

И. А. КРАШЕНИННИКОВ, П. П. ГОРОЖАНИН, академик А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

ИЗУЧЕНИЕ ГИСТОНОВ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР *NEUROSPORA CRASSA*

К настоящему времени гистоны обнаружены в ядрах всех изученных животных и высших растений. Что касается организмов, стоящих на более низких ступенях развития, то вопрос о наличии или отсутствии у них белков, аналогичных гистонам, изучен еще совершенно недостаточно. Между тем, путем изучения свойств и функций ядерных белков у низших организмов можно было бы получить информацию о том, на каком этапе эволюции появились гистоны и каким образом осуществляется генетическая регуляция у организмов, которые в процессе своего развития претерпевают незначительную дифференцировку.

Бактерии, относящиеся к прокариотическим организмам, лишены гистонов (¹⁻³). Что же касается другой группы низших организмов — грибов, т. е. эукариотов, то вопрос о наличии гистонов у них остается спорным. Так, Штумм и ван Вент (⁴) сообщили об отсутствии гистонов у фикомицета *Allomyces arbuscula*, а Диведи и др. не удалось их выявить у *Neurospora crassa* (⁵). В то же время Тонино и Розийн (⁶) выявили в составе хроматина *Saccharomyces cerevisiae* белки, сходные с гистонами, а Моберг и Раш (⁷) выделили гистоны из ядер плазмодия *Physarum polycephalum*.

Настоящее сообщение посвящено изучению основных ядерных белков *Neurospora crassa*.

Материалом служил 18-часовой мицелий *N. crassa*, выращенный на синтетической среде (⁸). Для получения клеточных ядер применяли модифицированный нами метод Розийн и Тонино (⁶) с последующей очисткой препарата детергентами (¹⁰). Выделение рибосом проводили стандартными методами. Гистоны выделяли из ядер экстракцией 0,25*N* раствором HCl после предварительной многократной отмывки препарата 0,9% раствором NaCl при pH 5,6 в присутствии 0,05*M* бисульфита натрия. Гистоны получали также по методу Моберга и Раша (⁷), извлекая их из ядер 1*M* раствором CaCl₂ с последующим осаждением ТХУ и выделением гистонов из осадка при помощи 0,02*N* H₂SO₄. Из кислотных экстрактов гистоны осаждали ацетоном. Определение аминокислотного состава белков проводили при помощи автоматического аминокислотного анализатора. Триптофан определяли спектрофотометрически в негидролизованном белке (¹¹). Электрофорез препаратов в полиакриламидном геле проводили по методу Джонса (¹²).

Изучение состава препаратов изолированных ядер грибов показывает, что они характеризуются большим содержанием белка и РНК, причем содержание белка, в зависимости от организма и метода выделения ядер, превосходит содержание ДНК в 30—100 раз (^{9, 13, 14}). По нашим данным, до 60% ядерных белков приходится на фракцию глобулинов и РНП, извлекаемую 0,9% раствором NaCl, на долю же ДНП приходится только около 5% всех ядерных белков. Поэтому при выделении гистонов существует опасность некоторого загрязнения их основными рибосомальными белками. В связи с этим было приведено сравнительное изучение гистонов *N. crassa*, гистонов тимуса теленка и основных рибосомальных белков, выделенных из рибосом *N. crassa* экстракцией 0,25*N* раствором HCl.

Для выделения гистонов прежде всего была проведена прямая экстракция белков из изолированных клеточных ядер при помощи 0,25*N* HCl, как это нередко делается с целью извлечь гистоны (¹⁵). Белки, полученные при этом, по электрофоретическому поведению оказались идентичными основным рибосомальным белкам (см. рис. 1). Содержащиеся, очевидно, в

этом препарате гистоны не могли быть выявлены на электрофореграмме из-за громадного преобладания рибосомальных белков. Таким образом, белки, полученные прямой кислотной экстракцией, нельзя считать гистонами. Впоследствии, перед выделением гистонов, мы применяли многократную отмывку ядер слабым солевым раствором. Присутствие ионов бисульфита и подкисление до pH 5,6 являются, как известно, мерами, предотвращающими протеолиз гистонов в процессе выделения^(16, 17). При отмывке ядер без бисульфита, как и при недостаточной отмывке их, выделенные затем кислоторастворимые ядерные белки по электрофоретическим свойствам не отличались от основных белков рибосом.

Полученные препараты гистонов *N. crassa* составляли лишь 2—4% от суммы всех ядерных белков. Гистоны и ДНК в ядрах высших организмов присутствуют почти в равном весовом соотношении. Это характерно также для изученных грибов^(6, 7). Отношение гистонов к ДНК в полученных нами препаратах составляло 1,0 — 1,5. Электрофореграммы полученных препаратов представлены на рис. 1. По электрофоретической гетерогенности препараты гистонов резко отличаются от основных рибосомальных белков, но сходны с гистонами из тимуса телят. Можно отметить наличие 4—6 основных зон белков, из которых 3 наиболее интенсивны. При нанесении на гель большого количества белка (перегрузка геля) выявляется ряд минорных зон. Препараты, полученные одинаковыми методами, давали сходные электрофоретические картины, однако отмечались некоторые количественные различия в содержании отдельных фракций.

При проведении электрофоретического разделения препарата, выделенного при помощи CaCl_2 , было выявлено около 5 зон белков, из которых наиболее интенсивными являлись 2, в отличие от 5 интенсивных зон, выявленных у миксомицета⁽⁷⁾. По сравнению с препаратом кислоторастворимых гистонов *N. crassa*, этот препарат оказался менее гетерогенным при электрофорезе. Видимо, в нем содержится лишь часть фракций гистонов, экстрагируемых кислотой. Методом двойных гелей нам также удалось продемонстрировать значительное сходство электрофоретических свойств полученных нами препаратов и тимусных гистонов. Однако эти результаты не согласуются с данными Дживеди и др.⁽⁵⁾, которым не удалось обнаружить в хроматине *N. crassa* белков, сходных с гистонами тимуса телят. Это, видимо, может быть объяснено различиями в методах получения ядер.

Результаты изучения аминокислотного состава гистоновых белков, полученных из *N. crassa*, вместе с данными о гистонах дрожжей, представлены в табл. 1. Из нее видно большое сходство аминокислотного состава препаратов гистонов *N. crassa*, полученных двумя различными методами. Они характеризуются значительной основностью: отношение основных аминокислот к кислым (осн./кисл.) равно 1,1; она, однако, значительно меньше, чем у типичных гистонов, у которых отношение осн./кисл. составляет от 1,4 до 2,0. Как видно из данных, представленных в табл. 1, содержание таких аминокислот, как метионин, цистеин, триптофан, в гистонах *N. crassa* почти так же низко, как и в типичных гистонах высших ор-

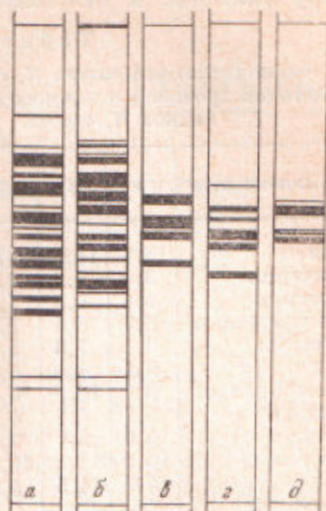


Рис. 1. Схемы электрофоретического разделения гистонов и рибосомальных белков в пол-акриламидном геле по методу Дюнса⁽¹²⁾. а — основные белки рибосом *N. crassa*; б — основные белки ядер *N. crassa*; в — гистоны тимуса телят; г — гистоны *N. crassa*; д — гистоны *N. crassa*, экстрагированные 0,25 N HCl; е — гистоны *N. crassa*, полученные экстракцией 1 M CaCl_2 .

ганизмов. По содержанию аланина, лейцинов и ароматических аминокислот гистоны *N. crassa* также сходны с типичными гистонами.

Нельзя не отметить очень большого сходства по аминокислотному составу гистонов и основных рибосомальных белков *N. crassa*. Вместе с тем, как явствует из табл. 1, по аминокислотному составу гистоны *N. crassa* очень сходны с гистонами дрожжей⁽⁶⁾ и слабоосновными хроматиновыми белками *N. crassa*, выделенными Дживеди и др.⁽⁵⁾. Последние были отнесены авторами к рибосомальным белкам на том основании, что при электрофоретическом разделении хроматиновых белков не было обнаружено зон, сходных с гистонами тимуса телят.

В своей работе, посвященной гистонам дрожжей, Тонино и Розийн⁽⁶⁾ предположили, что действительная основность этих белков может быть гораздо выше, если значительная часть дикарбоновых аминокислот находится в составе гистонов в форме амидов. Такое же предположение можно сделать и для препаратов, полученных нами: с одной стороны, при гидролизе этих белков отщепляется очень большое количество аммиака, что, несомненно, свидетельствует о наличии амидов дикарбоновых аминокислот, с другой — сходство электрофоретической подвижности этих гистонов и гистонов тимуса телят в принятых

Таблица 1
Аминокислотный состав *N. crassa*,
гистонов дрожжей и хромосомальных
белков *N. crassa*

Аминокислота	1	2	3	4
Лизин	10,6	11,6	10,8	10,0
Гистидин	3,6	3,0	2,4	2,7
Аргинин	6,4	6,0	7,4	7,3
Аспарагиновая	8,3	8,4	7,4	9,5
Треонин	6,1	7,3	5,9	6,7
Серин	8,1	8,2	8,4	7,2
Глютаминная	9,6	10,5	10,3	9,2
Пролин	5,7	6,2	4,1	4,9
Глицин	9,0	9,8	7,4	11,3
Аланин	10,5	12,5	10,1	8,9
Валин	5,7	4,5	5,7	6,2
Метионин	Сл.	Сл.	0,6	1,1
Изолейцин	4,2	3,4	5,8	4,2
Лейцин	7,0	5,5	8,5	6,0
Тирозин	2,1	1,4	2,7	1,8
Фенилаланин	2,6	1,7	2,6	2,8
Цистеин	0	0	0	0
Триптофан	0,6	—	0,5	—
Осн./кисл.	1,15	1,14	1,1	1,1

Примечание. 1 — препарат гистона *N. crassa*, полученный экстракцией HCl; 2 — препарат гистона *N. crassa*, полученный экстракцией CaCl₂; 3 — нефракционированный препарат гистонов дрожжей⁽⁶⁾; 4 — хромосомальные белки *N. crassa*⁽⁸⁾.

условиях электрофореза (рН 2,4) говорит о том, что истинная основность выделенных белков выше, чем это следует из результатов анализа аминокислотного состава суммарного препарата.

Резюмируя представленные в данной работе результаты, а также данные других исследований, проведенных в этом же направлении, следует сделать вывод о наличии у таких низших организмов, как грибы, белков типа гистонов. Они сходны с типичными гистонами по экстракционным и электрофоретическим свойствам, а также по весовому отношению к ДНК, но отличаются от них меньшей основностью и несколько большей гетерогенностью.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
5 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 A. N. Belozersky, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., N. Y., 12, 1 (1947).
- 2 A. H. Белоцерский, С. О. Урысон, Биохимия, 23, 568 (1958).
- 3 M. H. F. Wilkins, G. Zubay, J. Biophys. and Biochem. Cytol., 5, 55 (1959).
- 4 C. Stumm, J. L. van Went, Experientia, 24, 1112 (1968).
- 5 R. S. Dwivedi, S. K. Dutta, D. P. Bloch, J. Cell Biol., 43, 51 (1969).
- 6 G. J. M. Tonino, T. H. Rozijn, Biochim. et biophys. acta, 124, 427 (1966).
- 7 J. Mohberg, H. P. Rusch, Arch. Biochem. and Biophys., 134, 577 (1969).
- 8 И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников, Н. К. Кокурина, Биохимия, 31, 850 (1966).
- 9 Т. Н. Розийн, Г. Дж. М. Тонино, Биохим. et biophys. acta, 91, 105 (1964).
- 10 S. Penman, J. Mol. Biol., 17, 117 (1966).
- 11 G. H. Beaven, E. R. Holiday, Adv. Prot. Chem., 7, 319 (1952).
- 12 E. W. Johns, Biochem. J., 92, 55 (1967).
- 13 И. С. Кулаев, И. А. Крашенинников, В. Ю. Поляков, II Симпозиум по структуре и функции клеточного ядра, Рига, 1968.
- 14 J. H. Duffus, Biochim. et biophys. acta, 195, 230 (1969).
- 15 G. E. Stone, J. Cell Biol., 40, 837 (1969).
- 16 S. Panyim, R. Chalkley, Arch. Biochem. and Biophys., 130, 337 (1969).
- 17 A. L. Dounce, R. Ickowicz, Arch. Biochem. and Biophys., 131, 210 (1969).