した。これはヒストンの量がアセンブリーファクターの結合能力を超え、過剰のヒストンがヌクレオソーム形成を阻害したためと考えられる。データは示していないが、ヌクレオソーム形成反応を12時間に延長すると、0.2から0.8 μ gのヒストンで同じ程度の量のDNAフラグメントがみられた。従って、60分インキュベーションで観察されたDNAフラグメントの量の差(図4)は、異なるヒストン濃度でのヌクレオソーム形成速度の差を反映していると考えられる。この実験条件下では、線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAの間でヌクレオソーム形成の速度に有意な差は検出できなかった(図4, A, B, C)。基本転写因子とRNAポリメラーゼIIをヌクレオソーム形成反応に加えた場合も、同じ結果が得られた。

100ngのDNAとヌクレオソームアセンブリーファクターをDNAトポイソメラーゼIの存在下にいろいろな量のヒストンと60分インキュベートした後、proteinase Kで除蛋白して得られる超らせんDNAを、電気泳動後、エチジウムブロマイド染色で検出した結果を図5に示す。ヒストンの量の増加に伴いDNA上に形成されたヌクレオソーム数が増加することがこの方法でも確認で

きた。この泳動条件ではヌクレオソームの数が多くなると泳動距離の差が小さくなり解像度が悪くなるが、クロロキンゲルを用いて泳動するとこの問題は回避できる。0.8 μ gのヒストンを用いた時に1分子のDNA上に形成されたヌクレオソームの数を閉環状DNAに導入されたDNAトポイソメラーゼIで弛緩できない超らせんの数から測定したところ、平均15個のヌクレオソームが再構成されていた。この数はDNA分子上の約80%の領域にヌクレオソームが形成されていることに相当する。

3.2.2 HSP70プロモーターを含む線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAにおけるヌクレオソーム再構成

ポリグルタミン酸とヒストンをインキュベートしてヒストンオクタマーを形成させ、ヌクレオソームの再構成に用いた。100ngのDNAと0.1 μ gから0.4 μ gのヒストンオクタマーを30°C、2時間インキュベートし、塩化カルシウムとマイクロコッカルヌクレアーゼを加えて25°C、15分インキュベートした後アガロースゲル(2%アガロース、TAE)電気泳動で解析し、³²PでラベルしたHSP-C2AT線状DNAをプローブとするサザンブロットハイブリダイゼーションで検出した。結果を図6-1に示す。HSP-C2AT DNAでも線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAにおいて同じ程度のヌクレオソーム形成がみられた。H1を含まないヒストンでヒストンオクタマーを形成させ、これを用いてヌクレオソームの形成を調べたところ、H1を含むヒストンと同じ結果が得られた(図6-2)。図6-1に比べ、図6-2でプロットのパターンが鮮明なのはH1ヒストンによるリンカー部分の保護がないためマイクロコッカルヌクレアーゼによる切断が効率よく進んだためと考えられる。

3.2.3 ヌクレオソームを形成した鋳型DNAのアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写

この系でクロマチンを形成した鋳型DNAの転写活性を調べるために、DNAをヒストンとヌクレオソーム形成因子と共に60分インキュベートしてヌクレオソームを形成させ、ヌクレオチド、基本転写因子、RNAポリメラーゼIIとDNAトポイソメラーゼIを加えて転写を開始させた。DNAトポイソメラーゼIは全ての鋳型DNAを弛緩しうる量を転写の開始と同時に加えた。鋳型DNAの転写活性を調べた結果を図7に示す。DNAにヌクレオソームを形成させた鋳型DNAではアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写は全く見られなかった(図7A)。この結果は、プロモーター配列上にヌクレオソームが形成されると転写の開始が阻害されることを示唆している。

対照的に、DNAを基本転写因子とRNAポリメラーゼIIと共に40分プレインキュベートして転写開始前複合体を形成させ、次いでヌクレオソームを形成させてから転写を行わせると、アデノウイルス後期主要プロモーターからの転写が明瞭に認められた(図7B)。この転写は、0.5 μ g/mlの α -アマニチンに感受性であり、RNAポリメラーゼIIによる転写であることが確認された。これらの結果は予め転写開始前複合体が形成されるとプロモーター配列上にヌクレオソームが形成されなくなり、他の領域にヌクレオソームが形成されても転写が起きることを示唆している。図7では超らせん化した閉環状DNAを用いた結果のみを示したが、同様の結果が、線状DNA、弛緩型環状DNAについても得られた。

3.2.4 ヌクレオソームを形成した鑄型DNAのHSP70プロモーターからの転写

ヌクレオソームを形成したHSP-C₂AT鑄型DNAの転写活性を調べるために、それぞれ100ngの線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAを、0.1-0.4 μ gのH1ヒストンを含むヒストンオクタマーと共に1mM MgCl₂、75mM KClの条件下で120分インキュベートしてヌクレオソームを形成させ、MgCl₂、ヌクレオチド、基本転写因子、RNAポリメラーゼIIとDNAトポイソメラーゼIを加えて7.5mM MgCl₂、66mM KClの条件下で転写を開始させた。DNAトポイソメラーゼIは全ての鑄型DNAを弛緩しうる量を転写の開始と同時に加えた。ヌクレオソームを形成した鑄型DNAの転写活性を調べたところ、ヒストンオクタマー0.2 μ gでは抑え残りと思われる転写がわずかに認められたが、ヒストンオクタマー0.3 μ g以上では鑄型DNAのトポロジーに関わらず、HSPプロモーターからの転写は全く見られなかった(図8A)。この結果はHSPプロモーターにおいてもプロモーター配列上にヌクレオソームが形成されると転写の開始が阻害されることを示唆している。H1を含まないヒストンでヒストンオクタマーを形成させ、これを用いてヌクレオソームを形成させ、転写を行わせると、H1を含むヒストンの場合と同じく転写開始が阻害された(図9A)。これは、ヌクレオソーム形成による転写阻害にはコアヒストンだけで充分であることを示唆している。

対照的に、DNAを基本転写因子とRNAポリメラーゼIIと共に30°Cで20分プレインキュベートして転写開始前複合体を形成させ、次いでヌクレオソームを形成させてから転写を行わせると、線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAの全てのDNAにおいてHSP70プロモーターからの転写が明瞭に認められた(図8B)。H1を含まないヒストンでも同じ結果が得られた(図9B)。0.5 μ g/mlの α -アマニチンを加えるとこの転写はみられなくなり、RNAポリメラーゼIIによる転写であることが確認された。これらの結果は、HSP70プロモーター

でも予め転写開始前複合体が形成されるとプロモーター配列上にヌクレオソームが形成されなくなり、他の領域にヌクレオソームが形成されても転写が起きることを示唆している。

3.2.5 DNAのトポロジーが活性クロマチン形成に及ぼす効果 (アデノウイルス後期主要プロモーター)

アデノウイルス後期主要プロモーターについて、DNAのトポロジーが転写活性のあるクロマチン形成に果たす役割を調べる目的で、100ngのDNAを0-1.2 μ gのヒストン、ヌクレオソームアセンブリーファクター、基本転写因子、RNAポリメラーゼIIと共に25°C、60分インキュベートして転写開始前複合体の形成とヌクレオソーム形成を競合させ、その後ヌクレオチドとDNAトポイソメラーゼIを加えて転写を開始させた。その結果、出発材料として超らせん化したDNAを用いた場合はアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写産物が明瞭に認められたが(図10C)、線状DNAと弛緩型環状DNAを用いた場合は全く転写産物は検出できなかった(図10A, 10B)。これらの結果は、転写開始前複合体の形成とヌクレオソーム形成を競合させた時、線状DNAと弛緩型環状DNAではヌクレオソーム形成により転写は不活性化されるが、超らせんDNAでは転写開始前複合体の形成がヌクレオソーム形成に先だって速やかに起こり、ヌクレオソーム形成による転写の不活性化に対して耐性になることを示している。

3.2.6 DNAのトポロジーが活性クロマチン形成に及ぼす効果 (HSP70プロモーター)

HSP70プロモーターについて、DNAのトポロジーが転写活性のあるクロマチン形成に果たす役割を調べる目的で、100ngのpHSP(C2AT) DNAを0-0.4 μ gのヒストンオクタマー、基本転写因子、RNAポリメラーゼIIと共に120分インキュベートして転写開始前複合体の形成とヌクレオソーム形成を競合させ、その後ヌクレオチドとDNAトポイソメラーゼIを加えて転写を開始させた。その結果、HSP-C2AT鑄型DNAでは線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAの全てのDNAにおいてHSP70プロモーターからの転写が明瞭に認められた(図11)。この結果は、転写開始前複合体の形成とヌクレオソーム形成を競合させた時、HSP-C2AT鑄型DNAでは線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAの全てのDNAで転写開始前複合体の形成がヌクレオソーム形成に先だって速やかに起こり、ヌクレオソーム形成による転写の不活性化に対して耐性になることを示している。

3.2.7 ヌクレオソーム形成した鑄型DNAにおいても転写のコミットメントにはTFIIDの結合が重要な役割を果たす

アデノウイルス後期主要プロモーターを含む超らせん化したDNAで転写開始前複合体の形成とヌクレオソーム形成を競合させた時、転写開始前複合体の形成がヌクレオソーム形成に先だって速やかに起こって転写が進行し、ヌクレオソーム形成による転写の不活性化に対して耐性になることが分かったので、このために必要な基本転写因子を特定するために次のような実験を行った。まず、超らせん化したDNAをヒストン、ヌクレオソームアセンブリーファクター、特定の基本転写因子の1画分、と共に25°C、60分インキュベートし、その後、残りの転写因子の画分とヌクレオチドとDNAトポイソメラーゼIを加えて転写を開始させた。結果を図12に示す。超らせん化したDNAにおけるアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写は、TFIIDをヌクレオソーム形成時に加えた時にのみ検出でき、TFIIB、TFIIE、RNAポリメラーゼIIをヌクレオソーム形成時に加えた時には転写は検出できなかった。この結果は、転写開始前複合体形成の各段階のうち、TATA boxへのTFIIDの結合がヌクレオソーム形成に先だって起こることが、超らせん化したDNAで転写開始前複合体の形成がヌクレオソーム形成に先だって起こるための本質的段階であることを示している。

3.3 考察

アデノウイルス後期主要プロモーターでは鑄型DNA上にヌクレオソームを先に形成させるとDNAのトポロジーに関わらず転写は阻害されるが、鑄型DNA上に転写開始前複合体を先に形成させるとその後ヌクレオソームを形成させても転写は進行する。これは、転写開始前複合体の形成によりプロモーター部分が開かれた形になり、おそらくヌクレオソームはプロモーター部分を避けて形成され、転写可能な状態になることを示唆している。ただし、ヌクレオソームがプロモーター部分を避けて形成されているか否かという点に関しては推測が入る。TATA box上にTFIIDが結合してコミットメントが成立したあとならば、ヌクレオソームがプロモーター部分に形成されても転写できる、という可能性を現在のところ否定しきれていない。転写開始前複合体の形成後ヌクレオソームを形成させ、プロモーター部分がヌクレオソームの外に出ているかどうかを制限酵素による切断により調べようとしたが有意に差のある結果を得ることができなかった。これは、反応系に加えたDNAのうち実際に転写の鑄型として働くのは数%に過ぎないために明確な結果が得られなかったものと考えられる。RNAポリメラーゼIIの分子量が大きいことを考慮すると転写の進行のためにはヌクレオソームがプロモーター部分を避けて形成されているとする方がより現実的に思われる。

アデノウイルス後期主要プロモーターでは適度に超らせん化した構造をとらせるとTATA box上へのTFIIDの結合が促進され、競合実験の結果、この条件下ではプロモーターのTATA box上へのTFIIDの結合がヌクレオソーム形成に先行することが見いだされた。線状DNAと弛緩型環状DNAではヌクレオソーム形成が先行した。ショウジョウバエHSP70プロモーターでは、競合実験の条件下では線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAの全てのDNAにおいてプロモーターのTATA box上へのTFIIDの結合がヌクレオソーム形成に先行した。ヌクレオソーム構造をとらない裸のDNAでは、アデノウイルス後期主要プロモーターでは適度な超らせん化によりTATA box上へのTFIIDの結合が促進され転写が活性化されるが、HSP70プロモーターでは転写はDNAのトポロジーに関わらず高レベルに保たれており超らせん化の影響を受けないことが分っている(Tabuchi and Hirose, 1988)(Mizutani *et al.*, 1991b)。今回得られた結果は、裸のDNAで得られた結果と傾向として極めてよく一致した。のみならず、アデノウイルス後期主要プロモーターを用いた系で裸のDNAでは超らせんDNAと弛緩型DNAで数倍から20倍の転写活性の差しか検出できなかった(Tabuchi and Hirose, 1988)(Mizutani *et al.*, 1991b)のに対し、このヌクレオソーム再構成系では100倍以上の転写活性の差が見られたことは、この系がより生体内での機構を反映していることを示唆している。

これらの結果から、活性型、不活性型クロマチンの構築について以下のモデルを考えた(図13)。真核生物のクロマチンDNAは互いに独立なトポロジーをとりうる多数のループ状の構造を形成している。こうしたクロマチンのループ構造は、ゲノム内の異なる領域を種々の程度に超らせん化することを可能にしており、それによって転写が調節を受けていると考えられる。大部分のクロマチンは弛緩した状態にあるが、クロマチンの限定された一部の領域にはひずみが束縛されていない超らせん構造が存在する。弛緩したクロマチンループではDNA複製やクロマチン構造の不安定化により一時的にプロモーター領域からヌクレオソームが消失しても、転写開始前複合体の形成が遅いため、ヌクレオソームの形成が先に起こり、転写が不活性化されてしまう。超らせん化したクロマチンループではプロモーター領域からヌクレオソームが消失すると、転写開始前複合体の形成がヌクレオソーム形成に先だって速やかに起こり、次いで他の領域にヌクレオソームが形成され、活性型のクロマチンが構築される。そして、どの程度のクロマチンループの超らせん化が最大の転写活性をもたらすかという点については各々のプロモーターについて固有の値があるらしい。大部分のプロモーターは超らせん化による転写調節を受けており、ラジオのチューニングのように波長が合ったところで最大の転写活性を示すような超らせん化による調節機構が存在すると考えられる。一方、HSP70プロモーターでは熱ショックの後、数分以内に転写の誘導が観察されている。転写開始前複合体形成を介した調節にはかなりの時間が必要で、このように速やかな転写活性化には向いていない。実際、ショウジョウバエのHSP70プロモーターには熱ショック前に既にTFIIDやRNAポリメラーゼIIが結合し、熱ショックにより熱ショックファクターが結合すれば直ちにRNAポリメラーゼIIが走れる状態にあることが知られている(Rougvie and Lis, 1988) (Sorger, 1991)。従って、HSP70プロモーターでは例外的に転写開始前複合体が形成されやすく、このステップが転写の律速段階になっていないと考えられる。今回、HSP70プロモーターで、転写開始前複合体形成とヌクレオソーム形成を競合させた時、DNAのトポロジーに関わらず活性クロマチンが形成されたことは、上記の生体内での状態を良く反映していると思われる。

第4章 アセチル化ヒストンを用いたヌクレオソーム形成と転写への影響

4.1 序論

ヒストンの可逆的なアセチル化がコアヒストンのN末ドメインの特定のリジン残基で起こっていることが報告されている(Allfrey, 1964)。ヒストン分子上のアセチル基は速やかに代謝回転しており、アセチル化のレベルはアセチル化と脱アセチル化の活性の平衡状態により制御されている(Sanders, 1973)(Jackson, 1975)(Inoue, 1970)(Vidali, 1972)。ヒストンのアセチル化がDNAの複製や転写に関わっているらしいことがいくつかの間接的な知見から示唆されている(Chahal, 1980)(Waterborg, 1984)(Allegra, 1987)(Reeves, 1984)。一般的には、ヒストンが高度にアセチル化されているとクロマチン構造の緩みを引き起こし、DNA結合因子がDNAに近づきやすくなる(Norton, 1989)。in vivoで盛んに転写を行っているDNA領域をとって来るとヒストンがアセチル化されているが転写が不活発なDNA領域のヒストンはアセチル化されていない(Allegra, 1987)(Chen, 1987)(Hebbes, 1988)。これは、転写に関して活性化されているクロマチン領域のヒストンが高度にアセチル化されていることを示している。しかしながら、ヒストンのアセチル化がクロマチンの機能をどのようにして調節しているかはわかっていない。ヒストンのアセチル化による転写調節の機構を知るため、細胞培養時にヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である酪酸ナトリウムを共存させ、得られたアセチル化ヒストンを用いてヌクレオソームを再構成し、さらに転写を行わせ、ヌクレオソームによる転写阻害に対するアセチル化ヒストンの影響を調べた。

4.2 材料と方法

4.2.1 DNA、ヌクレオソームアセンブリーファクター

DNAはアデノウイルス後期主要プロモーターを含む閉環環状DNAを用いた。実験には転写活性が最大になる適度に超らせん化したDNA（超らせん化密度-0.036）と線状DNAを使用した。ヌクレオソームアセンブリーファクターとしてポリグルタミン酸を使用した。（各々の調製法の詳細は第3章3.2参照のこと）

4.2.2 アセチル化ヒストン及びヒストン

アセチル化ヒストンはヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である酪酸ナトリウム存在下に培養したHeLa細胞の核から調製した(Riggs, 1977)(Yau, 1982)。HeLa細胞S3株をスピナーフラスコでMEM培地（ニッスイ4型、5%ウマ血清含有）を用いて培養し、細胞を回収する24時間前に酪酸ナトリウムを7mMの濃度になるように培地に加えて培養した。最終細胞密度は 4×10^5 /ml以下に抑えた。培養1リッター分の細胞を集め、核をバーティスホモジェナイザーでホモジェナイズしてシアードクロマチンを調製し、このシアードクロマチンをハイドロキシアパタイトカラムにかけてDNAとカラムとの相互作用によりカラムにつけ、0.4M、0.63M、2.0MのNaClを含む0.1Mリン酸カリウムバッファー(pH6.8)で順に溶出した。H1ヒストンのみが0.63M NaClで、その他のヒストンが2.0M NaClで溶出された。精製はすべて7mM酪酸ナトリウム存在下に行った。得られたアセチル化ヒストンの画分は7mM酪酸ナトリウムを含むHEKバッファーに透析して実験に使用した。酢酸-Urea-Tritonゲルを用いてこの画分を電気泳動し、H4のアセチル化の程度を確認した。対照に用いるアセチル化していないヒストンは酪酸ナトリウムを加えずに培養したHeLa細胞の核から酪酸ナトリウムを含まないバッファーを用いて同様に調製した。

4.2.3 酢酸-Urea-Tritonゲル電気泳動

ヒストンのアセチル化の程度を解析するため、酢酸-Urea-Tritonを含むポリアクリルアミドゲル(1M酢酸、8M Urea、0.5% Triton X-100、45mM NH₄OH、16%アクリルアミド)を用いてこの画分を電気泳動した(Yoshida, 1990)。10cmの高さの分離ゲルの上に3cmの高さの濃縮ゲル(1M酢酸、6.3M Urea、4.4%アクリルアミド)を重ねて用いた。ヒストンを等量のサンプルバッファー(7.4M Urea、1.4M NH₄OH、10mM DTT)と混合して5分おき、1/8量の1%

pyronin C/酢酸を加えて濃縮ゲルにのせ、0.2M グリシン/1M 酢酸、で泳動した。ヒストンはクマシーブリリアントブルー染色により検出した。

4.2.4 その他の試薬

酪酸ナトリウムは和光純薬から購入した。

4.2.5 先にヌクレオソームを形成させた鋳型DNAでの転写

ポリグルタミン酸とアセチル化ヒストンを7mM 酪酸ナトリウムを含むHEKバッファー中で37°C、16時間インキュベートしてヒストンオクタマーを形成させ、分注して液体窒素で急速凍結したものを-80°Cで保存し、これをヌクレオソームの再構成に用いた。100ngのDNAと0から400ngのアセチル化ヒストンオクタマーを7.5mM HEPES-NaOH (pH7.9)、7mM 酪酸ナトリウム、75mM KCl、2% PVA、1mM MgCl₂を含む4μlの反応液中で30°C、2時間インキュベートし、ヌクレオソームを形成させた。

ヌクレオソームを形成させた鋳型DNAで転写を行わせるために、TFIIB 1μl、TFIID 1.5μl、TFIIE 1.5μl、RNAポリメラーゼII 0.5μl、を含む7μlの溶液を加えて63.6mM KCl、1mM MgCl₂、2% PVA、となるようにした。この混合液(11μl)を30°Cで20分インキュベートして転写開始前複合体を形成させた。更に、HEPES-NaOH (pH7.9)、MgCl₂、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、[α-³²P]CTP、RNaseT1、DNAトポイソメラーゼIを含む1.6μlの溶液を鋳型DNAを含む反応液に加えて、30°Cで60分インキュベートして、転写を開始させた。反応液の最終的な組成は8.8mM HEPES-NaOH pH7.9、2.2mM 酪酸ナトリウム、56mM KCl、1mM MgCl₂、2% PVA、0.6mM ATP、0.6mM UTP、0.08mM 3'-O-methyl-GTP、62.5μM [α-³²P]CTP、5units RNaseT1、2 units DNAトポイソメラーゼIであった。RNAを7M Ureaを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、シグナルをイメージアナライザーで検出した。

4.2.6 転写開始前複合体形成の後でヌクレオソームを形成させた鋳型DNAでの転写

ヌクレオソームの形成に先立ち100ng DNAを5.3mM HEPES-NaOH pH7.9、1mM MgCl₂、2% PVA、60mM KCl、10.7% グリセロール、基本転写因子、RNAポリメラーゼIIを含む7.5μlの溶液を30°Cで20分インキュベートしてDNA上に転写開始前複合体を形成させた。これに0から400ngのアセチル化ヒストンオクタマーとMgCl₂、PVA、KClを含む4μlの溶液を加え、1mM MgCl₂、

2% PVA、75mM KClの条件にして30°C、2時間インキュベートし、ヌクレオソームを形成させた。更に、Hepes-NaOH pH7.9、MgCl₂、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、[α -³²P] CTP、RNaseT1、DNAトポイソメラーゼIを含む1.6 μ lの溶液を鋳型DNAを含む反応液に加えて、30°Cで60分インキュベートして、転写を開始させた。反応液の最終的な組成は8.8mM Hepes-NaOH pH7.9、2.2mM 酪酸ナトリウム、56mM KCl、7.5mM MgCl₂、2% PVA、0.6mM ATP、0.6mM UTP、0.08mM 3'-O-methyl-GTP、62.5 μ M [α -³²P] CTP、5units RNaseT1、2units DNAトポイソメラーゼIであった。生成するRNAを7M Ureaを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、シグナルをイメージアナライザーで検出した。

4.3 結果

4.3.1 アセチル化ヒストンの調製

ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である酪酸ナトリウムで処理したHeLa細胞の核からシアードクロマチンを調製し、ハイドロキシアパタイトカラムにかけ、KClの濃度を変えてヒストンを溶出しH1を含まないアセチル化ヒストンの画分を得た。酢酸-Urea-Tritonゲル電気泳動にかけてヒストンH4がアセチル化されていることを確認した(図14)。

4.3.2 アセチル化ヒストンを用いて形成したヌクレオソームの転写への影響

得られたアセチル化ヒストンの画分を用いてアデノウイルス後期主要プロモーターDNA上にヌクレオソームを形成させ、これを鋳型に用いて転写活性を調べた。ヌクレオソームを形成した鋳型DNAの転写活性を調べるために、それぞれ100ngの線状、弛緩型環状、超らせん型環状DNAを0-0.4 μ gのアセチル化ヒストンオクタマーと共に120分インキュベートしてヌクレオソームを形成させ、ヌクレオチド、基本転写因子、RNAポリメラーゼII、DNAトポイソメラーゼIを加えて転写を開始させた。ヌクレオソームを形成した鋳型DNAの転写活性を調べたところ、鋳型DNAのトポロジーに関わらず、アデノウイルス後期主要プロモーターからの転写は全く見られなかった(図15A)。ヒストンオクタマー0.2 μ gでは抑え残りと思われる転写がわずかに認められた。この結果はH1を含まないアセチル化ヒストンを用いてもプロモーター配列上にヌクレオソームが形成されると転写の開始が阻害されることを示唆している。対照的に、DNAを基本転写因子とRNAポリメラーゼIIと共に30°Cで20分プレインキュベートして転写開始前複合体を形成させ、次いでH1を含まないアセチル化ヒストンを用いてヌクレオソームを形成させ、次いで転写を開始させるとアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写が明瞭に認められた(図15B)。これらの結果はアセチル化していないヒストンを用いて得られた結果(3.2.3、図7A,7B)と本質的に同じであり、ヒストンのアセチル化により転写が常に活性化されるわけではないことを示している。

4.4 考察

アセチル化ヒストンから形成したヌクレオソームはアセチル化していないヒストンから形成したヌクレオソームと同じく転写を阻害した。また、先に転写開始前複合体を形成させておくとそのあとヌクレオソームを形成させても転写は進行した。in vivoでヒストンのアセチル化と転写の活性化との間に相関がみられているので、in vitroでヒストンのアセチル化が転写を促進する方向に作用することを期待したがそのような結果にはならなかった。その原因として、以下のことが考えられる。(1)ヒストンのアセチル化はクロマチンDNAの転写活性化に必要だが、それだけでは充分でない。(2)ヒストンのアセチル化は転写が活性化された結果起きる現象で、活性化の原因ではない。(3)プロモーターによりアセチル化に対する反応性が異なり、アデノウイルス後期主要プロモーターではヒストンのアセチル化により転写が活性化しない。最後の可能性について検討する目的で、現在、アデノウイルス後期主要プロモーターに代えてc-fosのプロモーターを用いて実験を進めている。c-fosのプロモーターはin vivoでヒストンのアセチル化と転写活性化との間に相関が認められている(Chen, 1987)のでin vitro系でもそれを反映した結果が期待される。in vitro系でヒストンのアセチル化と転写活性化との関連を直接示すことができればその意義は大きいと思われる。

第5章 総合考察

多細胞生物ではある特定の時期に特定の細胞で発現されている遺伝子は全遺伝子のごく一部にしか過ぎない。必要のない大部分の遺伝子の発現を抑える一般的な様式としてクロマチン構造が発達してきたものと推察される。一方、生物は内外の要因によって、これまで抑えられていた遺伝子を発現させることができる。従って、クロマチン構造による抑制にうち勝って遺伝子を活性化する機構が存在するはずである。この機構に関して、現在、ヌクレオソームの再構成系と *in vitro* の転写系を組み合わせることにより、先駆的な研究がなされつつある。こうした研究の成果から、転写活性化因子のうち少なくとも一部はヌクレオソーム形成と競合させた場合、ヌクレオソーム形成に先立ってターゲット部位に結合し、プロモーターを転写可能な状態に保つことが分かってきた。本研究で、私はアデノウイルス後期主要プロモーターを用いてDNAの超らせん構造がTFIIDのTATA boxへの結合を促進することにより、同様の機能を果たすことを示した。

転写活性化因子や超らせん構造を介した活性化は、DNAの複製やその他の原因で一時的にヌクレオソーム構造が消失した場合に働くと考えられるが、実際には、複製などを経なくても、これまで抑えられてきた遺伝子が発現する場合がある。このタイプの活性化の機構の一つとしてヒストンのアセチル化によるクロマチン構造の不安定化が考えられるが、本研究でアデノウイルス後期主要プロモーターを用いて調べた限り、アセチル化したヒストンから形成したヌクレオソームも十分に転写を抑制する能力をもっていた。この点に関しては更に研究を続けていくつもりである。この分野の研究は数年前に始まったばかりで、今後の研究に負うところが多いが、これまでに得られた限られた研究結果から、クロマチン構造による抑制にうち勝って遺伝子を活性化する機構は単一ではなく、遺伝子によって異なった様式がとられていると推定される。

第6章 謝辞

本研究の遂行にあたり、指導をいただきました広瀬 進教授、有益な助言をたびたびいただきました上田 均博士、林 茂生博士、および良好な研究環境を共に分かち合ってきた合成研究室関係者の皆様に心より感謝致します。

第7章 引用文献

Allegra, P., Sterner, R., Clayton, D.F., Allfrey, Y.G. (1987) Affinity Chromatographic Purification of Nucleosomes Containing Transcriptionally Active DNA Sequences. *J. Mol. Biol.* 196: 379-388

Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and Methylation of Histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51: 786-794

Brown, D. D. (1984) The role of stable complexes that repress and activate eucaryotic genes. *Cell* 37: 359-365

Chahal, S. S., Matthews, H.R., Bradbury, E.M. (1980) Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function. *Nature* 287: 76-79

Chen, T. A., Allfrey, V.G. (1987) Rapid and reversible changes in nucleosome structure accompany the activation, repression, and superinduction of murine fibroblast protooncogenes *c-fos* and *c-myc*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5252-5256

Han, M. and M. Grunstein (1988) Nucleosome loss activates Yeast downstream promoters *in vivo*. *Cell* 55: 1137-1145

Handa, H., H. Watanabe, Y. Suzuki, and S. Hirose (1989) Effect of DNA supercoiling on *in vitro* transcription from the adenovirus early region 4. *FEBS Lett.* 249: 17-20

Hebbes, T. R., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* 7: 1395-1402

Hirose, S. and T. Ohta (1990) DNA supercoiling and eukaryotic transcription - cause and effect. *Cell Struct. Funct.* 15: 133-135

Hirose, S. and Y. Suzuki (1988) *In vitro* transcription of eukaryotic genes is affected differently by the degree of DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 718-722

Hirose, S., M. Tsuda, and Y. Suzuki (1985) Enhanced transcription of fibroin gene *in vitro* on covalently closed circular templates. *J. Biol. Chem.* 260: 10557-10562

Inoue, A., Fujimoto, D. (1970) Histone Deacetylase from Calf Thymus. *Biochim. Biophys. Acta.* 220: 307-316

Jackson, V., Shires, A., Chalkley, R., Granner, D.K. (1975) Studies on Highly Metabolically Active Acetylation and Phosphorylation of Histones. *J. Biol. Chem.* 250: 4856-4863

Kim, U. J., M. Han, P. Kayne, and M. Grunstein (1988) Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO journal* 7: 2211-2219

- Knezetic, J. A., G. A. Jacob, and D. S. Luse (1988) Assembly of RNA polymerase II preinitiation complexes before assembly of nucleosomes allows efficient initiation of transcription on nucleosomal templates. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3114-3121
- Knezetic, J. A. and D. S. Luse (1986) The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II *in vitro*. *Cell* 45: 95-104
- Laskey, R. A., B. M. Honda, A. D. Mills, and J. T. Finch (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275: 416-420
- Lorch, Y., J. W. Lapointe, and R. D. Kornberg (1987) Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49: 203-210
- Matsui, T. (1987) Transcription of adenovirus 2 major late and peptide IX genes under conditions of *in vitro* nucleosome assembly. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1401-1408
- Mizutani, M., T. Ohta, H. Watanabe, H. Handa, and S. Hirose (1991a) Negative supercoiling of DNA facilitates an interaction between transcription factor IID and the fibroin gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 718-722
- Mizutani, M., K. Ura, and S. Hirose (1991b) DNA superhelicity affects the formation of transcription preinitiation complex on eukaryotic genes differently. *Nucl. Acids Res.* 19: 2907-2911
- Norton, V. G., Imai, B.S., Yau, P., Bradbury, E.M. (1989) Histone Acetylation Reduces Nucleosome Core Particle Linking Number Change. *Cell* 57: 449-457
- Ohba, R., H. Tabuchi, and S. Hirose (1992) DNA supercoiling facilitates the assembly of transcriptionally active chromatin on the adenovirus major late promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 963-969
- Reeves, R. (1984) Transcriptionally Active Chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 782: 343-394
- Riggs, M. G., Whittaker, R.G., Newmann, J.R., Ingram, V. M. (1977) n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 268: 462-464
- Rougvie, A. E. and J. T. Lis (1988) The RNA Polymerase II Molecule at the 5' End of the Uninduced hsp70 Gene of *D. melanogaster* Is Transcriptionally Engaged. *Cell* 54: 795-804
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Press) 2nd ed.
- Sanders, L. A., Schechter, N.M., McCarty, K.S. (1973) A Comparative Study of Histone Acetylation, Histone Deacetylation, and Ribonucleic Acid Synthesis in Avian Reticulocytes and Erythrocytes. *Biochemistry* 12: 783-791

- Sawadogo, M. and R. G. Roeder (1985) Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative *in vitro* assay. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 4394-4398
- Simon, R. H. and G. Felsenfeld (1979) A new procedure for purifying histone pairs H2A+H2B and H3+H4 from chromatin using hydroxylapatite. Nucl. Acids Res. 6: 689-696
- Sorger, P. K. (1991) Heat Shock Factor and the Heat Shock Response. Cell 65: 363-366
- Stein, A., Whitlock, Jr., J.P., Bina M (1979) Acidic polypeptides can assemble both histones and chromatin *in vitro* at physiological ionic strength. Proc. Natul. Acad. Sci. USA 76: 5000-5004
- Tabuchi, H. and S. Hirose (1988) DNA supercoiling facilitates formation of the transcription initiation complex on the fibroin gene promoter. J. Biol. Chem. 263: 15282-15287
- Tokunaga, K., S. Hirose, and Y. Suzuki (1984) In monkey COS cells only the TATA box and the cap site region are required for faithful and efficient initiation of the fibroin gene transcription. Nucl. Acids Res. 12: 1543-1558
- Tujimoto, Y. and Y. Suzuki (1984) Natural fibroin genes purified without using cloning procedures from fibroin-producing and -nonproducing tissues reveal indistinguishable structure and function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1644-1648
- Vidali, G., Boffa, L.C., Allfrey, V.G. (1972) Properties of an Acidic Histone-Binding Protein Fraction from Cell Nuclei. J. Biol. Chem. 247: 7365-7373
- Waterborg, J. H., Matthews, H.R. (1984) Patterns of Histone acetylation in Physarum polycephalum. Eur. J. Biochem. 142: 329-335
- Wolffe, A. P. and D. D. Brown (1988) Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. Science 241: 1626-1632
- Workman, J. L. and R. G. Roeder (1987) Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. Cell 51: 613-622
- Workman, J. L., R. G. Roeder, and R. E. Kingston (1990) An upstream transcription factor, USF(MLTF), facilitates the formation of preinitiation complexes during *in vitro* chromatin assembly. EMBO J. 9: 1299-1308
- Workman, J. L., I. C. A. Taylor, and R. E. Kingston (1991) Activation domains of stably bound GAL4 derivatives alleviate repression of promoters by nucleosomes. Cell 64: 533-544

Yau, P., Thorne,A.W., Imai,B.S.,Matthews,H.R., Bradbury,E.M. (1982) Thermal Denaturation Studies of Acetylated Nucleosomes and Oligonucleosomes. Eur. J. Biochem. 129: 281-288

Yoshida, M., Kijima,M., Akita,M.,Beppu,T. (1990) Potent and Specific Inhibition of Mammalian Histone Deacetylase Both *in Vivo* and *in Vitro* by Trichostatin A. J. Biol. Chem. 265: 17174-17179

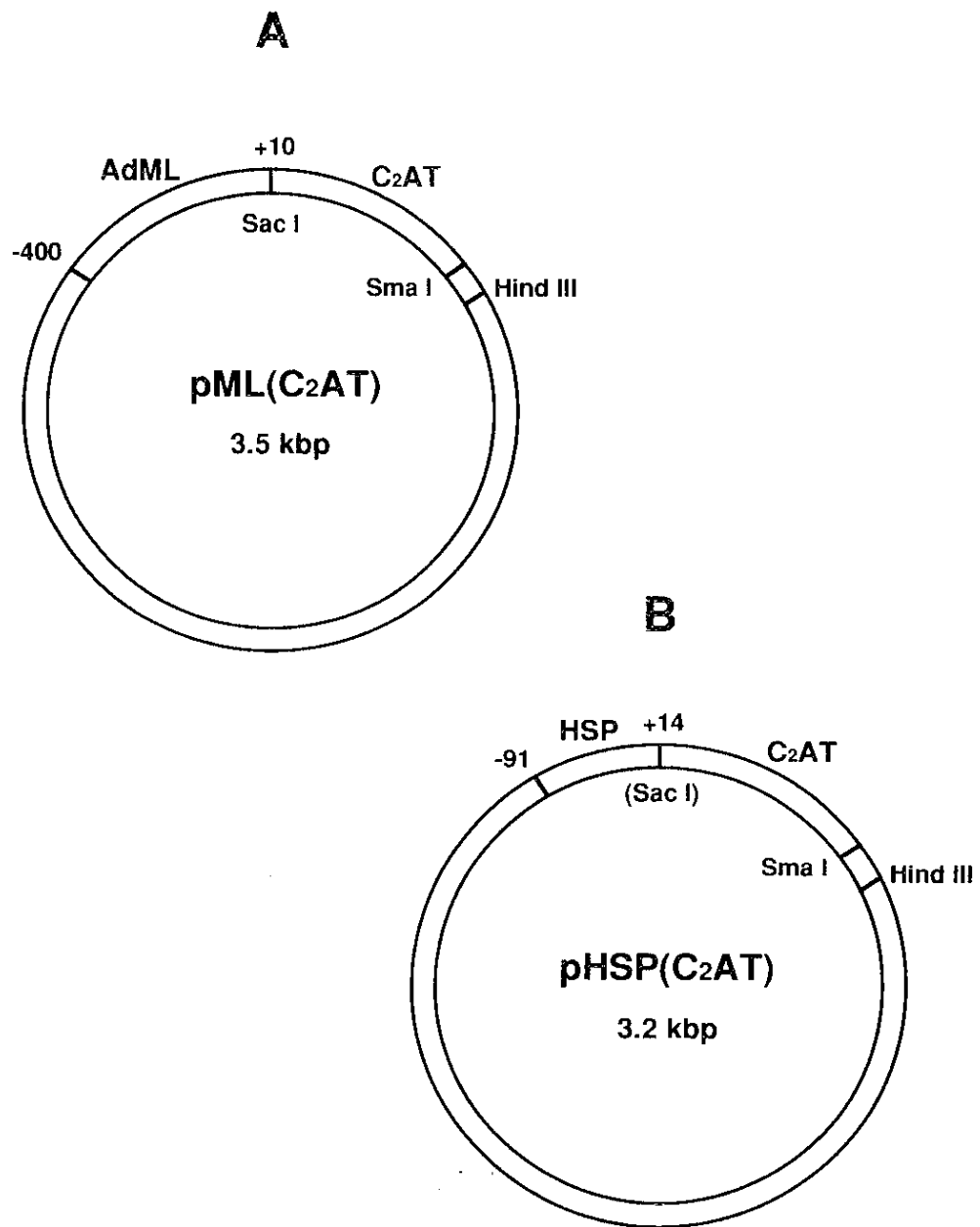


図1、実験に使用したプラスミドの構造。 A : pML(C₂AT)、B : pHSP(C₂AT)。
 pUC13のSacI-SmaIサイトに挿入したguanosin-free cassette (385bp)の上流に、アデノウイルス後期主要プロモーターの-400から+10、及びHSP70プロモーターの-91から+14までの領域を各々結合して構成した。プラスミドDNAの全長は各々3.5kbpと3.2kbpである。

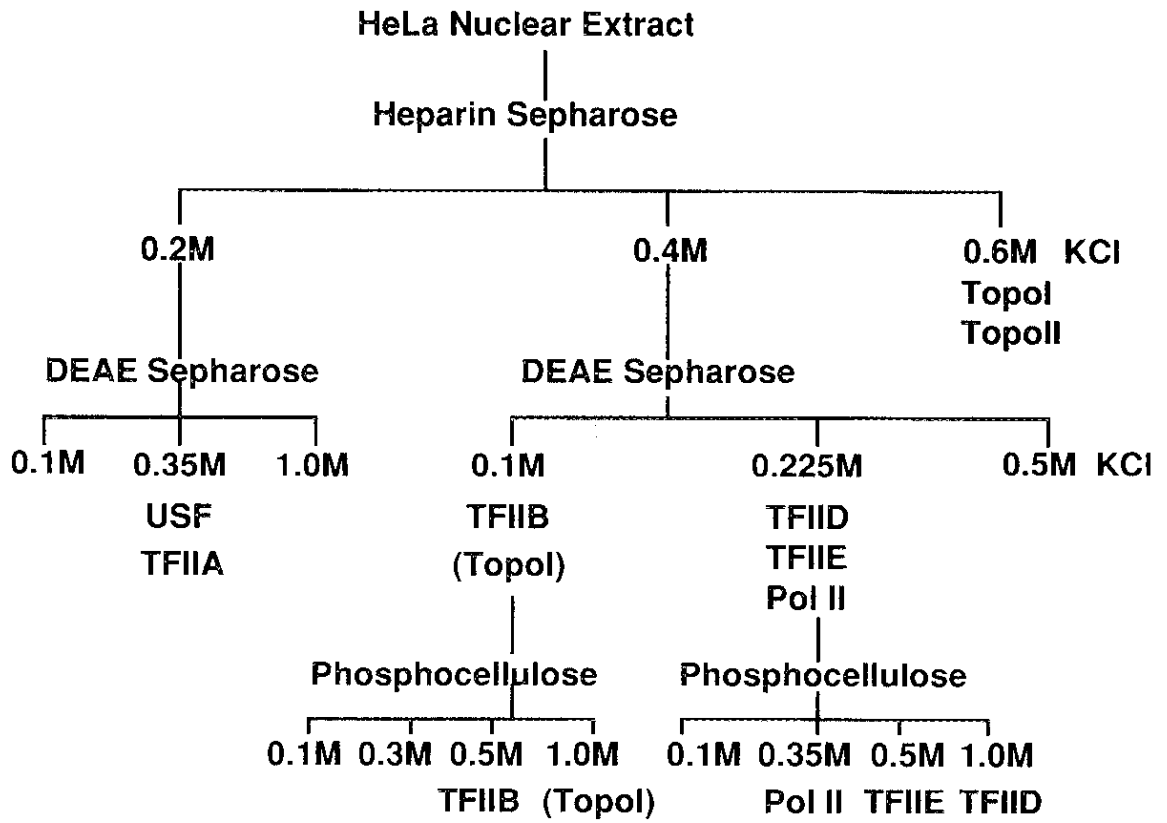


図2、基本転写因子画分の精製スキーム。 HeLa細胞核抽出液をヘパリンセファロース、DEAEセファロース、ホスホセルロースカラムに順次かけ、KClの濃度を変えて溶出した。実験に関わる基本転写因子、RNAポリメラーゼII及びDNAトポイソメラーゼの挙動を併記した。

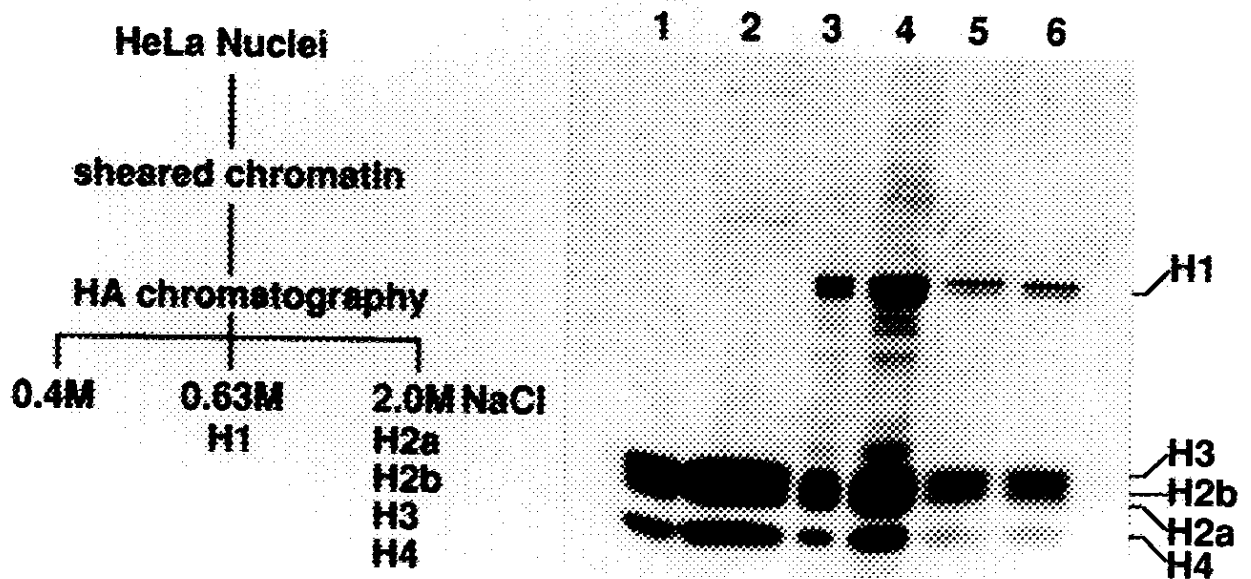


図3、用いたヒストンのSDS-PAGE。 レーン1: ヒストン1.2 μ g (-H1、ハイドロキシアパタイトカラム法)。 レーン2: ヒストン4.8 μ g (-H1、ハイドロキシアパタイトカラム法)。 レーン3: ヒストン1.2 μ g (+H1、硫酸抽出法)。 レーン4: ヒストン4.8 μ g (+H1、硫酸抽出法)。 レーン5: ヒストン1.2 μ g (+H1、ハイドロキシアパタイトカラム法)。 レーン6: ヒストン1.5 μ g (+H1、ハイドロキシアパタイトカラム法)。 12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて常法により泳動し、クマシーブリリアントブルーで染色して検出した。

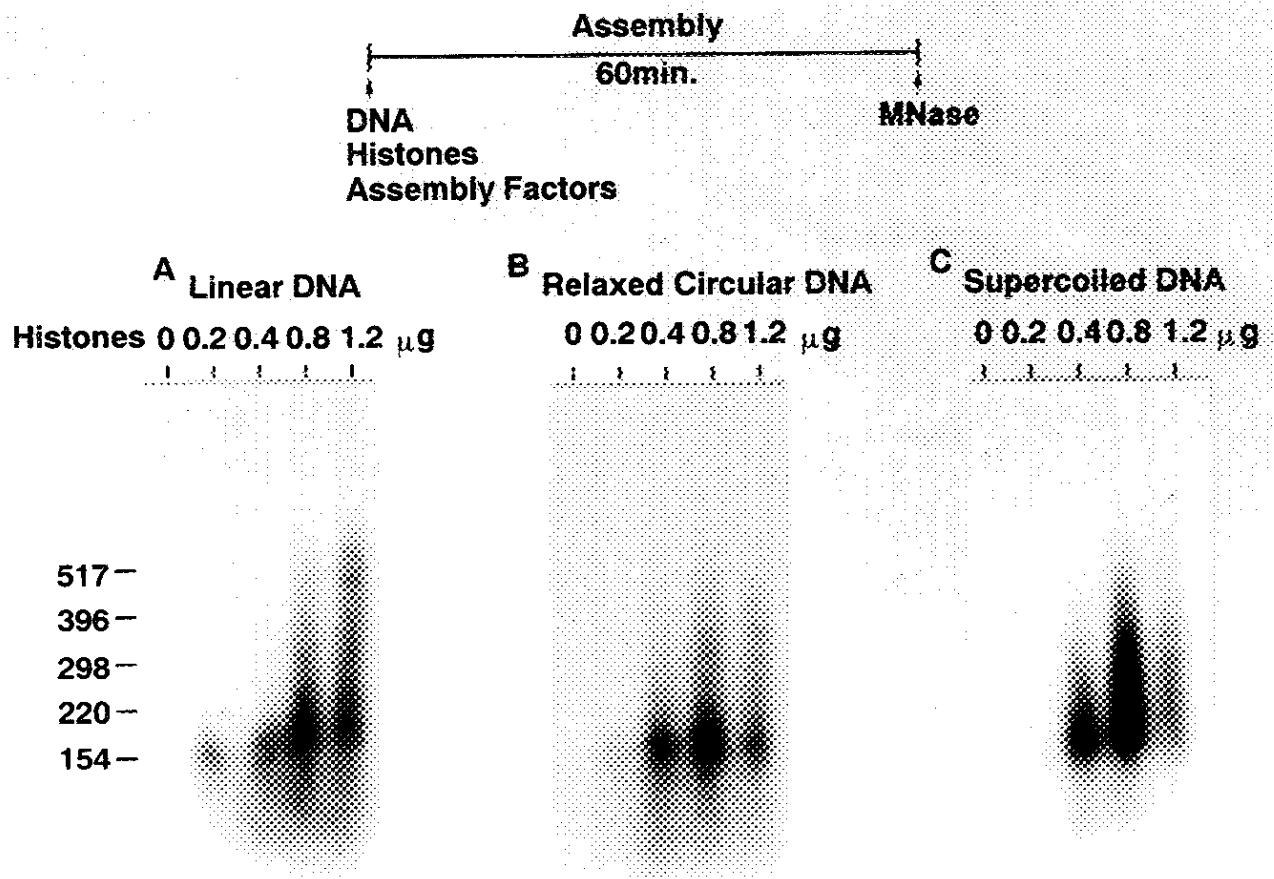


図4、pML(C2AT)プラスミドにおけるヌクレオソーム形成。 DNA、ヒストン (+H1、硫酸抽出法、0-1.2 μg)、ヌクレオソームアセンブリーファクターを25°C、60分インキュベートし、塩化カルシウムとマイクロコッカールヌクレアーゼを加えて25°C、15分反応させた。得られたDNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動にかけ、ランダムプライマー法により ^{32}P でラベルした線状pML(C2AT)プラスミドDNAをプローブとしたサザンプロットハイブリダイゼーションで検出した。線状DNA、弛緩型閉環状DNA、超らせん化した閉環状DNA(超らせん化密度 -0.036)、を用いた結果を各々A、B、Cに示した。

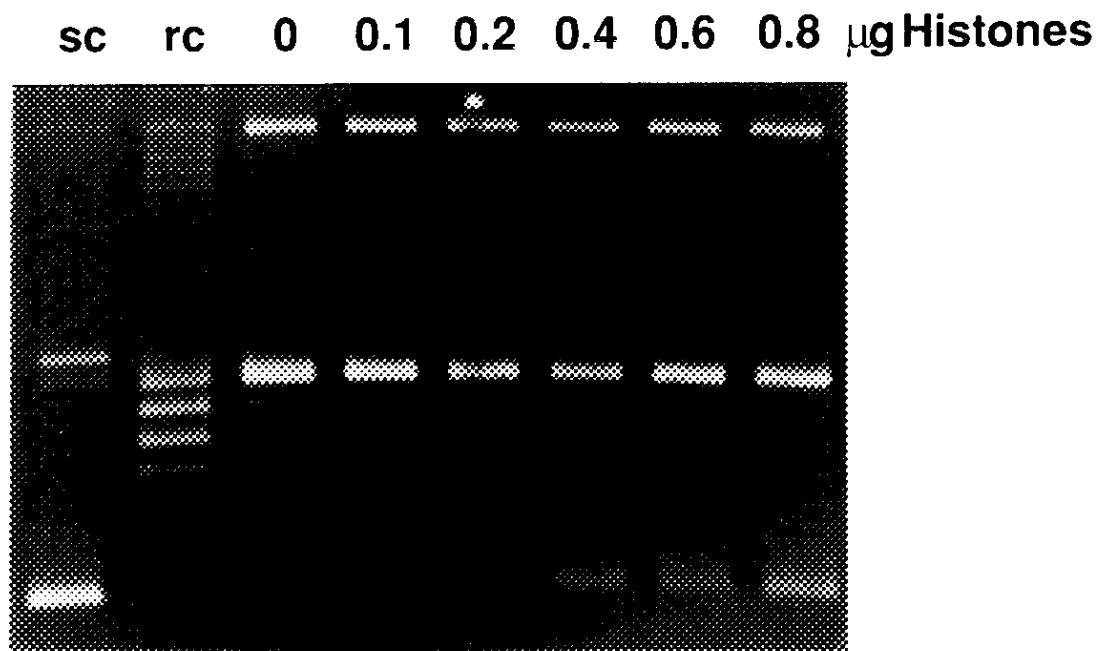


図5、pML(C2AT)プラスミドにおけるヌクレオソーム形成。100ng DNA、ヒストン(+H1、硫酸抽出法、0-0.8 μg)、ヌクレオソームアセンブリーファクター、1.8units DNAトポイソメラーゼIを25°C、60分インキュベートし、除蛋白して1%アガロースゲル電気泳動 にかき、エチジウムブロマイド染色でDNAのラダーを検出した。sc: 超らせん化したプラスミドDNA (超らせん化密度 -0.06)、rc: 弛緩型DNA。

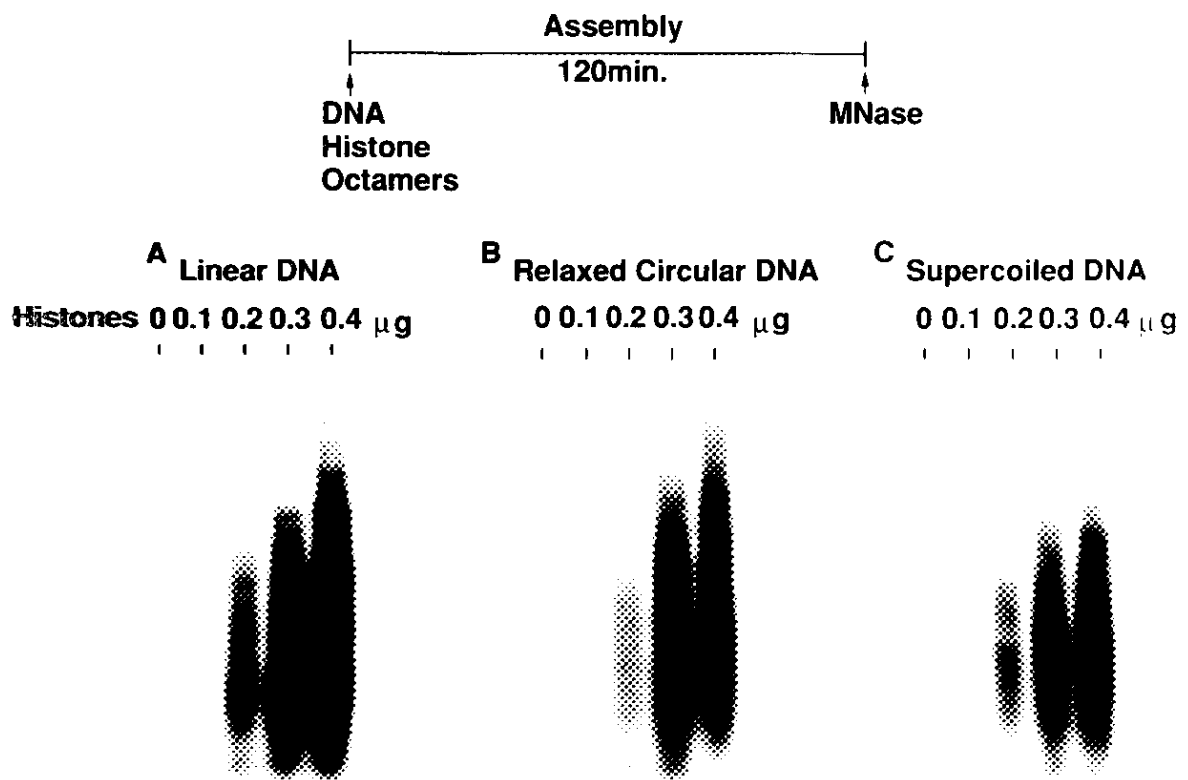


図6-1、pHSP(C2AT)プラスミドにおけるヌクレオソーム形成。ヒストン(+H1、
 ハイドロキシアパタイトカラム法)を用いた結果を示した。DNAとヒストンオ
 クタマー(0-0.4μg)を30°C、120分インキュベートし、塩化カルシウムとマイク
 ロコッカルヌクレアーゼを加えて25°C、15分反応させた。得られたDNAフラグ
 メントをアガロースゲル電気泳動にかけランダムプライマー法により³²Pでラ
 ベルした線状pHSP(C2AT)プラスミドDNAをプローブとしたサザンプロットハ
 イブリダイゼーションで検出した。線状DNA、弛緩型閉環状DNA、超らせん化
 した閉環状DNA(超らせん化密度-0.06)を用いた結果を各々A、B、Cに示した。

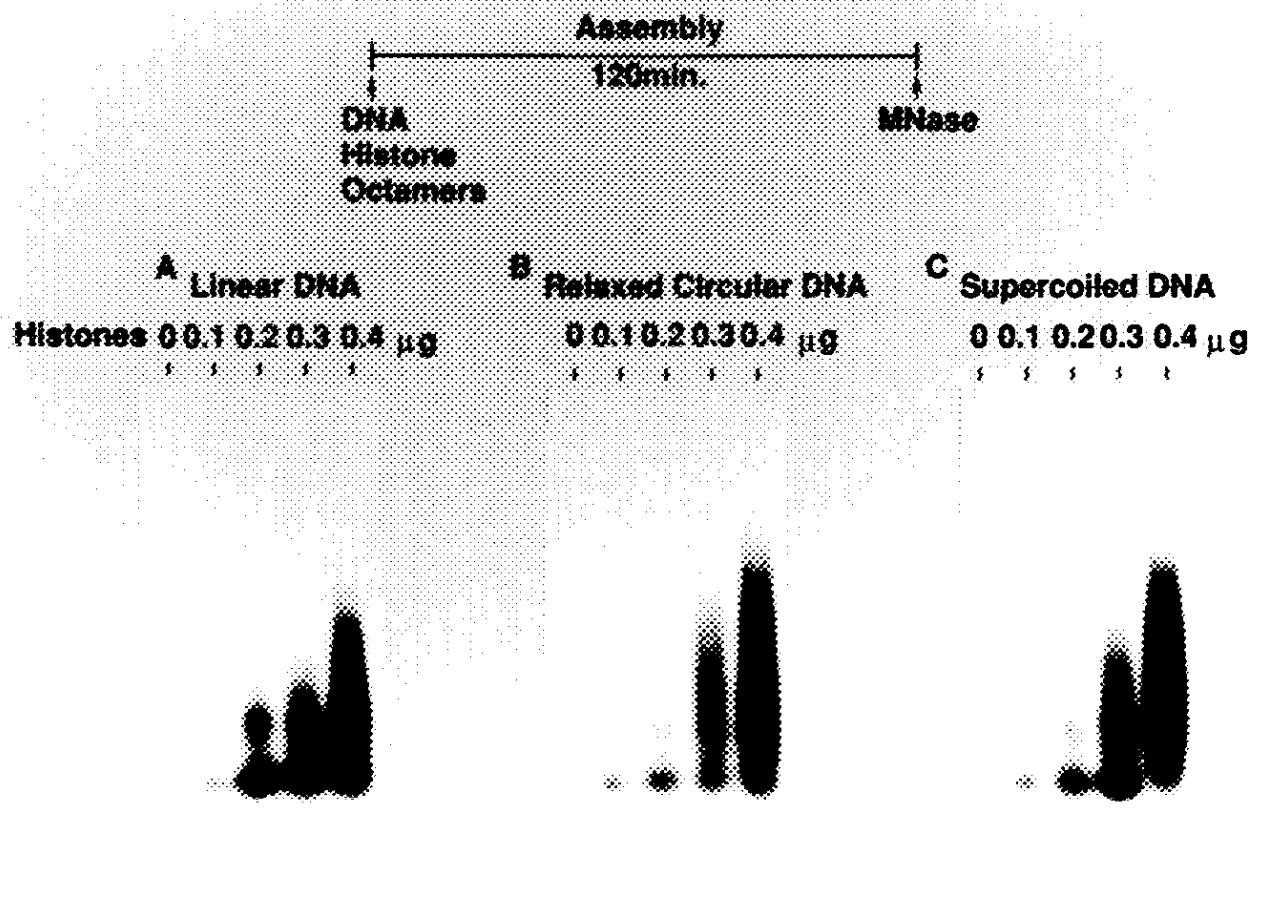


図6-2、pHSP(C₂AT)プラスミドにおけるヌクレオソーム形成。 ヒストン (-H1、
 ハイドロキシアパタイトカラム法) を用いて図6-1と同じ実験を行った結果を6-2
 に示した。線状DNA、弛緩型閉環状DNA、超らせん化した閉環状DNA (超らせ
 ん化密度 -0.06) を用いて得られた結果を各々A、B、Cに示した。

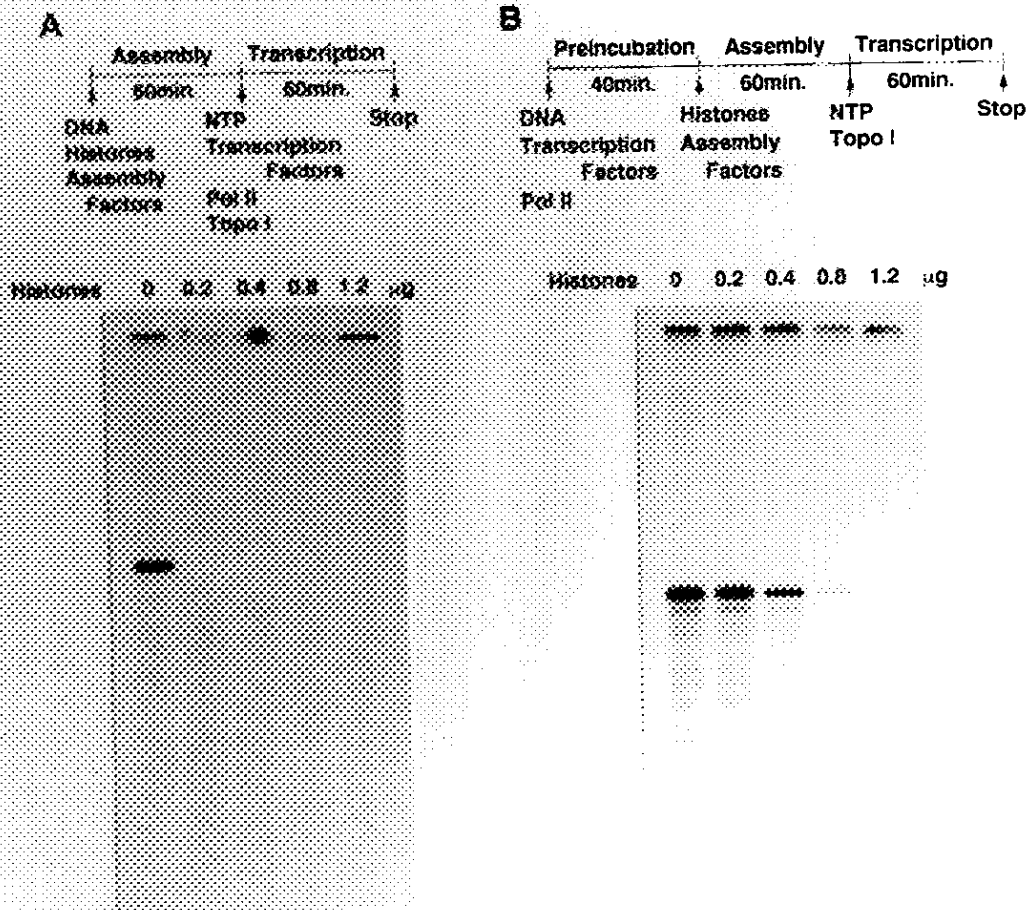


図7A、ヌクレオソーム形成したpML(C₂AT)プラスミド上のアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写。DNA、ヒストン(+H1、硫酸抽出法、0-1.2μg)、ヌクレオソームアセンブリーファクターを25°C、60分インキュベートし、基本転写因子、RNAポリメラーゼII、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、[α-³²P-CTP]を加えて25°C、60分反応させて転写を行わせた。図7B、転写開始前複合体形成の後、ヌクレオソーム形成したpML(C₂AT)プラスミド上のアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写。DNAと基本転写因子とRNAポリメラーゼIIを25°C、40分インキュベートし、ヒストン(+H1、硫酸抽出法、0-1.2μg)とヌクレオソームアセンブリーファクターを加えて25°C、60分インキュベートし、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、[α-³²P-CTP]を加えて25°C、60分反応させて転写を行わせた。7M Ureaを含む6%ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて泳動し、オートラジオグラフィーで転写産物を検出した。超らせん化した閉環状DNA(超らせん化密度-0.036)を用いた結果のみを各々示した。

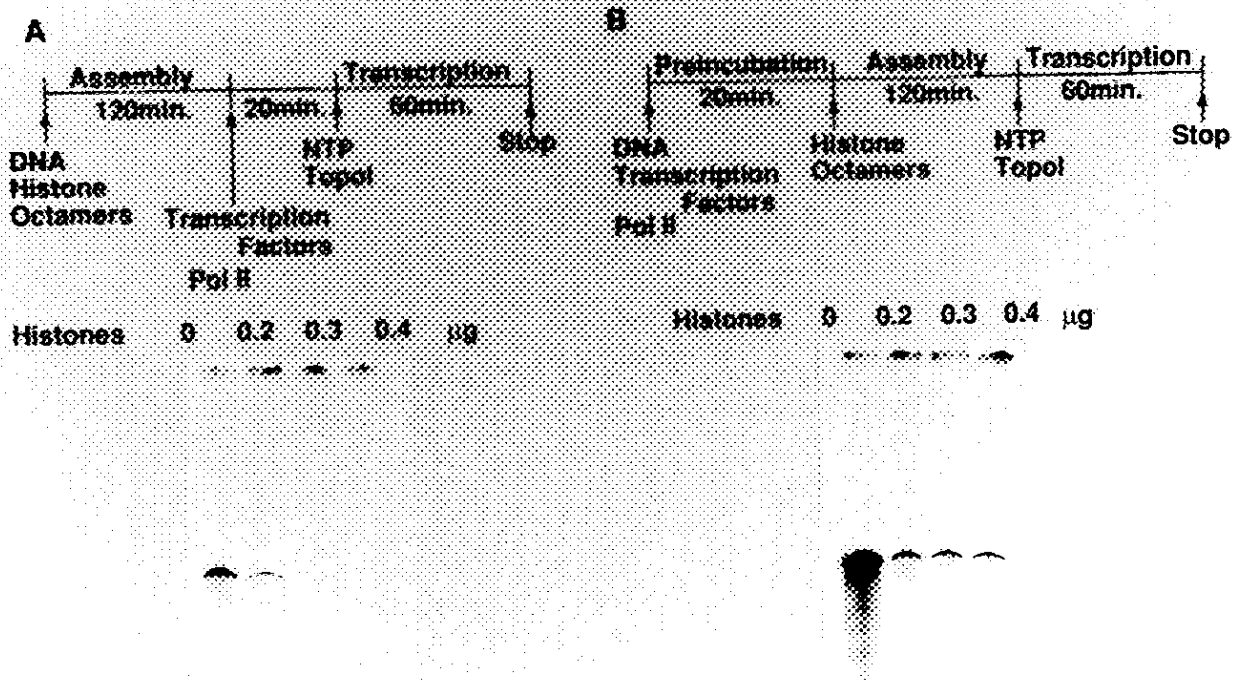


図8A、ヌクレオソーム形成したpHSP(C2AT)プラスミド上のHSPプロモーターからの転写。H1を含むヒストン(ハイドロキシアパタイトカラム法)を用いた結果を示した。DNAとヒストンオクタマー(0-0.4 μ g)を30 $^{\circ}$ C、120分インキュベートし、基本転写因子とRNAポリメラーゼIIを加えて30 $^{\circ}$ C、20分インキュベートした後、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}]$ を加えて30 $^{\circ}$ C、60分反応させて転写を行わせた。

図8B、転写開始前複合体形成の後、ヌクレオソーム形成したpHSP(C2AT)プラスミド上のHSPプロモーターからの転写。DNAと基本転写因子とRNAポリメラーゼIIを30 $^{\circ}$ C、20分インキュベートし、ヒストンオクタマー(+H1、0-0.4 μ g)を加えて30 $^{\circ}$ C、120分インキュベートした後、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}]$ を加えて30 $^{\circ}$ C、60分反応させて転写を行わせた。7M Ureaを含む6%ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて泳動し、イメージアナライザーで転写産物を検出した。超らせん化した閉環状DNA(超らせん化密度 -0.06)を用いた結果のみを各々示した。

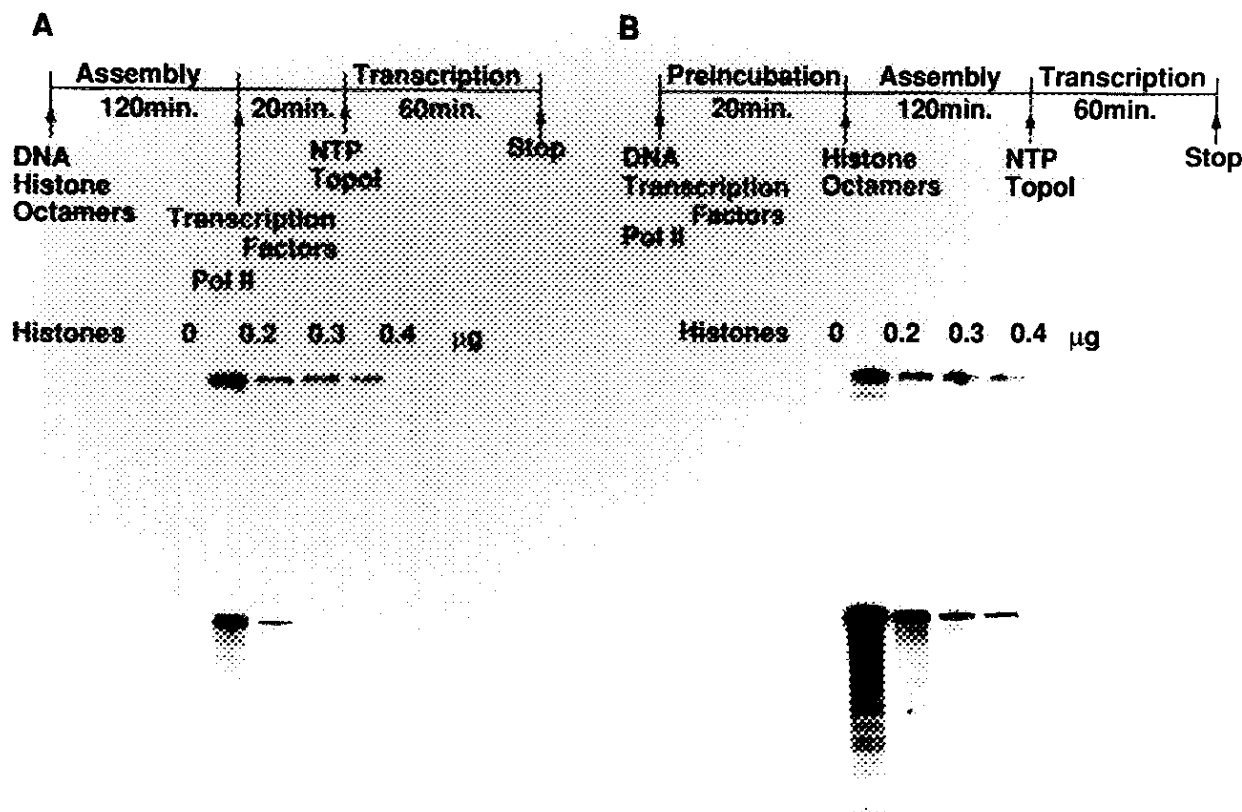


図9A、ヌクレオソーム形成したpHSP(C2AT)プラスミド上のHSPプロモーターからの転写。

図9B、転写開始前複合体形成の後、ヌクレオソーム形成したpHSP(C2AT)プラスミド上のHSPプロモーターからの転写。HIを含まないヒストン(ハイドロキシアパタイトカラム法)を用いて図8Aと同じ実験を行った結果を9Aに、図8Bと同じ実験を行った結果を9Bに示した。

超らせん化した閉環状DNA(超らせん化密度-0.06)を用いて得られた結果のみを各々示した。

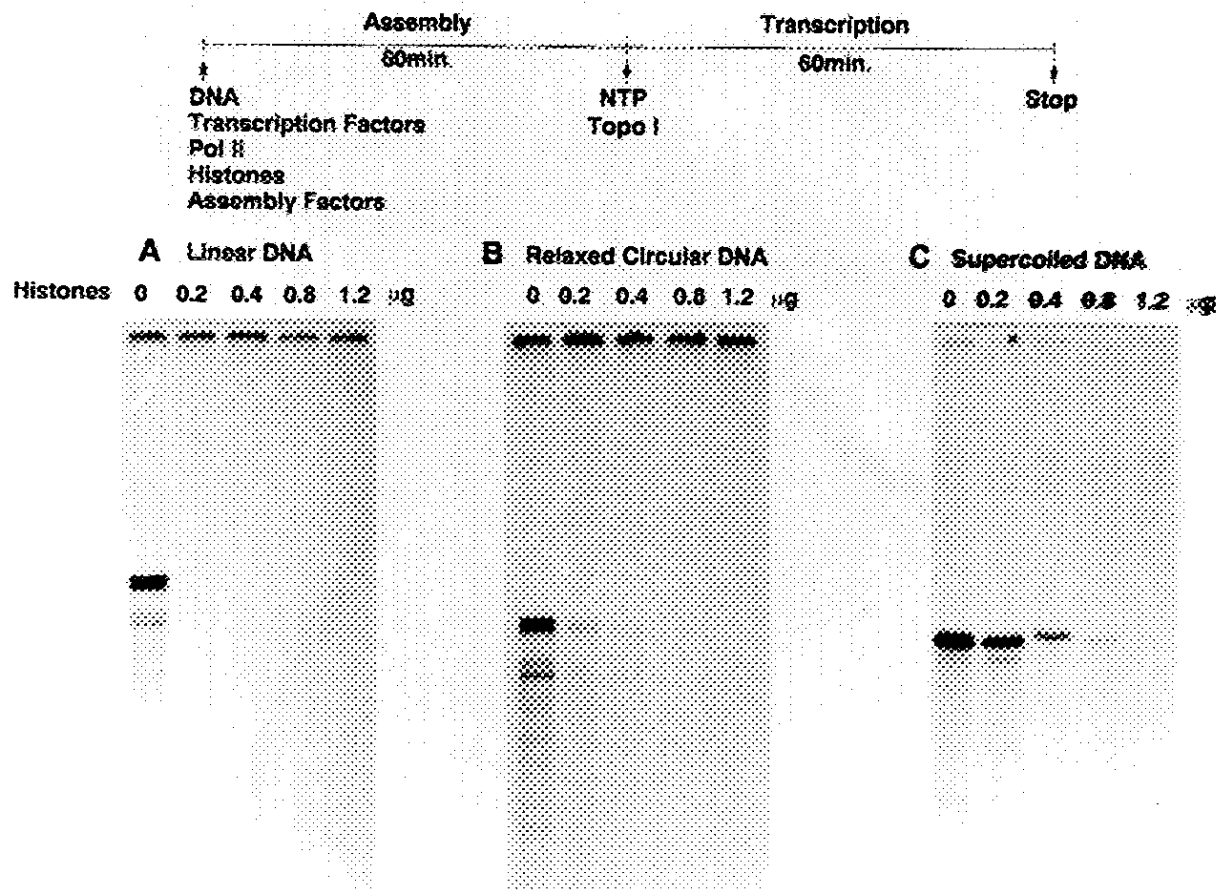


図10、ヌクレオソーム形成と転写開始前複合体形成の競合下における pML(C2AT)プラスミド上のアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写。DNA、ヒストン(+H1、硫酸抽出法、0-1.2 μ g)、ヌクレオソームアセンブリーファクター、基本転写因子、RNAポリメラーゼIIを加えて25°C、60分インキュベートし、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、[α^{32} -P-CTP]を加えて25°C、60分反応させて転写を行わせた。7M Ureaを含む6%ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて泳動し、オートラジオグラフィーで転写産物を検出した。線状DNA、弛緩型閉環状DNA、超らせん化した閉環状DNA(超らせん化密度 -0.036)を用いた結果を各々A、B、Cに示した。

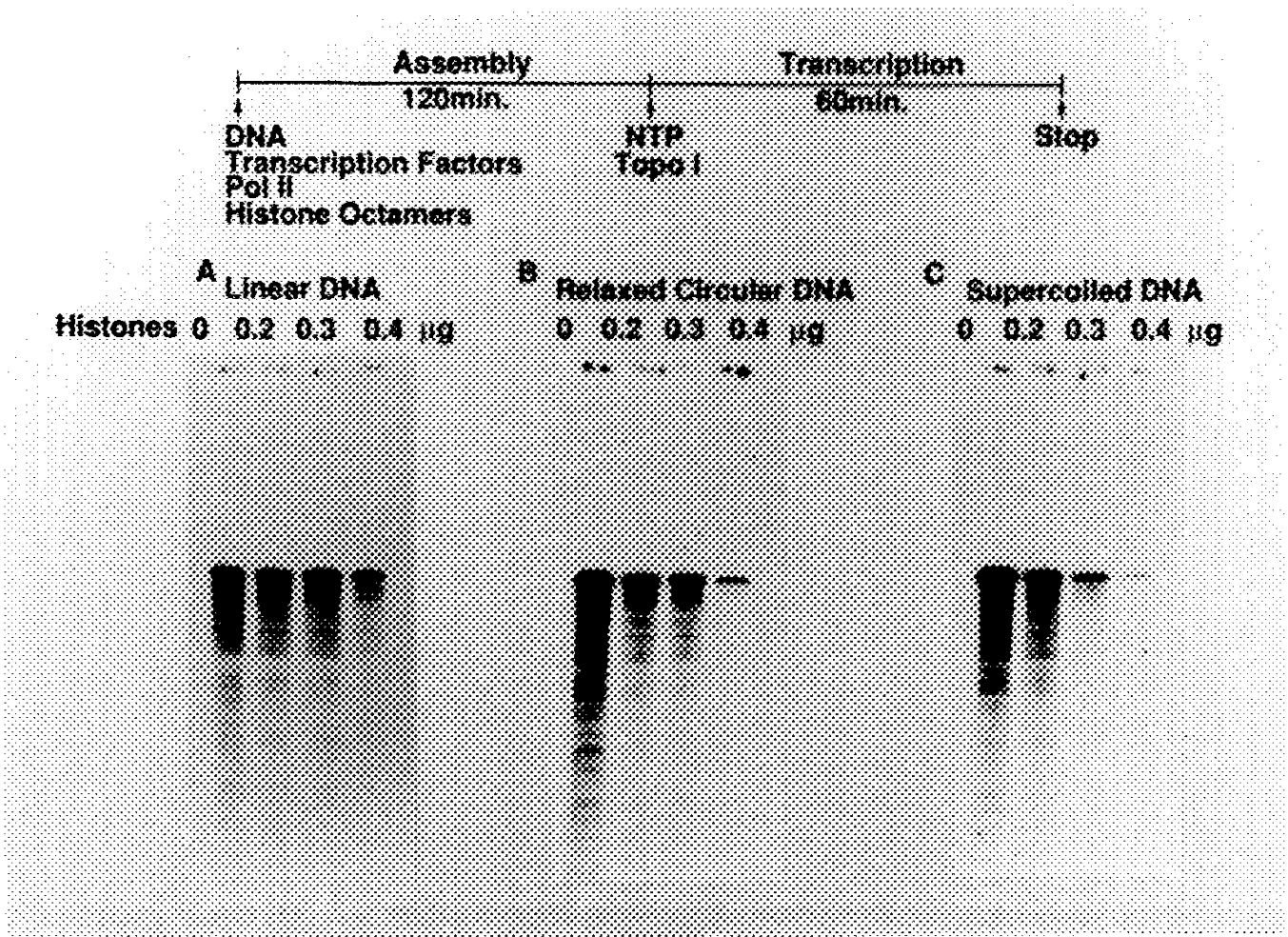


図11、ヌクレオソーム形成と転写開始前複合体形成の競合下における pHSP(C2AT)プラスミド上のHSPプロモーターからの転写。 DNA、HIを含むヒストンオクタマー(ハイドロキシアパタイトカラム法、0-0.4 μ g)、基本転写因子、RNAポリメラーゼIIを加えて30°C、120分インキュベートし、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}]$ を加えて30°C、60分反応させて転写を行わせた。7M Ureaを含む6%ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて泳動し、イメージアナライザーで転写産物を検出した。線状DNA、弛緩型閉環状DNA、超らせん化した閉環状DNA(超らせん化密度 -0.06)を用いた結果を各々A、B、Cに示した。

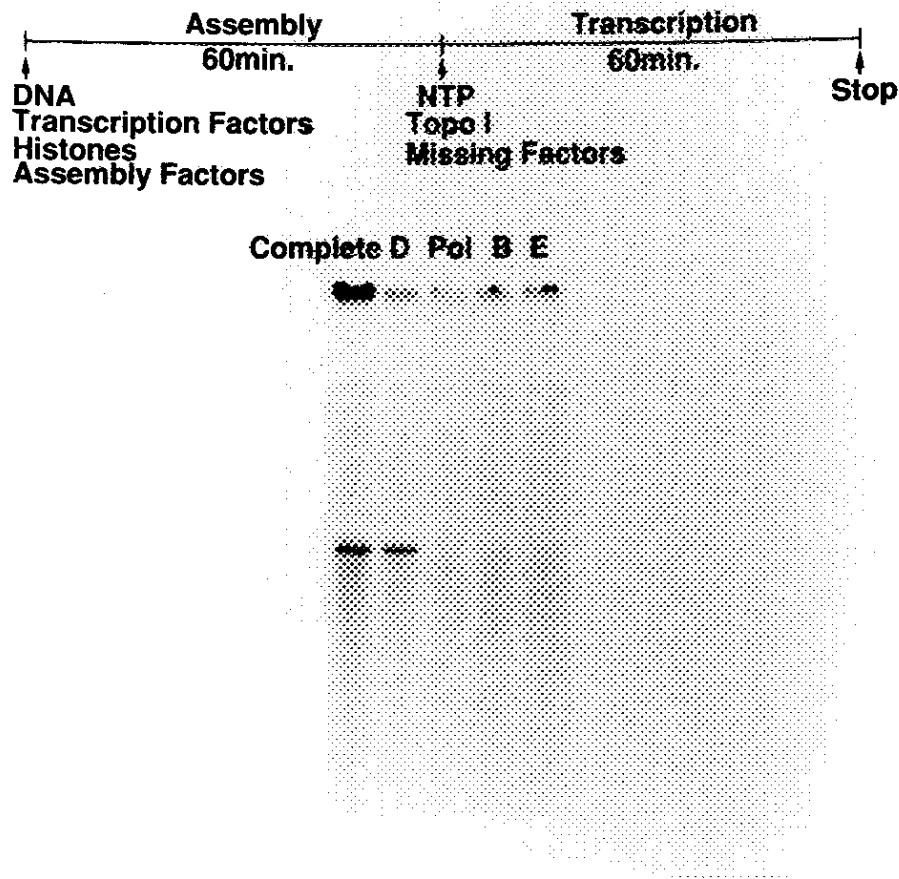


図12、ヌクレオソーム形成との競合条件下で転写がヌクレオソーム形成に優先するためにはTFIIDのTATA boxへの結合が重要である。100ngの超らせん化した閉環状pML(C2AT)DNA(超らせん化密度 -0.036)、400ngのヒストン(+H1)、ヌクレオソームアセンブリーファクター、基本転写因子画分1種類を加えて25°C、60分インキュベートし、残りの基本転写因子画分、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}]$ を加えて25°C、60分反応させて転写を行わせた。7M Ureaを含む6%ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて泳動し、オートラジオグラフィーで転写産物を検出した。各レーンの上に、最初に加えた基本転写因子画分を表示している。completeは最初に全部の基本転写因子画分を加えたことを示す。

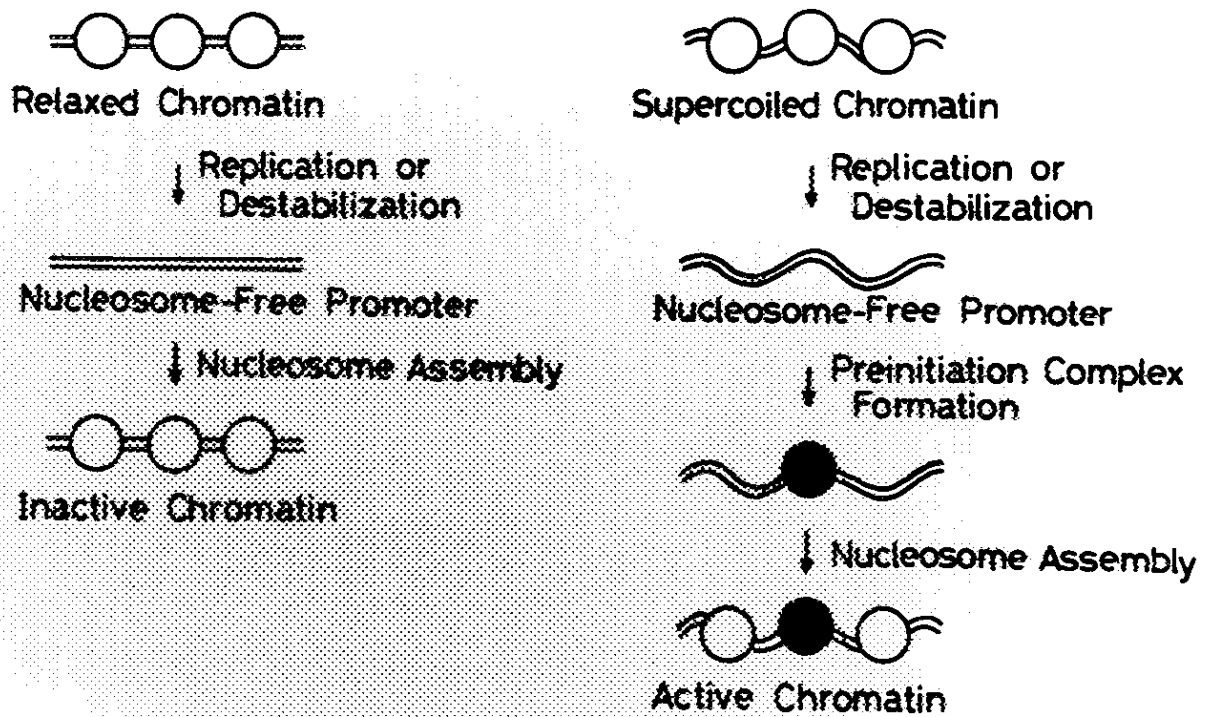


図13、活性型、不活性型クロマチン形成のモデル。ヌクレオソームの形成と転写開始前複合体形成の競合が起きた時、超らせんDNAでは転写開始前複合体形成が先行して活性型クロマチンに、弛緩型DNAではヌクレオソームの形成が先行して不活性型クロマチンになる。アデノウイルス後期主要プロモーターで得られた実験結果により考えたモデルである。

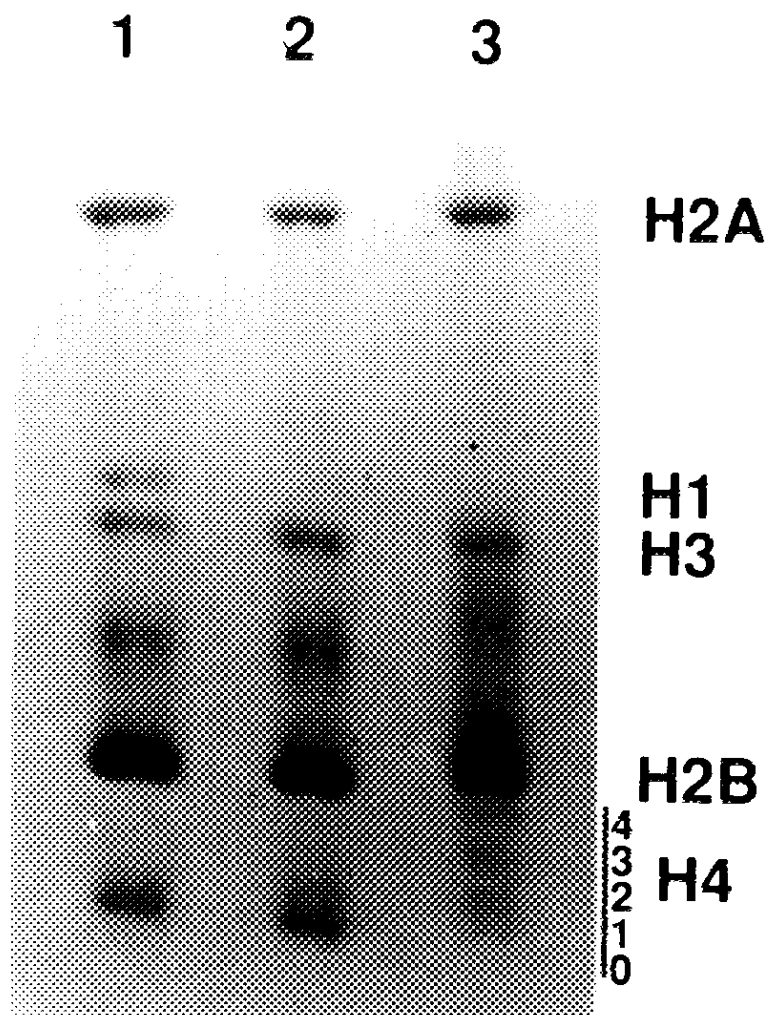


図14、酢酸-Urea-Triton ゲル電気泳動によるアセチル化ヒストンの検出。培養時に酪酸ナトリウムで処理した細胞の核からヒストンを調製し、酢酸-Urea-Triton ゲル電気泳動によりアセチル化の程度を調べた。レーン1: ヒストン(+HI)、レーン2: ヒストン(-HI)、レーン3: アセチル化ヒストン(-HI)。0-4までの数字はH4のアセチル化の程度を示している。

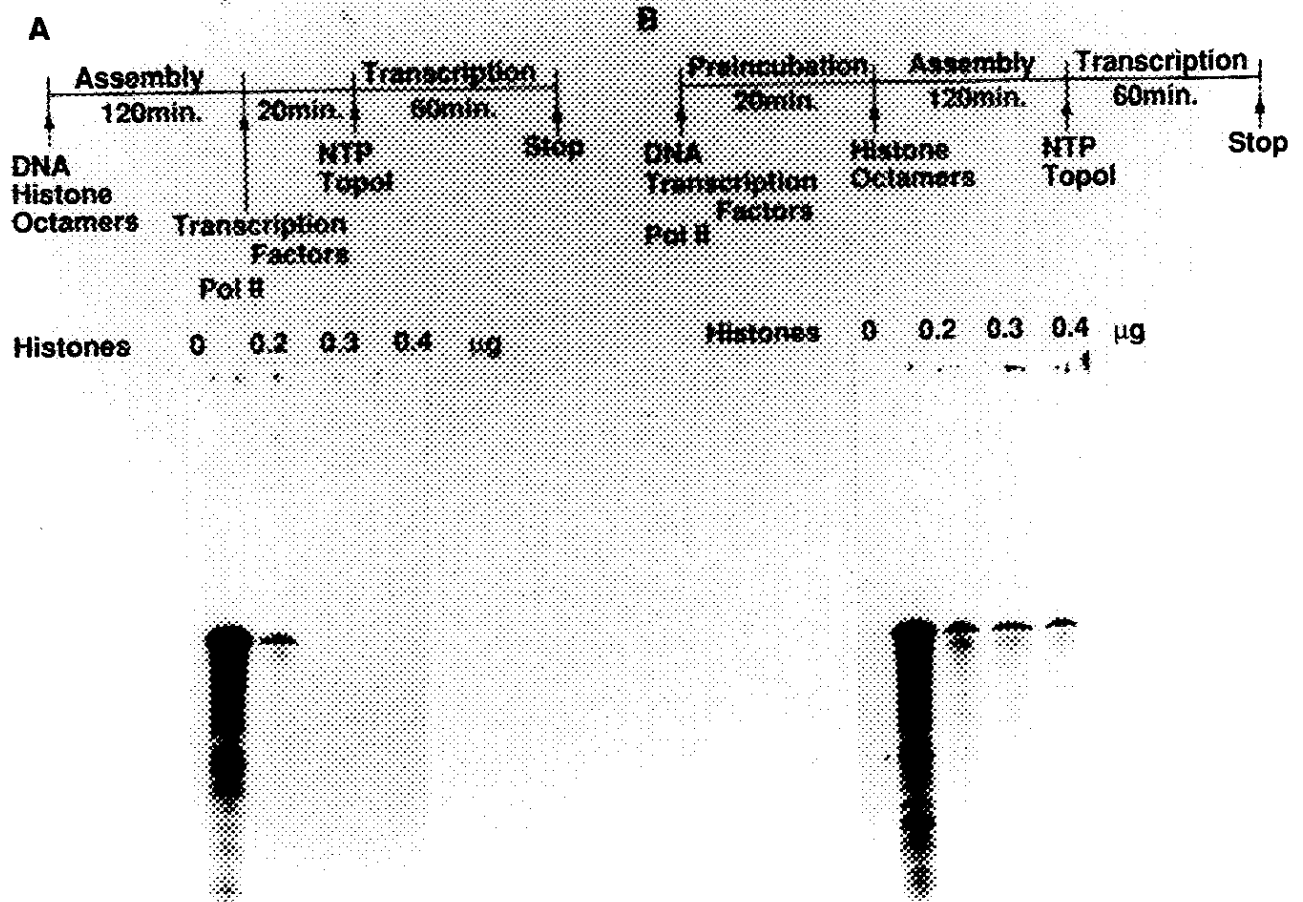


図15A、アセチル化ヒストンを用いてヌクレオソーム形成したpML(C2AT)プラスミド上のアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写。アセチル化ヒストン(-H1、ハイドロキシアパタイトカラム法)を用いた結果を示した。DNAとアセチル化ヒストンオクタマー(0-0.4 μ g)を30 $^{\circ}$ C、120分インキュベートし、基本転写因子とRNAポリメラーゼIIを加えて30 $^{\circ}$ C、20分インキュベートした後、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}]$ を加えて30 $^{\circ}$ C、60分反応させて転写を行わせた。

図15B、転写開始前複合体形成の後、アセチル化ヒストンを用いてヌクレオソーム形成したpML(C2AT)プラスミド上のアデノウイルス後期主要プロモーターからの転写。DNAと基本転写因子とRNAポリメラーゼIIを30 $^{\circ}$ C、20分インキュベートし、アセチル化ヒストンオクタマー(-H1、0-0.4 μ g)を加えて30 $^{\circ}$ C、120分インキュベートした後、DNAトポイソメラーゼI、ATP、UTP、3'-O-methyl-GTP、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP}]$ を加えて30 $^{\circ}$ C、60分反応させて転写を行わせた。7M Ureaを含む6%ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて常法により泳動し、イメージアナライザーで転写産物を検出した。超らせん化した閉環状DNA(超らせん化密度-0.036)を用いた結果のみを各々示した。