

Phosphorylation of histone H1 subtypes of L5178Y cells at mitotic phase

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7720

L5178Y 細胞のヒストン H1 小成分の 細胞分裂期におけるリン酸化

金沢大学がん研究所分子生物部 (主任: 亀山忠典教授)

松 川 通

(昭和59年2月7日受付)

ヒストン H1 小成分のリン酸化について、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびカラムクロマトグラフィを用いて検討した。マウス白血病由来の培養細胞 L5178Y の H1 を 5 種の小成分に分画した。対数増殖期にある細胞では、H1 小成分は各々異なる程度にリン酸化されていた。リン酸化の程度は小成分 II が最も高く、以下小成分 IV + V > I > III の順であった。細胞分裂期において、H1 小成分はやはり各々異なる程度にリン酸化されていた。対数増殖期に高度にリン酸化されることが観察された小成分は、分裂期においてもやはり高度にリン酸化されていた。コルセミド添加後、各小成分のリン酸化は同時に始まり、リン酸化体の蓄積は直線的であった。各小成分への³²P の単位時間あたりのとり込み量はあまり経時的変化を示さず、ほぼ一定の値であった。コルセミド処理 4 時間以内では、リン酸残基の代謝回転はみられなかった。また、H1 リン酸化酵素の活性は、コルセミド処理後 6 倍に増加した。

Key words ヒストン H1 小成分, リン酸化, 細胞分裂期

クロマチンは、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 の 4 種のコアヒストンたん白質に DNA が巻きつき、ヌクレオゾーム構造と名付けられた基本構造をもっている¹⁾。この基本構造は折りたたまれて、なんらかの超高次構造 (super structure) をとっていると考えられる²⁾。もう一種のヒストンたん白質 H1 はこの超高次構造の形成に関わっていると推定される³⁾。

ヒストン H1 は、細胞周期上の DNA 合成期 (S 期)、および細胞分裂期 (M 期) にリン酸化される³⁾。DNA 合成時、あるいは M 期における染色体凝集時に、クロマチンは超高次構造の変化をされると考えられる。H1 のリン酸化はこれらの超構造変化の制御因子と推定される。特に G2 後期から M 期にかけて、H1 は最も高度のリン酸化体となっており⁴⁾⁵⁾、Bradbury ら⁶⁾はこのリン酸化が染色体凝集の引き金になると発表している。

H1 は一次構造のわずかに異なるいくつかの小成分より成っている³⁾。そしてこれら H1 小成分はその生理的機能が各々異なっているのではないかと予想される。ラッド、ウサギ、その他の生物種において、臓器

により小成分の存在比が異なり³⁾、その存在比は加齢により変化する⁷⁾。また、ウニ⁸⁾⁹⁾、イモリ¹⁰⁾などは発生過程で合成される H1 小成分の量比が異なる。このように小成分の存在比は多様に変化し、小成分の機能的差異を暗示している。また、H1 小成分の物理化学的な性質も各々異なっていることが見出されている。Smerdon ら¹¹⁾は、仔牛胸腺の 3 種の H1 小成分が、クロマチン結合性のノンヒストンたん白質の一種である HMG1 や HMG2 と、各々特異的な相互作用を行うことを見出した。Cole らは、ウサギや仔牛胸腺の H1 小成分が環状スーパーコイル DNA や直線 DNA と特異的な相互作用をする^{12)~14)}こと、ヌクレオゾーム二量体の円偏光二色性スペクトルの変形に対する効果が小成分によって異なる¹⁵⁾ことを報告している。

以上のように H1 小成分がそれぞれ異なる機能を果していることを示唆する報告が多い。しかし、まだ H1 小成分については不明の点が多く、上記以外の他の観点から H1 小成分について検討する必要があるであろう。リン酸化の観点から小成分について検討すること

Phosphorylation of histone H1 subtypes of L5178Y cells at mitotic phase. **Tohru Matsukawa**, Department of Molecular Biology (Director: Prof. T. Kameyama), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

は、H1 がクロマチン超高次構造の形成に関与し、リン酸化がその構造変化の制御因子と考えられることから、H1 小成分の機能の解明に重要なことと思われる。

H1 小成分が細胞周期依存性のリン酸化を各々異なる程度に受けることが報告されている。Gurley ら⁴⁾は、CHO 細胞の 2 種の H1 小成分、CHO-I と CHO-II について、細胞周期を通して両者が異なった程度にリン酸化されていると報告した。また、Ajiro らは、HeLa 細胞の 2 種の H1 小成分 H1-A、H1-B について、両者でリン酸化の程度に差がある⁵⁾こと、両者のリン酸化部位の差¹⁰⁾について報告している。しかし通常、多くの生物種の各種の臓器、あるいは培養細胞から抽出される H1 は、3~6 種の小成分に分画されている³⁾。したがって、Gurley ら⁴⁾、また Ajiro ら⁵⁾の報告は H1 小成分の多様性を十分に反映しているとはいえない。H1 小成分の機能を解明する研究の一環として、より多種類の H1 に分画できる方法を用いての研究が必要であると考へた。マウス白血病由来の培養細胞、L5178Y の H1 小成分は 5 種に分画され、H1 小成分の研究にはよい材料であった。この細胞を用いて、分裂期における H1 小成分のリン酸化とその動態について解析し、リン酸化の観点より、H1 小成分の機能的差異の解明を試みた。

材料及び方法

1. 材料

Fischer の培地は日水製薬(株) (東京) の粉末培地を用いた。馬血清は Flow Lab.社 (U. S. A.) のものを用いた。BioRex 70 (200-400 メッシュ) は BioRad Lab.社 (U. S. A.) から購入した。コルセミドは半井化学薬品(株) (京都) から求めた。³²P]-正リン酸(キャリアフリー) は日本アイソトープ協会 (東京) のものを使用した。³H]-リジン(40 mCi/mMole), ³H]-デオキシシチジン (15,500 mCi/mMole), ¹⁴C]-リジン (287 mCi/mMole) は Amersham 社 (U. K.) から購入した。

2. 培養及び分裂期細胞の蓄積法

L5178Y 細胞は 10%馬血清を加えた Fischer の培地中、37°C で培養した。この細胞は浮遊性で、世代時間は 9 時間、細胞密度は 1.2×10^6 cells/ml 程度まで対数的に増殖する。通常 500 ml 程度の培地で回転培養した。M 期細胞を集めるために、過剰チミジンとコルセミドによる二重ブロックを行った。対数増殖期にある細胞 (細胞密度: $3 \sim 4 \times 10^6$ cells/ml) を 2.5 mM のチミジンで 6 時間処理した。チミジンブロックは、0.1 mM デオキシシチジンを加えることにより解除した。コルセミド (0.1 μ g/ml) をデオキシシチジン投与 2 時

間後に加えて、M 期で細胞周期を停止させた。M 期細胞数はアセトオルセイン染色¹⁷⁾により観察した。³H]-リジン (0.1 μ Ci/ml) を培地へ加えて 3 世代間、たん白質を標識した。たん白質の放射活性を測定し、培地中の³H]-リジンの比活性に基き、たん白質量を算定した。³²P]-正リン酸 (5~8 μ Ci/ml) による標識条件は各々の実験により異なるので、その都度示した。³²P の放射活性を測定し、培地中の³²P]-正リン酸の比活性に基いて、たん白質中のリン酸残基数を求めた。

3. 分裂期または中間期細胞からのヒストン H1 の調整

全ての操作は 4°C で行った。図 3 で用いた対数増殖期細胞より抽出した H1 標品を除いて、以下の方法で調整した。細胞を 1000 \times g, 3 分の遠心で集め、リン酸緩衝液生理食塩水 (phosphate-buffered saline, 以下 PBS と略) で 3 回洗った。3 mM MgCl₂-50 mM NaHSO₄ (pH7.0)-1 mM フェニルメチルスルホニルフルオライド (phenylmethylsulfonyl fluoride, 以下 PMSF と略) 中で、50 W, 15 秒の超音波処理 (Branson 社, U. S. A., タイプ B-12) を行い、細胞を破壊した。2700 \times g, 10 分の遠心で沈殿を得た。この沈殿は単離染色体を含み、分画 C と名付けた。分画 C より 0.4 N H₂SO₄ 中で 6 時間あるいはそれ以上攪拌し全ヒストンを抽出した。10000 \times g, 30 分遠心後、上清をとり、4 倍量のエタノールを加えてたんぱく質を沈殿させた。沈殿をアセトンで 3 回洗い、乾燥後、水に溶かした。5% HClO₄ 中、2 時間攪拌し、H1 を抽出した。1000 \times g, 10 分遠心し、上清は H1 分画、沈殿はコアヒストン分画とした。上清を 1 mM 酢酸に対して透析し、凍結乾燥して H1 標品を得た。

図 3 で用いた対数増殖期細胞からの H1 の抽出は以下のように行った。対数増殖期にある細胞を集め、PBS で洗った。1 mM ブリッジ 58-10 mM MgCl₂-1 mM PMSF 中でテフロン-ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズした。1000 \times g, 2 分の遠心後、0.25 M ショ糖-3 mM CaCl₂-1 mM PMSF 中で更にホモジナイズした。1000 \times g, 2 分遠心し得られた沈殿を更に 2 回ホモジナイズし単離核を得た。単離核をウルトラターラックスホモジナイザーを用い、1 mM エチレンジアミンテトラ酢酸 (pH7.5)-1 mM PMSF 中で破壊した。1000 \times g, 10 分遠心し、沈殿に単離クロマチンを得た。以下 H1 の抽出は分画 C と同様に行った。たん白質量は Lowry ら¹⁸⁾の方法によって求めた。

4. カラムクロマトグラフィ及びポリアクリルアミドゲル電気泳動

BioRex 70 イオン交換カラムクロマトグラフィは、

Kinkade らの方法¹⁹⁾に基く変法(足立, 大場)によった。カラムサイズは 0.6×55 cm とした。H1 は塩酸グアニジン直線濃度勾配(9.6~11.6%)をかけて溶出し、1 ml ずつ分画した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下 PAGE と略)はディスクゲルについては手製の、スラブゲルについては BioRad 社 (U.S.A) の装置 (13.5×16 cm) を用いた。

SDS-PAGE は, Laemmli の系²⁰⁾に従った。アクリルアミド(以下 AAm と略)の濃度は、12.5%、ゲル厚は 1.5 mm とした。染色はクマシーブリリアントブルー(以下 CBB と略) G 250 を用いた。

二次元 PAGE は以下のように行った。一次元目として、酢酸-尿素 PAGE を Hardison らの方法²¹⁾に基く Ajiro らの変法⁵⁾に従って行った。ゲルは 0.18×27 cm で、組成は 2.5 M 尿素-5%酢酸-12%AAm-0.08%ビス AAm とした。電気泳動は 4°C 、450 V 定電圧、14 時間行った。各ゲルの標準泳動位置を定めるため、対数増殖期の L5178Y 細胞より抽出したマーカー用 H1 標品を、サンプル H1 標品泳動開始 3 時間後に、各ゲルにのせ、サンプル H1 と共に泳動した。

二次元目として、Kistler らの系²²⁾の変法を行った。ゲルは $0.2 \times 13.5 \times 16$ cm とした。濃縮用ゲルは、5% AAm-0.13%ビス AAm-20 mM KOH (pH6.0, 酢酸にて調整)-0.35%トライトン X 100 とし、分離用ゲルは、20%AAm-0.13%ビス AAm-60 mM KOH (pH4.5, 酢酸)-0.35%トライトン X 100 とした。一次元目の泳動終了後、ゲルをガラス管より取り出し、25%グリセリン-20 mM KOH (pH6.0, 酢酸)-1%トライトン X 100-0.08%ピロニン Y に浸した。その後、二次元目のゲルにのせ、 4°C 、16 mA 定電流、16 時間電気泳動した。染色は CBB R 250 で行った。H1 小成分は、CBB R 250 に対し各々異なる色に染まるので、小成分の識別を容易にするためにこれを用いた。

染色後、スポットをゲルより切り出し、30% H_2O_2 中で溶かした。トライトン-トルエン系のシンチレーターを加えて、 ^3H あるいは ^{32}P の放射活性を測定した。

5. アミノ酸分析

各分画を集め、1 mM 酢酸に対して透析し、凍結乾燥させた。6N HCl にて 110°C 、24 時間加水分解した。アミノ酸分析は、日立アミノ酸分析機 835 型を使用した。

6. たん白質リン酸化酵素の活性測定

細胞を PBS で洗った後、3 ml の 10 mM Tris-HCl (pH7.5)-3 mM MgCl_2 (TMB) 中で、50 W、15 秒超音波処理をして破壊した。2700×g、15 分遠心し、上

清(SUP I)と沈殿に分けた。沈殿に TMB を加え、同じ操作を繰り返した。遠心後、得られた上清をあわせて SUP I とした。沈殿に 0.35 M NaCl を加え、水中 90 分、スターラーで攪拌した。2700×g、15 分遠心し、上清(SUP II)を得た。

たん白質リン酸化酵素の活性測定は、Langan の方法²³⁾の変法によった。反応は、10 μl の 10 mM NaF-250 mM TrisHCl (pH7.5)-25 mM MgCl_2 -5 mM ジチオスレイトールと、20 μl の SUP I あるいは 2 倍に希釈した SUP II と、15 μl の水、H1 水溶液(20 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$) あるいはコアヒストン水溶液(50 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$) と、5 μl の [γ - ^{32}P]-ATP (61.8 cpm/pmole) を混合した後、 37°C 、5 分を行った。反応は、5 μl の 0.1 MATP、100 μl の牛血清アルブミン(1 mg/ml)を加え、冷却し、20%トリクロル酢酸を加えて止めた。たん白質をニトロセルロースフィルターにトラップし、トルエン系シンチレーターを加えて、 ^{32}P の放射活性を測った。

H1 とコアヒストンは、対数増殖期の L5178Y 細胞より抽出し、BioRex 70 のカラムクロマトグラフィを行って、ノンヒストンたん白質を除いた。

成 績

1. 分裂期細胞の集積とヒストン H1 のリン酸化

細胞を過剰チミジンで処理すると、細胞の DNA 合成が抑制される。S 期にある細胞は DNA 合成阻害のため、S 期→G 2 期→M 期の正常な細胞周期を回ることができなくなる。しかし、G 2 期、M 期、G 1 期にある細胞は影響を受けずに細胞周期を進行させる。

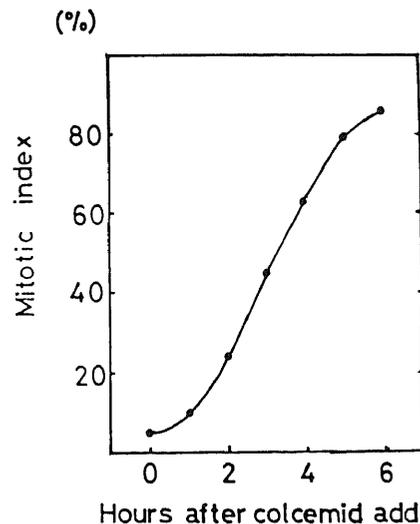


Fig. 1. Accumulation of mitotic cells by colcemid treatment following excess thymidine treatment.

だが、新たに S 期に入ることにはできず、G1/S 期の境界で細胞周期を停止させる。デオキシチジンを加えて DNA 合成阻害を解除し、 ^3H -デオキシチジンを加えて DNA 合成中の細胞を標識した。すると、過剰チミジン 6 時間の処理で、90%以上の細胞の細胞周期が S 期あるいは G1/S 期で停止していた。

デオキシチジン添加 2 時間後にコルセミドを加えた。コルセミドは紡錘糸の形成を阻害し、細胞周期は分裂中期で停止する。コルセミド添加後の分裂期細胞の割合を図 1 に示した。分裂細胞はコルセミド添加後次第に増加し、5 時間後に 80%に達した。コルセミド

処理が長時間に及ぶとマイクロヌクライが観察され、細胞は不可逆的な損傷を受ける。そこで、コルセミド処理が細胞に不可逆的な変化をもたらしているかどうか調べるために、コルセミド添加 5 時間後に細胞をコルセミドを含まない培地へ移した。M 期細胞の割合は速やかに減少し、細胞密度は 2 倍となった。したがって、コルセミド処理を 5 時間行っても、細胞は細胞分裂に関して生理的な状態を維持していた。

上記のような処理をし、H1 がリン酸化されるかどうかを調べた。 ^{32}P -正リン酸をデオキシチジンと同時に培地へ加えて、リン酸化たん白質を標識した。

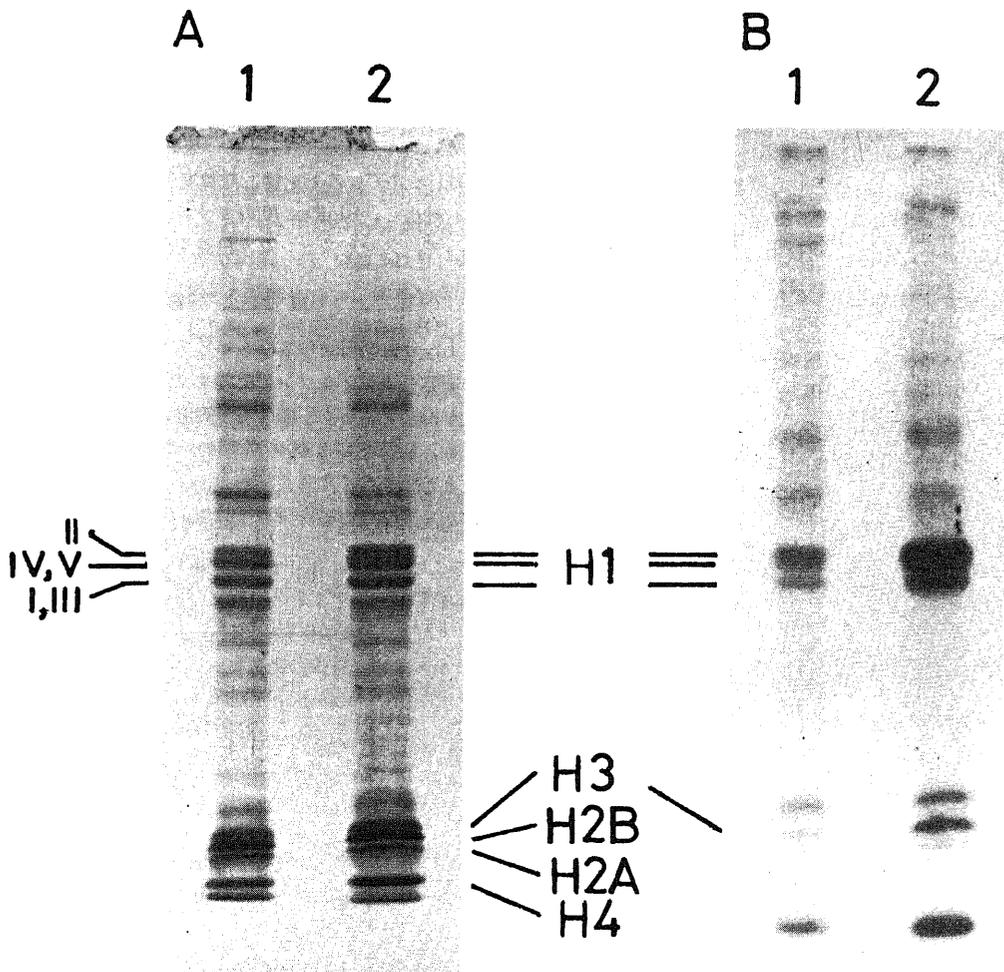


Fig. 2. Histone H1 phosphorylation during colcemid treatment.

Proteins extracted with 0.4 N H_2SO_4 from fraction C were analyzed by SDS-PAGE (12.5% acrylamide). The gel was stained by CBB G250. ^{32}P -orthophosphate was added to the medium at the time of adding deoxycytidine. Roman numerals in Panel A are shown as the corresponding H1 subtypes as mentioned later (Fig. 3-A). H1 was extracted from cells treated with colcemid for 3 hrs (lane 1) or 5 hrs (lane 2). A) CBB G250 staining. B) Autoradiographic pattern of A.

コレシド添加後、細胞を集め、分画Cより硫酸抽出した全ヒストン分画をSDS-PAGEで分離した。リン酸化たん白質はオートラジオグラフィによって検出した(図2)。後述するが、L5178Y細胞のH1は5種の小成分より成る。SDS-PAGEにおいては3本のバンドが検出された(図2-A)。ヒストンたん白質はそれらの移動度が、それらの分子量から予想される位置より大きくずれたたん白質として知られている²⁴⁾。したがって、H1に関して、移動度の遅い小成分が移動度の早い小成分よりも高分子量のたん白質であるのかどうかはわからない。図2中のローマ数字については後述

する。たん白質の電気泳動パターンにコレシド添加後経時変化はほとんど見られなかった。オートラジオグラフィ上で多数のバンドが検出された。ほとんどのたん白質のバンドが、コレシド添加3時間後と5時間後とで放射活性が変化していなかった。しかし、H1とH3のバンドは5時間後には3時間後より、放射活性の強いバンドとなった。このような条件下で、L5178Y細胞のH1がM期にリン酸化されることがわかった。

2. カラムクロマトグラフィによるヒストンH1リン酸化体の解析

イオン交換クロマト樹脂、BioRex 70を用いて、H1をいくつかの小成分に分画できる。対数増殖期にあるL5178Y細胞のH1はこのカラムクロマトグラフィによって5つのピークとなり、それぞれI, II, III, IV, Vとした(図3-A)。たん白質量を求めるために(³H)-リジンで3世代間、H1を標識した。これらの分画に含まれるたん白質は、SDS-PAGEでの泳動位置が、H1の泳動位置と一致し、他のたん白質のバンドがみられなかったこと、またそのアミノ酸組成が、報告されているH1のアミノ酸組成²⁵⁾とよく似ていることから、すべてH1であると結論した。表1に各分画のアミノ酸組成を示した。これらの値は互いにわずかずつ異なっており、各々たん白質として異なると考えた。各分画をH1小成分I, II, III, IV, Vとした。また図2に、各小成分のSDS-PAGEにおける泳動位置を、ローマ数字で示した。これら小成分の対数増殖期にお

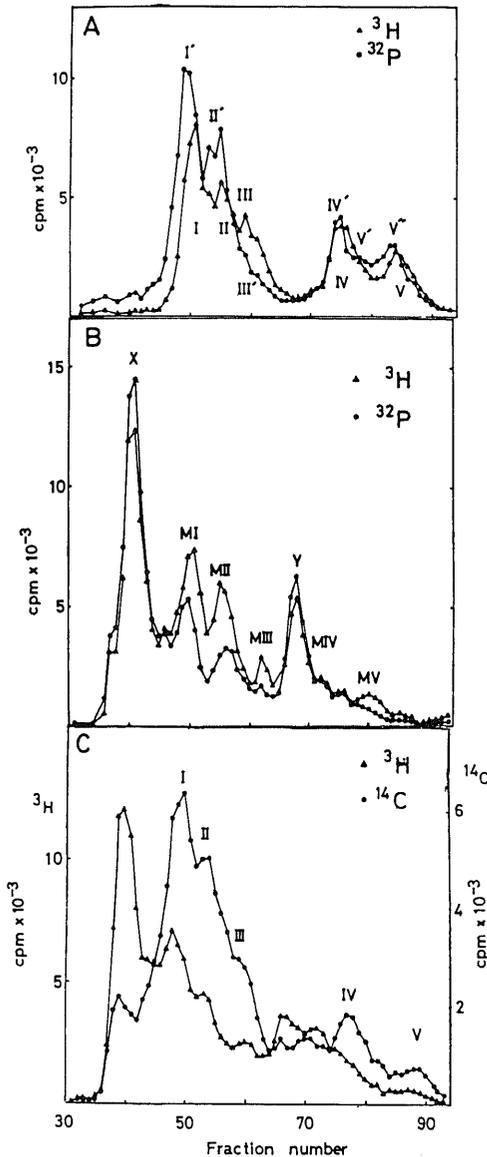


Fig. 3. BioRex 70 column chromatography of histone H1.

Proteins were labeled with [³H]-lysine for 3 generation periods. Nonhistone proteins eluted in run-through fraction were not shown. A gradient elution was begun at fraction No. 20. A) H1 (1 mg) from exponentially growing cells.

[³²P]-orthophosphate (8μCi/ml) were added to the medium during one generation period. Roman numerals show H1 subtypes and roman numerals with prime show phosphorylated H1 subtypes. B) H1 (0.5 mg) from mitotic cells harvested after 5.5 hrs from colcemid addition (mitotic index, 65%). [³²P]-orthophosphate was added to the medium immediately after addition of colcemid. The subfractions were called X, MI, MII, MIII, MIV and MV in order of elution. C) Co-chromatography of H1 from mitotic cells were labeled with [³H]-lysine. Exponentially growing cells were labeled with [¹⁴C]-lysine (0.05μCi/ml) for 4 generation periods. [³H]-H1 (0.6 mg) and [¹⁴C]-H1 (0.3 mg) were mixed together and co-chromatographed.

Table 1. Amino acid compositions of H1 subtypes

	I	II	III	IV	V
Asp	3.5	3.7	2.6	4.7	4.6
Thr	6.7	6.7	4.6	5.6	5.7
Ser	8.7	7.8	7.3	9.3	10.9
Glu	5.9	6.0	5.9	7.0	8.3
Pro	11.0	11.5	10.9	9.1	6.7
Gly	7.0	8.2	8.6	10.2	12.7
Ala	18.0	18.0	22.0	19.8	20.1
Cys	—	—	—	—	—
Val	6.4	5.3	6.2	3.9	3.9
Met	—	—	—	—	—
Ile	1.1	0.8	0.8	0.9	1.2
Leu	4.1	3.9	3.5	3.4	2.9
Tyr	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—
Lys	26.2	26.5	25.9	24.6	21.6
His	—	—	—	—	—
Arg	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8

ける存在量は I = 34%, II = 20%, III = 14%, IV = 13%, V = 18%であった。

リン酸化体について調べるために、培地に [^{32}P]—正リン酸を加え一世代培養し、リン酸化体を標識した。

^{32}P は6つのピークとなり、I', II', III', IV', V', V''と命名した(図3-A)。各々は ^3H のピークより少し早く溶出し、それぞれ小成分 I, II, III, IV, V のリン酸化体と思われた。II'とV''はホスファターゼ処理後、再クロマトグラフィーを行うと、それぞれ小成分IIとVの位置に溶出され、小成分IIとVのリン酸化体であることが確認された。

$^{32}\text{P}/^3\text{H}$ 値を計算すると、小成分 I = 1.03, II = 1.11, III = 0.66, IV = 0.83, V = 1.12 となり、リン酸化のうけ易さは V ~ II > I > IV > III となった。対数増殖期において、H1 小成分が各々異なる程度にリン酸化されていることがわかった。

次に M 期の H1 リン酸化を調べ、上の結果と対比させた。M 期細胞は前述のようにして集め、 ^{32}P —正リン酸をコルセミドと同時に培地へ加えて、分裂期のリン酸化体を標識した。M 期において H1 は 7 つのピークに分かれ、MI, MII, MIII, MIV, MV, X, Y, とそれぞれ命名した(図3-B)。 ^3H のピークと ^{32}P のピークは MII を除いて重なっており、MII 以外の H1 はすべてリン酸化されていた。対数増殖期の小成分との対応を調べるために、 ^{14}C —リジンで標識した対数増殖期細胞の H1 標品と混合し、クロマトグラフィーを行った(図3-C)。分画 MI, MII, MIII, MIV,

MV はそれぞれ小成分 I, II, III, IV, V とやや前方のほぼ一致する位置に溶出されていた。したがって、MI, MII, MIII, MIV, MV はそれぞれ、小成分 I, II, III, IV, V のリン酸化体であると考えた。分画 X と Y は M 期に特有であった。分画 X に含まれるたん白質は、SDS-PAGE において 2 本のバンドとなり、小成分 I, II, III と同じ移動度を示した。また分画 Y に含まれるたん白質は 1 本のバンドとなり、小成分 IV, V と同じ移動度であった。さらに分画 X および Y の $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ 値が MI, MII, MIII, MV の約 2 倍と高いこと、カラムからの溶出位置などから、分画 X は小成分 I, II の高リン酸化体、分画 Y は小成分 IV, V の高リン酸化体であると結論した。このように、M 期に特有の高リン酸化体 H1 を分離することができた。

3. 二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるヒストン H1 小成分のリン酸化の解析

前述のように、カラムクロマトグラフィーによる解析では、高リン酸化体相互の交雑があり、細かな解析が困難であった。そこで、二次元-PAGE による解析を行い、高リン酸化体小成分相互、および高リン酸化体と低リン酸化体小成分の分離を試みた。

一次元目として、酢酸-尿素 PAGE を行った。この系において、リン酸化された H1 は泳動が遅れ、その遅れの大きさはリン酸化の程度に依存する。二次元目としてトライトン X 100 を加えた pH 4.5-PAGE を行った。pH 4.5 の系へトライトン X 100 を加えることで、L5178Y 細胞の H1 を 4 本のバンドに分離できた。クロマトグラフで分画した小成分と対応させると、泳動の早い順に小成分 III, I, II, IV+V であった。

対数増殖期の細胞およびコルセミド処理を 4.5 時間行った細胞から H1 を抽出し、各々、H1 を二次元 PAGE で分離した(図4)。対数増殖期の H1 と比べると、M 期の H1 は一次元目方向で泳動の遅れがあった。特に小成分 II と IV+V で泳動の大きな遅れが認められた。このことは、小成分 II と IV+V は他の小成分に比して、高リン酸化体を含むことを示唆していた。小成分 I と II は、2 つのスポット、Ia と Ib, IIa と IIb に各々分離した。Ib, IIb は各々小成分 I, II の高リン酸化体と思われた。

酢酸-尿素 PAGE によると、H1 のリン酸化の程度と泳動の遅れとは比例する。図4で分離した、各小成分のバンドの位置および拡がりから、各小成分の分裂期におけるリン酸化の程度とその拡がり求めた。すると、Ia = 1 ~ 2 (リン酸残基数(モル)/H1(モル)), Ib = 3 ~ 4, IIa = 2 ~ 3, IIb = 5 ~ 6, 小成分 III = 1 ~ 2, IV+V = 2 ~ 6 となった。

^3H —リジンで 3 世代以上、 ^{32}P —正リン酸で 1 世

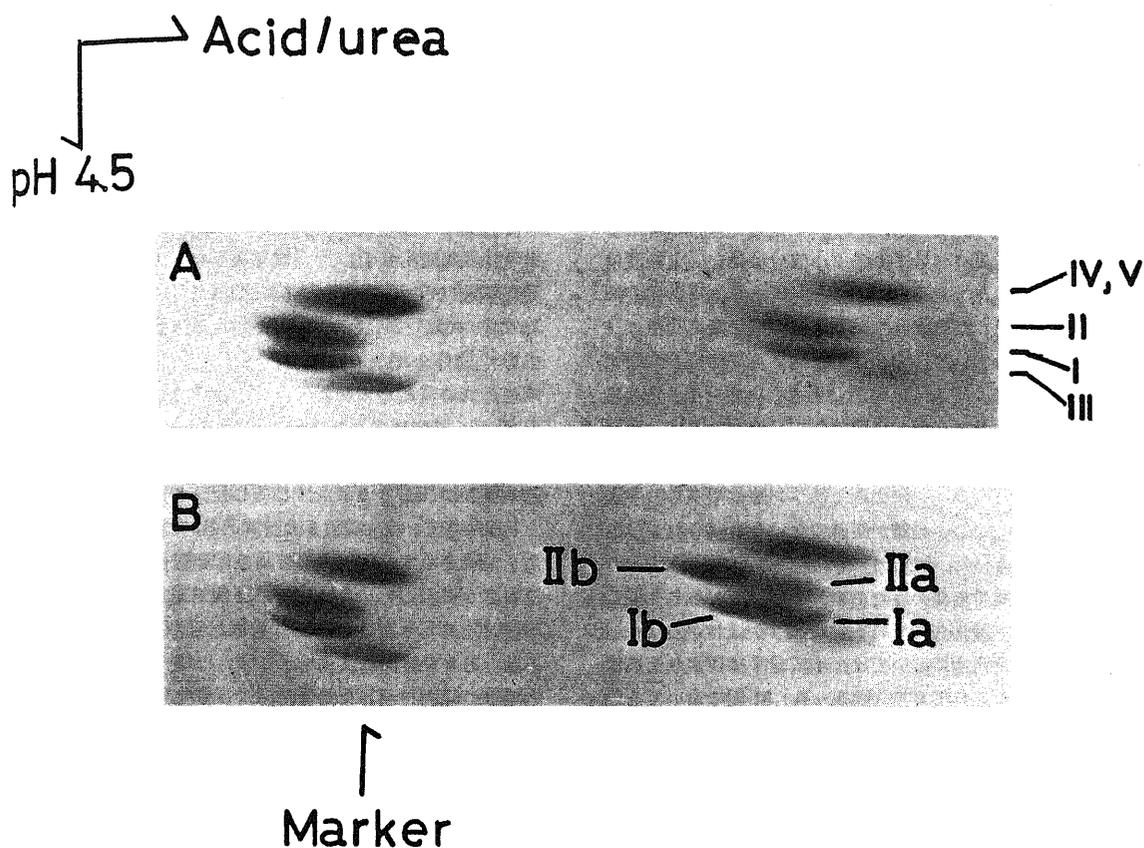


Fig. 4. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

First dimension gel electrophoresis was on a disc gel containing Acid/Urea. Second dimension one was on a slab gel as described in Materials and Methods. H1 was extracted from fraction C. The gel was stained by CBB R250. A) H1 extracted from exponentially growing cells. Roman numerals correspond with subtypes shown in Figure 3-A. B) H1 from mitotic cells treated with colcemid during 4.5 hrs (mitotic index, 60%).

Table 2. The degree of phosphorylation of H1 subtypes

H1 from	H1 Subtypes					
	I		II		III	IV/V
Exponential cells*	0.7, 0.8		1.8, 1.8		0.5, 0.5	1.6, 1.2
Mitotic cells†	Ia	Ib	IIa	IIb	III	IV/V
	1.8 (±0.39)	2.7 (±0.26)	2.4 (±0.14)	6.0 (±0.68)	1.2 (±0.38)	3.5 (±0.78)

Phosphate (mole)/H1 (mole)

H1 extracted from fraction C was separated into subtypes by two-dimensional PAGE as shown in Figure 4. [³²P]-orthophosphate was added to the medium one generation period before harvest (exponentially growing cells) or excess thymidine treatment (mitotic cells). Values are indicated as phosphate residues (mole)/ H1 (mole).

* Values from two independent experiments are shown.

† Mean values were calculated from 4 experiments. The numbers in parentheses show the standard deviations.

代以上、たん白質とリン酸化体を二重標識した。電気泳動後、各スポットを切り取って、 ^3H と ^{32}P の放射活性を測定し、H1 1分子あたりのリン酸残基数を求めた。表2に対数増殖期とM期における、H1小成分のリン酸化の程度を示した。対数増殖期において、各小成分は各々異なった程度にリン酸化されており、リン酸化の受け易さは小成分II>IV+V>I>IIIの順であった。M期においても各々小成分は異なった程度にリン酸化されており、小成分II>IV+V>I>IIIの順で高度にリン酸化されていた。対数増殖期に高度にリン酸化されている小成分は、M期にも高度にリン酸化されていた。またIb, IIbは各々、小成分I, IIの高分子型であった。小成分IV+Vのバンドは一次元目方向に、泳動の早い成分から遅い成分まで存在しており、やはり高分子型と低分子型があると思われる。しかし、分離が明確でないため、これを二つに分けなかった。小成分IVとVがこの二次元PAGEの系では分離できなかったため、それらがどちらも同じ程度にリン酸化されているのかどうかはわからなかった。対数増殖期においては、小成分VはIVよりも高度にリン酸化されており(図3-A)M期においても両者は異なる程度にリン酸化されているのではないかと推測された。

また二次元PAGEの一次元目方向の泳動位置から求めたリン酸化の程度(前述)は、Ibを除いて表2とほぼ一致した。一次元目方向の泳動の遅れから求めたIbのリン酸化の程度は、表2の値より大きく、一致しなかった。不一致の原因はよくわからないが、次のようなことを可能性として上げられる。1)分子種によっては、リン酸化の程度と泳動の遅れとが比例しないこともある。2)小成分Iは、さらに2種の小成分より成り、各々の酢酸-尿素PAGEにおける原点が異なる。

4. 分裂期におけるリン酸化の動態

コルセミド添加後、H1のリン酸化体が蓄積してくる(図2)が、小成分によって蓄積に差があるかどうか検討した。コルセミド添加後、時間を追って細胞を分取し、H1を抽出した。二次元PAGEで展開し、以下、表2の結果を得た方法に従って、各時刻におけるリン酸化の程度を求めた。図5に、各時刻の各小成分のリン酸化の程度を示した。2つのスポットに分離した小成分については、その平均値で示した。各小成分とも、M期細胞の増加につれて、リン酸化体の蓄積が見られた。それらの増加は、各小成分ともほぼ直線的で、コルセミド添加4.5時間後には、増加がほとんど見られなくなった。しかし、分裂期細胞の増加はこの時点でまだ続いており、リン酸化反応は、分裂期に入

る直前には終了すると考えた。また、リン酸化反応は、各小成分ともほぼ同時に開始されると判断した。

コルセミド添加2時間後には、IIaとIIbの2つのスポットが見られた。IIaとIIbの存在量比は、コルセミド添加3時間後で、IIa:IIb=0.64:0.36、5時間後で、0.44:0.56であり、M期細胞の増加につれてIIbが増加していた。しかし、IIa, IIb各々のリン酸化の程度は変化せず、同じ値であった。IaとIbは、3時間後から観察され4.5時間後の存在量比は、Ia:Ib=1:2であった。Ia, IIaは、各々Ib, IIbへの中間体と考えられたが、全てのIa, IIaが中間体かどうかはわからなかった。一部はM期においても、低リン酸化体のままとどまっているかもしれない。

次に、リン酸化反応速度を調べた。たん白質は、前述のように ^3H -リジンで標識した。さらに、コルセミド添加後0, 1, 2, 3.5時間の各時点で、 ^{32}P -正リン酸を培地へ加え、1時間後に細胞を集めた。前述のようにH1を分離し、 $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ 値を求めた(図6)。単位時間あたりおよびたん白量あたりの ^{32}P のとり込みは、あまり経時的変化を示さず、ほぼ一定ない少し増加の傾向を示した。また、リン酸化の程度の高い小成分II, IV+Vは高い値を示した。また同時に、培地中のリン酸濃度を定量したところ、コルセミド処理

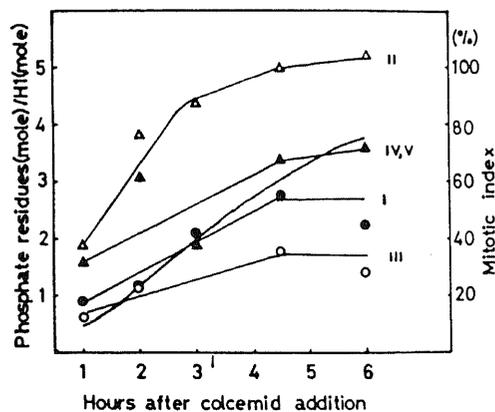


Fig. 5. The accumulation of phosphorylated H1 subtypes during colcemid treatment. Each of H1 subtypes was prepared by two-dimensional PAGE. The degrees of phosphorylation of subtype I (closed circle), subtype II (open triangle), subtype III (open circle) and subtype IV/V (closed triangle) were determined. ^3H -lysine was added to the medium 3 generation periods before excess thymidine treatment. ^{32}P -orthophosphate was added to the medium one generation time before the excess thymidine treatment. A solid line indicates the population of mitotic cells.

期間内では一定の値であった。

以上の測定はみかけ上のものであり、コルセミド処理を行っている期間内のリン酸化が脱リン酸化を伴っているかどうか検討した。 $[^{32}\text{P}]$ -正リン酸を、コルセミド処理1時間後から1時間培地へ加えてリン酸化体を標識した後、細胞を、コルセミドを含み $[^{32}\text{P}]$ -正リン酸を含まない培地へ移した。時間を追って細胞を分取し、全ヒストン分画を抽出し、H1をSDS-PAGEにて分離した。図7に、たん白質量あたりの ^{32}P 放射活性を示した。比活性は減少せず一定の値となり、脱リン酸化は観察されなかった。しかし、コルセミド処理が5時間となった時点で、比活性の低下が見られ、リン酸残基の脱リン酸化が観察された。しかし、リン酸化の程度は低下してはず、リン酸残基の代謝回転がおきると判断した。前述のように、コルセミド処理が長時間に及ぶと、細胞に不可逆的な損傷がおこる。したがって、この時点で観察される脱リン酸化は、そのような不可逆的变化に対応したものかもしれない。

5. H1リン酸化酵素の活性変化とH1リン酸化体の蓄積

H1リン酸化酵素の活性変化とH1リン酸化体蓄積

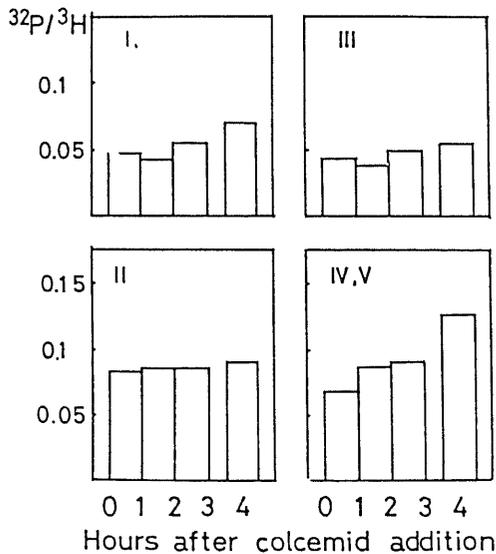


Fig. 6. Incorporation rate of ^{32}P into each H1 subtype.

Each H1 subtype was prepared by two-dimensional PAGE. Mitotic indexes were 12.5%, 32.5%, 62.5% and 75.3% at 1 hr, 2 hrs, 3.5 hrs and 5 hrs after colcemid addition. $[^{32}\text{P}]$ -orthophosphate was added to the medium at 1 hr before harvest. $[^3\text{H}]$ -lysine was added to the medium as shown in the legend to Figure 5.

の関連について検討した。コルセミド添加後、時間をおいて細胞を分取し、細胞質分画 (SUP I) とクロマチン結合性たん白質分画 (SUP II) に分け、各々の分画のたん白質リン酸化酵素の活性を測定した (図8)。SUP Iの活性は低く、また経時変化をほとんど示さなかった。SUP IIでは、コルセミド添加後、H1リン酸化酵素活性が急激に上昇し、3時間後に6倍となった。4.5時間後にはいくらか減少すると思われた。分裂期細胞はコルセミド添加4.5時間後にはまだ増加しており、H1リン酸化酵素の活性はH1リン酸化体の蓄積と同様な変化を示していた。また、cAMP依存性はほとんどなかった。コアヒストンを基質として加えた場合、および他のたん白質を加えずSUP IIに含まれるノンヒストンたん白質のみを基質として用いた場合には、SUP II中のたん白質リン酸化酵素の活性はほとんど一定であった。したがって、H1に高い特異性をもつ酵素であることがわかった。H1がリン酸化されていることは、反応後、たん白質をSDS-PAGEで分離し、オートラジオグラフィを行って確かめた。 ^{32}P の放射活性のほとんどはH1のバンドの位置に検出された。

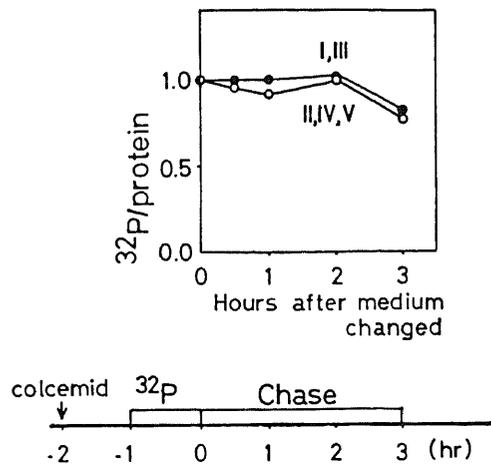


Fig. 7. Dephosphorylation of phosphate residues in H1 during colcemid treatment.

Cells were labeled with $[^{32}\text{P}]$ -orthophosphate from 1 hr to 2 hrs after colcemid addition. Then cells were transferred to the radioisotope free medium containing colcemid, and harvested at the time as indicated. H1 was resolved into two bands, that is subtype I/III, IV/V/II in the order of mobilities on SDS-PAGE. Proteins were determined from densitometric tracing. The relative value of ^{32}P to protein are plotted as a standard at time=0.

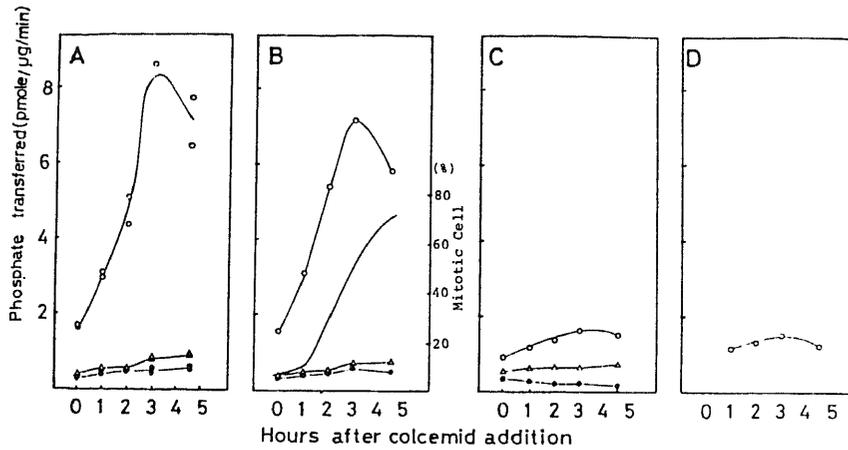


Fig. 8. Protein kinase activity during colcemid treatment.

Protein kinase activities in cytoplasmic fraction (Panel C and D) or chromosomal protein fraction (Panel A and B) were assayed with (Panel A and C) or without (Panel B and D) cAMP. H1 (open circle), core histones (triangle) or endogeneous proteins (closed circle) were used as substrates. A solid line in Panel B indicates the population of mitotic cells.

考 察

L5178Y細胞の5種のヒストンH1小成分は、対数増殖期において、各々異なる程度のリン酸化をされていた。クロマトグラフィによる解析結果では、小成分V~II>I>IV>IIIの順で高度にリン酸化されていた。一方、二次元PAGEの結果では、小成分II>IV+V>I>IIIの順で高度にリン酸化されていた。クロマトグラフィの結果の小成分IVとVの平均値を考えると、二次元PAGEの結果はクロマトグラフィの結果に一致した。実験方法の容易さと感度の点から、本研究では主たる方法として二次元PAGEを採用したが、この方法でも充分解析できることが判明した。

対数増殖期のリン酸化の程度は、G1期-S期-G2期-M期、各時期のリン酸化の程度の平均値と考えられる。L5178Y細胞は対数増殖期において、G1期=15%、S期=60%強、G2期=15%、M期=7%の分布をしており、平均値はS期のリン酸化の程度に近いと推定される。染色体凝集に伴うリン酸化と、他の時期のリン酸化は細胞核内の事象としては無関係なように思える。例えば、S期のリン酸化は、DNA複製に伴うクロマチン構造のゆるみ(unfolding)と関係すると考えられ、M期では一義的にクロマチンの凝集が起こることを考えると、クロマチン高次構造の変化は互いに逆の方向になる。しかし、細胞核内事象との表面的な対応関係が知られているのみで、分子レベルで見た場合H1のリン酸化がどのような効果をもたらすかは

不明である。対数増殖期においてリン酸化の程度の高い小成分は、M期においてもやはり高い程度にリン酸化されていたこと、M期におけるリン酸化の程度は各小成分とも対数増殖期における値の約3倍で、だいたい同じ程度の倍率でリン酸化が促進していたことがわかった。これらのことは、M期におけるリン酸化と他の時期のリン酸化は、基本的には同一傾向の効果を示し、同じ制御機構が働いていることを示すと思える。また、対数増殖期においてもM期においても、各小成分が各々異なる程度にリン酸化されていたことは、リン酸化を通してみた各小成分の機能には差異のあることを示している。

M期において、小成分のリン酸化の程度には各々分布の拡がりがあった。小成分IIとIV+Vにおいては、小成分II=2~6(リン酸残基数(モル)/H1(モル))、IV+V=2~6の広い拡がりを見せた。コルセミド添加1時間後には、小成分IIとIV+Vでこの分布の拡がりが見られ、分裂期細胞の増加に伴い、低リン酸化体成分が減少し、高いリン酸化体成分が増加していた。したがって、リン酸化は除々に起こるのではなく、極めて短期間で低リン酸化体から高リン酸化体への移行がなされると考えられる。図5にみられる小成分のリン酸化程度の上昇は、この高リン酸化体の割合の増加によっている。コルセミド添加4.5時間後にもみられる、このような分布の拡がり、ひとつにはM期細胞の割合が低い(60%)という技術的な側面の不完全さによることも否めない。しかし小成分VI+Vの拡がり

は、小成分IVあるいはVの片方が低リン酸化体、片方が高リン酸化体となっていることによるかもしれない。IIaはすべてが分裂期細胞となった時点では、終局的にはIIbへ移行するものと考えている。

L5178Y細胞のH1小成分は、高リン酸化型小成分と低リン酸化型小成分の2種に大別される。高リン酸化型は小成分IIとIV+Vで、高リン酸化体(4リン酸残基数(モル)/H1(モル))を含み、低リン酸化型は小成分IとIIIである。高リン酸化体を形成する分子は、コルセミド添加4.5時間後において、小成分IV+Vの半数と全IIbとして計算すると、全H1分子の20%となる。

SDS-PAGEにおける移動度で比較すると、高リン酸化型小成分は低リン酸化型小成分よりも移動度が遅かった。他の細胞を用いた研究でも同様のことがみられる。Ajiroら²¹⁾はHeLa細胞の2種のH1、H1-AとH1-Bについて、H1-Aは低リン酸化体、H1-Bは高リン酸化体と報告している。H1-AはSDS-PAGEにおける泳動がH1-Bよりも早い。また、CHO細胞のH1小成分I、IIについても同様のことがいえる²⁰⁾。さらにもうひとつの共通点として、L5178Y細胞、HeLa細胞¹⁹⁾、CHO細胞²⁰⁾の高リン酸化型小成分は、いずれもバリン含量が低いことが上げられる。また、ラット肝部分切除後の再生時におけるH1小成分のリン酸化について同様のことがいえる²⁷⁾。ラット肝臓のH1は4種の小成分より成り、肝再生中のDNA合成時にH1はリン酸化される。この時、小成分IIIは最も高度にリン酸化され、この小成分IIIはSDS-PAGEにおいて遅く泳動され、バリン含量の少ないH1である。このように、生物種、細胞の種類によらない共通の特長が、高リン酸化型小成分にはあることがわかった。

Coleら¹²⁾¹³⁾は、ウサギ胸腺の4種のH1小成分において、環状スーパーコイルDNAや直線DNAと最も強く相互作用するのは、小成分RTL-3であると報告している。また、仔牛胸腺の3種のH1小成分について、ヌクレオゾーム2量体、環状スーパーコイルや直線DNAの円偏光二色性スペクトルのゆがみに対して、小成分CTL-3が最も強い影響力をもつ¹⁴⁾¹⁵⁾と報告している。これらの小成分RTL-3とCTL-3は、SDS-PAGEで遅く泳動され、バリン含量の少ないH1である。SDS-PAGEで遅く泳動され、バリン含量の少ない小成分がDNAやヌクレオゾームと強く相互作用すること、そのような小成分のリン酸化の程度が高いこととはなにか関連があるかもしれない。

H1をリン酸化する酵素(Histone Kinase)として報告されているタンパク質リン酸化酵素がいくつかある。ひとつはクロマチン結合性、cAMP非依存性で、

増殖関連型(growth-associated)ヒストンリン酸化酵素と名づけられた酵素である。また、I型とII型のcAMP依存性タンパク質リン酸化酵素(EC.2.7.1.37)がある。Lakeら²⁸⁾や、Zeiligら²⁹⁾はcAMP非依存性、クロマチン結合性の酵素活性がM期に上昇することを報告した。また、cAMP依存性の酵素活性がM期、およびS期に上昇することが、CHO細胞³⁰⁾、Leydig I-10細胞³¹⁾で観察されている。図8に示したように、L5178Y細胞では、cAMP非依存性の酵素活性が、クロマチン結合性タンパク質分画で上昇した。ここで観察された活性は、増殖関連型ヒストンリン酸化酵素と同じ種類の酵素活性と思われた。これらの結果は、Lakeら²⁸⁾や、Zeiligら²⁹⁾の結果と一致する。

またコルセミド添加3時間後に、タンパク質リン酸化酵素の活性は最大となり、以後、多少減少する。H1リン酸化体の蓄積はコルセミド添加4.5時間後にはほぼ終了していた。一方3時間後、4.5時間後の時点ではM期細胞数はまだ増加していた。これらのことから、酵素活性はM期以前に高まり、続いてH1がリン酸化され、M期に入るまでにリン酸化は終了すると考えた。細胞がM期に入り、長時間M期に止められるとリン酸化酵素の活性は低下すると思われる。

タンパク質リン酸化酵素の活性が、*in vitro*での測定で6倍の上昇をみせたにもかかわらず、図5で示されたように、リン酸化速度はあまり経時的変化をみせなかった。脱リン酸化はみられず(図7)、脱リン酸化では説明されなかった。これは、H1のリン酸化について、クロマチンの凝集が段階的に進行し、基質としてのH1の有効性が減少しリン酸化反応が抑制され、より大量の酵素を必要とするためかもしれない。

以上を総括すると、細胞が分裂期へ進入する際に、その前段階としてクロマチンの凝集が起こり、その引き金的な役割としてH1のリン酸化を伴う。それは短期間におこり、クロマチンの凝集をひきおこしながら、同時にH1のリン酸化も進行すると結論できる。

結 論

1. L5178Y細胞の5種のヒストンH1小成分は対数増殖期の細胞で、各々異なる程度にリン酸化されている。

2. それらは細胞分裂期においても、各々異なる程度のリン酸化をされている。

3. 各小成分のリン酸化の程度が各々異なることは、小成分がリン酸化からみた機能的差異をもつことを示唆する。

4. 高リン酸化体となるH1小成分には、生物種、細胞種の違いによらない共通の特長があった。

5. リン酸化は分裂期に入る直前には終了し、H1のリン酸化に伴って、クロマチンの凝集が徐々に進むらしい。

謝 辞

終わりに、御指導、御助言をいただきました、金沢大学薬学部生物薬品化学教室・大場義樹教授、倉科喜一助教授に感謝いたします。また、御助言、御校閲をいただきました、金沢大学がん研究所分子生物部・亀山忠典教授に感謝いたします。また、足立博一修士、日暮雅夫技官、小川千恵子学士はじめ、いろいろな御世話になりました生物薬品化学教室の皆様へ感謝いたします。

文 献

- 1) McGhee, J. D. & Felsenfeld, G.: Nucleosome structure., *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 1115-1156 (1980).
- 2) Igo-Kemenes, T., Hörz, W. & Zachau, H. G.: Chromatin., *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 89-121 (1982).
- 3) Hohman, P.: The H1 class histone and diversity in chromosomal structure., *Sub. Cellular Biochem.*, **5**, 87-127 (1979).
- 4) Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S. & Tobey, R. R.: Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in chinese hamster cells., *Eur. J. Biochem.*, **84**, 1-15 (1987).
- 5) Ajiro, K., Borun, T. W. & Cohen, L. H.: Phosphorylation states of different Histone 1 subtypes and their relationship to chromatin functions during the HeLa S-3 cell cycle., *Biochemistry*, **20**, 1445-1451 (1981).
- 6) Bradbury, E. M., Inglis, R. J., Matthews, H. R. & Langan, T. A.: Molecular basis of control of mitotic cell division in eucaryotes., *Nature*, **249**, 553-556 (1974).
- 7) Lennox, R. W. & Cohen, L. H.: The histone H1 complements of dividing and nondividing cells of the mouse., *J. Biol. Chem.*, **258**, 262-268 (1983).
- 8) Robert, J. A., Donald, R. S. & Paul, R. G.: The programmed switch in lysine-rich histone synthesis at gastrulation., *Cell*, **9**, 171-178 (1976).
- 9) Brandt, W. F., Strickland, M., Carlisle, L., Woods, D. & Holt, C. V.: A histone programme during the life cycle of the sea urchin., *Eur. J. Biochem.*, **94**, 1-10 (1979).
- 10) Imoh, H.: Changes in H1 histone during development of newt embryos., *Exp. Cell Res.*, **108**, 57-62 (1977).
- 11) Smerdon, M. J. & Isenberg, I.: Interactions between the subfractions of calf thymus H1 and nonhistone proteins HMG 1 and 2., *Biochemistry*, **15**, 4242-4247 (1976).
- 12) Welch, S. L. & Cole, R. D.: Differences between subfractions of H1 histone in their interaction. Circular dichroism and viscosity., *J. Biol. Chem.*, **254**, 662-665 (1979).
- 13) Welch, S. L. & Cole, R. D.: Differences among subfractions of H1 histone in retention of linear and superhelical DNA on filters., *J. Biol. Chem.*, **255**, 4516-4518 (1980).
- 14) Liao, L. W. & Cole, R. D.: Differences among subfractions of H1 histone in their interactions with linear and superhelical DNA., *J. Biol. Chem.*, **256**, 6751-6755 (1981).
- 15) Liao, L. W. & Cole, R. D.: Condensation of dinucleosomes by individual subfractions of H1 histone., *J. Biol. Chem.*, **256**, 10124-10128 (1981).
- 16) Ajiro, K., Borun, T. W., Shulman, S. D., MacFadden, G. M. & Cohen, L. H.: Comparison of the structures of human histone 1A and 1B and their intramolecular phosphorylation sites during the HeLa S-3 cell cycle., *Biochemistry*, **20**, 1454-1464 (1981).
- 17) 黒田行昭: 動物組織培養法, 第14章, 共立出版, 東京 (1974).
- 18) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 19) Kinkade, J. M., Jr. & Cole, R. D.: The resolution of four lysine-rich histone derived from calf thymus., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5790-5797 (1966).
- 20) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 21) Hardison, R. & Chalkley, R.: Polyacrylamide gel electrophoretic fractionation of histones., In Stein, G., Stein, J. & Kleinsmith, L. J. (eds.), *Methods in Cell Biology*, **17**, 235-251, Academic Press, New York (1978).
- 22) Kistler, W. S. & Geroch, M. E.: An unusual pattern of lysine-rich histone components is associated with spermatogenesis in rat testis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 378-384 (1975).

- 23) Langan, T. A.: Characterization of highly phosphorylated subcomponents of rat thymus H1 histone., *J. Biol. Chem.*, **257**, 14835-14846 (1982).
- 24) Hayashi, K., Matsutera, E. & Ohba, Y.: Theoretical consideration of the abnormal behavior of histones on sodium dodecylsulfate gel electrophoresis., *Biochim. Biophys. Acta*, **342**, 185-194 (1974).
- 25) Kinkade, J. M.: Qualitative species differences and quantitative tissue differences in the distribution of lysine-rich histone., *J. Biol. Chem.*, **224**, 3375-3386 (1969).
- 26) D'Anna, J. A., Gurley, L. R. & Becker, R. R.: Histones H1^a and H1^b are the same as CHO histones H1 (III) and H1 (IV): New features of H1^a phosphorylation during the cell cycle., *Biochemistry*, **20**, 4501-4505 (1981).
- 27) Ohba, Y., Higurashi, M. & Hayashi, Y.: Phosphorylation of H1 subtypes in regenerating rat liver., *J. Biol. Chem.*, in press.
- 28) Lake, R. S. & Salzman, N. P.: Occurrence and properties of a chromatin associated F1-histone phosphokinase in mitotic chinese hamster cells., *Biochemistry*, **11**, 4817-4826 (1972).
- 29) Zeilig, C. E. & Langan, T. A.: Studies on the mechanism of mitotic histone H1 kinase., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1372-1379 (1980).
- 30) Costa, M., Gerner, E. W. & Russell, D. H.: Cell cycle-specific activity of type I and type II cyclic adenosine 3': 5'-mono-phosphate dependent protein kinase in chinese hamster ovary cells., *J. Biol. Chem.*, **251**, 3313-3319 (1976).
- 31) Christensen, M., Schweppe, J. S. & Jungmann, R. A.: Cyclic AMP-dependent activity in subcellular fractions of synchronously growing Leydig I -10 cells., *Exp. Cell Res.*, **124**, 15-24 (1979).

Phosphorylation of Histone H1 Subtypes of L5178Y Cells at Mitotic Phase Tohru Matsukawa, Department of Molecular Biology (Director: Prof. T. Kameyama), Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. J. J. Med. Soc.*, **93**, 291 - 303 (1984)

Key words: Histone H1 subtype, Phosphorylation, Mitotic phase

Abstract

The phosphorylation of histone H1 subtypes was analyzed in the present study by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and BioRex 70 column chromatography. H1 of L5178Y cells, a cultured mouse lympholeukemic cell strain, were separated into five subtypes. In exponentially growing cells, the degree of phosphorylation was different in each subtype. Subtype II was phosphorylated at the highest level, followed by subtype IV/V, I and III in this order. In mitotic phase, this degree of phosphorylation was also different in each subtype. Highly phosphorylated H1 subtype observed in exponentially growing cells showed a high level of phosphorylation also in mitotic phase. Phosphorylation started simultaneously among subtypes after colcemid addition, and phosphorylated H1 accumulated linearly. The incorporation rate of ³²P into each H1 subtype was almost constant during colcemid treatment. Within 4 hrs of colcemid addition, the phosphate residues in H1 did not turn over. The H1 kinase activity increased six times higher during colcemid treatment.