

渦鞭毛虫の染色体構造解明に向けて: 新規染色体タンパク質 Np23 の同定と解析

福田 康弘^{1,2}, 洲崎 敏伸² (¹東北大学大学院 農学研究科 先端農学研究センター
環境システム生物学分野, ²神戸大学大学院 理学研究科 生物学専攻)

A novel nuclear protein Np23 from the ancestral dinoflagellate *Oxyrrhis marina*

Yasuhiro FUKUDA^{1,2} and Toshinobu SUZAKI¹

(¹Laboratory of Sustainable Environmental Biol., Department of Biodiversity Sci., Division of Biological Resource Sci., Graduate School of Agricultural Sci., Tohoku Univ., ²Laboratory of Sustainable Environmental Biology, Department of Biodiversity Science, Division of Biological Resource Sciences, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ.)

SUMMARY

Dinoflagellates are unusual eukaryotes because of their nuclear characteristics. Chromosomes in dinoflagellates are permanently condensed throughout the whole cell cycle. Moreover, not all histone proteins that are well conserved in eukaryotes are found in dinoflagellate nuclei. Some nuclear proteins were identified in previous studies, but no identified protein was located in their chromosomes. Therefore, its molecular structure remains unclear. To elucidate the architecture of dinoflagellate chromosomes, we specifically examined the nuclear protein, Np23, which is co-localized on chromosomes in the most ancestral dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. This study established a method for isolating the *Oxyrrhis* nucleus and obtained plural Np23 genes. Actually, Np23 comprises at least nine molecular species. Based on estimated amino acid sequences of all Np23, one bipartite nuclear localization signal located on the N terminal region, but other typical domains observed in other eukaryotic nuclear proteins were not found. Using BLASTN analyses, the amino acid sequences of Np23 proteins were shown to have homology to two proteins derived from typical dinoflagellates and to one protein derived from a virus. In conclusion, Np23 protein is a novel nuclear protein. Moreover, Np23 might be conserved among dinoflagellates; the protein might be derived via viral infection to the common ancestor of dinoflagellates.

[目的] 染色体の基本構造となるクロマチン繊維は、ヒストンタンパク質と DNA の複合体である。また、ヒストンタンパク質のアミノ酸修飾によって遺伝子発現が調節される。すなわち、ヒストンタンパク質は極めて重要な機能を担うタンパク質であり、ほぼ全ての真核生物で保存されている。原生動物渦鞭毛虫はこのヒストンタンパク質を二次的に喪失した唯一の真核生物であるが、この渦鞭毛虫の染色体を構成するタンパク質は未だ同定されていない (Rizzo, 1991)。本研究は、祖先的な渦鞭毛虫であるオキシリス (*Oxyrrhis marina*) において、今日までに唯一となる染色体との共局在が確認された塩基性核タンパク質 (Np23) (Kato et al., 1997) を同定し、ヒストンを欠く渦鞭毛虫の染色体構造の解明を目的とする。

[方法] Sucrose と超遠心を用いた典型的手法 (Rizzo and Nooden, 1973) を一部改変し、オキシリスから核を精製、単離した。単離した全核分画から SDS-PAGE によって Np23 タンパク質を分離した。分離した Np23 を用いた内部部分アミノ酸配列解析を行い、Np23 の部分アミノ酸配列を得た。決定した内部

アミノ酸配列から縮合プライマーを設計し、3'RACE と 5'RACE にて Np23 遺伝子の ORF 全長を含む部分塩基配列を決定した。

[結果] SDS-PAGE による解析では、Np23タンパク質は複数の分子種を含んでいる可能性が示唆されていた。遺伝子解析の結果、Np23 は、アミノ酸の欠失によって3グループに大別され、少なくとも9種以上の異なる分子種を含むタンパク質ファミリーを形成する事が明らかとなった。アミノ酸配列解析では、すべての Np23 分子種間において、N 末端領域と C 末端領域が強く保存され、配列内部に複数のリン酸化修飾予想部位が示された。また N 末端領域には、核移行シグナルと機能不明な繰り返し配列が含まれた。いずれの分子種にも塩基性アミノ酸が多く含まれ、推定 pI 値は平均 12 となり、Np23 が極めて強い塩基性のタンパク質である事が示された。また、推定分子量は最小の Type1b で約 13.8 kDa、最大の Type3a で約 14.7 kDa であった。BLASTN 解析では、典型的渦鞭毛虫ヘテロカプサ(A811U1_HETTR: *Heterocapsa triquetra*, A811Z6_HETRO: *H. rotundata*) の

機能未知タンパク質と高い相同性が示され、また褐藻に感染するウイルス (*Feldmannia species virus*) のゲノム配列とも相同性が示されたが、他に相同性を持つタンパク質配列は得られなかった。

[考察] Np23 の N 末端領域に核移行シグナルが存在する事、Np23 が高い pI 値を示す強塩基性タンパク質である事、また Np23 が染色体と共局在を示す事より、Np23 が DNA と相互作用してオキシリスの染色体を構成しているタンパク質であると強く示唆される。

Np23 の BLASTN 解析において、渦鞭毛虫類とウイルスに由来する配列の他に相同性を示すタンパク質が見いだされなかった点から、Np23 が全く新規のタンパク質であると言える。また、オキシリスの Np23 が、系統的に離れている典型的な渦鞭毛虫ヘテロカプサの配列と高い相同性を示した事は、Np23 が渦鞭毛虫内で広く保存される核タンパク質である可能性を示唆する。また、我々の行った MNase assay において、オキシリスと典型的な渦鞭毛虫のクロマチン繊維が同じ生化学的性質を持つ事が示された。これらの点を総合すると、渦鞭毛虫類では Np23 タンパク質と DNA によって染色体の基本単位であるクロマチン繊維が構成されていると考えられ、染色体のより高次な構造を決定する因子がオキシリスと典型的な渦鞭毛虫類で異なっており、この結

果として染色体の外形がオキシリスと典型的な渦鞭毛虫類で大きく異なるのだろう。

また、ウイルスゲノムの配列情報と Np23 が相同性を示す点も極めて示唆的である。このウイルスゲノムとの相同性から、渦鞭毛虫がヒストンを喪失してユニークな染色体構造を獲得した進化の過程を、我々は以下のように想定している。渦鞭毛虫の共通祖先において、Np23 の起源となったウイルスが感染し、ヒストンタンパク質とウイルスのタンパク質が置き換わってしまったのだろう。そして、この新たな染色体タンパク質の獲得が、従来では強く抑制される凝縮した染色体からの遺伝子発現を可能としたのではないか。

[文献]

- 1) K. H. KATO, A. MORIYAMA, P. HUITOREL, J. COS-SON, M. CACHON and H. SATO (1997) Isolation of the major basic nuclear protein and its localization on chromosomes of the dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*, *Biology of the Cell*, 89, 43-52.
- 2) P. J. RIZZO (1991) The Enigma of the Dinoflagellate Chromosome, *J. Protozool.*, 38(3), 246-252.
- 3) P. J. RIZZO and L. D. NOODEN (1973) Isolation and Chemical Composition of Dinoflagellate Nuclei, *J. Protozool.*, 20(5), 666-672.