

祖先的渦鞭毛虫の核タンパク質と染色体

福田 康弘, 洲崎 敏伸 (神戸大・院理・生物)

Analyses of nuclear proteins and chromosome structure of ancestral dinoflagellates.

Yasuhiro FUKUDA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Dinoflagellates are one of the most famous groups of protozoa because of the unique characteristics of the nucleus. Their chromosomes are permanently condensed throughout the cell cycle and do not contain typical eukaryotic nuclear proteins such as histones. In addition, the typical eukaryotic chromatin structure, the so-called “beads-on-a-string apparatus”, cannot be observed in chromatin spreads made from isolated nuclei of dinoflagellates. Previously, dinoflagellates were considered to be the most primitive eukaryotes, and such a chromatin structure was regarded as a primitive feature of the eukaryotic nucleus. However, many molecular phylogenetic analyses have clearly shown that dinoflagellates recently branched from the eukaryote lineage, and that they secondarily lost the eukaryotic nuclear features. Previous studies have reported the presence of six major basic proteins of low molecular weight (14–17 kDa) and two higher molecular weight proteins (45 and 50 kDa) in core dinoflagellates. On the contrary, only one 23-kDa basic protein, namely Np23, was identified from the ancestral dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. Np23 was reported to be localized in the chromosome-like structures in the nucleus, but there was no further characterization. In this study, to elucidate the molecular architecture of the dinoflagellate chromosome, we focused on the relationship between Np23 chromosomal protein and DNA in *O. marina*.

【背景】 遺伝子とは、細胞が生命活動を営むために必要な要素の設計図であり、細胞の核は、それら様々な設計図を収める引き出しと言える。設計図である遺伝子は、状況に応じて高度に制御され発現している。この遺伝子の制御へ深く関わるタンパク質がヒストンタンパク質ファミリーである。また、ヒストンタンパク質ファミリーは、遺伝子発現の制御のみならず、染色体の基本構造であるクロマチンを形成するタンパク質でもある。また、ヒストンタンパク質と相似なアミノ酸配列を持つ塩基性タンパク質が原核生物である古細菌から発見されているが、これらの塩基性タンパク質もDNAと結合し、原核生物のヌクレオソーム様の構造形成へ関与している。これらの事実は、ヒストンタンパク質が真核生物の出現より以前から存在し、細胞の生命活動に常に深くかかわってきた事を強く示唆している。しかし、渦鞭毛虫はこのヒストンタンパク質を持たない、唯一の例外的な真核生物である。

原生動物渦鞭毛虫は、二次的にヒストンタンパク質を喪失したと考えられており、その染色体はヒストンタンパク質と異なる塩基性タンパク質による独自のヌクレオソーム構造によって形成され、細胞周

期全体を通して常に凝縮する。コア渦鞭毛虫の場合、少なくとも約14–17 kDaの低分子塩基性核タンパク質6種類と、約45 kDaと50 kDaの高分子核タンパク質2種類が確認され¹⁾、塩基性低分子核タンパク質(HCc2)が二量体を形成してDNAと結合し、DNAを高度に凝集する事が明らかにされている²⁾。一方、代表的な祖先的渦鞭毛虫であるオキシリス (*Oxyrrhis marina*) では、約23 kDaの塩基性タンパク質(Np23)が核で多量に存在し、染色体と考えられる核内構造物内部に局在している事が明らかになっている³⁾。しかし、オキシリスのNp23に関する報告はこの後に発表されていない。

本研究は、祖先的渦鞭毛虫であるオキシリスの核タンパク質を同定し、その染色体構造の解明をめざす。また、この研究は、真核生物でユニークな渦鞭毛虫出現へ至る進化のイベントを解き明かす事が最終的な目標である。

【材料と方法】 オキシリスは、f/2 培養液を用いて、緑藻 (*Dunaliella tertiolecta*) を餌として与え培養した。オキシリスの核は以下の手順にて単離した。1000 gで5分の遠心にて収集した細胞は、核単離緩衝

液 (NI Buffer: 0.6 M Sucrose, 20 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10% Glycerol, 25 mM HEPES-KOH pH 7.8) にて懸濁し最終密度 1×10^7 cells/mlへ調整した。細胞懸濁液へ界面活性剤Nonidet P-40を最終濃度 0.5% で加え、細胞を溶解した。細胞破碎液を3000 gで10分間の遠心し、細胞質夾雑物と核が含まれた不溶成分画を沈殿として回収した。回収した沈殿を洗うため、NI Bufferを最終量 1 mlになるように加え3000 Gで10分間遠心し、沈殿を回収した。洗浄した核/細胞質夾雑物が含まれる沈殿を300 μ lのNI Bufferへ再度懸濁し、1 mlのスクロース分画液 (2.2 M Sucrose, 0.1% Triton X-100) へ重層し、10,000 g, 10 minの遠心にて分画した。この遠心により、核は最下層の沈殿として分画された。この核の精製分画はNI Bufferで洗浄した後、核保存緩衝液 (0.5 M Sorbitol, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 50 % Glycerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.6) に懸濁し、解析を行うまで-20°Cにて保存した。

核タンパク質解析のため、単離した核をタンパク可溶化緩衝液 (10% SDS, 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, 2.5 M Tris-HCl pH 6.8) へ懸濁し、-80°Cの凍結処理と95°Cで10分間の熱処理を行い、SDS-PAGEによって解析した。なお、タンパク質の検出は銀染色とCBB染色により行った。またタンパク質のN末端アミノ酸配列解析は、SDS-PAGE後にPVDFへ転写し、エドマン分解法により行った。

染色体構造の解析は、マイクロコッカスのDNaseを用いたゲル解析とDAPIによる核染色を用いた。単離した核をDNase酵素緩衝液 (1 mM CaCl₂, 0.35 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) へ懸濁し、0.1 Uと1 UのMicrococcal nucleaseを加え、37°Cで30分処理し、除タンパク処理とエタノール沈殿にてDNAを回収しアガロースゲル電気泳動で解析した。オキシリスの染色体観察は、細胞を3.7%ホルムアルデヒドで固定した後、最終濃度10 mg/mlのDAPIで30分染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

[結果と考察] スクロース分画液を用いた核の単離により、多くの核が含まれる核分画を得た。しかし、食胞に由来すると考えられる夾雑物の混入も少量あり、加えてスクロース分画液の上層に留まる核も多く存在する。より純度の高い、回収率のよい核分画を得るためには、核分画処理に用いるスクロース分画液の濃度や、スクロースにかわる分画剤の検討が必要である。SDS-PAGEによる解析の結果、存在が報告されている核タンパク質であるNp23を確認し

た。このNp23のN末端アミノ酸解析を行った結果、N末端は化学修飾されておらず、アミノ酸10残基の配列決定に成功した。この配列はN末端よりA-P-L-T-G/Q-D-I-Q-(S)-Vであった。また、Np23に続く主要な核タンパク質と考えられるバンドを2本検出した。これらは分子量約39 kDaと18 kDaに相当する。これらの核タンパク質に相似な分子量の核タンパク質はコア渦鞭毛虫で報告されておらず、この2種類のタンパク質は祖先的渦鞭毛虫独自の核タンパク質であると示唆される。

単離した核を用い、一般的なProteinase Kとフェノール処理によってDNAを抽出したが、ゲノムDNAの分解は見られず、染色体構造の破壊は生じていないと言えよう。一方、マイクロコッカスのDNaseを用いた酵素処理の結果、0.1 Uの酵素ではゲノムDNA一部が切断され高分子ゲノムDNAから伸びる均一なスミアが見られた。1 Uの酵素を用いた場合、ゲノムDNAは完全に切断されていた。典型的な真核生物の核では、同条件ではコアヒストンに巻き付くヌクレオソーム単位でのDNA切断がおこり、約170塩基対の倍数で形成されたはしご状の電気泳動パターンが観察される。また、コア渦鞭毛虫の染色体では、二価イオン (マグネシウムイオン) 濃度依存的に染色体構造が段階的に分解される事が確認されている。これらの結果をまとめると、オキシリスの染色体も、コア渦鞭毛虫の染色体が持つイオン反応性と極めて似た特性を示すのだろう。つまり、様々なマグネシウムイオン濃度下にてマイクロコッカスのDNase処理を行う事により、オキシリスのヌクレオソーム構造依存的なDNA分解を確認できる可能性がある。またDAPI観察の結果、核小体領域を除く核全体に分布して紡錘形を成す、コア渦鞭毛虫の染色体と極めて類似した形態の構造物を確認した。これはオキシリスの染色体と思われるが、従来の透過型電子顕微鏡観察では、オキシリスは典型的真核生物様の核を持つとされ、コア渦鞭毛虫特有の染色体構造は見られない。この観察結果の矛盾点は、細胞の固定法の差異に依存している可能性もある。

[文献]

- 1) M. Sala-Rovira et. al., *Chromosoma*, 1991, Vol. 100, 510-518.
- 2) Chan Y. H. and Wong J. T., *Nucleic Acids Res.*, 2007, Vol. 35 (8), 2573-2583.
- 3) Koichi H Kato et. al., *Biology of the Cell*, 1997, 89, 43-52.