

ハダカフタヒゲムシの染色体
——ヒストンに代わる核タンパク質の分離——*

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES
ON THE CHROMOSOME OF *OXYRRHIS*

加藤 宏 一¹⁾ 佐藤 英美²⁾
K. H. Kato H. Sato

A marine dinoflagellate, *Oxyrrhis marina* was cultured in our laboratory being fed with *E. coli*. Morphological and biochemical characters of their nucleus and chromosomes were studied. In interphase nucleus, polytene chromosomes were observed attached to the nuclear pore by their ends. On mitosis, they moved in a cluster to the equatorial zone within the nucleus, but did not form a typical equatorial plate. Several bundles of intranuclear microtubules which connect two nuclear pores at two opposite poles were observed. The nuclear division proceeded concomitant with the cytokinesis.

Nuclei were isolated by a modified method for other dinoflagellates (Rizzo, '73). Nuclear fraction was then processed for extraction of histones by ordinary method. protein components of the extract were analyzed on the SDS-PAGE. In comparison with histones of a sea urchin extracted by the same method, it was found that *Oxyrrhis* lacks histones which universally coexists with chromatin of the eukaryote. In place of typical histones, a characteristic basic protein was detected. Biochemical characters, function(s) and spatial distribution of this protein were examined. Classification of several dinoflagellata was discussed on the basis of chromatin constitution.

1) 名古屋市立大学教授 2) 長野大学

* 謝辞：この研究は平成4～5年度文部省科学研究補助金（一般研究C）、研究課題番号4640676（研究代表者：佐藤英美）の御援助によって行われた。厚く感謝申上げる。

これまでの研究の概要

渦鞭毛虫類 (Dinoflagellate) は、[1] 分裂周期の全期間を通じて染色体を有する [2] 核内有糸分裂を行う [3] 真核細胞に共通するヌクレオソーム構造を欠く [4] ヒストンを持たない 等の特徴を有し、原核細胞と真核細胞の両方の性質を合わせ持つ。この意味で、両生物群の中間に位置する独立の生物群 (mesokaryote) とみなされている(1)。しかしながらこの生物群は、細胞学的にも生態学的にもきわめて多様性に富んでおり(2)、系統分類学上の論議が多くなされている(3)。本研究に用いたハダカフタヒゲムシ (*Oxyrrhis marina* Dujardin) は、海産の渦鞭毛虫で完全に他養性であり、chloroplast, plastid や proplastid を持たず、光合成を行わない(4)。研究室内では、小型の繊毛虫・珪藻・酵母菌等を餌としたり、完全合成培地を用いても培養されているが、増殖過程や増殖条件が明らかでないため大量培養は出来ていない。また、接合から減数分裂にいたる有性生殖の過程を含む生活史全体も、未だ明らかにされていない。核内染色体の微細構造および有糸分裂の過程については、数編の論文が報告されている(4、5、6、7)。本種の染色体の特徴として、他の渦鞭毛虫に共通して見られる規則的な arched structure が見られず、全長にわたって 40nm のフィラメントの束がねじれた状態で詰まっていること、染色体の小片と思われる電子密度の高い小体が染色体とは離れて多数存在することが挙げられる。有糸分裂の過程については、ほとんどの渦鞭毛虫が3つの形式に分類されるが、本種はそのいずれにも属さない特異的な過程をとる(2、8)。最も特徴的な点は核内に微小管の束が形成されることである。この微小管束は、一部の核膜孔に分裂時に形成された電子密度の高い小斑 (plaque) に端を発し、分裂軸に平行に伸びて核の基質部分を横切り反対側の核膜孔の plaque に達している。一部の微小管は一端が染色体に結合しているとの報告もあるが、動原体様の構造は全く観察されていない。核分裂の際の娘染色体の分離には核膜が重要な働きをしている事が示唆されている(5)。

ハダカフタヒゲムシの染色体の物質的な構成に

ついてはほとんど分かっていないが、他の渦鞭毛虫については興味深い報告がなされている。これらの種においては形態的にヌクレオソームが存在せず、生化学的にはヒストンが存在しない(9、10、11)。ヒストンにかわる少量の塩基性核蛋白の存在が電気泳動的に示されているが、詳細なタンパク特性の解析、核内での存在様式、DNAとの関連性、遺伝子発現との関連等は明かでない。Soyer et al. (12) は染色体表面における DNA の Z-conformation の存在を明らかにし、渦鞭毛虫の特異的な染色体上での遺伝子の発現機構について言及している。

本研究では、ハダカフタヒゲムシを材料とし、
Ⅰ. 新しい培養法および増殖過程 (栄養生殖過程) Ⅱ. 細胞分裂過程の微細構造 Ⅲ. 非ヒストン性核タンパクの分離と定性について検討した。

Ⅰ. 培養条件と増殖過程

材料と培養方法

ハダカフタヒゲムシは、フランスの Marine Laboratory of Villefranche-sur-mer の海岸近くの岩場上の海水溜まりから採集した。これらを予備的培養段階として、室内暗黒条件下で酵母菌を餌として飼育した。この培養条件下では、ほとんどの緑藻類は増殖できず、ハダカフタヒゲムシに摂取されてしまう。その後培養液を小分けし、大型の繊毛虫の混在していないものを選んで大量培養に移した。市販の人工海水 Jamarin U (ジャマリンラボ、Osaka, Japan) を培養液として用いた。Jamarin U を海水の 1/2 の濃度となるよう蒸留水で希釈した後、ミリポアフィルター (孔径 0.22 μm) で濾過し除菌する。餌の大腸菌 (*E. coli*, K 株) は、標準培地 (極東製薬工業、Tokyo, Japan) で培養した。大腸菌培養液を 1,500xg 30min. 遠心し集菌、ディープフリーザーに保存し使用時に溶解して用いた。培養の維持のためには給餌は 5~15 日毎に行い、もとの培養液を新しい培養液で倍量に薄め容積にして 1/4000 の大腸菌を懸濁した。培養は、室内暗所で 20°C に保ち通気せずに静置しておこなった。

増殖過程の解析

方法：ハダカフタヒゲムシに大腸菌を与えると短い潜伏期の後活発に分裂を始める事がわかっ

た。培養条件と細胞数や細胞の大きさとの関係を知るため、我々は次のような実験をおこなった。1カ月以上餌を与えずにおいた原培養液100mlを1lの新しい培養液に移し、上に述べた濃度の大腸菌を加えて培養を開始した。12時間毎に5mlのサンプルを取りブアン海水固定液で固定した。サンプルが器底に沈んだ後顕微鏡写真を撮り、印画から細胞数と細胞の大きさを計測した。なお、細胞の大きさは虫体の長径(体長)を指標とした。培養の途中、5日目と12.5日目に新たに餌を与えた。また、9日目には新しい培養液で5倍に希釈した。

結果と考察：培養日数と細胞数との関係を図1に示す。培養開始1日後には細胞数の急激な増加が見られる。図から見た doubling time の最小値は7.6時間である。2.5日後には細胞数はプラトーに達し、その後は餌を与えても、新しい培養液で希釈しても細胞数の増加は見られない。希釈後餌を与えたところ(12日目)再び急激な細胞数の増加が見られた。この結果は細胞数の増加が餌と細胞密度の両方に依存していることを示している。細胞密度が高くなると分裂が抑制される原因は明らかでない。次に細胞の大きさと培養時間との関係を調べた。細胞数を計測したのと同じ写真上で、形態的に分裂間期の個体を100個体選び、その長軸を計測した。平均体長及び度数分布を図2に示す。培養開始後、まず平均の大きさが増加する(1日目)。次に培養開始時点より小さな個体が増加し(2.5日目)、やがて培養開始時と似た体長分布を示す(7日目)。ハダカフタヒゲムシに大腸菌を与えると、直ちにこれを活発に補食し、短い潜伏期の後分裂を始める。活発に分裂している集団中では、個々の虫体の大きさはまちまちであり、その差は定常期よりはるかに大きい。同一サンプルにおける大きさのばらつきは非常に大きく、最小の個体と最大の個体とでは体積にして8倍以上の差がみられた。*Gymnodinium* においては、大小2つの細胞集団が存在しており、相互に移行可能であることが観察されているが(15)、本種においては大小の差は連続的であった。

クローニング

方法：大きさに関して遺伝的に均一な個体群を得るためクローニングを試みた。併せて、個体毎

の増殖速度を比較した。クローンの分離には、テフロンコートした Cell-line slide (10 well, Cell-line Associates, Inc, Newfield, USA) を用いた。虫体のガラス面への付着や空気との界面での破壊を防ぐため、スライドは使用前に0.5% BSA 溶液でコートした。分離法の概要を表1の挿入図に示す。原培養は、大腸菌を含む新しい培養液で十分に希釈した。これを1滴ずつ各wellに落した後検鏡し、単一細胞を含むものを残した。培養は20°C 暗所の湿室中で行い、12時間毎に顕微鏡下で細胞数を数えた。

結果と考察：単離した32個体についての結果を表1に示す。表中、UC は個体の数が多すぎて泳いでいる状態では計数できなかったものである。これから分裂増殖のスピードは、個体によって大きく異なることが確かめられた。また、分裂速度の速いものほど、個体の大きさは小さくなっていった。ほとんどのクローンは大量培養に移した後も分裂を続け、長期間個体群を維持することができた。

II. 細胞分裂

光学顕微鏡による細胞形態と核の観察

方法：増殖期の細胞を全載標本とし、DAPI で染色して透過光による外部形態と蛍光像による核の形態を比較観察した。標本は以下のようにして作成した。0.5% polylysine でコートしたスライドグラス上に、培養液を数滴々下する。この上に0.1% OsO₄ を数滴々下、20秒後に2% glutaraldehyde の $\frac{1}{2}$ 海水溶液を加え固定する。この操作は外部形態の保存と蛍光色素による染色性の保存のために必要である。通常の方法によると trychocyst の放出が起こり、外部形態がかなり変化する。30分後に固定液を洗い0.1 μ g/ml の濃度の DAPI で DNA 染色した。

結果と考察：図3に間期及び分裂の各時期の透過像と蛍光像を示す。間期細胞は米粒形をしており、後端部腹面の hypococone 基部から2本の鞭毛(longitudinal flagellum; 縦鞭毛, transverse flagellum; 横鞭毛)が伸びている。この期の核はほぼ球形で、体の中心部やや前寄りに位置する(図3 a-b)。分裂期に入ると細胞は長軸方向に伸び、核はほぼ中央に位置して長軸方向に扁平な

円盤状になる(図3 c-d)。細胞が赤道面でくびれだすと同時に核もくびれて2分する(図3 e-f)。細胞質分裂の終わり頃には、2つの娘細胞はしばらくの間細い橋部でつながっている。この状態で連続して次の分裂に移行する個体もある(図3 g-h)。分裂期間中個体は泳ぎ回っており、複製された2組の鞭毛は完全に同調して波動している。なお、DAPI染色では染色体は識別できず核全体が染まって見えた。

走査型電子顕微鏡による外部形態の観察

方法：0.5% polylysin でコートしたカバーガラスの薄片を小容器の基底に置きサンプルを注いだ。直ちに OsO_4 (final conc. 0.2%) と glutaraldehyde (final conc. 2.5%) を加え静置、室温30分固定した。蒸留水で洗浄後、エタノールシリーズで脱水、isoamylacetate で置換し液体 CO_2 で臨界点乾燥した。試料台にカバーガラスごと接着後、200Åの厚さで金粒子をスパッタコーティングした。試料はJEOL JSMT-100 走査型電子顕微鏡で観察した。

結果と考察：図4 aは分裂間期のハダカフタヒゲムシを腹側面から見たところである。虫体の大部分は epicone が占めている。小さな hypocone が腹部後方に位置する。2本の鞭毛は epicone と hypocone の接続部から伸びているが、この両部を境する girdle 構造は明らかでない。この図で上方に位置するのが縦鞭毛であり、下方が横鞭毛である。横鞭毛に沿って多数の小突起が側方に出ている。細胞分裂が始まるとまず2本の鞭毛が複製される(図4 b)。この時期には細胞本体の形態はまだ変化していない。細胞分裂が進むと、細胞は長軸方向に伸びる(図4 c)。hypocone は複製されその基部に一对の鞭毛をつけたまま前後に分かれて移動する。新しく複製された hypocone が前に移動するのか、後ろに移動するのかは明らかでない。終期には赤道面で細胞質分裂が進み、やがて2細胞となる(図4 b)。分裂の最終段階では、前方の細胞後端部に後方の細胞の前端部がつながった形となり、2つの娘細胞は分裂面に関して非対称的である。

透過型電子顕微鏡による核分裂の観察

方法：透過型電子顕微鏡用の試料は次のように作成した。4% glutaraldehyde を含む緩衝液

(0.1M Na-Phosphate, 0.15M sucrose, 5mM EGTA, 5mM MgCl_2 , pH6.6) で室温45分固定する。同じ緩衝液で洗浄した後、0.5% OsO_4 を含む緩衝液(0.1M Na-Phosphate, 0.15M sucrose, pH6.6) で0°C 1時間後固定した。エタノールシリーズで脱水後 Spurr法によりエポキシ樹脂に平板包埋した。光学顕微鏡下で、適当な分裂期の細胞を選び切り出した後、常法に従って薄切染色し、Hitach H-7100型透過電子顕微鏡により観察した。

結果と考察：分裂間期の細胞は、球形または卵形の核を持つ(図5 a)。核内には多数の染色体が散在し、中央に大きな核小体が1個存在する。各染色体は直径約5nmの電子密度の高い細い繊維の束からなり、束全体の直径は3μm程度ある。また各染色体は大きくラセンを描いて走行している。染色体の1端が核膜内膜に付着していると思われる像がしばしば観察される(図5 b)。核小体は真核細胞に典型的な様相を示し、線維状部分、顆粒状部分および核小体付属染色質が区別される(図5 c)。核膜孔は少数であり隔板構造が認められる。また膜間腔は、小胞体腔と明らかに連続している。内部細胞質(endoplasm)中には大腸菌を取り込んだ多数の食胞が見られるほか、小胞体・ミトコンドリア・リボソーム・油滴・ゴルジ体を含む archoplasm や trychocyst が存在する。皮層細胞質(epiplasm)は幅0.3μmほどの薄い層で、長軸方向に3~6本の微小管の束が1μm程度の間隔をおいて並んでいる(図5 d)。これと垂直方向にも多数の微小管が走行している。細胞膜の外部には外皮(theca)は認められない。分裂期になると核は長軸方向に扁平な円盤型となる(図6 a)。染色体はこの円盤の両面を結ぶ方向に配列している。この時期にも少なくとも一部の染色体は端部を核膜に接している。扁平な面にある核膜孔の一部には電子密度の高い物質の集積が見られる。ここから反対側の核膜孔に向かって、数本の微小管が伸びている(図6 b)。この微小管は染色体の間を通過して直線的に伸びており、両側の核膜孔間で連続していると思われる。染色体上に動原体の構造は全く認められない。核小体は細長く伸び、両端は核膜に接している(図6 c)。染色体上に動原体の構造は全く認められない。分

裂後期には核は細胞の長軸方向に伸長し、赤道面できびれ皿鈴形となる(図6 d-e)。中央の狭部には染色体は認められず、既に両極に向かって分離していると思われる。核小体は中央部に軸方向に細長くなって存在する。核膜孔から伸びる微小管束は中央狭部に向かって放射状に集束している。両極部を除く核膜側面は核膜孔を持たない。また核のくびれの中央部付近には核の内側にも細胞質側にも特別な構造は見られない。

Ⅲ. 塩基性核タンパクの分離と定性

大量培養したハダカフタヒゲムシを用いて、核内の塩基性タンパクの分離精製と定性をおこなった。

核の分離と塩基性核タンパクの抽出

核の分離：核の分離には Rizzo & Nooden (1973)(13) の方法を改変して用いた。手順を以下に箇条書きする。

1. 高密度に増殖した培養液を、連続遠心(500 xg)して集菌する。培養液10Lあたり1mlのハダカフタヒゲムシが得られる。
2. 沈澱した菌体1mlあたり25mlの核分離用溶液(10mM Tris-HCl buffer pH7.4, 0.35 M Sucrose, 10mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 5mM NaHSO₃, 0.5mM PMSF)に懸濁する。
3. Daunce型ホモゲナイザー(クリアランス10 μ m)で10~20往復させて破碎する。
4. 破碎液を400xg、10分遠心し、沈査に20mlの核分離用溶液を加え再度遠心洗浄。
5. 沈査を核分離用溶液に懸濁した後、1.6M sucrose bed上に重層し、1500xg 30分遠心する。
6. 沈査を核分離用溶液に懸濁、0.1% Triton-X 100を加えて30分振とうする。
7. 20,000xg 20分遠心し、沈査を核分画として用いた。

塩基性核タンパクの抽出：硫酸抽出法を用いた。

1. 核分画に0.25N H₂SO₄を加え4℃ 12時間攪伴した後、20,000xg、20分遠心する。
2. 上清を固体 sucrose、ついで0.02N H₂SO₄で0℃ 4日間透析する。

3. 透析内液を Sephadex G200 の粉末で濃縮する。
4. 5倍容のエタノールを加え、-20℃で48時間置く。
5. 20,000xg 30分遠心して沈澱を集め、減圧乾燥する。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による精製：硫酸抽出した塩基性核タンパクをさらに精製するため、HPLCをおこなった。カラムは Develosil 300C4-HG-5(径4.6mm,長さ150mm)を用いた。サンプルを溶媒A(0.1% Trifluoroacetate; TFA)に溶解しカラムに注入した。溶媒Aを流して平衡に達したのち、0.1% TFAの acetonitril 溶液(溶媒B)の濃度勾配をかけて溶出した。流速は0.8ml/minとし、タンパク濃度はUV214nmでモニターした。タンパクの流出のパターンを図7に示す。aは硫酸抽出分画を示し、bは溶媒のみの場合である。この図から明らかのように、溶媒B/溶媒Aが40%のあたりで大きなシングルピークが認められた。このピークの分画を分取濃縮し、アミノ酸分析、および抗体作成用試料とした。

塩基性核タンパクの定性分析

SDS-PAGEによる分析：分離したタンパクおよび精製過程の各分画をSDS-PAGEにより解析した。SDS-PAGEは10%ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmli(14)の方法に従った。比較のために、同じ硫酸抽出法により分離精製したバフンウニ胞胚の塩基性核タンパク、市販の仔牛胸腺ヒストンおよび分子量マーカーを並列泳動した。結果を図7に示す。精製タンパクのメインバンドは1本で分子量はほぼ23kDである。小牛胸腺ヒストンおよび、ヒストンを含むバフンウニの塩基性核タンパクには5種類のヒストンによる4本のバンドが区別されたが、本タンパクと同じ泳動度のタンパクは存在しなかった。従って、ハダカフタヒゲムシは通常のヒストンを持たず、単一分子種の塩基性核タンパクを持つことがわかった。この結果は、他種の渦鞭毛虫で報告されている結果(9、10)と良く似ている。このことは、本タンパクが渦鞭毛虫核内の普遍的な構成要素であることを示唆する。現在、本タンパクに対する抗体を作成中であり、これが得られれば核内での局在性、染色

体との関係を明らかにすることができるであろう。

アミノ酸組成：アミノ酸分析機はJEOL JLC 300 Amino Acid Analyzerを使用した。試料の加水分解は6NHCl、110°C、減圧下で20時間おこなった。アミノ酸組成の分析結果を表2に示す。この表中でHuman H1ヒストンおよびCalf thymusヒストンH2 a—H4については岩井・笠井(1982)(13)から引用し、モル%に換算して比較対照とした。アミノ酸組成中、LysとArgの含量が高く全体の23.7%を占め、他の一連の核タンパク質同様塩基性蛋白であった。またAlaの含量も比較的高く疎水性部分の割合が大きいと考えられる。既知のヒストンのうちでは、Lys、Arg、Alaの含量からはH1とH2の中間の性質を有するものの、総合的にはこれらのヒストンとは明らかに異なっていた。

(さとう ひでみ 教授)

(1995. 3. 29 受理)

参 考 文 献

1. Spector D. L. & Triemer R. E. Chromosome structure and mitosis in the dinoflagellates: An ultrastructural approach to an evolutionary problem. *BioSystems*, 14, 289-298 (1981)
2. Triemer R. E. & Fitz L. Cell cycle and mitosis. In *Dinoflagellates* (ed. Spector D. L.) Acad. Press, 149-179 (1984)
3. Cachon J., Sato H., Cachon M. & Sato Y. Analysis by polarizing microscopy of chromosomal structure among dinoflagellates and its phylogenetic involvement. *Biol. Cell*, 65, 51-60 (1989)
4. Dodge J. D. & Crawford R. M. Fine structure of the dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*. I. The general structure of the cell. *Protistologica*, 7, 295-304 (1971)
5. Cachon J., Cachon M. & Salvano P. The nuclear division of *Oxyrrhis marina*: An example of the role played by the nuclear envelope in chromosome segregation. *Arch. Protistenk*, 122, 43-54 (1979)
6. Triemer R. E. A unique mitotic variation in the marine dinoflagellate *Oxyrrhis marina* (pyrophyta). *J. Phycol.*, 18, 399-411 (1982)
7. Xiao-Ping G. & Jing-Yan L. Nuclear division in the marine dinoflagellate *Oxyrrhis marina*. *J. Cell Sci.*, 85, 161-175 (1986)
8. Cachon M. Up-date on the mitosis of dinoflagellates (in preparation)
9. Bodansky S., Mintz L. B. & Holmes D. S. The mesokaryote *Gyrodinium cohnii* lacks nucleosomes. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 88, 1329-1336 (1979)
10. Herzog M. & Soyer M. O. Distinctive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species *Prorocentrum micans* E. *J. Cell Biol.*, 23, 295-302 (1981)
11. Spector D. L. Dinoflagellate nuclei. In *Dinoflagellates* (ed. Spector D. L.) Acad. Press, 107-147 (1984)
12. Soyer M. O., Geraud M. L., Coulaud D., Barry M., Theveny B., Revet B. & Delain M. Location of B- and Z-DNA in the chromosomes of a primitive eukaryote dinoflagellate. *J. Cell Biol.*, 111, 293-308 (1990)
13. 岩井浩一、笠井賢太郎 ヒストンの一次構造 蛋白質・核酸・酵素, 27, 1446-1455 (1982)
14. Laemmli U. K. *Nature* (London), 227, 680-685 (1979)
15. Partensky F. & Vaultot D. Cell size differentiation in the bloom-forming dinoflagellate *Gymnodinium* CF. *Nagasakiense*. *J. Phycol.*, 25, 741-750 (1989)

図表の説明

図1 培養条件下におけるハダカフタヒゲムシの増殖曲線

縦軸：培養液 1 μ lあたりの個体数。培養液を希釈した場合には、元の容積に換算した個体数。

横軸：培養日数

図中の Feed は大腸菌を加えた事を示し、Dilute は新しい培養液で希釈したことを示す。

図2 培養経過に伴う体長の変化

縦軸：100個体中の一定サイズの個体の占める割合。

横軸：体長（虫体の長軸の長さ）

Start は培養開始時点、1 day・2.5 day・7 day は培養開始後の経過時間を示す。この図は図1と同一試料を元に計測したものである。

表1 単離した個体の増殖経過

全て単一細胞から出発し、各時間での細胞数を示す。左図は単離の操作の概略を示す。

図3 分裂の経過（光学顕微鏡像）

分裂過程の明視野像（3 a, c, e, g）と DAPI 染色蛍光像（3 b, d, f, h）を対比して示す。

図4 分裂の経過（走査型電子顕微鏡像）

a. 間期 b. 分裂前期 c. 分裂中期 d. 分裂後期

ft; transverse flagellum fl; longitudinal flagellum h; hypocone e; epicone

t; 放出された trychocyst

図5 間期細胞の透過型電子顕微鏡像

a. 全体像 n; 核 e; 取り込まれた大腸菌 t; trychocyst

b. 核膜付近の拡大 c; 染色体

c. 核小体の拡大 f; 繊維状部分 g; 顆粒状部分 nc; 核小体付属染色質

d. epiplasm の斜切片 mt; microtubule

スケールバー上の数値は全て μ m 単位で示してある。

図6 分裂期細胞の透過型電子顕微鏡像

a. 中期細胞の全体像 a; archoplasm n; 核

b. 核膜付近の拡大 d; dense plaque mt; microtubule

c. 中期核の拡大 no; 核小体

d. 後期細胞の全体像

e. 後期核の拡大 くびれの中央付近の核質中に染色体が無い事に注意（矢印）

図7 HPLC による流出パターン

a. 分離核タンパク b. 溶媒のみ 上部に流出用溶媒の濃度勾配を示す。

図8 核タンパクの SDS-PAGE 像

Total homogenate, Nuclear fraction, Acid extract はハダカフタヒゲムシの塩基性核タンパクの抽出精製過程の分画を示す。Sea urchin H は同じ方法でバフンウニ胞胚の分離核から抽出した塩基性核タンパク、Calf thymus H は市販の仔牛胸腺由来ヒストン標品を示す。

表2 分離したタンパクのアミノ酸組成

NP; ハダカフタヒゲムシの塩基性核タンパク

比較のため、ヒストン H 1 (ヒト) およびヒストン H 2 a—H 4 (仔牛胸腺) の組成を並記してある。

Fig. 1

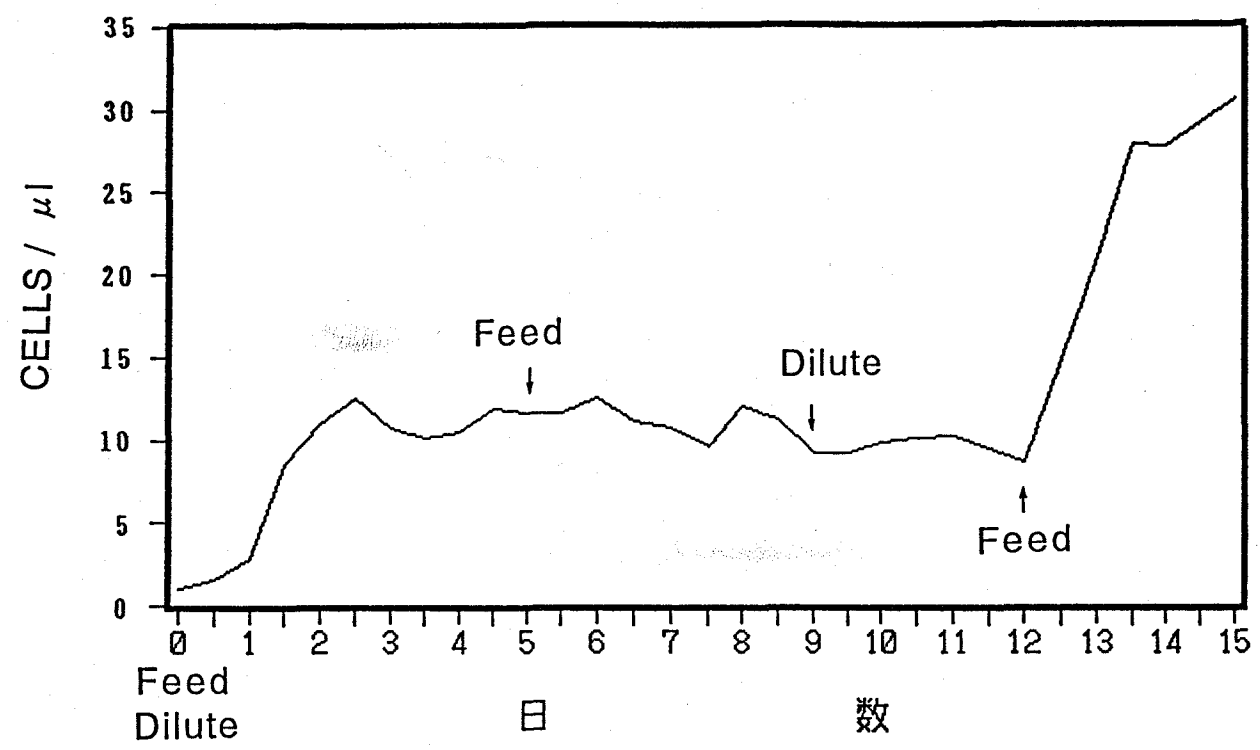
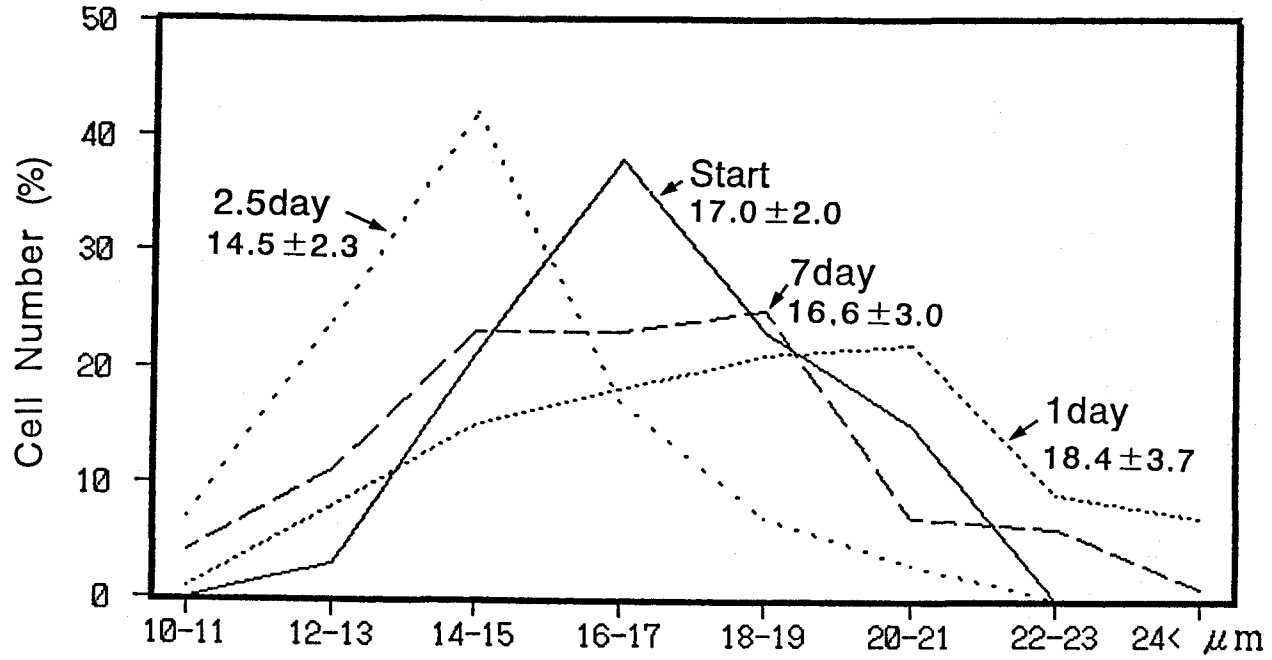
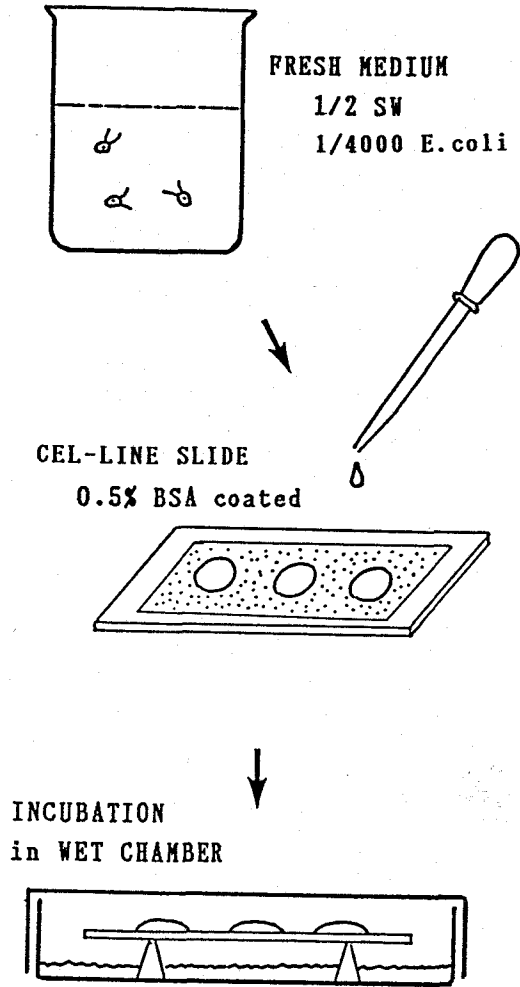


Fig.2



Tab.1



単一細胞の増殖 (クローニング)

12hr	36hr	60hr	12hr	36hr	60hr
1	4	6	1	4	7
1	4	10	1	1	1
1	4	6	1	16	U C
1	1	4	1	4	7
1	2	8	1	7	7
1	3	6	1	4	5
1	4	4	1	3	3
1	4	U C	1	1	6
1	4	8	1	4	5
1	2	2	1	8	9
1	1	2	1	4	6
1	2	6	1	4	8
1	2	5	1	1	1
1	2	4	1	5	9
1	1	5	1	8	14
1	4	7	1	7	10

U C: 細胞数が多過ぎて数えられない batch

Fig.3

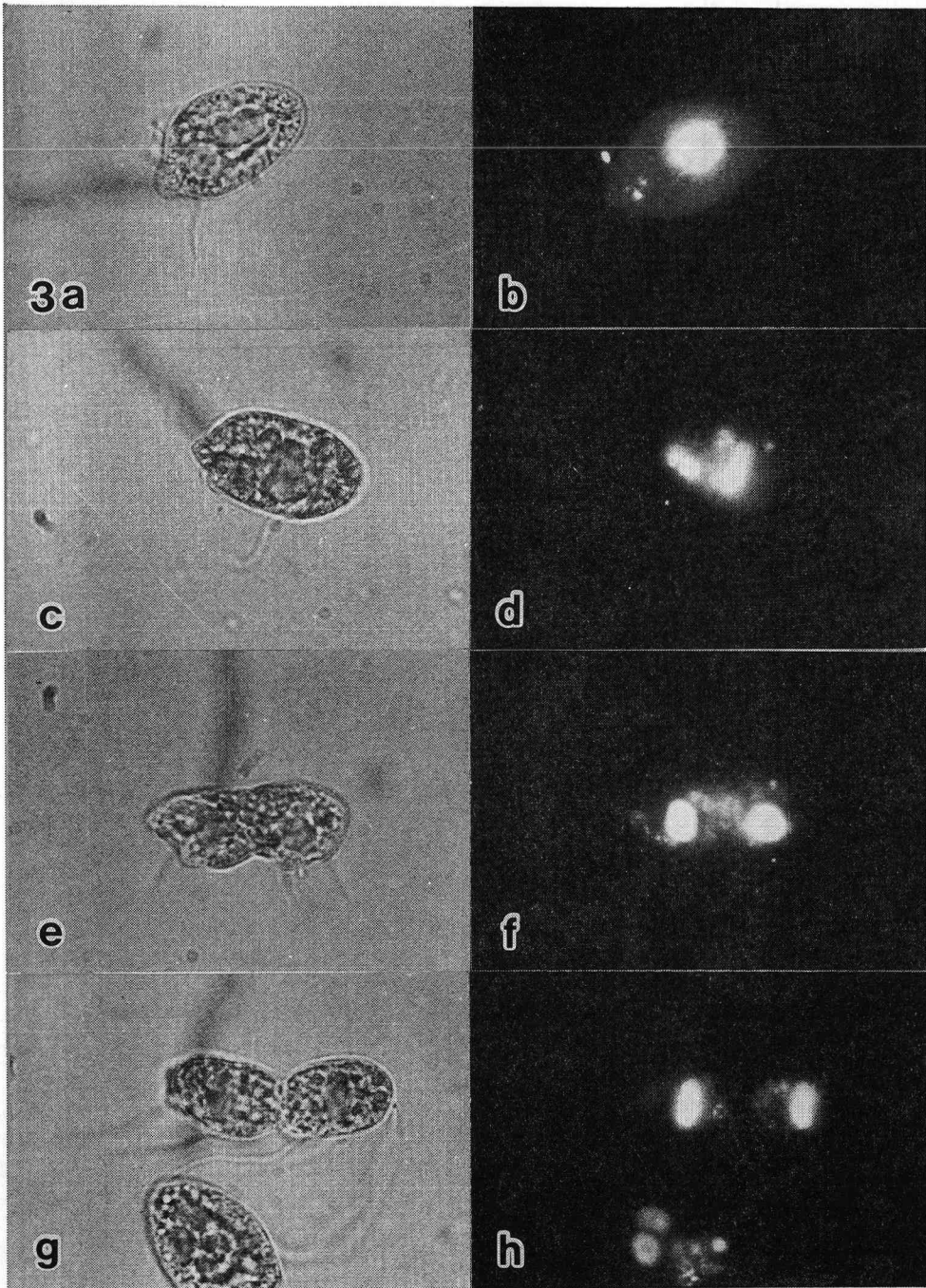


Fig.4

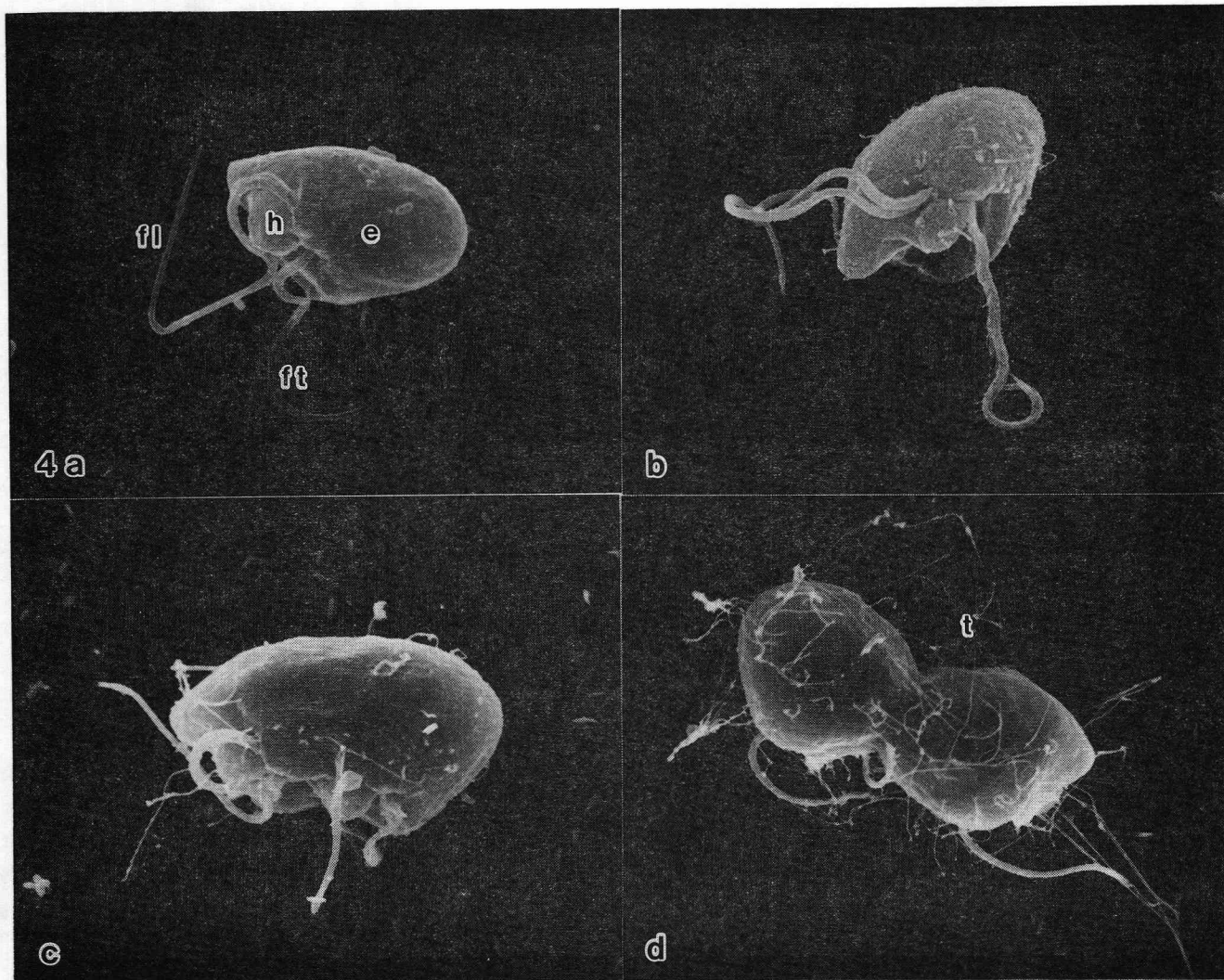


Fig.5

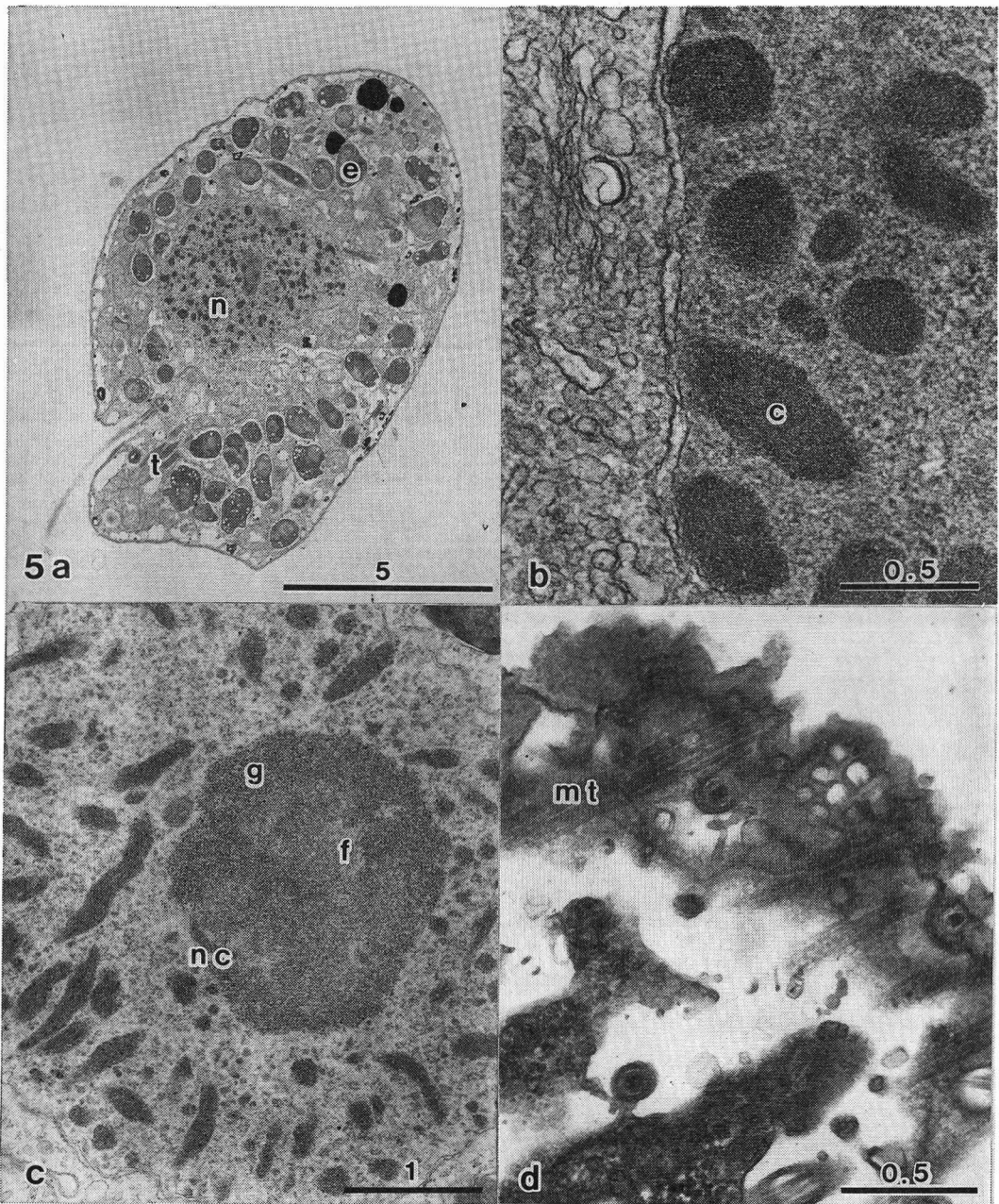


Fig.6

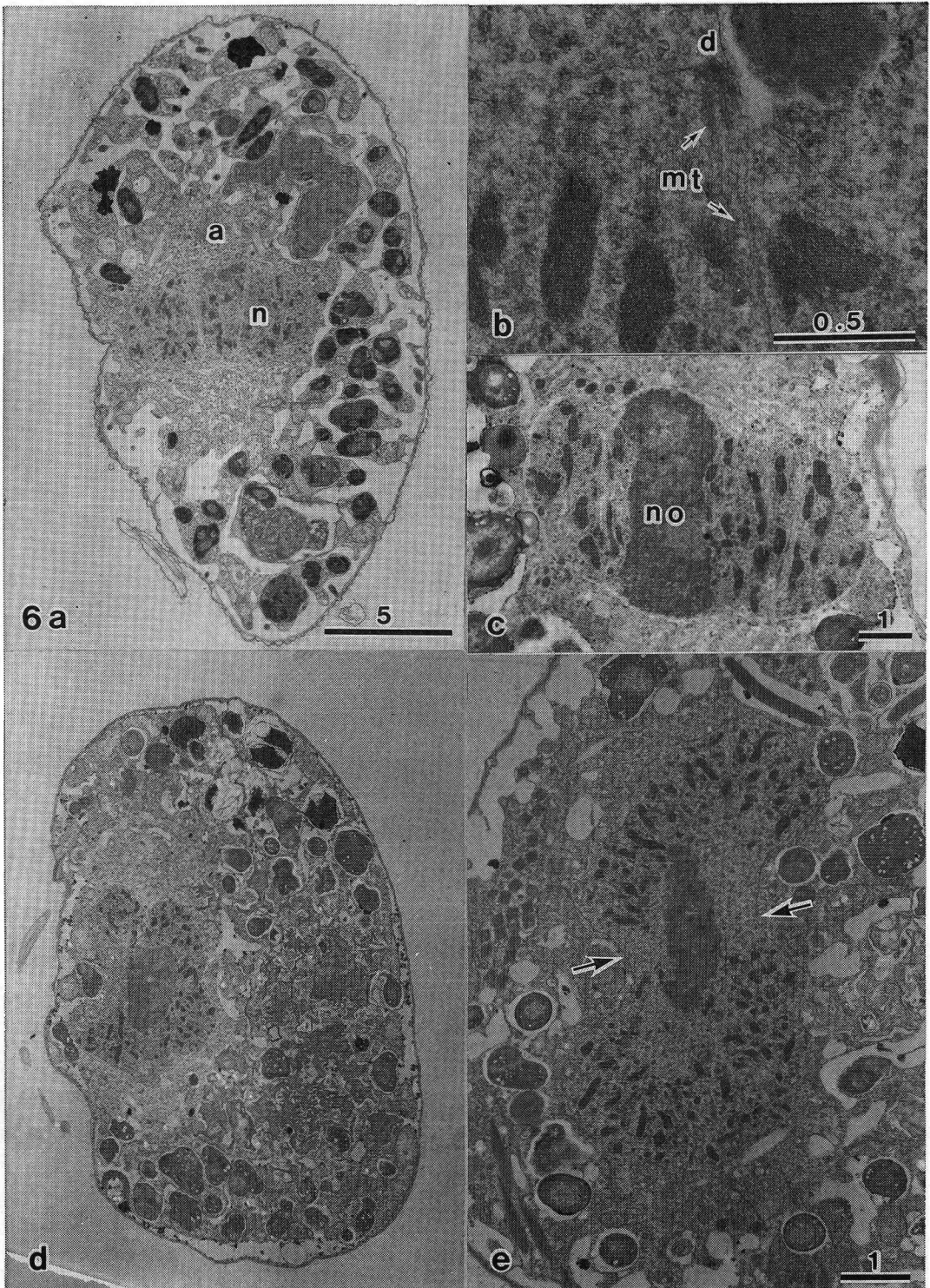
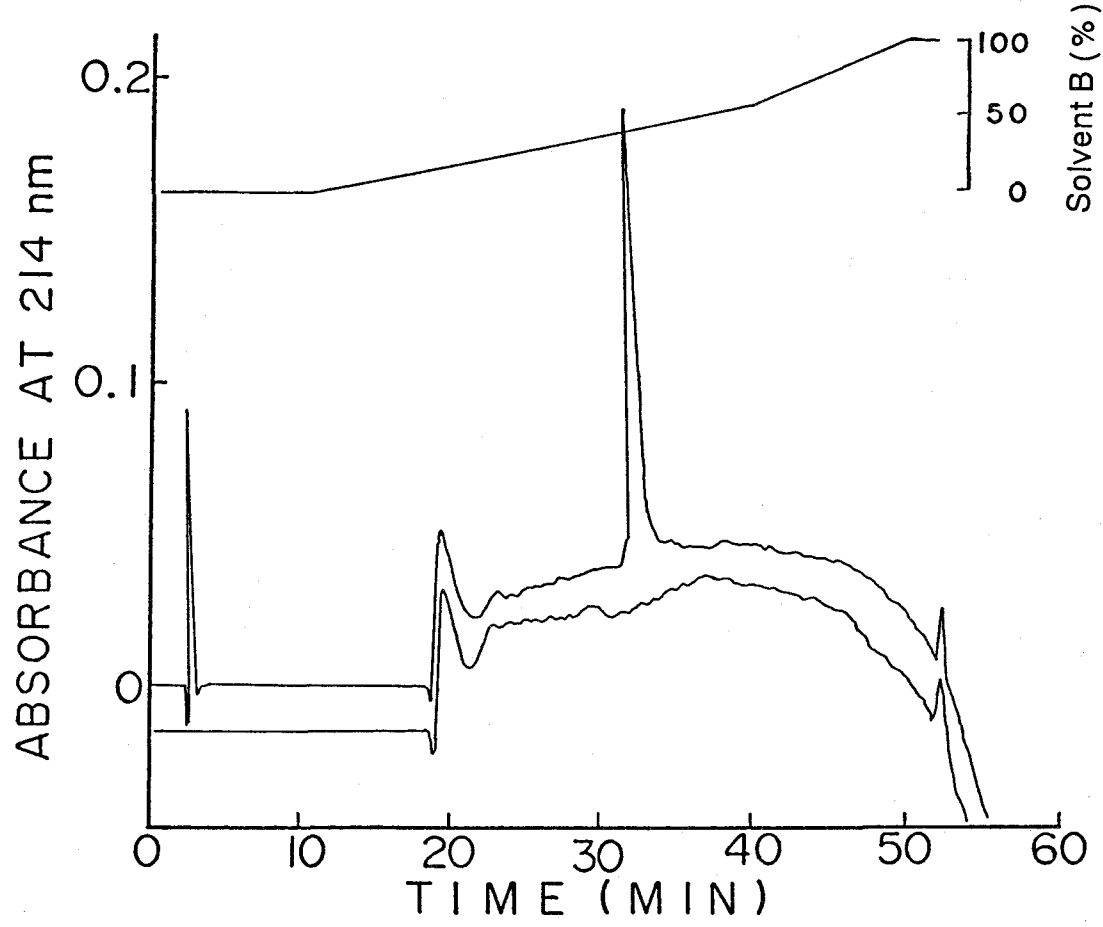


Fig.7



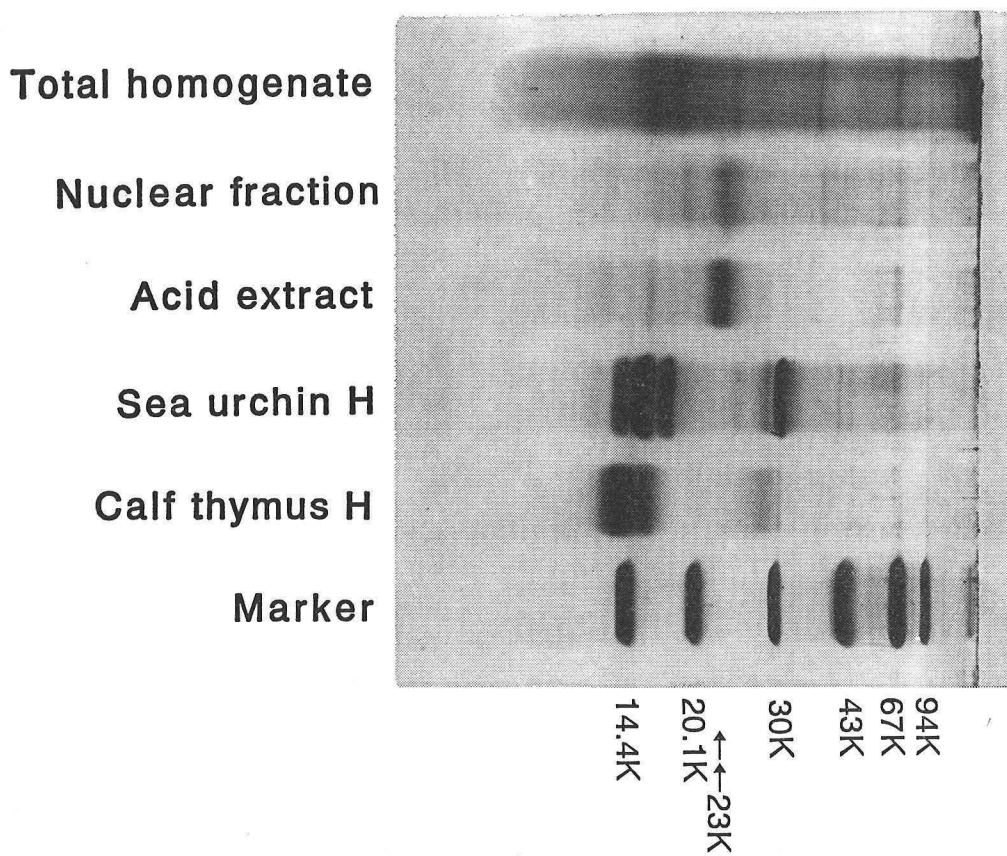


Fig. 8

Tab. 2**Amino Acids Composition of Nuclear Protein**

	Oxyrrhis	Human		Calf Thymus		
	NP	H1	H2A	H2B	H3	H4
Asx	4.42	1.83	6.20	4.80	3.70	4.90
Thr	7.05	4.59	3.88	6.40	7.41	6.86
Ser	7.15	7.34	3.10	11.20	3.70	1.96
Glx	4.62	3.21	9.30	8.00	11.11	5.88
Pro	1.89	9.63	3.88	4.80	4.44	0.98
Gly	10.46	6.42	10.85	5.60	5.18	16.67
<u>Ala</u>	18.46	27.06	13.17	10.40	13.33	6.86
Cys	ND	0	0	0	1.48	0
Val	7.98	3.67	6.20	7.20	4.44	8.82
Met	0.68	0	0	1.60	1.48	0.98
Ile	2.93	0.92	4.65	4.80	5.18	5.88
Leu	6.18	4.13	12.40	4.80	8.89	7.84
Thr	1.49	0.46	2.33	4.00	2.22	3.92
Phe	2.43	1.11	0.78	1.60	2.96	1.96
His	0.71	0	3.10	2.40	1.48	1.96
<u>Lys</u>	19.84	28.44	10.85	16.00	9.62	10.78
<u>Arg</u>	3.93	1.83	9.30	6.40	13.33	13.73
Trp	ND	ND	0	0	0	0

Number of residues per 100 mols of protein