

# 渦鞭毛藻類における塩基性核タンパク質HCcと葉緑体型フェレドキシンの 遺伝子構造に関する研究

1997年

吉川 毅

*Cryptomonas* 属の渦鞭毛藻類において、葉緑体DNAにコードする塩基性核タンパク質HCcと葉緑体型フェレドキシン遺伝子の塩基配列を決定し、その遺伝子構造に関する研究を行った。

HCc遺伝子の塩基配列は、葉緑体DNAのAT-rich領域に位置し、葉緑体DNAの複製開始点付近に存在する。フェレドキシン遺伝子は、葉緑体DNAのA-rich領域に位置し、葉緑体DNAの複製開始点から離れた位置に存在する。

HCc遺伝子の塩基配列は、他の渦鞭毛藻類のHCc遺伝子の塩基配列と高い同源性を示した。フェレドキシン遺伝子の塩基配列は、他の渦鞭毛藻類のフェレドキシン遺伝子の塩基配列と高い同源性を示した。

HCc遺伝子の塩基配列は、葉緑体DNAの複製開始点付近に存在し、葉緑体DNAの複製開始点と近い位置に存在する。フェレドキシン遺伝子の塩基配列は、葉緑体DNAの複製開始点から離れた位置に存在し、葉緑体DNAの複製開始点と遠い位置に存在する。

HCc遺伝子の塩基配列は、葉緑体DNAの複製開始点付近に存在し、葉緑体DNAの複製開始点と近い位置に存在する。フェレドキシン遺伝子の塩基配列は、葉緑体DNAの複製開始点から離れた位置に存在し、葉緑体DNAの複製開始点と遠い位置に存在する。

# 目次

第1章 緒言	1
第2章 <i>Cryptocodinium cohnii</i> からのヒストン様塩基性核タンパク質HCcをコードする遺伝子のクローニングとその遺伝子構造解析	6
2.1 方法	7
<i>Cryptocodinium cohnii</i> の培養と全DNAの抽出	
PCRによるHCc1遺伝子の増幅	
PCR増幅産物のクローニングと塩基配列の決定	
2.2 結果	10
HCc1遺伝子のPCRによる増幅	
HCc1遺伝子に存在する介在配列	
HCc1遺伝子周辺領域の塩基配列	
2.3 考察	17
HCc1遺伝子はmultigene familyを形成する	
HCc1遺伝子に存在するイントロンの特殊性	
HCc1遺伝子のプロモーター領域の特殊性	
第3章 渦鞭毛藻類の葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子の塩基配列から見た渦鞭毛藻類の分子系統とその遺伝子構造の解析	21
3.1 方法	24
渦鞭毛藻類の培養	
渦鞭毛藻類からの全DNAの抽出	
<i>Gonyaulax polyedra</i> からの全RNAの抽出	
PCR、RT-PCRによる葉緑体型フェレドキシン遺伝子の増幅	
TAIL-PCRによる葉緑体型フェレドキシン遺伝子周辺領域の増幅	
PCR増幅産物のクローニングと塩基配列の決定	
葉緑体型フェレドキシンアミノ酸配列のアラインメントと系統樹の作成	
葉緑体型フェレドキシントランジット配列の解析	
3.2 結果	30
葉緑体型フェレドキシン遺伝子のPCR、TAIL-PCRによる増幅	
葉緑体型フェレドキシン遺伝子の塩基配列の解析	
葉緑体型フェレドキシン遺伝子の塩基配列を用いた渦鞭毛藻類の分子系統	

葉緑体型フェレドキシン遺伝子のプロモーター領域の解析	
葉緑体型フェレドキシン遺伝子のトランジット配列	
3.3 考察	46
葉緑体型フェレドキシンから見た渦鞭毛藻類と緑藻類の類縁関係	
葉緑体型フェレドキシン遺伝子プロモーターの特殊性	
葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列と渦鞭毛藻類の	
葉緑体膜構造との関係	
第4章 総括	54
Summary	57
参考文献	58

## 第1章 緒言

渦鞭毛藻類は赤潮形成種や麻痺性貝毒産生種を含み、水産増養殖業に多大な被害を及ぼしていることから、その防除という面で産業的に重要視されている。その一方で染色体やDNAも含めてその核構造に注目すると他の真核生物と大きく異なる特徴的な性質が数多く認められる。例えば、渦鞭毛藻類は真核生物の中でも直径5-40  $\mu\text{m}$ と比較的大きな核を持ち、そのDNA量も極めて多く、*Gonyaulax polyedra*では200 pg/nucleusと、ヒトの約100倍ものDNAを有する (Sigeo, 1986)。染色体数も種によっては数100を数える (Shyam *et al.*, 1978, Holt *et al.*, 1982)。また、核DNA中においてはthymineの修飾塩基 hydroxymethyluracil (HOMeUra) への置換もしくは修飾が認められる (Rae, 1973, Rae and Steele, 1978, Steele and Rae, 1980, Herzog and Soyer, 1982, Galleron, 1984, Davies *et al.*, 1988, Jarvis *et al.*, 1992)。HOMeUraは一部のバクテリオファージにおいてのみ存在が確認されている極めて特異な修飾塩基で (Kallen *et al.*, 1962)、渦鞭毛藻類においてはThyの10-70%が置換されていることが確認されている (Rae, 1976)。

しかし、渦鞭毛藻類の核構造の特殊性がより顕著に認められるのはdinomitosisと呼ばれる体細胞分裂に伴う核分裂機構と染色体構造である。渦鞭毛藻類の核分裂ではM期においても核膜の消失が認められず (Hall, 1924)、核外動原体微小管が核を貫通する形で分裂方向に伸長し (Leadbeater and Dodge, 1967)、その微小管は核膜を通じて染色体の動原体様構造につながっている (Oakley and Dodge, 1974, 1976)。核は微小管の方向に従って分裂するが、染色体は核膜に付着した状態で娘核に分配される (Kubai and Ris, 1969)。

また、渦鞭毛藻類の染色体は細胞周期を通じて常に凝集したままで、その高次構造は2価の金属イオン (Herzog and Soyer, 1983) と構造RNA (Soyer-Gobillard and Herzog, 1985) により安定化されていることが示唆されている。染色体を光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて観察すると、顆粒状領域と繊維状領域が交互に現れるバンドパターンが認められ、これは真核生物におけるヘテロクロマチンに由来するバンド構造とは異なる。染色体の高次構造に関しては多くのモデルが提唱されたが (Haapala and Soyer, 1973, Soyer and Haapala, 1974, Livolant and Bouligand, 1980)、Giesbrecht (1961, 1965) はアーチ型のヌクレオイド様構造を認め、渦鞭毛藻類とバクテリアの染色体構造の類似性を指摘している。Spector *et al.* (1981) は *Peridinium cinctum* においてDNA複製途中の染色体を観察し、スーパーコイ

ルを形成する染色体DNAと繊維状骨格より成る渦鞭毛藻類特有のクロモネマ構造を報告した。またHaapala and Soyer (1974) は*Prorocentrum micans*の染色体DNAが閉環状のスーパーコイル構造を取ることを示している。実際の染色体構造は更なる形態学的、生化学的な情報の蓄積を待たなければならないが、渦鞭毛藻類の染色体が真核生物において示されているクロマチンのループ状ドメインにより形成される染色体構造と全く異なっていることは明らかである。

更に特徴的な事例として、渦鞭毛藻類の核はヒストンタンパク質を欠き、従って染色体の高次構造の基本単位であるヌクレオソーム構造が渦鞭毛藻類の染色体には認められないことが挙げられる (Bodansky *et al.*, 1979, Rizzo, 1981, Herzog and Soyer, 1981, Rizzo and Burghardt, 1980, Shupe and Rizzo, 1983)。しかしながらその染色体は前述の通り明らかに高次構造を有していることから、何らかの形でDNAのパッキングを行っていることは間違いない。このような観点からヒストンに代わるDNA結合タンパク質が検索され、数種の渦鞭毛藻類からヒストン様核タンパク質が見出された (Rizzo and Nooden, 1974, Rizzo, 1981, Rizzo *et al.*, 1984)。しかし、その性状やアミノ酸配列、DNAとの結合パターンなどから渦鞭毛藻類のDNAパッキングはヒストンによるヌクレオソーム構造、さらにより高次の構造であるヒストンH1によるクロマチン構造の形成とは全く異なるものであることが示唆された。

これら渦鞭毛藻類の核構造と核分裂様式、染色体構造の特殊性は渦鞭毛藻類のたどってきた進化の道筋を考察する上で興味深い。原核生物は、真核生物へと至る進化の過程において細胞内区画としての核構造を獲得し、その核の娘細胞への分配システムである核分裂と、それに付随する染色体の分配機構に働く紡錘体と動原体微小管を構築した。また、長大になった染色体DNAを効率よく核内にパッキングするために、ヒストンタンパク質とそれに伴うヌクレオソーム構造を基本単位とする染色体構造を構築した。一方渦鞭毛藻類は、真核生物と同様明確な核構造を持ちながらその分裂の過程では染色体DNAが核膜に付着して娘核に分配され、その様子は原核生物の細胞分裂に極めて酷似している上に、より原始的とされる種では紡錘体の形成が認められず、動原体微小管は核外に存在して染色体とは結合せず分裂方向を指示しているのみであることなど、一般的な真核生物と比べて未発達な核分裂の機構が見て取れる。また、染色体におけるヒストン、ヌクレオソーム構造の欠如、クロマチン繊維の直径が3-6 nmとバクテリアと類似していること (Hamkalo and

Rattner, 1977, Bodansky *et al.*, 1979, Rizzo and Burghardt, 1982)、電子顕微鏡で観察される染色体断面のアーチ型のヌクレオイド様の構造は何れも渦鞭毛藻類の染色体構造が真核生物というよりはむしろ原核生物的であることを示している。Dodge (1965) は渦鞭毛藻類が示す原核生物的な性状から、渦鞭毛藻類を原核生物が真核生物へと進化を遂げる過程の中間に位置する生物であるとし、mesokaryoteと分類することを提唱した。またLoeblich (1976) は原核生物的な性状に加えて認められる渦鞭毛藻類独自の核分裂機構や染色体構造に基づき、渦鞭毛藻類は単なる"mesokaryote"ではなく、原核生物が真核生物へと進化する過程の極めて初期の段階で真核生物から分岐し独自の進化を遂げた生物群であると捉えた。

このような研究に対し、近年、生物の進化系統関係を論じる手法として、DNAの塩基配列に蓄積された変異から生物間の進化の道筋を推定する、いわゆる分子進化学を応用した研究も進められ、渦鞭毛藻類においても分子進化の指標として信頼度の高いリボゾームRNA (rRNA) をコードする遺伝子の塩基配列と、それに基づく渦鞭毛藻類の真核生物内における進化系統関係が示された。Maroteaux *et al.* (1985) は*P. micans*と*Crypthecodinium cohnii*の5.8S rRNAをコードする遺伝子の塩基配列から渦鞭毛藻類が真核生物の中でも極めて初期の段階に分岐したことを示す分子系統樹を得た。しかし、18S rRNAの塩基配列から作成された分子系統樹からはむしろ渦鞭毛藻類が真核生物の中でも比較的最近分岐した生物群で、しかもアピコンプレクサや繊毛虫類と類縁関係を持つことが指摘された (Gajadhar *et al.*, 1991, MacNally *et al.*, 1994, Leipe *et al.*, 1994, McFadden *et al.*, 1994)。Cavalier-Smith (1993) は生物8界説を提唱した中で、渦鞭毛藻類とアピコンプレクサ、繊毛虫類をこれらに共通に存在するアルベオールと呼ばれる小胞に基づきアルベオラータ群としている。また、渦鞭毛藻類、特に*C. cohnii*においてはその細胞周期が極めて特殊であることから研究が進められてきたが (Bhaud *et al.*, 1991)、細胞周期の制御に真核生物においてM期促進因子として機能するCDC2とサイクリンBが関与している可能性が指摘され、なおかつ他の真核生物との互換性が示された (Rodriguez *et al.*, 1993, Bhaud *et al.*, 1994, Barbier *et al.*, 1995, Van Dolah *et al.*, 1995)。さらに真核生物において染色体の高次構造の形成に機能している核マトリックス構造が渦鞭毛藻類においても確認され、また他の真核生物と同様マトリックス内にラミン様タンパク質とトポイソメラーゼIIの存在が確認された (Minguez *et al.*, 1994)。

これら rRNA の塩基配列、CDC2 やサイクリン B、核マトリックス構造の解析から示された渦鞭毛藻類の性状は明らかに真核生物のものであり、Dodge や Loeblich が提唱した、渦鞭毛藻類が原核生物から真核生物への進化の過程の初期に分岐したとする仮説は支持しない。Hinnebusch *et al.* (1981) は渦鞭毛藻類の染色体構造の特殊性に関して、渦鞭毛藻類は本来典型的な真核生物タイプの染色体構造を持っていたが、進化の過程でヒストンを失い独自の染色体構造をとるに至ったとしている。但し渦鞭毛藻類の複雑な染色体高次構造をヒストンの欠如のみで説明するのは困難であると思われる。

染色体の高次構造と遺伝子の転写は互いに密接な連係を保っていることが知られている。一般的な真核生物においてはヌクレオソーム構造は遺伝子の転写に阻害的に働くが、転写因子のプロモーター領域への結合がトリガーとなってプロモーター領域におけるヌクレオソーム構造の破壊とそれに伴う他の基本転写因子群と転写装置のプロモーター領域への結合が開始される (Wolffe, 1994, Wallrath *et al.*, 1994)。また、染色体 DNA は SAR (scaffold attachment region) を介して核内の骨格構造である核マトリックスと結合することによりループ構造を形成し、機能的ドメインとして働く (飯 哲夫, 1996)。このループ構造は遺伝子のドメイン単位での発現制御に必須であることが明らかにされている。染色体レベルにおいても、染色体上の転写活性の高い領域においてはコアヒストンのアセチル化によりクロマチンの凝縮度が低下し (Wolffe, 1995)、いわゆる活性クロマチンを形成することが知られている。場合によってはこういった構造の変化、もしくは染色体構造を司るヌクレオソーム構造や核マトリックス中の因子が積極的に遺伝子の発現を制御している可能性があることも示唆される。しかしながら渦鞭毛藻類においてはヒストンやヌクレオソーム構造の欠如、Spector *et al.* (1981) の報告したクロモネマ構造といった染色体構造の特殊性からこのような転写制御システムと染色体構造との相互作用は適用できない。即ち、渦鞭毛藻類においては、その核、染色体構造のみならず転写制御システムについても一般的な真核生物と異なっている可能性が示唆される。渦鞭毛藻類の転写制御に機能する因子についての報告は皆無に等しいが、*G. polyedra* ではルシフェリン結合タンパク質 LBP をコードする遺伝子のプロモーター領域の塩基配列が報告されている (Lee *et al.*, 1993)。この配列を見る限り、真核生物にユニバーサルなプロモーターコンセンサス配列が認められず、渦鞭毛藻類の転写システムの特殊性を支持する結果が得られている。

そこで本研究では、渦鞭毛藻類の核構造、染色体構造の特殊性と遺伝子構造との関連に

ついて検討すると共に、渦鞭毛藻類の進化系統関係について分子進化学の見地から解析することを目的として、染色体構造への関与が示唆されている塩基性核タンパク質 HCC (histone-like protein of *Cryptocodinium cohnii*) をコードする遺伝子 *hcc1*、生物群の分子系統関係を検討するマーカーとして用いられている葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子 *fed* について渦鞭毛藻類からのクローニングを試み、その塩基配列を決定、解析することにより遺伝子の発現を制御するプロモーターやシス因子、イントロンといった遺伝子構造について解析した。

## 第2章 *Crypthecodinium cohnii*からのヒストン様塩基性核タンパク質HCcをコードする遺伝子のクローニングとその遺伝子構造解析

渦鞭毛藻類は、第1章で述べたように、体細胞分裂に伴う核分裂の様式や染色体構造が他の真核生物と比べて極めて特殊であることが知られている。なかでもヒストンタンパク質の欠失とそれに伴うヌクレオソーム構造の欠如は特徴的である。

真核生物は進化に伴い長大化した染色体DNAを核に納めるため、核の主要構造タンパク質であるヒストンによりDNAをパッキングしている。一般に真核生物のヒストンはH2A、H2B、H3、H4それぞれ2分子ずつでヒストン八量体を形成し、ヒストンの塩基性を利用してDNAと結合し、クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソームを形作る。またヒストンH1がヌクレオソームの凝集を行い、いわゆる30 nmクロマチン繊維（ソレノイド）を形成する。クロマチン繊維は核マトリックスにSARを介して結合し、ループ構造を形成するが、細胞周期のM期前期に核マトリックスが染色体軸（chromosomal scaffold）を形成して凝縮し、染色体を形作る。ヒストン、特にヒストン八量体を形成するH2A、H2B、H3、H4はその機能的な重要性から真核生物内においてアミノ酸配列が極めて高度に保存されている。

一方、渦鞭毛藻類においても染色体構造の特殊性からDNAのパッキング機構に興味を持たれたこともあり、そのヒストンタンパク質とヌクレオソーム構造について研究が重ねられた。その中でDodge (1964) はファストグリーンを用いた染色法により渦鞭毛藻類がヒストンタンパク質を欠いている可能性を指摘した。またクロマチンの電子顕微鏡による観察から、渦鞭毛藻類にヌクレオソーム構造に典型的なビーズ構造が認められないこと (Hamkalo and Rattner, 1977, Bodansky *et al.*, 1979, Rizzo and Burghardt, 1982)、クロマチンのmicrococcal nuclease処理により認められるヒストンにより保護される200 bpのDNA断片が渦鞭毛藻類では認められないこと (Bodansky *et al.*, 1979, Herzog and Soyer, 1981) などから、渦鞭毛藻類がヌクレオソーム構造を持たないことが明らかとなった。しかしながら渦鞭毛藻類は明らかに染色体構造を有する。そこでその基本単位としてのヒストン様の塩基性タンパク質の存在を仮定し、塩基性核タンパク質のSDS-アクリルアミドゲル電気泳動による検出が試みられた。その結果、何れのヒストンとも泳動度の異なる分子量10,000程度の塩基性核タンパク質が*C. cohnii* (Rizzo and Nooden, 1974)、*Gymnodinium*

*nelsoni*、*Gymnodinium breve*、*Peridinium trochoideum* (Rizzo, 1981)、*P. micans* (Herzog and Soyer, 1981) において見出された。中でも*C. cohnii*の塩基性核タンパク質HCc (histon-like protein of *Crypthecodinium cohnii*, Rizzo and Morris, 1984) に関しては詳細に調べられている。HCcは分子量約14 KDaで、分子間、もしくは分子内で二量体を形成する $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の3種のvariantから成り (Vernet *et al.*, 1990)、各variantは異なる遺伝子に由来することが示されている (Rizzo PJ, 1991)。HCcはその塩基性という性質から、渦鞭毛藻類においてヒストンにかわりDNAのパッキングに関与しているとされた。しかし、この塩基性核タンパク質とDNAの核内におけるモル比が真核生物においては1.0以上であるのに対して*C. cohnii*は0.03と非常に少ないこと (Rizzo and Nooden, 1974)、HCcの二本鎖DNAとの親和性がヒストンに比べて低いこと (Vernet *et al.*, 1990)、さらにHCcが転写活性の高い領域とされている染色体表面のnucleofilament領域と核小体のnucleolar organizer region (NOR) にもみ局在していること (Geraud *et al.*, 1991) から、HCcの機能はDNAのパッキングというよりはむしろDNAの転写活性の制御因子ではないかとも考えられる。

Sala-Rovira *et al.* (1991) は*C. cohnii*のcDNA発現ライブラリーから抗HCcポリクローナル抗体を用いて2種類のHCc遺伝子をクローン化したプラスミドpHC1とpHC2を得た。各々のコードするポリペプチドHCc1、HCc2のアミノ酸配列から、HCcがDNA結合タンパク質であることは示唆されたが、ヒストンや他の既知のDNA結合タンパク質との相同性を示さず、その機能は明確にはされていない。また、cDNAからの情報であるため、その遺伝子構造に関しては言及されていない。

本章では、渦鞭毛藻類における遺伝子構造の特殊性、転写制御機構の特殊性と染色体構造との関連について明らかにすることを目的に、*C. cohnii*のゲノムDNAよりHCc1をコードする遺伝子*hcc1*をクローニングし、その遺伝子構造について解析した。

### 2.1 方法

#### *Crypthecodinium cohnii*の培養と全DNAの抽出

*C. cohnii* e30021株 (American Type Culture Collection) を栄養強化海水培地 (0.2 % yeast extract、2.0 % glucose in seawater) に接種した後25℃、暗条件にて5日間培養した。この培養液 (細胞密度約 $10^{10}$  cells/ml、対数増殖期後期) を6,000 gにて10分間遠心すること

により集藻した。得られた藻体ペレットを液体窒素中で乳鉢により破碎し、NETバッファー (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) に懸濁後、終濃度でそれぞれ1.0 mg/ml, 1.0 %となるようプロテナーゼK (Merk)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加え、65℃で1時間インキュベートし、細胞を可溶化した。この反応液を15,000 gにて10分間遠心して細胞残渣を除き、得られた上清をTEバッファー飽和フェノール、クロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) にて抽出することにより除タンパク質操作を行った後、常法に従いエタノール沈殿に供した (Sambrook et al., 1989)。沈殿画分を遠心により回収した後TEバッファーに溶解し、終濃度で100  $\mu$ g/mlとなるようRNase A (Sigma Chemical) を加え、37℃で1時間インキュベートすることによりRNAを除いた。この反応液を再びフェノール、クロロホルム:イソアミルアルコールにて抽出してRNaseを除き、エタノール沈殿に供した後、得られた沈殿画分をTEバッファーに溶解し、全DNAとして以降の実験に用いた。

また、必要に応じ、除糖操作として界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) を用いたDNAの精製を行った (Rogers and Bendich, 1988)。全DNA溶液に2×CTABバッファー (2.0 % cetyltrimethylammonium bromide, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0 % polyvinylpyrrolidone) を等量加えて65℃にて30分間インキュベートした後、クロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) にて抽出した。遠心により有機溶媒層を分離して水層を回収した。1/10容量の10 % CTAB溶液 (10 % cetyltrimethylammonium bromide, 0.7 M NaCl) を加えて混合した後、CTAB沈殿バッファー (1.0 % cetyltrimethylammonium bromide, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) を加え、1時間インキュベートした。遠心によりDNA沈殿画分を回収して1 M NaCl-TEバッファー (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1.0 M NaCl) に溶解した後、常法に従いエタノール沈殿を行った。得られた沈殿画分をTEバッファーに溶解し、以降の実験に用いた。

#### PCRによるHCC1遺伝子の増幅

*hcc1*のタンパク質コード領域のPCR (polymerase chain reaction) による増幅を目的に、プライマーHCC1-A, HCC1-B, HCC1-C, HCC1-DをSala-Rovira et al. (1991) により報告された*hcc1*のcDNA塩基配列の情報をもとに設定した (Table 1)。各プライマーの5'末端には

Table 1. Nucleotide sequences of primers for HCC1 gene amplification

primers	primer sequences	positions on cDNA*
HCC1-A	5'- CCCTGCAGAT GGCCCCAAG ATGAAGGCT -3'	64-84
HCC1-B	CCGCATGCTG CAGAAGGGCA AGGCCATGAC GAAG	115-215
HCC1-C	CCGAATTCGT CGACGACGTC TTGGCAGCTG GCCTT	358-338
HCC1-D	CCGTCGACTC AGAAGTCTGT CTTGAGGGC	400-380
HCC1-AR	CCGCATGCTG CAGAGCCTTC ATCTTGGGGG CCAT	84-64
HCC1-DR	CCGGATCCGT CGACGCCCTC AAGACAGACT TCTGA	380-400

\*The sequences of linker sites at the 5'-termini of primers are also shown.

The positions of primers are represented by the nucleotide numbers according to the cDNA of HCC1 gene.

プラスミドベクターへのクローニングを目的に制限酵素認識部位を含むリンカー配列を付加した。PCRは2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 1.0  $\mu$ Mプライマー、25units/ml Taq DNAポリメラーゼ (クラボウ)、50 ng/ml *C. cohnii*全DNAの反応条件で、また温度条件は94℃、2分間のプレヒートを行った後、94℃で1分、50℃で2分、72℃で3分のサイクルで25回行った。

また、inverse PCRに用いる鋳型DNAは、*C. cohnii*の全DNAをHind IIIにて消化した後、DNAライゲーションキット (宝酒造) を用い、DNA終濃度10 ng/ $\mu$ lの条件で自己環状化反応を行うことにより調製した。この鋳型に対しcDNAの塩基配列の情報をもとにして設定したプライマーHCC1-AR, HCC1-DR (Table 1) を用い、上記と同様の条件でPCRを行った。

PCRの増幅産物はPCR反応液を2.0 % アガロースゲル電気泳動に供することにより確認した。

#### PCR増幅産物のクローニングと塩基配列の決定

PCR増幅産物はベクタープラスミドpUC18もしくはpT7Blue (R) (Novagen, USA)、pCR II

(Invitrogen, USA) を用いてクローン化した。pUC18へクローン化するにはPCR産物、pUC18をそれぞれ適当な制限酵素で消化した後にDNAライゲーションキット (宝酒造) を用いてライゲーションを行い、常法に従い *Escherichia coli* JM109コンピートセルに形質転換し、形質転換体のスクリーニング、アルカリ-SDS法による形質転換体からのプラスミドの回収を行った (Sambrook *et al.*, 1989)。pT7Blue (R)、pCR IIへのクローンは付属のマニュアルに従いPCR産物とのライゲーションを行った後 *E. coli* JM109、INV  $\alpha$  F'各コンピートセルに形質転換し、同様にプラスミドを回収した。

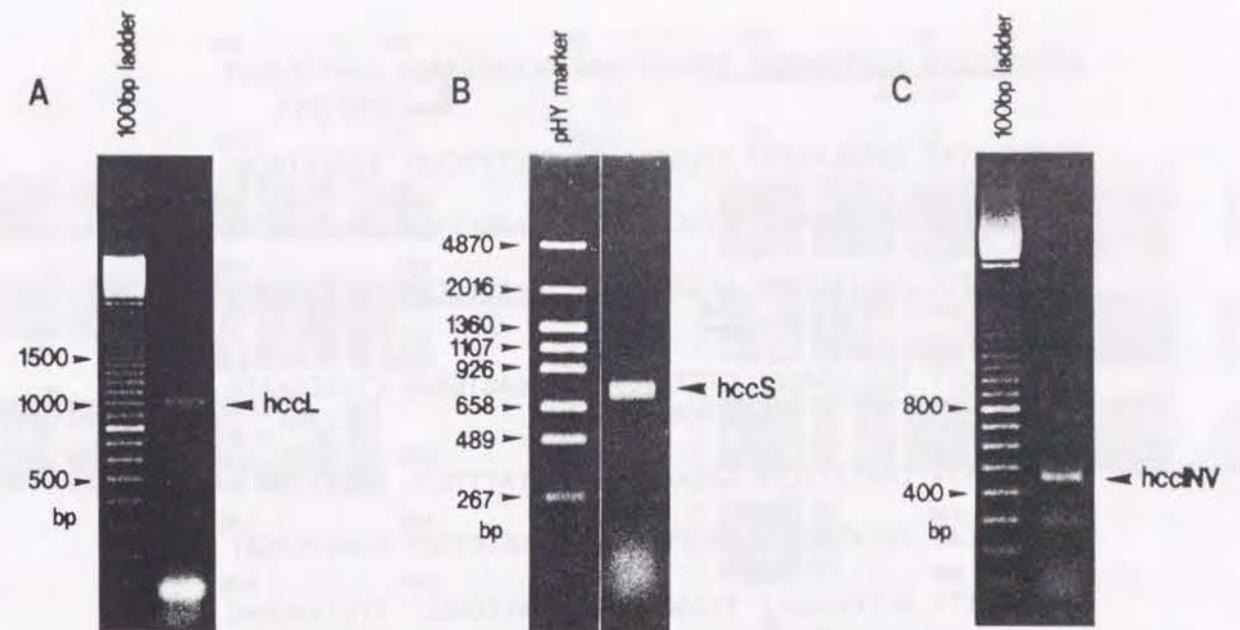
PCR増幅産物をクローン化したプラスミドはチェーンターミネーター法に基づく DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., USA) を用いてサイクルシーケンシング反応に供し、全自動DNAシーケンサー373A (Applied Biosystems, Inc., USA) にて解析することによりその塩基配列を決定した。

得られた塩基配列はDNA塩基配列解析ソフトDNAsis (日立エンジニアリング) を用いて解析し、塩基配列のアラインメントを行った。

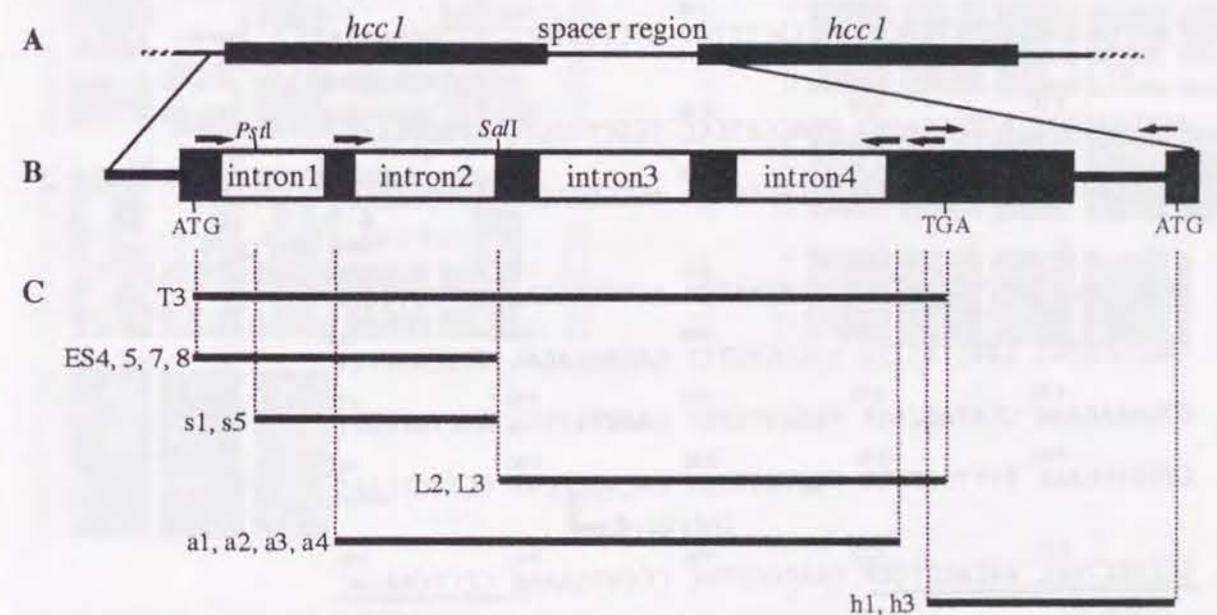
## 2.2 結果

### HCC1遺伝子のPCRによる増幅

*C. cohnii*の全DNAを鋳型とし、*hcc1*をターゲットとしたプライマーのうち外側に設定したプライマーセットHCC1-A、HCC1-Dを用いてPCRを行った結果、330 bpと1030 bpの増幅産物が得られた (Fig. 1A)。330bpの増幅産物はPCRにおけるアニーリング温度を60℃に上げると増幅されないこと、cDNAから予想される断片長より短いことから、以降の実験においては考慮しないこととした。一方1030 bpの増幅産物、*hccL*はcDNA塩基配列から予想される断片長 (343 bp) より約3倍ほど長い断片長を持つことから、非特異的な増幅に由来する可能性も考えられた。*hccL*が確かに *hcc1*に由来することを確認するため、*hccL*を鋳型により内側に設定したプライマーセットHCC1-B、HCC1-Cを用いてnested PCRを行った。その結果、770 bpの単一の増幅産物 (*hccS*) が得られ (Fig. 1B)、*hccL*、*hccS*が共に *hcc1*に由来することが確認された。しかしながら*hccS*もcDNAから予想される断片長 (250 bp) より長く、*hcc1*に介在配列が存在することが予想された。



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified fragments from the total DNA of *C. cohnii*. A, PCR-amplified products with primers HCC1-A and HCC1-D, 100 bp ladder marker is also shown; B, PCR-amplified products with primers HCC1-B and HCC1-C, pHY marker is also shown; C, Inverse PCR-amplified products with primers HCC1-AR and HCC1-DR, 100 bp ladder marker is also shown.



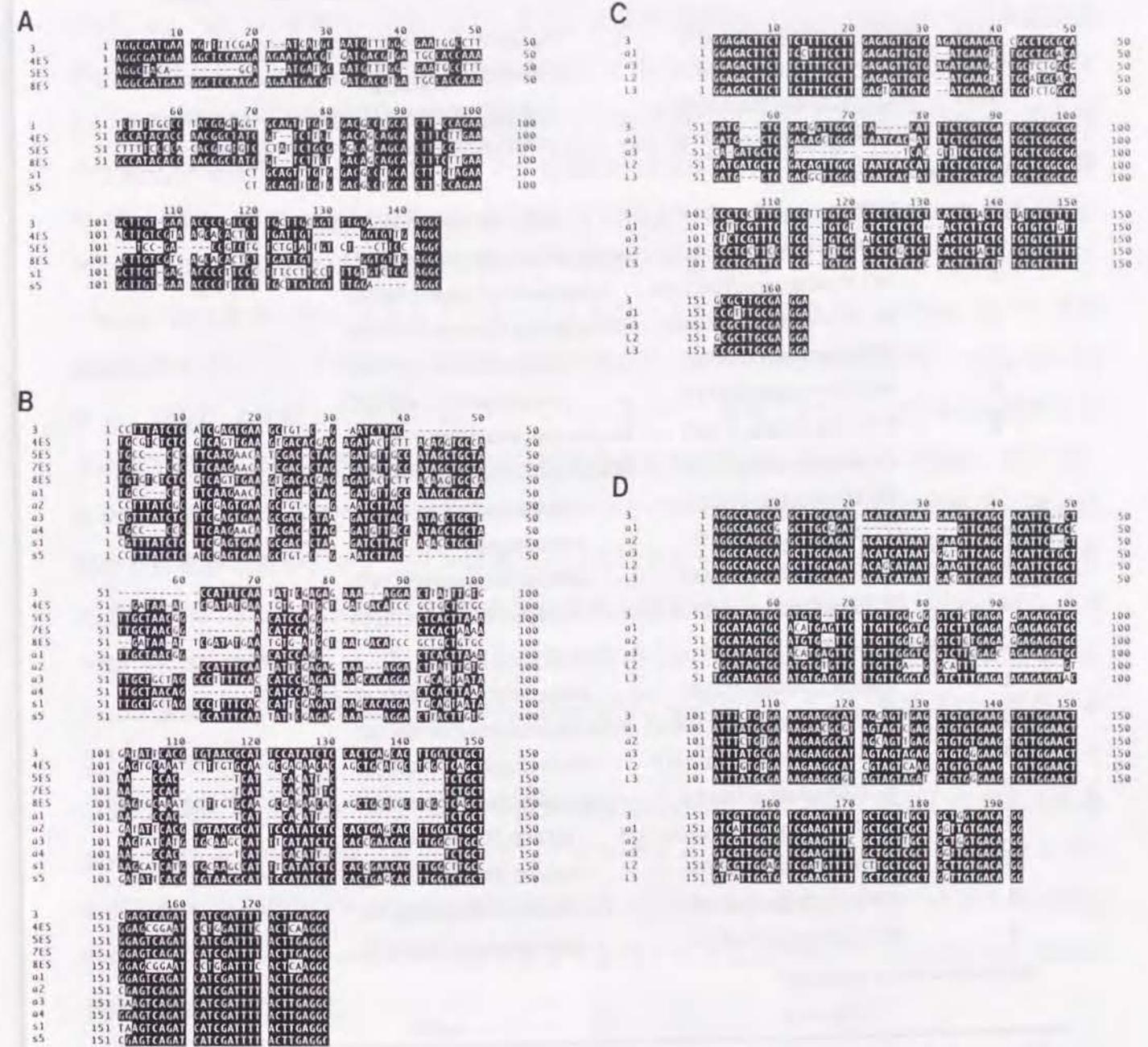
**Fig. 2.** Structural organization of the tandemly arranged HCC1 genes. **A.** Tandemly arranged HCC1 genes. **Bold** and **light** lines indicate the HCC1 coding regions and the spacer regions, respectively. **B.** Gene structure of the HCC1 gene. The exon and intron regions are shown as **solid** and **open** boxes. **Arrows** indicate the primer regions and their directions, and restriction enzymes *Pst*I and *Sal*I recognition sites are also shown. **C.** Regions of each clone derived from the PCR-amplified products.

```

10      20      30      40      50
ATGCCCCCA AGATGAAGG TGCCATGAAG GCGATGAAGG CGATGAAGT
HCC-A
60      70      80      90      100
TTTCGAATAT CATGCAATGT TTGGCGAATG GCCTTTCTTT TGCCCTACGG
110     120     130     140     150
GTGGTGCAGT TTGTGGACGC CTGCACTTCC AGAAGCTTGT GAAACCCCGT
160     170     180     190     200
CCTTGCTTGC GGTTTGGAAG GCGACTGCGA TGAAGGGCAA GGCCATGACG
intron1
210     220     230     240     250
AAGACTGGTT TGCGGAGGC CTTTATCTCA TCGAGTGAAG CTGTCGAATC
intron2
260     270     280     290     300
TTACCCATTT CAATATTCGA GAGAAAAGGA CTTATTTGTG GATATTCACG
310     320     330     340     350
TGTAACGCAT TCCATATCTC CACTGAGCAC TTGGTCTGCT CGAGTCAGAT
360     370     380     390     400
CATCGATTTT ACTTGAGGCC TTGGCGTCGT CGACCGAGCT TTCTAAGAAG
intron2
410     420     430     440     450
GACTGCGGGG CAGTCTTGGG GAGCTTGGCC ACGATCTTGC GCTGCGGAGA
intron3
460     470     480     490     500
CTTCTTCTTT TCCTTGAGAG TTGTGAGATG AAGACCGCCT GCGCAGATGC
510     520     530     540     550
TCGACGGTTG GCTACATTTT TCGTCGATGC TCGGCGGCC TCCTTTCTCC
560     570     580     590     600
TTTGTGCTC TCTCTCTAC TCTACTCTAT GTCTTTTGGC CTTGCGAGGA
intron3
610     620     630     640     650
AGTGAAGAAG ACTGGCAAGT TGACCATCCC TGGCTTGGTG ATGGTCAAGA
660     670     680     690     700
CCCAGCAAGAA GCCTGCCACC AAGGCCGGAA AGCGCGAGAT GTTCGGCAAG
intron4
710     720     730     740     750
GCCAGCCAGC TTGCAGATAC ATCATAATGA AGTTCAGCAC ATTCTTTGCA
760     770     780     790     800
TAGTGCATGT GTTCTTGTG GTGGGTCTCT GAGAGGAGAG GTGCATTTCT
810     820     830     840     850
GTGAAAGAAG GCATAGCAGT TGAGGTGTGT GAAGTGTGG AACTGTGCTT
860     870     880     890     900
GGTGTGCAAG TTTTGTGCT TGCTGCTGGT GACAGGTCGT CCTTGTGAAG
intron4
910     920     930     940     950
GCCAGCTGCC AAGACGTCGT GAAGGCCCTAC CCGTGAAGG CCCTCAAGAC
HCC-C
960
AGACTTCTGA
HCC-D

```

**Fig. 3.** Nucleotide sequence of clone T3. Primer regions are underlined and intron-exon junction sites are shown by arrows. Dotted lines are repeated sequences of the both termini of introns. Nucleotide position 1 coincides with position 64 of cDNA (Sala-Rovira *et al.*, 1991).



**Fig. 4.** Nucleotide sequence alignments of *hcc1* introns.

**A.** Intron 1. Nucleotide position 1 coincides with position 38 of clone T3 (Fig. 3). **B.** Intron 2. Nucleotide position 1 coincides with position 220 of clone T3. **C.** Intron 3. Nucleotide position 1 coincides with position 446 of clone T3. **D.** Intron 4. Nucleotide position 1 coincides with position 699 of clone T3.

**Table 2.** Sequence comparison of the *Cryptocodinium cohnii hcc1*, *Euglena gracilis rbcS*, and *cab*

intron	5' border	3' border
<i>hcc1</i>		
int1	AGGCGATGAagggcagatgaaggttt.....	ttgcggtttggaagggcGACTGCGATGAAGGGCAAGGC
int2	TGGCGGAGGcctttatcgcatc.....	attttacttgaggcCTTGGCGTCGTCGACCGAGCTTT
int3	TTGCGCTGCggagacttcttcttt.....	ttgcgcttgagaggaAGTGAAGAAGACTGGCAAGTTG
int4	TGTTCCGCAagggcagcagcttg.....	gctgctggtgacaggTCGTCCTTGTGAAGGCCAGCTG
<i>rbcS</i> of <i>Euglena gracilis</i> <sup>a</sup>		
b	GGGTTGCgctcagattacctt.....	aggtttcctgaaactGAGTGCAATTC
c	TACTATgtccaagcaatgccttg..	tgacagcagtgctcctgcatcccGACAAC
d	TGCCATgaccagggcattgcttta....	ttgagcagaactctgggcatGACGGG
e	TACTACacccagggcctgttcatt....	ggtgtgctggcctgcatcctGACAAC
f	TATTACacccagggccttttcc.....	ggagcctgtgtcccGACAAC
g	TACTACacccagggcagtttt.....	ctggcctgcatcccGACAAC
h	TCTCCcaggttgtgcttagt....	taagcacaagcatgggctctccCCTGCC
j	ACGGACcagacaattgcttaa....	taagcaattatagcagggacGCCAGC
k	TGCCCGcaaacagggcttctgct.....	gcaaacgctggtggcAGGGCC
m	TTTTTaaacagcctctcttc.....	gaagagatggttctcccTCCAT
n	AGATGAacgcaggtttccatcc.....	ggatgaaatctggttcGTTGTG
p	TTGGGCagagggatgctggtt.....	ccagcctcccacactGTTTCA
<i>cab</i> of <i>Euglena gracilis</i> <sup>b</sup>		
1	GAAACgcccagcggcatttgt.....	acaaagccgctgagggccAACCTTTTC
2	GGCCCCaaccaaaacactctgaagt.	gtttcaggggtgcttgggtgccGACCGT
3	GGTGGTgccgtacttctgctttt.....	aaaagcgggagctcctGTCCCG
4	TGTTCCaactggtggttttt.....	cagaccaccctgcccAGCGCT
5	AAGGCCacgcctgcttctgaggtctt....	agtgtgctgtgaccGGTGCC
6	GGCCCTgaccaagcttgagtt.....	aattgagcttggggccGACCGT
7	GTACCTgtccaggtcgaag.....	gcagagcctgcttGACTGG
8	GACCTCgatcatatctctc.....	agagatgtatgacctcGACCCC
Spliceosomal intron consensus <sup>c</sup>		
AGgtragt.....y <sub>n</sub> agG		

<sup>a</sup> From L. H. Tessier *et al* (1995).

<sup>b</sup> From U. S. Muchhal and S. D. Schwarzbach (1992).

<sup>c</sup> From M. R. Green (1991).

The nucleotides from the exons are in capital letters and those from the introns are in lower case letters. The *arrows* indicate direct repeats and *underlined* sequences indicate the regions potentially able to anneal. The *italics* indicate the repeated sequences found at the intron-exon junction site.

### HCC1 遺伝子に存在する介在配列

PCR増幅産物hccSはプラスミドベクターpT7Blue (R)にクローン化し、プラスミドクローンa1、a2、a3、a4を得た (Fig. 2C)。また、PCR増幅産物hccLはその配列の中に制限酵素PstI、SalIIのサイトを有するため、制限酵素にて消化後各々の断片を別個にクローニングし、クローンs1、s5、L2、L3を得た。またそれと同時にベクタープラスミドpCR IIを用いてhccL全長のダイレクトクローニングを行い、その結果クローンT3、4、5、7、8を得た (Fig. 2C)。クローンT4、5、7、8に関してはSalIIサイトより5'末端側をサブクローニングし、それぞれサブクローンES4、5、7、8を得た (Fig. 2C)。

hccS、hccL由来の各プラスミドクローンとクローンT3、サブクローンES4、5、7、8の塩基配列をチェーンターミネーター法により決定し、hcc1のcDNA塩基配列 (Sala-Rovira *et al.*, 1991) と比較した結果、hcc1のタンパク質コード領域上4ヶ所にcDNAには認められない配列の挿入が見出され、イントロン様の介在配列の存在が示された (Figs. 2B、3)。エクソン領域ではクローン間、また各クローンとcDNA塩基配列との間では配列に違いは認められなかったが、イントロン領域においてはクローン間で塩基の挿入、欠失が認められ (Fig. 4)、特にイントロン1と2で配列の差異が顕著であった (Figs. 4A、4B)。イントロン3、4においてもクローン間での塩基置換が認められた (Figs. 4C、4D)。このようなイントロン領域における塩基配列のheterogeneityから、hcc1がゲノム上に複数コピー存在することが示唆された。

また、各イントロンのエクソンとの境界領域には真核生物において共通して認められるGT-AGコンセンサス配列、またイントロンのスプライシングに機能するスプライセオソームが認識する領域のコンセンサス配列は認められなかった。その一方で、イントロン間での相同性は認められないものの、各イントロンのエクソンとの境界付近にはdirect repeatが見出された (Table 2)。

### HCC1 遺伝子周辺領域の塩基配列

hcc1の非翻訳、非転写領域も含めた周辺領域の塩基配列を決定するためにプライマーHCC1-AR、HCC1-DRを翻訳領域両末端に設定し (Table 1)、inverse PCRを行った。その結果得られた450 bpの増幅産物hccINV (Fig. 1C) を先と同様にプラスミドベクターに組み込みプラスミドクローンh1、h3を得 (Fig. 2C)、各々についてその塩基配列を決定した (Fig.

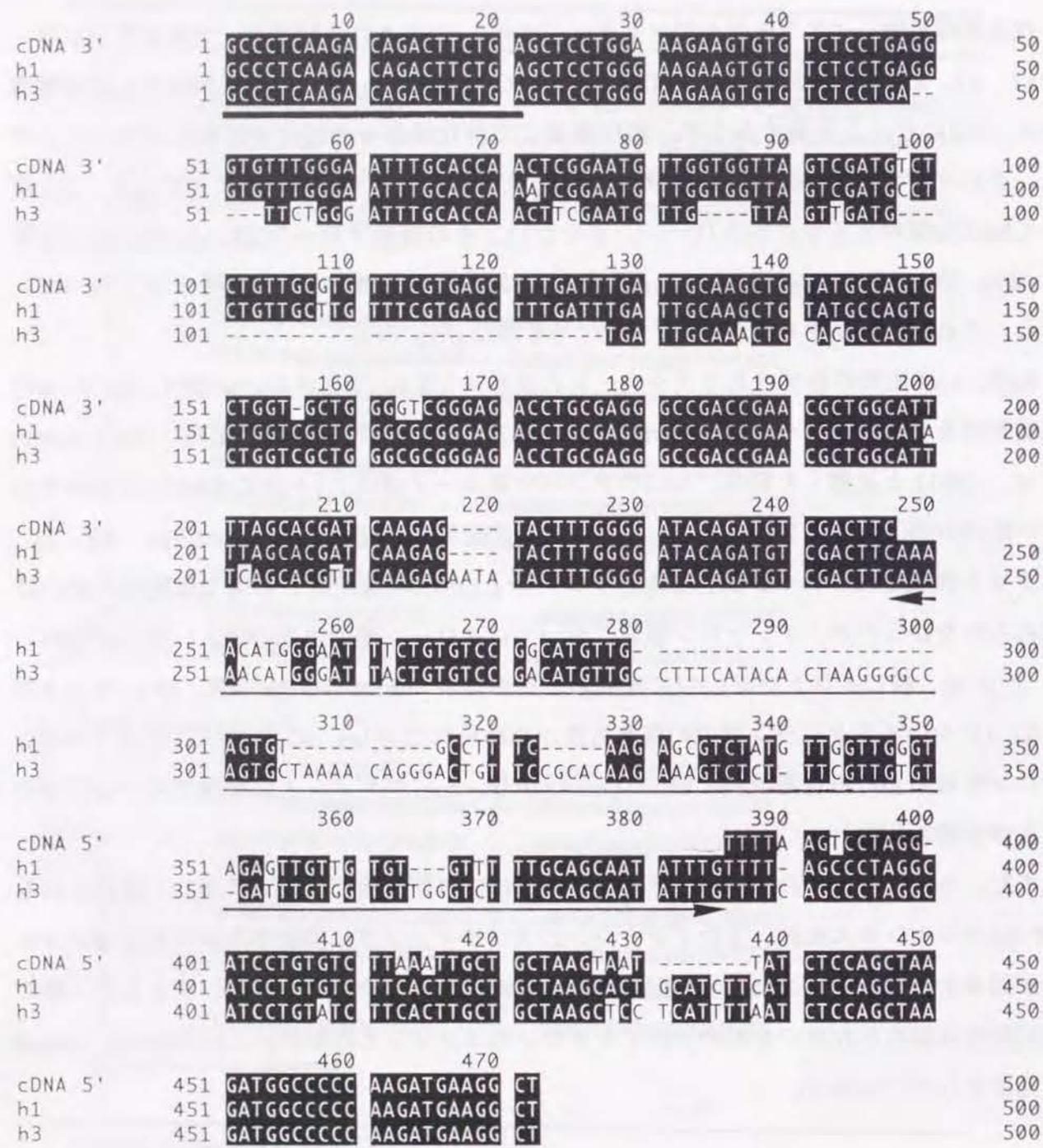


Fig. 5. Nucleotide sequence comparison of non-coding regions of *hcc1* with two clones of inverse PCR-amplified products *hcc1INV*.

Primer positions are underlined and non-transcribed region is indicated by double-headed arrows.

5)。クローンh1、h3にはその両末端にcDNAで報告されている非翻訳領域の配列が認められることから、*hcc1*の周辺領域に由来することが確認された。しかしながらinverse PCRの原理上存在するはずのHindIIIの認識部位がh1、h3共に見出されないことから、*hcc1INV*は*hcc1*の各コピーの少なくともその一部がタンデムにコードされているために増幅された*hcc1* tandem repeatのスペーサー領域であることが示された (Fig. 2)。また*hcc1*が複数コピー存在することに由来すると思われる塩基配列の差異がイントロンと同様周辺領域においても認められた (Fig. 5)。またh1とh3には真核生物のプロモーター領域に共通して認められるプロモーターコンセンサスモチーフであるTATAボックス、CAATボックス、またmRNAの3'末端にポリ(A)を付加するシグナル配列であるポリ(A)+付加シグナルは共に認められなかった。

### 2.3 考察

本章では、塩基性核タンパク質HCc1をコードする遺伝子*hcc1*の遺伝子構造を明らかにするため、PCR、inverse PCRを用いて周辺領域も含めた*hcc1*の増幅とその塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列を既に報告のある*hcc1*のcDNA塩基配列 (Sala-Rovira et al., 1991) と比較することにより、*hcc1*にcDNAには認められないイントロン様の介在配列が存在することが示された。また介在配列においてその塩基配列がプラスミドクローン間で異なることから、*hcc1*がゲノム上に複数コピー存在することが明らかとなった。更にinverse PCRにより得られた増幅産物の塩基配列から、*hcc1*の各コピーは少なくともその一部がタンデムに並んでコードされていること、またそのスペーサー領域に真核生物に普遍的に認められるプロモーターコンセンサス配列が認められないことが明らかとなった。これらの結果から以下のことが考察できる。

#### (1)HCc1遺伝子はmultigene familyを形成する

PCR、inverse PCRにより得た増幅産物の塩基配列から、*hcc1*はゲノムDNA上に複数コピー存在し、また複数コピー存在する*hcc1*の少なくとも一部はtandem repeatを形成していることが示された (Fig. 2)。このような遺伝子構造の場合、遺伝子の転写、翻訳は以下のいずれかのパターンで行われる。

- (1)各々のコピーがそれぞれプロモーターを有し、個々に転写、翻訳される。
- (2)ポリシストロニックに転写された後、各々の翻訳開始点から個々に翻訳される。
- (3)最初のコピーから最後のコピーまで一気に転写、翻訳されてポリタンパク質前駆体を合成した後、プロセッシングを受けて成熟タンパク質となる。

渦鞭毛藻類においてタンパク質をコードする遺伝子の情報はまだ少ないが、*G. polyedra*のルシフェラーゼ結合タンパク質LBP遺伝子 (Lee *et al.*, 1993)、*Amphidinium carterae*のクロロフィルa/c結合タンパク質遺伝子cab (Hiller *et al.*, 1995)、*Symbiodinium* spp.のリブローソス二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ遺伝子rbcA (Rowan *et al.*, 1996) において報告されている。これらは何れもコード領域がゲノムDNA上にtandem repeatを形成している。cabとrbcAは何れもポリタンパク質として翻訳された後プロセッシングを受けて成熟タンパク質となるが、LBPは個々の遺伝子が独立して転写、翻訳されていることが確認されている。hcc1の場合は各コピーに翻訳終始コドンが存在し、またcDNAライブラリーからスクリーニングにより得たクローンは何れも1コピーのみを持つことから、LBP遺伝子同様各コピーがそれぞれ独立して転写、翻訳されていると思われる。

## (2)HCC1遺伝子に存在するイントロンの特殊性

真核生物におけるスプライセオソームイントロンの構造と、そのスプライシング機構については詳細に検討され、ほぼ明らかにされている (Green, 1991)。スプライセオソームイントロンは5'末端にGT、3'末端にAGのコンセンサス配列がほぼ例外なく認められることから、GT-AGルールと呼ばれている。スプライシングにはスプライセオソームと呼ばれる、snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) により構成されるRNA-タンパク質複合体が作用する。スプライシングはスプライセオソームの構成成分の一つであるU1 snRNPのイントロン5'末端領域の認識により開始される。続いてU2 snRNPがイントロンの分岐部位 (branchpoint) に結合し、これをきっかけにU1、U2、U4/U6/U5 snRNPが複合体を形成することによりイントロンの5'末端は切断され、それに伴い5'末端のグアニンは分岐部位のアデニンのリボースの2'部位のOH基に求核反応によりリン酸ジエステル結合を形成し、いわゆる lariart 構造が形作られる。最終的にイントロンの3'末端が切断され、エクソン同士が連結される。スプライシングにおいてはsnRNPによるイントロン配列の認識が極めて重要であり、そのためイントロン3'末端の(Y)<sub>n</sub>NYAG↓Gに加え、U1 snRNPが認識する

イントロン5'末端の(C/A)AG↓GT(A/G)AGT、U2 snRNPが認識する分岐部位のTNCTRACの各配列は厳密に保存されている (Table 2)。また、これらのコンセンサス配列はsnRNPの構成成分であるsnRNA (small nuclear RNA) 上の配列と相補性があり、snRNAがコンセンサス配列にアニーリングすることにより各snRNPはその領域を認識する。

*C. cohnii*においてもU1、U2、U5、U6 snRNAの部分配列が報告されており、ラットやヒトと極めて高い相同性を示すことが確認されている (Reddy *et al.*, 1983, Liu *et al.*, 1984)。しかしながら*C. cohnii*のhcc1に見出されたイントロンにはsnRNAとの相補性を示すコンセンサス配列は全く認められない。その一方で、hcc1のイントロンとエクソンとの境界領域には共通配列としてAGGCモチーフが、また、この境界領域付近には7-9 bpのdirect repeat配列が認められる (Table 2)。snRNPがhcc1イントロンのスプライシングにおいてスプライセオソームとして機能するのか、またAGGCモチーフやdirect repeatがhcc1イントロンのスプライシングにどのように関与するのかを配列から特定するのは困難である。しかし、同じく渦鞭毛藻類である*Symbiodinium* spp.のrbcAに見出されたイントロンにおいてもsnRNP認識部位の配列が保存されていない (Rowan *et al.*, 1996) ことは渦鞭毛藻類におけるイントロスプライシング機構の特殊性を示唆する興味深い事例と考えられる。また、ユーグレナ植物の一種*Euglena gracilis*はその染色体が細胞周期を通じて凝集している、体細胞分裂時に核膜が消失しないなど、核構造において渦鞭毛藻類との共通性が存在することが知られている。更にこの種においては、イントロン構造においてもリブローソス二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子rbcS、クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子cabに存在するイントロンにおいてスプライセオソームイントロンのコンセンサス配列が認められない。その上エクソンとの境界領域に互いにアニールが可能な15 bp前後の配列が見出される (Table 2, Tessier *et al.*, 1995, Muchhal and Schwarzbach, 1992) など、渦鞭毛藻類との共通性がみられる。*E. gracilis*のイントロンはスプライセオソームイントロンとは異なる未知のグループに属するイントロンであると推測されているが (Tessier *et al.*, 1995)、渦鞭毛藻類においても、少なくとも独自のスプライシング機構を有する可能性が指摘できる。

## (3)HCC1遺伝子のプロモーター領域の特殊性

真核生物の遺伝子コード領域の上流には、転写因子との相互作用により転写開始に極め

て重要な働きをするプロモーターが存在している。ほとんどの遺伝子には転写開始点より19 bpないし27 bp上流にTATAボックスが存在する。TATAボックスには転写因子TFIIDが結合し、転写開始点の決定に機能する。そのほかに多くの遺伝子においてCAATボックス、GCボックスが存在し、特にGCボックスはTATAボックスの存在しないハウスキーピング遺伝子においてTATAボックスに代わり転写開始を司っていることが知られている。

*hcc1*はタンデムに並んでmultigene familyを形成しているが、各遺伝子は独立して転写されているため、*hcc1*の転写開始を指示するプロモーターは遺伝子間の非転写スペーサー領域に存在するはずである。しかしながら*hcc1*には真核生物のプロモーター、TATAボックス、CAATボックス、GCボックスのコンセンサス配列は何れも見出されない。また、mRNAの3'末端にポリ(A)を付加するシグナルであるポリ(A)+付加シグナルAATAAAも認められない。*G. polyedra*のLBP遺伝子においても同様にTATAボックス、ポリ(A)+付加シグナルが認められず (Lee *et al.*, 1993)、渦鞭毛藻類の転写制御システム、プロモーターやそれに相互作用する転写因子の特殊性を示唆している。このシステムについては渦鞭毛藻類におけるゲノムDNAからの遺伝子塩基配列情報の蓄積とプロモーター領域を欠失、塩基置換した突然変異遺伝子における転写活性、プロモーター領域に特異的に結合する転写因子の検索といった、より詳細な解析を待たねばならないが、典型的なプロモーターの欠如は遺伝子の転写制御が染色体構造と密接に相互作用していることを考えると極めて興味深い事象である。

### 第3章 渦鞭毛藻類の葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子の塩基配列から見た渦鞭毛藻類の分子系統とその遺伝子構造の解析

フェレドキシンは原核生物、真核生物を問わず広い生物種に分布する低分子モノマータンパク質であり、様々な電子伝達系において電子の授受に機能し、酸化還元電位が-310から-455 mVと比較的低いことが特徴的である (Arnon and Buchanan, 1971)。分子中にはシステイン残基をリガンドとする非ヘム鉄と酸に不安定な硫黄より成る鉄-硫黄クラスターを持ち、鉄イオンの遷移により電子の授受を行う。鉄-硫黄クラスターの構造により、[4Fe-4S]ないしは[3Fe-4S]のクラスターを有する細菌型フェレドキシン、[2Fe-2S]のクラスターを有する葉緑体型フェレドキシンに分類される。

中でも葉緑体型フェレドキシンは植物や藻類の葉緑体、シアノバクテリアに分布し、光合成における電子伝達タンパク質として機能する。光エネルギーを受けてクロロフィルより放出された電子は光化学系IIから光化学系Iへと伝達される際にATPの合成を行い、最終的に葉緑体型フェレドキシンへと渡され、この還元型フェレドキシンはサイクリック光リン酸化、NADP<sup>+</sup>の光還元、亜硝酸還元、グルタミン酸合成 (Knaff and Hirasawa, 1991)、フェレドキシン-チオレドキシンシステム (De la Torre *et al.*, 1979, Lara *et al.*, 1980) における電子供与体として機能する。

葉緑体型フェレドキシンはアミノ酸残基100前後からなり、その精製も比較的容易であったことから、シアノバクテリア (Matsui *et al.*, 1988) や紅藻類 (Hase *et al.*, 1978) も含めて70種を超える生物種においてそのアミノ酸配列並びにDNA塩基配列が報告されている (佐伯和彦、松原 央、1993)。そのアミノ酸配列は比較的保存性が高いため、主に属レベル以上の分子系統解析に利用され、光合成生物の進化系統関係について議論されている (Uchida *et al.*, 1988, Alonso *et al.*, 1995, Dutton *et al.*, 1980)。すべての葉緑体型フェレドキシンにはCys-(X)<sub>4</sub>-Cys-(X)<sub>2</sub>-Cys-(X)<sub>n</sub>-Cysの構造が保存されており、この4残基のシステインが[2Fe-2S]クラスターに配位する。また多くの植物や藻類において複数種のフェレドキシンの存在が確認されている (Dutton *et al.*, 1980, Takahashi *et al.*, 1983)。特にダイコンのイソフェレドキシンはその機能的役割について詳細に検討されており (Wada *et al.*, 1989)、光合成組織と非光合成組織における機能分担を行っていることが予想されている。またシアノバクテリアの一種*A. nabaena*ではヘテロシストで特異的に発現する*fdxH*遺

伝子由来のイソフェレドキシンが存在し (Schrautemeier and Bohme, 1985, Bohme and Haselkorn, 1988)、窒素固定に働くニトロゲナーゼに対する電子供与体として機能している。

葉緑体型フェレドキシンによる電子の授受が光合成における電子伝達に密接に関係していることもあり、葉緑体型フェレドキシンは光によりその発現が制御されることが知られている。この発現調節は特にフィトクローム系による転写制御に由来する (Dobres *et al.*, 1987)。またイソフェレドキシンにおいてはその各々が特定の組織においてのみ発現する、いわゆる組織特異的発現も認められる (Vorst *et al.*, 1990)。このような発現制御に関与するシス因子については葉緑体型フェレドキシン間での比較、葉緑体型フェレドキシンと同様光による発現制御を受けるリブローズ二リン酸カルボキシラーゼやクロロフィル *a/b* 結合タンパク質をコードする遺伝子の転写制御モチーフとの類似性から検討されている (Caspar and Quail, 1993, Vorst *et al.*, 1993, Somers, 1990)。

真核生物の葉緑体型フェレドキシンは葉緑体内に存在するストロマタンパク質であるが、その遺伝子は核ゲノム上にコードされている。そのため核ゲノムにコードされている他の葉緑体タンパク質と同様葉緑体への移行シグナルであるトランジット配列がアミノ末端に付加されている。高等植物ではトランジット配列のアミノ酸配列が多数報告され (de Boer and Weisbeek, 1991)、その疎水性プロフィールや予想される二次構造、人為的に突然変異を導入したトランジット配列を用いた研究からその機能ドメインが推測されている (Smeekens *et al.*, 1985, von Heijne *et al.*, 1989, de Boer and Weisbeek, 1991, Pilon *et al.*, 1995)。また、トランジット配列の認識と葉緑体内への輸送に葉緑体膜タンパク質複合体が機能していること (Soll and Alefsen, 1993, Perry and Keegstra, 1994, Schnell *et al.*, 1994, Kessler *et al.*, 1994)、トランジット配列のプロセッシングを行うシグナルペプチダーゼがストロマに存在すること (Robinson and Ellis, 1984, Su and Boschetti, 1993) が明らかにされている。

葉緑体型フェレドキシンに認められるこれらの性質は、渦鞭毛藻類の進化系統関係について議論する上で極めて有用な指標となり得る。渦鞭毛藻類はその核構造、染色体構造の特殊性から真核生物内での進化系統関係について議論されてきたこともあり、rRNA もしくはそれをコードする rRNA 遺伝子を用いてその進化系統的な位置が分子進化的見地から示された (Hinnebusch *et al.*, 1981, Maroteaux *et al.*, 1985, Herzog and Maroteaux, 1986,

Gunderson *et al.*, 1987, Gajadhar *et al.*, 1991, McNally *et al.*, 1994)。しかしながら光合成生物の分子進化の良いマーカーとされているリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子、伸長因子 EF1 をコードする遺伝子などについては、渦鞭毛藻類における遺伝子クローニングが困難であることもあり全く検討されていない。そのため、渦鞭毛藻類における分子進化的な解析は一面的であると言わざるを得ない。そこで分子進化マーカーの一つである葉緑体型フェレドキシン遺伝子の塩基配列、もしくはアミノ酸配列を渦鞭毛藻類において知ることは渦鞭毛藻類の進化系統をより多面的に捉える一助となり得る。

また、渦鞭毛藻類の染色体構造の特殊性はそれらと密接な関係にある転写制御系の特殊性を予想させる。渦鞭毛藻類ではタンパク質をコードする遺伝子におけるプロモーターやエンハンサーといった転写制御領域に関する情報に関しては *G. polyedra* のルシフェラーゼ結合タンパク質遺伝子 (Lee *et al.*, 1993) において報告されている。また第 2 章において、塩基性核タンパク質 Hcc1 遺伝子 *hcc1* のプロモーター領域について報告した。何れの場合も真核生物にユニバーサルなコンセンサス配列は認められず、渦鞭毛藻類のプロモーターの特殊性が指摘できる。更に、光合成生物においては光による光合成関連のタンパク質、酵素群の発現制御系の存在が強く示唆される。よって、葉緑体型フェレドキシン遺伝子のプロモーター領域の解析は、プロモーター構造の解析のみならず、渦鞭毛藻類の光発現制御に関与するエンハンサー、もしくはシス因子構造の、他の真核生物との比較という意味からも極めて興味深い。

一方、葉緑体の膜構造に着目すると、陸上高等植物は二重膜構造を有し、葉緑体が光合成原核生物の共生に由来するとする、いわゆる共生説の根拠の一つとされている。しかしながら褐藻類、ラフィド藻類、クリプト藻類、クロララクニオ藻類においては葉緑体膜の外側に小胞体膜 (endoplasmic reticulum, ER) に由来する二重膜構造の葉緑体 ER が、渦鞭毛藻類やユーグレナ藻類では同じく一重膜構造を持つ葉緑体 ER が認められる (Lee, 1989)。このことは、これらの微細藻類の葉緑体の起源が原核生物ではなく真核光合成生物であるとする、いわゆる多重共生に由来することを示唆している (Gray, 1989)。特にクリプト藻類、クロララクニオ藻類においては共生生物に由来するとされる核様構造、ヌクレオモルフが葉緑体膜と小胞体膜の間隙に認められ (Gillott and Gibbs, 1980, Morrall and Greenwood, 1982)、その 18S rRNA の塩基配列から葉緑体が原始紅藻に由来することが示

された (Douglas *et al.*, 1991, Maier *et al.*, 1991)。渦鞭毛藻類をはじめ多重共生により葉緑体を獲得したと考えられる生物種においては、膜構造の特殊性から葉緑体タンパク質の葉緑体内への輸送において高等植物とは異なるシステムを機能させている可能性が指摘できる。特に葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列の解析はこのシステムの指標として有用である。

以上のことから、本章では渦鞭毛藻類の真核生物内における進化系統関係、渦鞭毛藻類内の系統関係を解析するための分子進化マーカーとしての有効性、プロモーター領域をはじめとする遺伝子構造、多重共生に由来する渦鞭毛藻類の葉緑体膜構造とトランジット配列との相関について明らかにすることを目的に、渦鞭毛藻類より葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子 *fedQ* のクローニングとその塩基配列の決定を行い、渦鞭毛藻類の進化系統関係の検討並びにプロモーター領域、トランジット配列の解析を行う。

### 3.1 方法

#### 渦鞭毛藻類の培養

本章において用いた渦鞭毛藻類は以下に示す5種である。

*Peridinium bipes*

*Alexandrium tamarense* OF151株、OF181株

*Alexandrium catenella* OFX072株

*Gonyaulax polyedra*

*P. bipes* は和歌山県合川ダム貯水池において発生した赤潮ブルームをプランクトンネットにより集藻してDNAの抽出実験に供した。集藻した藻体は光学顕微鏡観察によりほぼ単藻であることを確認した。また当研究室において分離された *A. tamarense* OF151株、OF181株、*A. catenella* OFX072株、また道旗氏 (広島大学) より分譲していただいた *G. polyedra* はSWIIm培地に接種し20℃、14L:10Dの明暗条件で培養した後、対数増殖後期に達した培養液を5,000 gにて10分間遠心することにより集藻し、DNAの抽出に用いた。

#### 渦鞭毛藻類からの全DNAの抽出

全DNAの抽出は第2章の方法に従った。また、必要に応じてDNA抽出キットSepaGene

(三光純薬) を用い、付属のマニュアルに従いDNAの精製を行った。

#### *Gonyaulax polyedra*からの全RNAの抽出

SWIIm培地に接種し、20℃、14L:10Dの明暗条件で培養した *G. polyedra* の培養液を培養開始後20日 (対数増殖後期) に回収し、5,000 gにて10分間遠心することにより集藻した。藻体ペレットを液体窒素中乳鉢にてホモジナイズし、GTC溶液 (4 M guanidium thioisocyanate, 25 mM sodium citrate) に懸濁した。懸濁液を5.7 M CsCl溶液 (5.7 M cesium chloride, 0.1 M ethylenediamine tetraacetate) に重層し、 $1 \times 10^5$  gにて24時間超遠心に供した。沈殿画分に回収されたRNAをH<sub>2</sub>Oにて洗浄した後、1.0 % SDSを含むTEバッファーに溶解した。RNA溶液をフェノール・クロロホルム抽出に供し除タンパク質を行った後、エタノール沈殿によりRNA画分を回収し、終濃度1.0 μg/μlとなる様TEバッファーに溶解した。このRNA溶液に1/5容の10 M塩化リチウム溶液を加えて1時間氷冷し、沈殿画分にRNAを回収することによりRNAの精製を行った。RNAはTEバッファーに溶解後エタノール沈殿に供し、そのまま-20℃で保存した。使用の際にはH<sub>2</sub>Oに溶解した。

#### PCR、RT-PCRによる葉緑体型フェレドキシン遺伝子の増幅

##### *P. bipes*

Uchida *et al.* (1988) により報告された *P. bipes* 葉緑体型フェレドキシンのアミノ酸配列をもとにdegenerate primer FXDTP-I、FXTCV-RIをデザインし (Table 3)、*P. bipes* 全DNAを鋳型にPCRを行った。PCRの条件は、サイクル数を35回とする以外第2章のHCc1遺伝子の増幅において用いた条件に従った。

##### *A. tamarense* OF151株

*P. bipes* のPCR増幅産物P BFDĐTの塩基配列をもとにプライマーP BFDCSS、PBFDMGNRを設定し (Table 3)、全DNAを鋳型にPCRを行った。PCRの条件は *P. bipes* の場合に従った。

##### *A. tamarense* OF181株、*A. catenella* OFX072株

*A. tamarense* OF151株のTAIL-PCR用に設計したプライマーATFDTAIL5、6、7、4R（後述）を用い、各々全DNAを鋳型にPCRを行った。PCRの条件は*P. bipes*の場合に従った。

**Table 3.** Primer sequences used for PCR and TAIL-PCR

Primers	Primer sequences (5' → 3')
<i>Peridinium bipes</i>	
for PCR	
FXDTP-I	GA(C/T)ACICCIGA(C/T)GGIAA(A/G)AA*
FXTCV-RI	GTIGG(A/G)TAIGTIAC(A/G)CAIGT*
for TAIL-PCR	
PBFDTAIL1	CCCTGGGCACTCAAA(A/G/T)(A/G)(A/G)CTTCTTC
PBFDTAIL2	TGAGGACCTTTCCTGCGCA(A/G)CTCGA
PBFDTAIL3	GATC(A/G)(A/C/T)ACCCGTGAGGACCTTTC
PBFDTAIL4	CTCGAG(C/T)TGCGCAGGAAAGGTCCTCA
PBFDTAIL5	GTCCTCACGGGT(A/G/T)(C/T)GATCGACCA(A/G)
PBFDTAIL6	AACGGCTA(C/T)TGCCTCACCTGCGTCA
<i>Alexandrium tamarense</i> OF151, OF181, <i>A. catenella</i> OFX072	
PBFDCSS	TGCTC(A/G)TCCGATCAGGCATTCTTG
PBFDMGNR	GGTGAGGCA(A/G)TAGCCGTTGCCCAT
ATFDTAIL2R	CTGGTC(A/G)ATGGA(G/T)CCGAGAGGACC
ATFDTAIL3R	CCTGGTCAGACTGGTC(A/G)ATGGA(G/T)CC
ATFDTAIL4R	GGTGAGGCAGTAGCCGTTGCCCATC
ATFDTAIL5	CTC(A/C/G/T)TGCCG(C/T)GC(A/G/T)GGCTC(C/T)TG(C/T)TCC
ATFDTAIL6	(A/G)(C/T)TGCC(A/G)TACTC(A/C/G/T)TGCCG(C/T)GC(A/G/T)GGC
ATFDTAIL7	CT(C/G/T)GA(C/T)CAGGC(C/G/T)GA(A/G)GAGGA(G/T)GGC
<i>Gonyaulax polyedra</i>	
for PCR	
PBFDYIL	TACATCC(A/T)GG(A/T)CAAGGC(C/T)GAGGAG
PBFDQAFR	CTGGTC(A/G)TCGTCCAAGAATGCCTG
for TAIL-PCR	
GPTA1R	CA(A/G)ACCCTCCTCCTC(A/G)GCCTTGACC
GPTA2R	CAGCTCGAGCAGGAGCC(A/C)GCGCGGC
GPTA3R	GAGCC(C/T)GAGAGCACCTT(C/T)CCCGC(A/G)C

\* I indicates inosine.

#### *G. polyedra*

*G. polyedra*からの*fedQ*の増幅はRT-PCR (reverse transcriptional PCR) により行った。5.0  $\mu$ gの全RNAを70℃で10分間熱処理してランダムに形成される二次構造の変性を行った後、first strand buffer存在下2.5  $\mu$ M random hexamer、0.5 mM dithiothreitol、10 mM dNTP mixtureの条件で25℃、10分間インキュベートすることによりプライマーのアニーリングを促した。その後逆転写酵素Superscript II (Gibco BRL)を終濃度10 units/ $\mu$ lとなる様加えて42℃で1時間インキュベートし、逆転写反応を行った。反応液はフェノール:クロロホルム抽出することにより除タンパク質操作を行った後エタノール沈殿に供し、合成されたcDNAを沈殿画分に回収した。これをH<sub>2</sub>Oに溶解し、PCRの鋳型として用いた。

PCRによる*fedQ*の増幅は、cDNAを鋳型に*P. bipes*のPCR増幅産物PBFDDTの塩基配列をもとにデザインしたプライマーPBFDYIL、PBFDQAFR (Table 3) を用いて行った。PCRの条件は*P. bipes*のそれに従った。

#### TAIL-PCRによる葉緑体型フェレドキシン遺伝子周辺領域の増幅

TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR) はLiu and Whittier (1995)、Liu *et al.* (1995) の方法に準じた。各渦鞭毛藻類に対して用いたspecific primerの設定については以下に示す。

#### *P. bipes*

*P. bipes*のPCR増幅産物PBFDDTの塩基配列をもとにプライマーPBFDTAIL1、2、3、4、5、6を設定した (Table 3)。

#### *A. tamarense* OF151株

PCR増幅産物ATFD1M1の塩基配列をもとに5'末端側増幅用プライマーATFDTAIL2R、3R、4Rを設定した (Table 3)。また、5'末端側のTAIL-PCRの結果得られた増幅産物ATFDTAIL2R.2、ATFDTAIL2R.3の塩基配列をもとに3'末端側増幅用プライマーATFDTAIL5、6、7を設定した (Table 3)。

*A. catenella* OFX072株

*A. tamarensis* OF151株に対して用いた5'末端側増幅用プライマーATFDTAIL2R、3R、4Rを用いた。

*G. polyedra*

RT-PCR増幅産物GPFDRTYQ160の塩基配列をもとに5'末端側増幅用プライマーGPTA1R、2R、3Rを設定した (Table 3)。

**Table 4.** Thermal cycle settings used for TAIL-PCR

reaction	thermal settings	cycle number
primary	93 °C (1 min), 95 °C (1 min)	1
	94 °C (1 min), 62 °C (1 min), 72 °C (2.5 min)	5
	94 °C (1 min), 25 °C (3 min), ramping to 72 °C over 3 min, 72 °C (2.5 min)	1
	94 °C (30 sec), 68 °C (1 min), 72 °C (3 min)	15
	94 °C (30 sec), 68 °C (1 min), 72 °C (3 min)	
94 °C (30 sec), 44 °C (1 min), 72 °C (3 min)		
	72 °C (7 min)	1
secondary	94 °C (30 sec), 64 °C (1 min), 72 °C (3 min)	12
	94 °C (30 sec), 64 °C (1 min), 72 °C (3 min)	
	94 °C (30 sec), 44 °C (1 min), 72 °C (3 min)	
	72 °C (7 min)	1
tertiary	94 °C (30 sec), 64 °C (1 min), 72 °C (3 min)	10
	94 °C (30 sec), 64 °C (1 min), 72 °C (3 min)	
	94 °C (30 sec), 44 °C (1 min), 72 °C (3 min)	
	72 °C (7 min)	1

PCRは3段階で行った。各段階のPCR温度サイクル条件はTable 4に示す。1段階目のPCRは全DNAを鋳型に2.0 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTP mixture、0.2 μM specific primer、4.0 μM arbitrary degenerate primer (Liu *et al.*, 1995)、25 units/ml Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer)、0.5 μg/ml全DNAの反応条件で行った。2段階目のPCRは鋳型としてその反応液量の1/20量を1段階目のPCR反応液から取り、1段階目のPCRと同条件で行った。3段階目も同様に2段階目の増幅産物を鋳型にPCRを行った。得られた増幅産物は1.5 %アガロースゲル電気泳動により確認した。

PCR増幅産物のクローニングと塩基配列の決定

PCR増幅産物のプラスミドベクターへのクローニングはTA Cloning Kit (Invitrogen) を用いた。すべての操作は付属のマニュアルに従った。

PCR増幅産物をクローン化したプラスミドの塩基配列の決定は第2章のHCc1遺伝子の場合と同様に行った。

葉緑体型フェレドキシンアミノ酸配列のアラインメントと系統樹の作成

アミノ酸配列の多重整列 (マルチプルアラインメント) はHigginsによるツリーベース法に基づくコンピュータープログラムClustal W Version 1.5 (Thompson *et al.*, 1994) にて行った。多重整列からの遺伝距離の算出、遺伝距離からの系統樹の構築はそれぞれKimura (1980) の方法、Saitou and Nei (1987) の近隣結合法に基づくコンピュータープログラムパッケージPHYLIP Version 3.5c<sup>1</sup>のPROTDIST、NEIGHBOUR、DRAWTREEにより行った。

葉緑体型フェレドキシントランジット配列の解析

トランジット配列の疎水性プロファイルはKyte and Doolittle (1982) の方法に従いDNA塩基配列解析ソフトDNAsis (日立エンジニアリング) を用いて推測した。シグナル配列のプロセッシング部位はPSORT電子メールサーバ (psort@nibb.ac.jp) によりMcGeoch (1985)

<sup>1</sup> Felsenstein J: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle (1993)

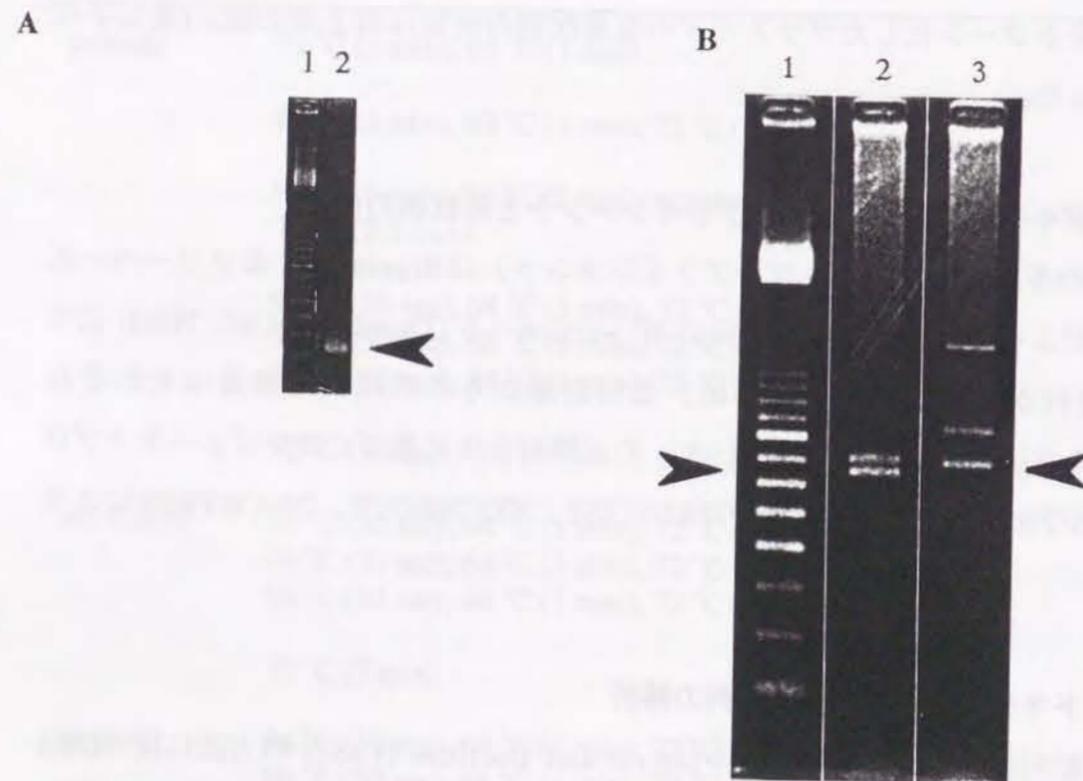
と von Heijne (1983) の方法に従い推測した。

### 3.2 結果

#### 葉緑体型フェレドキシン遺伝子のPCR、TAIL-PCRによる増幅

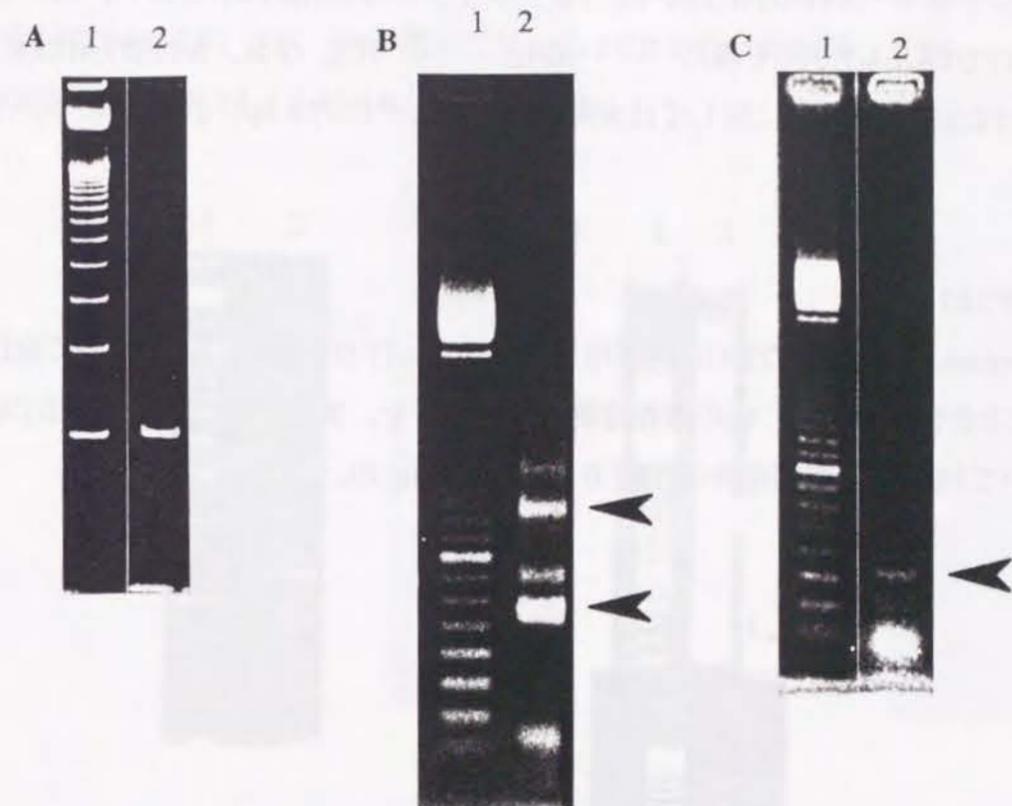
##### *P. bipes*

全DNAを鋳型にプライマーFXDTP-I、FXTCV-RIを用いてPCRを行った結果、224 bpの増幅産物PBFDDTを得た (Fig. 6A)。また、その周辺領域の塩基配列情報を得るため、5'側周辺領域用にPBFDTAIL1、2、3を、3'側周辺領域用にPBFDTAIL4、5、6を設定しTAIL-PCRを行った結果、何れも3段階目のPCRより約700 bpの5'側周辺領域増



**Fig. 6.** PCR and TAIL-PCR amplified products derived from the *Peridinium bipes* chloroplast-type ferredoxin.  
**A.** PCR amplified product PBFDDT. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, PBFDDT (arrowhead). **B.** TAIL-PCR amplified products PBFDTAIL3 and PBFDTAIL6 (arrowheads). Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, PBFDTAIL3; lane 3, PBFDTAIL6.

幅産物PBFDTAIL3、同様に約700 bpの3'側周辺領域増幅産物PBFDTAIL6を得た (Fig. 6B)。



**Fig. 7.** PCR and TAIL-PCR amplified products derived from the *Alexandrium tamarense* OF151 chloroplast-type ferredoxin.  
**A.** PCR amplified product ATFD1CM1. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, ATFD1CM1. **B.** TAIL-PCR amplified products ATFDTAIL2R.2 and ATFDTAIL2R.3. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, ATFDTAIL2R.2 and ATFDTAIL2R.3 (arrowheads). **C.** TAIL-PCR amplified product ATFDTA5-4.7.350. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, ATFDTA5-4.7.350 (arrowhead).

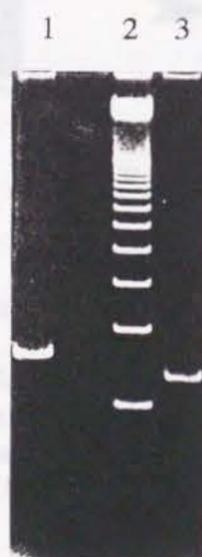
##### *A. tamarense* OF151株

*P. bipes*由来のPCR産物PBFDDTの塩基配列をもとに設計したプライマーPBFDCSS、PBFDMGMRを用いて全DNAを鋳型にPCRを行い、99 bpの増幅産物ATFD1CM1を得た (Fig. 7A)。また、ATFD1CM1の周辺領域の塩基配列を決定するため、ATFD1CM1の塩

基配列をもとに5'末端側周辺領域用プライマーATFDTAIL2R、3R、4RをデザインしTAIL-PCRを行った結果、約550 bp、1050 bpの増幅産物ATFDTAIL2R.2、ATFDTAIL2R.3を得た (Fig. 7B)。更に5'末端側のTAIL-PCR増幅産物の塩基配列から3'末端側用プライマーATFDTAIL5、6、7をデザインしてTAIL-PCRを行い、321 bpの増幅産物ATFDTA5-4.7.350を得た (Fig. 7C)。なお、ATFDTAIL2R.2、ATFDTAIL2R.3の塩基配列に関しては3'末端側のそれぞれ579 bp、544 bpについてのみ決定した。

#### A. tamarensis OF181株

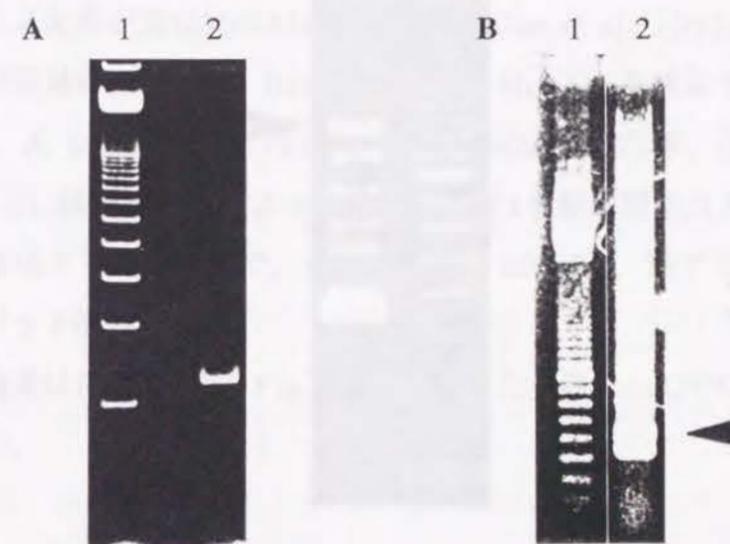
A. tamarensis OF151株のTAIL-PCR用プライマーATFDTAIL7、4Rを用いて全DNAを鋳型にPCRを行い、156 bpの増幅産物OF181.7-4を、またプライマーATFDTAIL6と4Rを用いて127 bpの増幅産物OF181.6-4を得た (Fig. 8)。



**Fig. 8.** PCR amplified products derived from the *Alexandrium tamarensis* OF181 chloroplast-type ferredoxin. Lane 1, PCR product OF181.7-4; lane 2, 100 bp ladder marker; lane 3, PCR product OF181.6-4.

#### A. catenella OFX072株

A. tamarensis OF151株のTAIL-PCR用プライマーATFDTAIL5、4Rを用いて全DNAを鋳型にPCRを行い、119 bpの増幅産物OFX072.5-4を得た (Fig. 9A)。また、この5'側周辺領域を増幅するため、同じくA. tamarensis OF151株のTAIL-PCR用プライマーATFDTAIL2R、3R、4Rを用いてTAIL-PCRを行った結果、426 bpの増幅産物OFX072TA4R.3R-4.7.450を得た (Fig. 9B)。



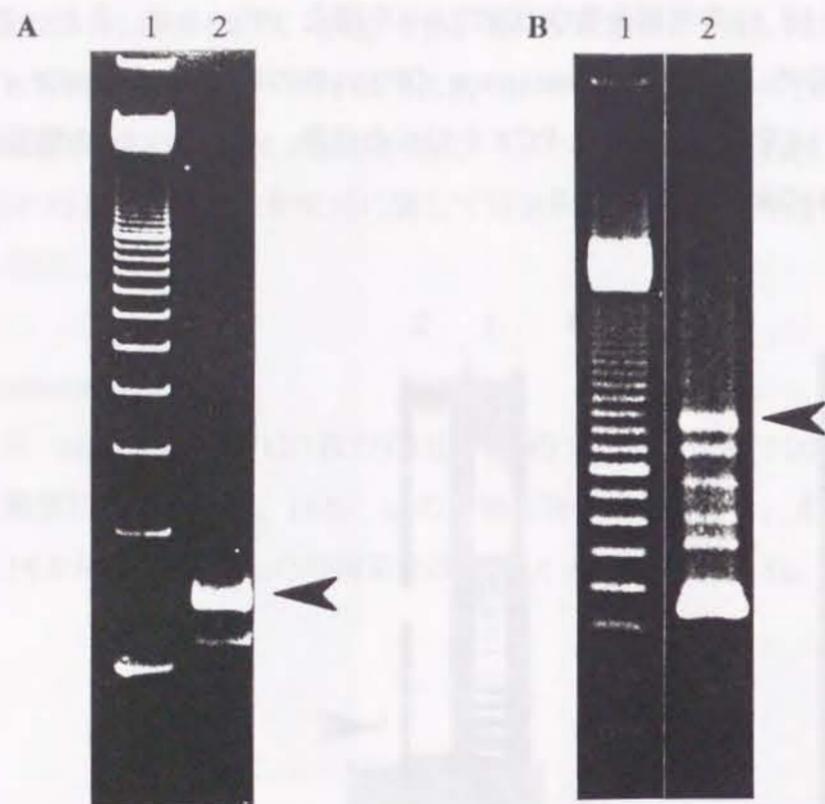
**Fig. 9.** PCR and TAIL-PCR amplified products derived from the *Alexandrium catenella* OFX072 chloroplast-type ferredoxin gene.

**A.** PCR amplified product OFX072.5-4. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, OFX072.5-4. **B.** TAIL-PCR amplified product OFX072TA4R.3R-4.7.450. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, OFX072TA4R.3R-4.7.450 (arrowhead).

#### G. polyedra

P. bipes由来のPCR産物PBFDDTの塩基配列をもとに設計したプライマーPBFDYIL、PBFDAQFRを用いてRT-PCRを行い、138 bpの増幅産物GPFDRTYQ160を得た (Fig. 10A)。また、GPFDRTYQ160の5'末端側周辺領域を増幅するため、GPFDRTYQ160の塩基配列をもとにプライマーGPFDTA1R、2R、3Rを設定し、全DNAを鋳型にTAIL-PCRを行った。その結果、約1100 bpの増幅産物GPTA3R-4.7Rを得た (Fig. 10B)。な

お、GPTA3R-4.7Rの塩基配列は3'末端側の609 bpについてのみ決定した。



**Fig. 10.** PCR and TAIL-PCR amplified products derived from the *Gonyaulax polyedra* chloroplast-type ferredoxin gene. **A.** PCR amplified product GPFDRTYQ160. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, GPFDRTYQ160 (arrowhead). **B.** TAIL-PCR amplified product GPTA3R-4.7R. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, GPTA3R-4.7R (arrowhead).

#### 葉緑体型フェレドキシン遺伝子の塩基配列の解析

PCR、TAIL-PCRにより得た増幅産物はプラスミドベクターpCR IIにクローニングした後その塩基配列を決定した。その結果、最終的に*P. bipes*からは922 bp、*A. tamarensis* OF151株からは804 bp、*A. tamarensis* OF181株からは156 bp、*A. catenella* OFX072株からは480 bp、*G. polyedra*からは673 bpの塩基配列情報が得られた。この塩基配列からアミノ酸配列を推測し、Uchida *et al.* (1988) により報告された*P. bipes*のアミノ酸配列や高等植物の葉緑体型フェレドキシンのアミノ酸配列と比較したところ、その何れとも極めて高

い相同性を示し、PCR、TAIL-PCR増幅産物がフェレドキシン遺伝子に由来することが確認された。また、このアミノ酸配列の比較から葉緑体型フェレドキシン成熟タンパク質のコード領域を決定し、*P. bipes*、*A. tamarensis* OF151株からは成熟タンパク質全長を含む領域が、*A. catenella* OFX072株、*G. polyedra*からは5'末端側周辺領域を含む部分配列が、また*A. tamarensis* OF181株からは成熟タンパク質中央部の部分配列が得られていることが確かめられた。

また、トランジット配列領域の決定は、高等植物において報告されているトランジット配列のアミノ末端が常にMet-Ala-で始まる (Pilon *et al.*, 1995) ことを参考に、成熟タンパク質コード領域の上流にin frameで存在するMet-Ala-を検索することにより行い、その結果*P. bipes*、*A. tamarensis* OF151株、*A. catenella* OF072株、*G. polyedra*においてそれぞれ塩基番号1-6に確認された。よって、塩基番号1を翻訳開始点とし、ここから成熟タンパク質コード領域アミノ末端まで、それぞれ77、80、83、79アミノ酸により構成される領域をトランジット配列とした。

以上の結果はFig. 11からFig. 15にまとめた。尚、*fedQ*中には介在配列の存在は認められなかった。

5' AGG ACC TTT CCT GCG CAG CTC GAG AAG CCA CTA GCA CGG CAT AAG CCG ACA GAG -220  
 TTT ATC ATC AGT TGT CGA TCA TTT CAA GTC GCA TTA GTC AAC AGG CGG GTC ATG -166  
 CCC GAT CCC CAC ATT TCA CTT CCC AGT CTG CGA CGT AGC TTA AGC TTC ACA CAT -112  
 TTT AGC AGG AAG TCG GCC GGG TGT GTG GGC AGG CAA CTC AGG GGA TGC GTT GCG -58  
 ATG TGG TAC AAG CCC CCT TTT TGA AAG GCT GNC ACA ATC TTG ATT TGC AAG CCT -4  
 GCC ATG GCG TCC AAG AGC ATT CTG GCC CCA ACT CTG CTC GTG GCG GCG CTC GGC 50  
 M A S K S I L A P T L L V A A L G  
 ACT GTT CTC CTC CGC CGC TCC ATG CTG GCG CCG ACC TTC ATT GCA CCT CAC TCA 104  
 T V L L R R S M L A P T F I A P H S  
 AGC AGC ACT TTG AGT CTA CAC CAG GGC TGC GTT CAT GTG GCT GGC GGC GGC GAC 158  
 S S T L S L H Q G C V H V A G G G D  
 ACC GCC ACC CTT GCC GGT GCT GTG CCG GCG ATC GTG AGC AGC GTG CCT ACG CGA 212  
 T A T L A G A V P A I V S S V P T R  
 CAA GGA GTC GCA GCA CAC TTC AAA GTG ACT TTG GAC ACC CCG GAC GGC AAG AAG 266  
 Q G V A A H F K V T L D T P D G K K  
 TCC TTC GAG TGC CCA GGG GAC TCC TAC ATC CTC GAC GAG GCG GAG GAG GAG GGC 320  
 S F E C P G D S Y I L D E A E E E G  
 CTG GAG CTG CCG TAT TCG TGC CGC GCA GGC TCG TGC TCG AGC TGC GCA GGA AAG 374  
 L E L P Y S C R A G S C S S C A G K  
 GTC CTC ACG GGT GTG ATC GAC CAG TCC GAT CAA GCA TTC TTG GAC GAC GAC CAG 428  
 V L T G V I D Q S D Q A F L D D D Q  
 ATG GGC AAC GGC TAT TGC CTC ACC TGC GTC ACC TAC CCC ACA TCC GAC GTG ACG 482  
 M G N G Y C L T C V T Y P T S D V T  
 ATC ATG ACA CAC TGC GAG AGC GAA CTT TGA GCG GGG GTG GCG CGT CCG GAG GGA 536  
 I M T H C E S E L \*  
 GAA ATA AAT TCT ATG ATT GCG GCC CAA AAA ATA TAT ATA AAA TAC AGA ACA TTT 590  
 TGG GGG GCT TGT TCA ACA TTT TGA ATT ATT GAC CAA GAT CCT TCC ATA TTC ACC 644  
 GTA T 3'

**Fig. 11.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Peridinium bipes* chloroplast-type ferredoxin gene. Nucleotide position 1 is agreed with the predicted translation initiation site. The predicted transit peptide region is indicated as *italics*. Nucleotide sequence motifs similar to *cis*-elements G box, I box, GC box, and CCAC box are underlined.

5' C ACA GAG ACG TAC ACA GAA ACG CAG ATA CAG AGA CAG AGA TAC AGA AAT TGA GCC -94  
 ARL GATA GATA ARL GC  
 GGA GAA GCT GAT ACA GAG AAG CTG ACA CAG AGG CAT CTT TGC ATC AGA CAG TCT -40  
 GATA  
 TTC TGT GCC ATT TGG GTA TTG TGC GCC GCT AGC TCC ATC ATG GCG TCC AGC ACG 15  
 M A S S T  
 AGG GTG CTC CCA GTT ATT CTT GTG GTA ACG CTG GGT GCT ATG TTC TTG CGC AGC 69  
 R V L P V I L V V T L G A M F L R S  
 TTC CTG ATG CCA GGC CAC ATC AAT GAT GCC GCC TTC ACC ATA TCA AAG CTT GCA 123  
 F L M P G H I N D A A F T I S K L A  
 ACG CAC TCA GTT CAC CAC GGC TGC CGA CCA GTG CAA AGC TCC AGA GCA CTC CTT 177  
 T H S V H H G C R P V Q S S R A L L  
 GCC CAG GGG GGT TTG TCC GCA GTT GTA AAT GGG GTA CCT GCC CGC CAG GGT GTT 231  
 A Q G G L S A V V N G V P A R Q G V  
 GCG GCG CAC TTC AAG GTG ACG TTG GAG ACC CCT GAT GGC ACA CAG GAG TTT GAG 285  
 A A H F K V T L E T P D G T Q E F E  
 TGC CCC GAG GAT GTG TAT ATC CTC GAC CAG GCC GAA GAG GAG GGC CTT GAG CTG 339  
 C P E D V Y I L D Q A E E E G L E L  
 CCA TAC TCT TGC CGT GCT GGC TCT TGC TCC AGC TGT GCT GGA AAG GTC CTC TCC 393  
 P Y S C R A G S C S S C A G K V L S  
 GGA TCC ATC GAC CAG TCT GAC CAG GCC TTC TTG GAC GAT GAT CAG ATG GGT GAT 447  
 G S I D Q S D Q A F L D D D Q M G D  
 GGC TAC TGC CTC ACA TGC GTC ACG TAT GCC ACC TCT GAT GTT ACC ATT AAG ACT 501  
 G Y C L T C V T Y A T S D V T I K T  
 CAC TGT GAG GAT GAG CTG TGA GTG GGT GCG GTT CTC CAT TTC CTT GGC ATT CGA 555  
 H C E D E L \*  
 GAT CTT TGC TAC AGC CGA TGT GAG GTA TAC GCT CAG TCA TGC GTA CGT ACC GGC 609  
 GTG CGC ACA AAC ACA CAT CGA CAT GCA CGG GCG TAA ATG 3'

**Fig. 12.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Alexandrium tamarense* OF151 chloroplast-type ferredoxin gene. Nucleotide position 1 is agreed with the predicted translation initiation site. Nucleotide sequence motifs similar to *cis*-elements GATA box, ARL, and GC box are underlined.

5' CTT GAC CAG GCC GAA GAG GAG GGC CTT GAG CTG CCG TAC TCT TGC CGT GCG GGC  
 L D Q A E E E G L E L P Y S C R A G  
 TCT TGC TCC AGC TGT GCT GGC AAG GTC CTC TCC GGT TCG ATT GAC CAG TCT GAC  
 S C S S C A G K V L S G S I D Q S D  
 CAG GCC TTC CTG GAC GAT GAT CAG ATG GGC AAC GGC TAC TGC CTC ACC 3'  
 Q A F L D D D Q M G N G Y C L T

**Fig. 13.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Alexandrium tamarense* OF181 chloroplast-type ferredoxin gene.

5' CGC GCC ATG GCC TCA AAG ACG AAG GTG TTG CCA CTG ATC CTG GCT GGA GCG GCT 48  
*M A S K T K V L P L I L A G A A*  
 TGT GCA CTC CTC CTG CAC AGC TTG TTT GCA ACC AAC GGC AGC AGT GGC GCT GCT 102  
*C A L L L H S L F A T N G S S G A A*  
 TTC GCC ACA CCA CAA GTC ACG TCG CAG ACG GTG CAC CGC AAC TGC CAG CCA GTG 156  
*F A T P Q V T S Q T V H R N C Q P V*  
 CAA ACC TCC GGT GCA CTA GCT GCA GGA CAC CAT GCA GGG GTT ATG CCT GCC ATT 210  
*Q T S G A L A A G H H A G V M P A I*  
 GAC AGT GGA GTT CCG GCC CGC CGA GGC GTC GCG GCG CAC TTC AAG GTG ACG TTG 264  
*D S G V P A R R G V A A H F K V T L*  
 GAG ACC CCA GAT GGC GCA CAG GAG TTC GAG TGC CCT GAG GAT GTT TAC ATC TTA 318  
*E T P D G A Q E F E C P E D V Y I L*  
 GAC CAG GCA GAG GAG GAA GGC TTG GAG TCG CCC TAC TCC TGC CGT GCC GGC TCT 372  
*D Q A E E E G L E S P Y S C R A G S*  
 TGC TCA AGT TGC GCT GGC AAG GTC TTG TCA GGT TCA ATC GAC CAG TCT GAC CAG 426  
*C S S C A G K V L S G S I D Q S D Q*  
 GCC TTC TTG GAT GAC GAC CAG ATG GGC AAC GGC TAC TGC CTC ACC 3'  
*A F L D D D Q M G N G Y C L T*

**Fig. 14.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Alexandrium catenella* OFX072 chloroplast-type ferredoxin gene. Nucleotide position 1 is agreed with the predicted translation initiation site. The predicted transit peptide region is indicated as *italics*.

5'A CAG CAA CAG CAA CAG CAA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAA CAG CAA CAG CAA CAG -184  
 CAA CAG CAG CGT CAG CAC CAG CAC CAG GAA CGA ACA CAA TAA CAA CAC CAA CAG -130  
 CAA CGC CAG CAC CAA CAA CAA CAC CAA AAT CAA CAT CAA CAC CAA CAC CAA GAA -76  
 CAA CAC CAA TCC GTA GCC ATT TTG GCT CAA GGT TCA AGC CCA GCA GCA GGG AAA -22  
 GTG CTT CGA ATT GTG GCC GGA ATG GCG TAC AGA CTG AAG ATG ATC CCC ACA CTG 33  
*M A Y R L K M I P T L*  
 ATG GCC GCC GTG GCG TGC ACA CTT CTC CTG CGG AAT ATA CTG GCG CCG CAG TCG 87  
*M A A V A C T L L L R N I L A P Q S*  
 TTT GTC TCA CCG CAG CTC CGC AGC ACT GCG GCG GCA CAA ACT GTG CAC CAG CAG 141  
*F V S P Q L R S T A A A Q T V H Q Q*  
 TGC AGG CTG GTT GGC GGC AGC AGC GAA GCA GGT CTC GCA CCG AGC ATG CCG GCA 195  
*C R L V G G S S E A G L A P S M P A*  
 GTC ATC AGC GGA AAG CCT GCA CGT GGG GAC GTG GCC GCG CAC TTC AAG GTC ACG 249  
*V I S G K P A R G D V A A H F K V T*  
 CTG GAG ACT CCA GAC GGC ACG CAG GAG TTC GAG TGC CCT GAG GAC GTC TAC GTC 303  
*L E T P D G T Q E F E C P E D V Y V*  
 TTG GAC CAG GCC GAG GAG GAG GGC CTT GAG TTG CCG TAC TCC TGC CGC GCG GGC 357  
*L D Q A E E E G L E L P Y S C R A G*  
 TCC TGC TCG AGC TGT GCG GGG AAG GTG CTC TCG GGC TCC ATT GAT CAG TCT GAC 411  
*S C S S C A G K V L S G S I D Q S D*  
 CAG GCA TTC TTG GAC GAC GAC CAG 3'  
*Q A F L D D D Q*

**Fig. 15.** Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Gonyaulax polyedra* chloroplast-type ferredoxin gene. Nucleotide position 1 is agreed with the predicted translation initiation site. The predicted transit peptide region is indicated as *italics*.

葉緑体型フェレドキシン遺伝子の塩基配列を用いた渦鞭毛藻類の分子系統

渦鞭毛藻類の真核生物内での進化系統関係について葉緑体型フェレドキシンを指標に解析することを目的に、成熟タンパク質領域について完全長のアミノ酸配列が得られている *P. bipes* と *A. tamarensis* OF151株について、陸上高等植物、緑藻類を含む緑色植物18種、紅色植物3種、褐色植物2種、ユーグレナ植物1種、シアノバクテリア8と比較することにより分子系統樹の構築を試みた。

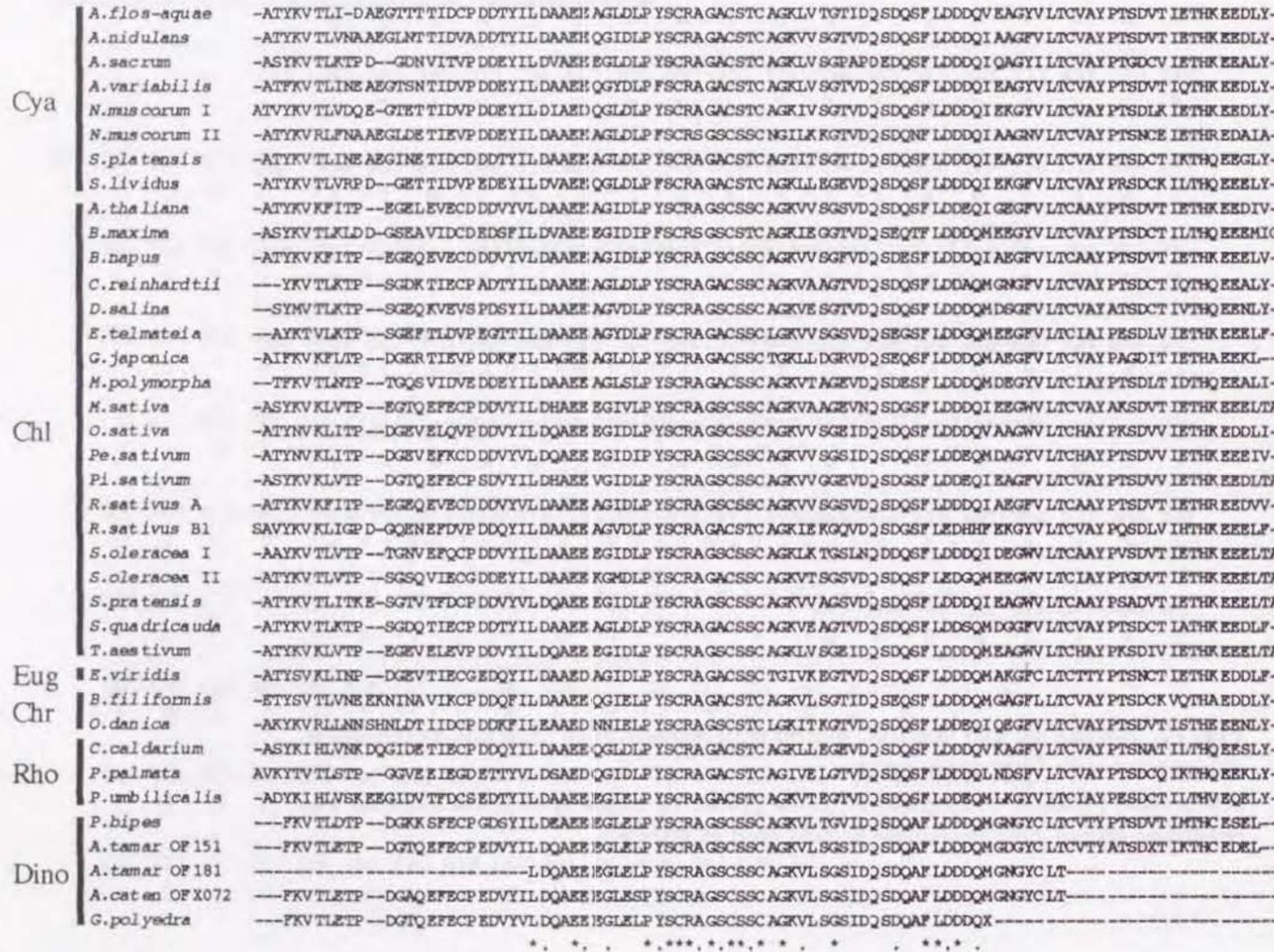


Fig. 16. Amino acid sequence alignment of chloroplast-type ferredoxins. Cyanobacteria, chlorophytes, euglenophytes, chromophytes, rhodophytes, and dinoflagellates are abbreviated as Cya, Chl, Eug, Chr, Rho, and Dino, respectively.

まず各生物種のアミノ酸配列についてHigginsによるツリーベース法に基づき多重整列

(マルチプルアラインメント)を行った (Fig. 16)。参考として部分配列のみ得られている *A. tamarensis* OF181株、*A. catenella* OF072株、*G. polyedra*も含めて整列すると、渦鞭毛藻類内では他の生物種間と比較して極めて高い相同性を示した。部分配列を用いて渦鞭毛藻類の属内と属間のアミノ酸置換率を比較したところ、*P. bipes*と *Alexandrium*属との間のアミノ酸置換率が7%であるのに対し、*Alexandrium*属内では0.2%を示し、属間に比べて属内では高い相同性が得られることが示された。*Alexandrium*属と *G. polyedra*では配列に差異は認められず、*Alexandrium*属と *Gonyaulax*属の高い相同性が示された。また、渦鞭毛藻類は他の生物群とも比較的高い相同性を示した。特に、鉄-硫黄クラスターのリガンドとして機能するCys残基を中心とするモチーフCys-(X)<sub>4</sub>-Cys-(X)<sub>2</sub>-Cys-(X)<sub>n</sub>-Cysは渦鞭毛藻類においても保存されていること、特にこのモチーフ周辺の領域のアミノ酸配列の保存性が渦鞭毛藻類においても極めて高いことが確認された。

Table 5. Genetic distance matrix deduced from the amino acid sequence alignment of chloroplast-type ferredoxins

	At	Pb	Cr	Sq	Ps	Os	At	Bf	Cc	Sp	An
<b>dinoflagellates</b>											
<i>Alexandrium tamarensis</i>	0.0000										
<i>Peridinium bipes</i>	0.1570	0.0000									
<b>chlorophytes</b>											
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0.3899	0.3498	0.0000								
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0.3899	0.4024	0.1150	0.0000							
<i>Pisum sativum</i>	0.3721	0.4207	0.3620	0.3202	0.0000						
<i>Oriza sativa</i>	0.3899	0.4585	0.4908	0.4213	0.2740	0.0000					
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.4458	0.4981	0.3620	0.3202	0.2592	0.3045	0.0000				
<b>chromophytes</b>											
<i>Bumilleriopsis filiformis</i>	0.4852	0.5186	0.3968	0.4213	0.5572	0.5161	0.5785	0.0000			
<b>rhodophytes</b>											
<i>Cyanidium caldarium</i>	0.5481	0.5397	0.3125	0.3362	0.4213	0.5364	0.5161	0.4275	0.0000		
<b>cyanobacteria</b>											
<i>Spirulina platensis</i>	0.4852	0.5186	0.2966	0.3045	0.4962	0.4962	0.4394	0.3761	0.3121	0.0000	
<i>Anacystis nidulans</i>	0.5481	0.5397	0.3125	0.2740	0.3362	0.3525	0.3362	0.3435	0.3121	0.2112	0.0000

多重整列の結果から、Kimura (1980) の方法に従い各生物種間での遺伝距離を算出し (Table 5)、更に得られた遺伝距離から近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により分子系統樹を作成した (Fig. 17)。若干の例外はあるものの、各生物群はそれぞれクラスターを形成した。特に、渦鞭毛藻類は単独でクラスターを形成すること、渦鞭毛藻類は *Marchantia*

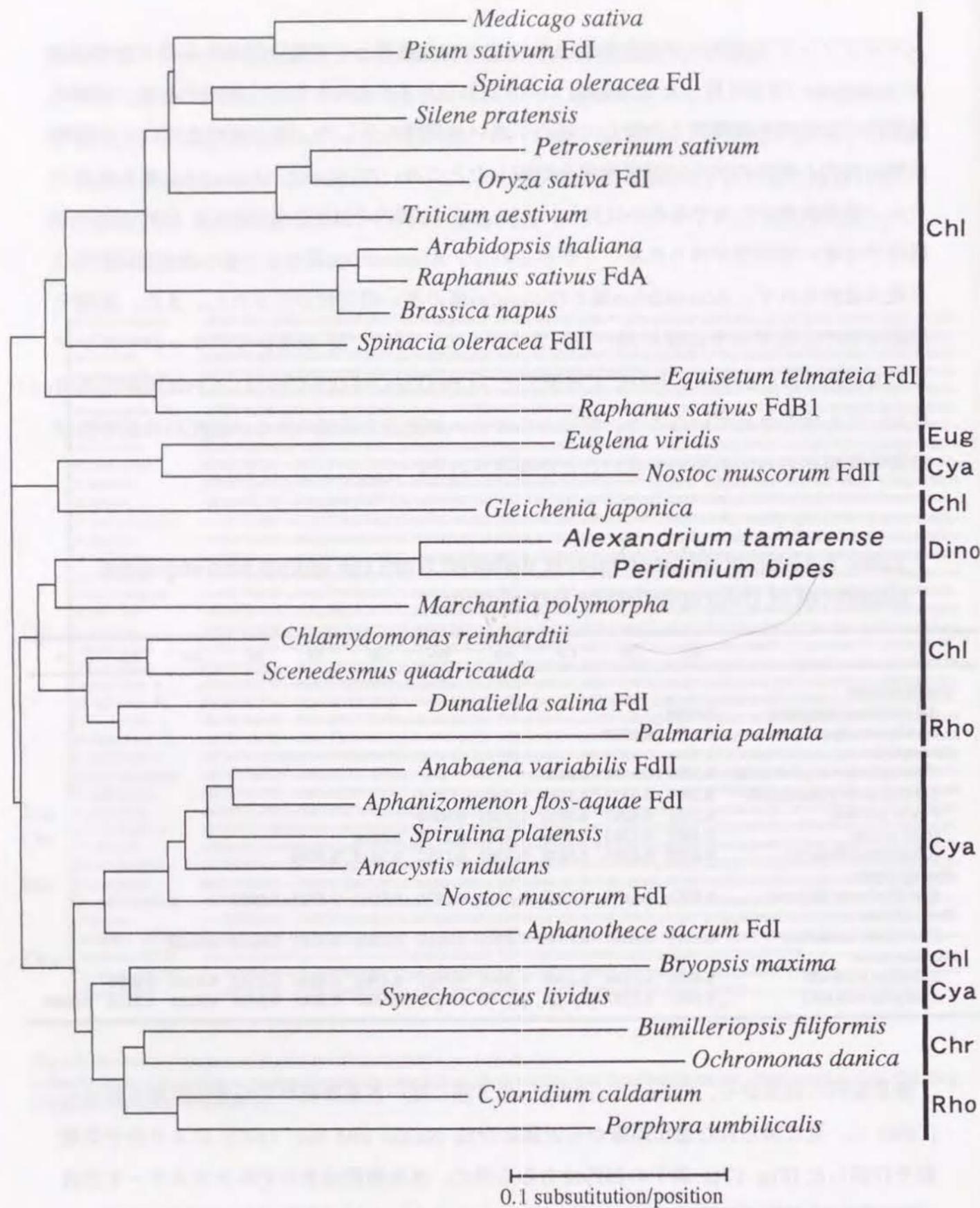


Fig. 17. Phylogenetic relationships inferred from chloroplast-type ferredoxin amino acid sequence similarities.

*polymorpha*とシスターグループを形成すること、更に渦鞭毛藻類-*M. polymorpha*のグループは緑色植物の一部、特に*Chlamydomonas reinhardtii*や*Scenedesmus quadricauda*、*Dunaliella salina*といった緑藻類とシスターグループを形成することが明らかとなった。葉緑体型フェレドキシンから見た渦鞭毛藻類の*M. polymorpha*や緑藻類との近縁関係は、緑藻類以外との遺伝距離が0.48-0.55であるのに対し、緑藻類とは0.30-0.45と低い値を示していることから支持された (Table 5)。

#### 葉緑体型フェレドキシン遺伝子のプロモーター領域の解析

*P. bipes*、*A. tamarensis* OF151株、*G. polyedra*では5'末端側の非翻訳領域の塩基配列が得られていることから、プロモーターコンセンサス配列の検索を試みた。その結果、転写装置の転写開始点認識に関与する配列であるプロモーターコンセンサス配列、TATAボックス、CAATボックスは何れの種から見出されなかった。一方、ハウスキーピング遺伝子においてしばしば見出され、TATAボックスにかわり機能していると考えられているGCボックス様の配列が*P. bipes*と*A. tamarensis* OF151株において認められた (Figs. 11、12)。

Table 6. Nucleotide sequence motifs of cis-elements

cis-element	consensus motif	gene	function
G box	(A/C)(C/G)ACGTGGC	<i>rbcS</i> , <i>chs</i> , <i>adh</i>	photoregulation
I box	GATA(A/G)G	<i>cab</i> , <i>rbcS</i> , CaMV35S promoter	photoregulation
GATA box	GATA	<i>rbcS</i> , <i>cab</i> , CaMV35S promoter	photoregulation
CCAC box	(C/A) <sub>8</sub> -TTT-(C/A) <sub>8</sub>	<i>fed</i>	unknown
ARL	ACAAAA	<i>fed</i>	unknown

また、葉緑体型フェレドキシンはその転写が一般的に光により制御されることが知られている (Dobres *et al.*, 1987) ことから、陸上高等植物の葉緑体型フェレドキシン遺伝子のプロモーター領域に見出されている光発現制御シス因子Gボックス、Iボックス、GATAボックス (Table 6, Vorst *et al.*, 1990, Somers *et al.*, 1990) について検索を試みた結果、*P. bipes*においてGボックスとIボックス様配列が、また*A. tamarensis* OF151株からはGATA

ボックスが見出された (Figs. 11, 12)。また、陸上高等植物の葉緑体型フェレドキシン遺伝子に共通して見出されるモチーフ配列であるCCACボックス、ARL (Table 6, Somers *et al.*, 1990, Caspar and Quail, 1993) についても検索した結果、*P. bipes*からはCCACボックス様モチーフが、また*A. tamarense* OF151株からはARL様配列が認められた (Figs. 11, 12)。*G. polyedra*からは何れのモチーフも見出されなかったが、特徴的な配列として-240 bpから-70 bpに極めてAC-richな領域が認められた (Fig. 15)。

#### 葉緑体型フェレドキシン遺伝子のトランジット配列

今回塩基配列を決定した渦鞭毛藻類のうち、翻訳領域のアミノ末端まで情報の得られている*P. bipes*、*A. tamarense* OF151、*A. catenella* OFX072、*G. polyedra*に関して、葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列を陸上高等植物のそれと比較した (Fig. 18)。高等植物のトランジット配列が50-55アミノ酸で構成され、一次構造の保存性がある程度認められる (Fig. 18A) のに対し、渦鞭毛藻類は高等植物との相同性がほとんど認められず、また80アミノ酸前後と高等植物と比較して長いトランジット配列を持つことが示された (Fig. 18B)。

<b>A</b>	
<i>A. thaliana</i>	MAS---T-ALSSAIVGTSFIRRSAPISLRSLSANTQSLFGLKSGTARGGRVTAM
<i>S. oleracea</i>	MAA---T-TTMMGMATTFVFKPQAPEMMAALPSNTGRSLFGLKTGS--RGGMT-M
<i>S. pratensis</i>	MAS---T--LSTLSVSASLLPK-QQPMVASSLPTNMGQALFGLKAGSR--GRVTAM
<i>P. sativum</i>	MAT---TPALYGTAVSTSFRLTQPMPEMSVTT--TKAFSNGFLGLKTSLSKRGDLAVAM
<i>Z. mays</i>	MATVLGSPRAPAFFSSSSSLRAAPAPTAV-ALPAKV-GIMGRSASSRR--RLRAQ
	** . . . . . * . . . . . * . . . . . *
<b>B</b>	
<i>A. tam</i> OF151	MASSTRVLPVILVVTLGAMFLRSFLMPGHINDAAFTISKLATHSVHHGCRPVQ--SSRAL
<i>A. cat</i> OFX072	MASKTKVLPILLAGAACALLHSLFATNGSSGAAFATQVTSQTVHRNCQPVQ--TSGAL
<i>P. bipes</i>	MASKSILAPTLVLAALGTVLLRRSMLA----PTFIAPHSSSTLSLHQGCVHVAGGGDTAT
<i>G. polyedra</i>	MAYRLKMIPTLMAAVACTLLLRNLLAP-QSFVSPQLRSTAAAQTVHQCRVLGG--SSEAG
	** . . . . . * . . . . . * . . . . . *
<i>A. tam</i> OF151	LA---QGGLSAVVNGVPARQGVAAH
<i>A. cat</i> OFX072	AAGHHAGVMPAIDSGVPARRGVAAH
<i>P. bipes</i>	LAG--A--VPAIVSSVPTROGVAAH
<i>G. polyedra</i>	LAP--S--MPAVISGKPARGDVAAH
	* . . . . * . . . . * . . . . *

Fig. 18. Transit peptide alignments of land plant (A) and dinoflagellate (B) chloroplast-type ferredoxin. The hydroxy amino acids are indicated as bold letters. The helix-breaking residue proline and processing site motif Ile/Val-X-Ala/Cys are underlined with single lines and double lines, respectively. Deduced signal sequence cleavage sites are indicated by arrowheads.

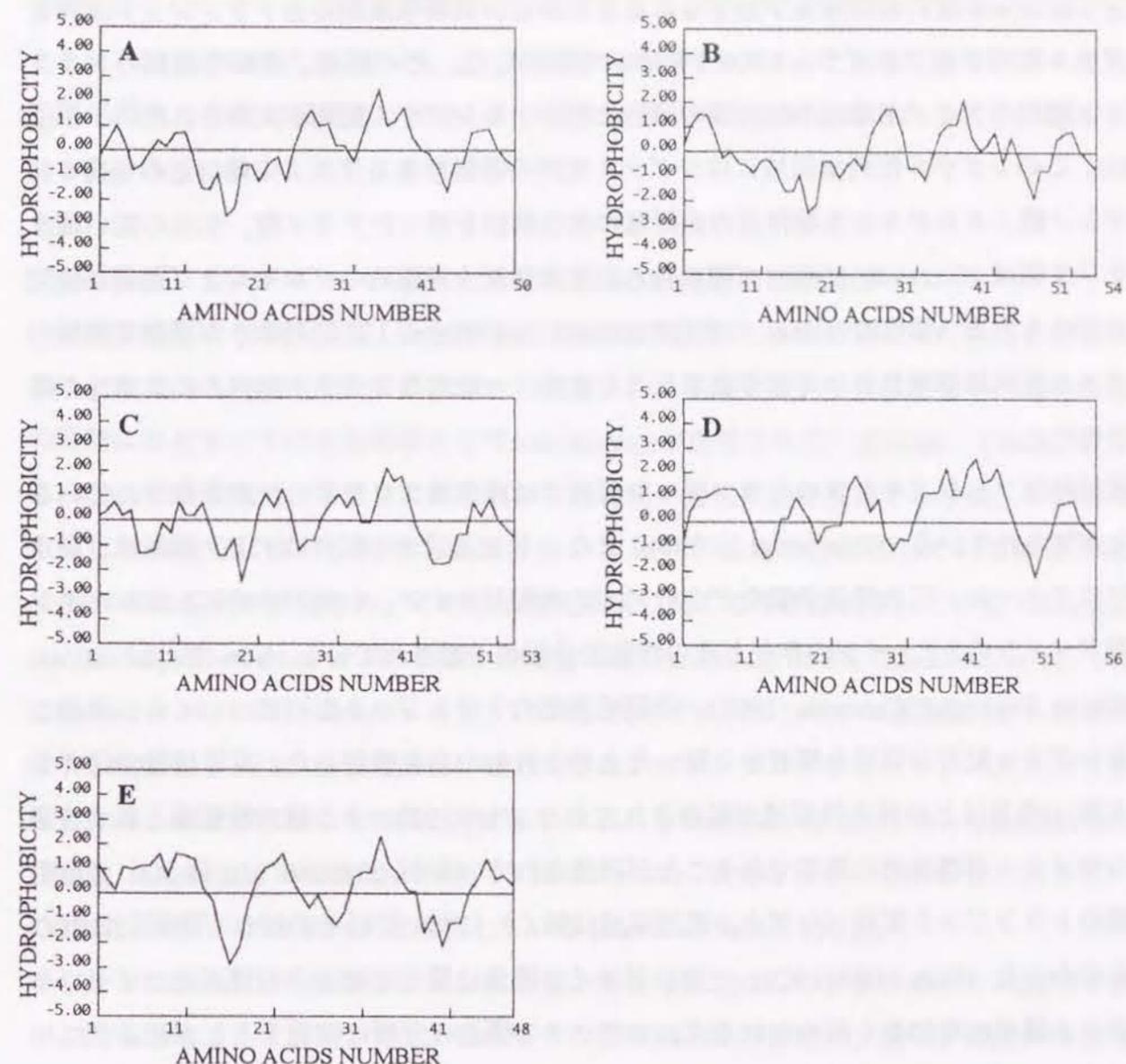


Fig. 19. Hydrophobicity profiles of dinoflagellates and a higher plant chloroplast-type ferredoxin transit sequences.

A, *Alexandrium tamarense* OF151; B, *A. catenella* OFX072; C, *Gonyaulax polyedra*; D, *Peridinium bipes*; E, *Silene platensis*. The hydrophobicity profiles are constructed according to Kite and Doolittle's hydrophobicity table. In the case of dinoflagellate transit sequences, the deduced signal sequence regions are omitted.

トランジット配列の機能を予想することを目的に、渦鞭毛藻類の各トランジット配列をシグナル配列予測プログラムPSORTを用いて解析した。その結果、渦鞭毛藻類のトランジット配列のアミノ末端に小胞体膜の通過を指示するシグナル配列が見出された (Fig. 18B)。このシグナル配列様領域にはシグナル配列の特徴であるアミノ末端付近の電荷を持つアミノ酸、カルボキシ末端付近の非荷電の極性側鎖を持ったアミノ酸、中央の高い疎水性を示す領域 (Gierasch, 1989) が認められ、またシグナル配列のプロセッシング部位に優先的に認められる-3部位のvaline、-1部位のalanine (von Heijne, 1983, 1986) が渦鞭毛藻類のシグナル配列様領域においても存在することから、一般的なシグナル配列との共通性が確認された。

葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列では疎水性プロフィールが保存されていることが知られている (Pilon *et al.*, 1995)。また、トランジット配列はアミノ酸組成、疎水性プロフィール、二次構造予測などからアミノ末端ドメイン、中央ドメイン、カルボキシ末端ドメインの3ドメインの存在とその機能的分担が予想されている (von Heijne *et al.*, 1989, de Boer and Weisbeek, 1991)。渦鞭毛藻類のトランジット配列についても、推測されるシグナル配列の領域を解析から除いた上でこれらの点を検討した。高等植物ではアミノ末端10残基ほどの疎水性領域が保存されており (Fig. 19E)、また疎水性領域と親水性領域のサイクルが機能的に重要であることが指摘されているが (Pilon *et al.*, 1995)、渦鞭毛藻類のトランジット配列 (シグナル配列領域は除く) においてはその何れも明瞭には認められなかった (Figs. 19A-19D)。一方、ドメイン構造に関しては、中央付近にヒドロキシアミノ酸が比較的多く認められる点、ヘリックス構造の分断に機能するとされるプロリン残基が渦鞭毛藻類内で保存されている点、プロセッシング部位モチーフとされる (Ile/Val)-X-(Ala/Cys) が渦鞭毛藻類のカルボキシ末端にも認められる点で高等植物のトランジット配列との共通性が認められた (Fig. 18)。

### 3.3 考察

本章では、渦鞭毛藻類数種から葉緑体型フェレドキシン遺伝子*fedQ*をクローニングし、その塩基配列を決定した。その塩基配列、もしくは塩基配列から予想されるアミノ酸配列より、渦鞭毛藻類が分子系統学的に*M. polymorpha*と緑藻類に近縁であること、遺伝子の

発現を司るプロモーター構造が他の真核生物と異なり特殊であること、光発現制御に機能するシス因子が認められること、また葉緑体への移行シグナルであるトランジット配列に渦鞭毛藻類の葉緑体膜構造を反映したシグナル配列の付加が認められることが明らかとなった。各々について以下に考察する。

#### (1)葉緑体型フェレドキシンから見た渦鞭毛藻類と緑藻類の類縁関係

渦鞭毛藻類はその核構造、染色体構造が他の真核生物と極めて異なった性質を有していることから、その進化系統関係について議論され、原核生物から真核生物への進化の途上の段階にとどまっている生物群としてmesokaryoteが提唱された (Dodge, 1969)。近年では、DNAの塩基配列に蓄積される変異から生物間の進化系統を解析する手法、いわゆる分子進化学の確立に伴い、渦鞭毛藻類においても分子進化の指標としての信頼度が高いrRNAの塩基配列が決定され、その分子進化系統に関する考察が成されている (Hinnebusch *et al.*, 1981, Maroteaux *et al.*, 1985, Herzog and Maroteaux, 1986, Gunderson *et al.*, 1987, Gajadhar *et al.*, 1991, McNally *et al.*, 1994)。現在では18S rRNAの塩基配列から構築した分子系統樹をもとに、渦鞭毛藻類は繊毛虫類やアピコンプレクサとシスターグループを形成するごく最近分岐した生物群と考えられており (Gunderson *et al.*, 1987, Gajadhar *et al.*, 1991)、細胞膜直下の特徴的な小胞 (アルベオール) を共有している点をもとにして、この3生物群をアルベオラータと総称している (Cavalier-Smith, 1993)。

しかしながら渦鞭毛藻類の特殊な核構造、染色体構造はこの分類体系からは説明できない。繊毛虫類、アピコンプレクサ何れもその核構造、染色体構造、遺伝子構造には渦鞭毛藻類に見られる特殊性は認められず、典型的な真核生物と同様の性状を示している。この事実はrRNAによる渦鞭毛藻類の分子進化系統学的な位置づけが一面的であることを示唆しており、渦鞭毛藻類の進化の道筋を議論するためにはより広範囲の分子進化マーカーを用いての検討が必要と考えられる。

本章では、渦鞭毛藻類の真核生物内での進化系統関係について検討するための分子進化マーカーとして葉緑体型フェレドキシンのアミノ酸配列を用いた。一般的に分子進化マーカーとして用いられるrRNA、伸長因子EF1、marate dehydrogenase (MDH)、lactate dehydrogenase (LDH) などの遺伝子はその起源が核ゲノムDNAに由来するとされている。一方、葉緑体内で機能するリボゾームや光化学系、炭酸固定回路を構成する葉緑体タンパ

ク質の多くも核ゲノムDNAにコードされているが、これらの遺伝子はシアノバクテリアが共生した後宿主の光合成、炭酸固定装置として特化し葉緑体へとその立場を変えていく過程で宿主の核ゲノムに移行した葉緑体ゲノムDNAに由来する。従ってリブソームRNA、カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子 *rbcS*、クロロフィル *a/b* 結合タンパク質遺伝子 *cab*、葉緑体型フェレドキシン遺伝子 *fed* に代表されるこれらの遺伝子の塩基配列、もしくはアミノ酸配列を分子進化の指標として進化系統を議論する際には注意を要する。一般に葉緑体DNAの進化速度は核ゲノムDNAに比べて遅いことが知られており、生物種により遺伝子の葉緑体から核への移行時期に差がある場合や、種によって核への移行が認められない遺伝子を分子進化の指標として用いる際には進化速度の差異を考慮に入れなければならない。また、葉緑体の多重共生が指摘されている褐藻類、ラフィド藻類、クリプト藻類、クロララクニオ藻類、ユーグレナ藻類や渦鞭毛藻類では、葉緑体DNA上にコードされていた遺伝子群が核ゲノムDNAへ移行する際にたどった経路、即ち、真核光合成生物が共生した後、その葉緑体にコードされていた遺伝子は一旦共生者の核ゲノムDNAに移行した後に宿主の核へ移ったのか、もしくは直接宿主の核へ移行したのかという点について把握しておくことは、これらの遺伝子を用いて分子進化を議論する際に極めて重要である。この問題点は葉緑体ゲノムDNA、宿主の核ゲノムDNA、共生者の核ゲノムDNAにコードされている遺伝子を用いて分子系統学的に解析し、その結果を比較検討することで、遺伝子の移行に由来する影響について知ることが出来る。しかしながら現段階では共生者の核として存在が確認されているのはクリプト藻類とクロララクニオ藻類のヌクレオモルフを除いてなく、またヌクレオモルフのゲノムDNAに関しても18S rRNAを除いて遺伝子の塩基配列に関する情報は得られていない。渦鞭毛藻類においても共生者であることが予想される光合成真核生物の核もしくはその名残と思われる構造は確認されておらず、また葉緑体ゲノムDNAに関する塩基配列情報についても全く報告されていない。ただし今回分子進化の指標として用いた *fed* に関しては、核に移行せずに葉緑体にコードされたまま維持されている生物種が現段階では確認されていないことから、おそらく光合成生物が共生した極めて初期の段階で *fed* は核に移行したと考えられる。そのため *fed* で示される系統関係は葉緑体というよりはむしろ核DNA、即ちその生物種自体の進化系統を反映していると考えられる。よって葉緑体ゲノムDNA、核ゲノムDNAにおける進化速度の差異による影響は生物種間で比較的小さいものと判断され、更に系統樹の構築法として進化速度の影響を受け

く近い近隣結合法を用いていることから、比較的信頼度の高い樹形が得られていると思われる。

得られた *fed* のアミノ酸配列に基づく系統樹の樹形は従来考えられていた渦鞭毛藻類の分類学的な位置関係とは異なる結果を示した。葉緑体の色素組成に基づく光合成生物の分類体系では、緑藻類はクロロフィル *a* と *b* を持つのに対し渦鞭毛藻類は褐色植物と同様クロロフィル *a* と *c* を持つことから、渦鞭毛藻類は褐色植物門と近縁であるとされていた。しかしながら *fed* から得た分子系統樹からは褐色植物との類縁性は認められず、むしろ一部の緑色植物、特に緑藻類や *M. polymorpha* との近縁関係が示された。また Iglesias-Prieto *et al.* (1993) はクロロフィル *a/c*-キサントフィルタンパク質複合体の免疫学的解析を行い、渦鞭毛藻植物と褐色植物は異なる性状を示すことを報告している。これらの結果から渦鞭毛藻植物と褐色植物との近縁関係については疑わしい。また、渦鞭毛藻類と幾つかの点で共通の性状を示す藻類としてユーグレナ藻類が注目される。渦鞭毛藻類とユーグレナ藻類との近縁関係は18S rRNAや *fed* からは示されていないが、ユーグレナ藻類はその染色体が細胞周期の間期においても凝集したままで、細胞分裂の際に核膜が消失しないといった染色体構造、核分裂上の特徴、さらに前章で考察した *hcc1* のイントロン構造などの点で渦鞭毛藻類に酷似している。ユーグレナ藻類の進化系統的な位置付けは、遺伝子の塩基配列情報が十分でないこと、18S rRNAのGC ratioが極端に偏っており、系統樹の樹形の信頼性に乏しいことから未だに混乱している。そのため、渦鞭毛藻類とユーグレナ藻類の系統関係についての議論は現段階では困難である。しかしながら染色体構造や核分裂の機構、イントロン構造は渦鞭毛藻類の進化系統を考察する指標のひとつとして興味深い。ここで示した幾つかの分子進化の指標に加え、より多くの遺伝子やタンパク質、転写、翻訳装置やDNA複製機構などについてその進化系統関係が渦鞭毛藻類も含む生物種において明らかにされることにより、渦鞭毛藻類の進化系統的な位置が更に明確に示されることが期待される。

## (2)葉緑体型フェレドキシン遺伝子プロモーターの特殊性

*fedQ* においても、*C. cohnii* の *hcc1*、*G. polyedra* のLBP遺伝子と同様真核生物のプロモーターコンセンサス配列であるTATAボックス、CAATボックスは認められない。しかしながらハウスキーピング遺伝子においてTATAボックスにかわり機能しているGCボックス様配列が *P. bipes* と *A. tamarense* OF151株において確認された。GCボックスは *G. polyedra*

のLBP遺伝子においても認められている (Lee *et al.*, 1993)。しかしながら*G. polyedra*の*fedQ*や*C. cohnii*の*hcc1*では確認されず、渦鞭毛藻類にユニバーサルに存在するモチーフではない。このことは*hcc1*同様渦鞭毛藻類の転写開始システムが他の真核生物とは異なる可能性を示唆している。GCボックスが実際にプロモーターとして機能しているのか、またGCボックスを持たない遺伝子においてどのようなプロモーターが機能しているのか、今後の解析が待たれる。

一般に葉緑体型フェレドキシン遺伝子の転写制御に関与するシス因子に関しては、その発現が光により調節されることから、光合成装置をコードする他の遺伝子と同様比較的詳細な研究が成されている。葉緑体型フェレドキシン遺伝子の転写はリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ遺伝子*rbc*やクロロフィル*a/b*結合タンパク質遺伝子*cab*と同様、光レセプターであるフィトクロームにより制御される (Dobres *et al.*, 1987)。光制御に関与するシス因子については*rbc*や*cab*において詳しく調べられ、GT-1ボックス (Green *et al.*, 1987)、Gボックス、Iボックス (Giuliano *et al.*, 1988)、GATAボックス (Donald and Cashmore, 1990) などが報告されており、各々のシス因子に結合する転写制御タンパク質、トランス因子も同定されている。陸上高等植物の葉緑体型フェレドキシン遺伝子においてもGボックス、Iボックス、GATAボックスが見出されている (Vorst *et al.*, 1990, Somers *et al.*, 1990)。また陸上植物内での葉緑体型フェレドキシン遺伝子上流領域の比較から、共通して見出されるモチーフとしてCCACボックス ((C/A)<sub>8</sub>-TTT-(C/A)<sub>8</sub>, Somers *et al.*, 1990)、ARL (A-rich leader, ACAAAA, Caspar and Quail, 1993) が報告されている。また、*Arabidopsis thaliana*の*fedA*ではその発現が転写後レベルでも制御されており (Vorst *et al.*, 1993)、緑色組織特異的な発現も認められている (Vorst *et al.*, 1990)。

渦鞭毛藻類の葉緑体型フェレドキシン遺伝子においてこれらのシス因子のモチーフ配列を検索した結果、*A. tamarensis* OF151からGATAボックスとARL、また*P. bipes*からはGボックス、Iボックス、CCACボックス、ARLとそれぞれ相同性を示す領域が見出された。また*G. polyedra*からはこれらのボックスのモチーフ配列は見出されなかったが、その一方で-240~-70 bpに極めてAC-richな領域が見出された。これらのシス因子様モチーフが実際に*fedQ*の転写調節に機能しているか否かについては確認できていない。しかし、渦鞭毛藻類においても葉緑体型フェレドキシンが光合成における電子伝達系における電子受容、供与体として機能していることはおそらく間違いない。そのため光による転写調節が行わ

れている可能性は高く、これらのモチーフいずれかがその調節に関与している可能性が予想される。欠失突然変異遺伝子を用いた転写制御領域の予測、各領域と相互作用するトランス因子の検索、光による転写、発現パターンの変化についての詳細な解析によりこれらのシス因子モチーフの関与について明らかにされることが期待される。

### (3)葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列と渦鞭毛藻類の葉緑体膜構造との関係

葉緑体は自身のゲノム構成がより単純化するのに伴い、*fed*を含むその遺伝子の一部を核ゲノムに移行し、その発現に関わる転写、翻訳はすべて細胞質、即ち宿主の装置を利用するようになった。しかしながらそのために核ゲノムにその遺伝子が移行した葉緑体タンパク質を何らかの形で葉緑体内に輸送する必要に迫られた。そのシステムとして葉緑体タンパク質のアミノ末端には葉緑体への輸送を指示するタグであるトランジット配列が付加されている。トランジット配列は葉緑体膜上の膜タンパク質複合体中のレセプタータンパク質に認識された後、複合体中の主にチャンネルタンパク質の働きにより前駆体は葉緑体内へと輸送される (Schnell *et al.*, 1994)。トランジット配列はストロマに存在するシグナルペプチダーゼ (Robinson and Ellis, 1984, Su and Boschetti, 1993) によるプロセッシングを受けて除去され、成熟タンパク質が形成される。このようにトランジット配列は葉緑体タンパク質を正確に葉緑体内へとソーティングする極めて重要な役割を担っている。

今回渦鞭毛藻類の葉緑体型フェレドキシンにおいても付加されているトランジット配列と考えられるDNA塩基配列が明らかとなり、渦鞭毛藻類内ではその一次構造の相同性がある程度認められた。その一方で、渦鞭毛藻類と陸上高等植物間での一次構造の相同性は全く見られず、なおかつ渦鞭毛藻類のトランジット配列は高等植物に比べて20-25アミノ酸ほど長いことが明らかとなった。これは渦鞭毛藻類のトランジット配列のアミノ末端に小胞体膜通過シグナル配列が付加されていることによる。このようなトランジット配列中に複数のシグナル配列が含まれる事象は高等植物のチラコイド膜中の膜タンパク質やチラコイドルーメン内に存在するタンパク質でも認められる (de Boer and Weisbeek, 1991)。例えば、プラストシアニンやチトクローム*f*では、トランジット配列のカルボキシ末端にチラコイド膜通過シグナル配列が付加されている (Vorst *et al.*, 1988, Willey *et al.*, 1984)。トランジット配列とチラコイド膜通過シグナルは、それぞれチラコイドタンパク質が葉緑体膜、チラコイド膜を通過する際に機能しているとされている (Hageman *et al.*, 1986,

James *et al.*, 1989, Ko and Cashmore, 1989, Kirwin *et al.*, 1988, Smeeckens *et al.*, 1986)。これらの事実から類推すると、渦鞭毛藻類のトランジット配列におけるシグナル配列の付加が渦鞭毛藻類の葉緑体膜構造に関連している可能性が指摘できる。渦鞭毛藻類の葉緑体の起源は、多重共生説に基づき真核光合成生物であると推測されているが、その根拠のひとつとして挙げられるのが葉緑体の膜構造である。渦鞭毛藻類においては2重膜構造を持つ葉緑体膜の外側に真核藻類の食作用 (phagocytosis) による取り込みと、その共生に由来するとされる葉緑体ERと呼ばれる小胞体様の膜構造が認められる。従って渦鞭毛藻類の葉緑体タンパク質は、葉緑体へ輸送される際に葉緑体膜に加えて葉緑体ERを通過しなければならない。渦鞭毛藻類のトランジット配列に認められるシグナル配列はおそらくこの葉緑体ERの通過に関与していることと考えられる。同様に葉緑体ERが認められる珪藻類やユーグレナ藻類からもフコキサンチン-クロロフィルa/c結合タンパク質FCPやボルフォビリンノーゲンデアミナーゼPBGDのトランジット配列にシグナル配列が存在することが示され、実際に葉緑体ERの通過に機能していることが示されている (Bhaya and Grossman, 1991, Kroth-Pancic, 1995, Shashidhara *et al.*, 1992)。また、渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. のペリディニン-クロロフィルa結合タンパク質PCPで報告されているトランジット配列 (Norris and Miller, 1994) においても、PSORTによる解析からシグナル配列の存在が予想される。以上のことから、トランジット配列へのシグナル配列の付加は、葉緑体ERを持つ生物群に共通するトランジット配列構造と考えられる。

葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列は、極性アミノ酸の分布や疎水性プロフィール、予想される二次構造について検討することにより、そのドメイン構造が示されている (von Heijne *et al.*, 1989, de Boer and Weisbeek, 1991)。アミノ末端ドメインは極性アミノ酸の出現頻度が低く、高い疎水性を示す。中央ドメインはヒドロキシアミノ酸に富み、ヘリックス構造を分断するとされるプロリン残基が保存されていることが特徴的である。またカルボキシ末端ドメインは $\beta$ -strand構造を取る傾向にあり、またプロセシング部位には (Ile/Val)-X-(Ala/Cys) のモチーフが認められる。人為的にトランジット配列領域に欠失もしくは部位突然変異を導入した突然変異前駆体タンパク質を用いた解析から、アミノ末端ドメインは葉緑体へのターゲティングと葉緑体膜上のレセプターとの結合に、中央ドメインは葉緑体内への輸送に、またカルボキシ末端ドメインはトランジット配列のプロセシングに関与していることが示され、これらのドメインがトランジット配列の機能上

極めて重要であることが指摘されている (Pilon *et al.*, 1995)。渦鞭毛藻類のトランジット配列において以上の点を検討した結果、中央部のヒドロキシアミノ酸、プロリン残基の保存性、プロセシング部位モチーフに関しては陸上高等植物と同様認められた。しかしながら、アミノ末端付近の疎水性領域、トランジット配列の二次構造に関わると予想されるプロリン残基のトランジット配列上での位置といった点に関しては陸上植物との明瞭な類似性は確認出来ない。また、葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列間である程度保存されている疎水性プロフィールに関しても、陸上高等植物と渦鞭毛藻類の間で相同性は認められない。葉緑体型フェレドキシンのトランジット配列自体の情報も乏しく、提唱されているドメイン構造の性状に関する信頼性に疑問が残ること、また渦鞭毛藻類の葉緑体膜上の輸送装置や膜構造、膜タンパク質に関する研究は皆無に等しいことから、現段階で渦鞭毛藻類のトランジット配列についての議論を行うのは困難ではあるが、少なくとも渦鞭毛藻類のトランジット配列が高等植物と比べて特異であることは指摘できる。この特異性が渦鞭毛藻類の葉緑体膜構造に由来するのか否か、渦鞭毛藻類の葉緑体の起源を考える上で興味深い。

## 第4章 総括

渦鞭毛藻類は赤潮形成種や麻痺性貝毒産生種を含むことから、その防除という面で産業的に重要視されている。またその細胞構造、特に核構造に注目すると、他の真核生物には認められない核分裂様式や染色体構造を有することから、その系統学的、進化的位置付けが議論されてきた。近年渦鞭毛藻類においてリボソームRNAの塩基配列が報告され、分子進化学的見地からその進化系統関係を構築する試みがなされている。しかしながら、機能タンパク質、もしくは構造タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列についての報告は極めて乏しい。特に染色体の高次構造が極めて特異であることを考え合わせると、遺伝子の発現制御に大きく関わっていると考えられるイントロンやプロモーター、エンハンサーといった遺伝子構造も他の真核生物とは異なっている可能性もあり、極めて興味深い。本研究では、渦鞭毛藻類の真核生物内における進化系統関係を明らかにするとともに、その遺伝子構造の特徴について解析することを目的に、渦鞭毛藻類数種より塩基性核タンパク質HCcをコードする遺伝子*hcc1*と葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子*fedQ*各領域の塩基配列を決定した。以下にその概要を示す。

### *Cryptocodinium cohnii*からのヒストン様塩基性核タンパク質HCcをコードする遺伝子のクローニングとその遺伝子構造解析

既に報告されている*Cryptocodinium cohnii*のヒストン様核タンパク質HCc1をコードする遺伝子*hcc1*のcDNA塩基配列をもとにプライマーを設定し、PCR、inverse PCRによりゲノムDNAから周辺領域を含む*hcc1*の増幅とその塩基配列の決定を行った。その結果、*hcc1*はゲノム上に複数コピー存在し、その各々がタンデムに並んだmultigene familyを形成すること、4箇所イントロンの挿入が認められることが示された。イントロンには真核生物のスプライセオソームイントロンに認められるエクソンとの境界領域やbranchpointのコンセンサスモチーフが認められないこと、またgene familyの非転写スペーサー領域にプロモーターコンセンサス配列が存在しないことから、*hcc1*のイントロンスプライシング機構、転写開始システムの特異性が指摘された。

### 渦鞭毛藻類の葉緑体型フェレドキシンをコードする遺伝子の塩基配列から見た渦鞭毛藻類

## の分子系統とその遺伝子構造の解析

渦鞭毛藻類*Peridinium bipes*、*Alexandrium tamarense* OF151株、OF181株、*Alexandrium catenella* OFX072株、*Gonyaulax polyedra*のゲノムDNAからPCR、TAIL-PCRにより葉緑体型フェレドキシン遺伝子*fedQ*をその周辺領域も含めてクローニングし、その塩基配列を決定した。*fedQ*の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を用いて渦鞭毛藻類と他の真核生物との分子系統を解析した結果、従来の色素組成に基づく分類体系やリボソームRNAを用いた分子系統樹とは異なり、渦鞭毛藻類の緑色植物、特にある種の緑藻類と*M. polymorpha*との近縁関係が示された。また、5'末端側非翻訳領域にはプロモーターコンセンサスモチーフとしてGCボックスは認められたが、TATAボックス、CAATボックスは確認されず、プロモーター構造の特異性が予想された。転写制御を司るシス因子を検索した結果、フェレドキシンに共通して見出されるARL、CCACボックスに加えて光発現制御に機能するシス因子GボックスとIボックスが確認され、渦鞭毛藻類のフェレドキシンも光によりその発現が制御されていることが示唆された。葉緑体への移行シグナルであるトランジット配列が渦鞭毛藻類のフェレドキシンにおいても認められ、それに加えてそのアミノ末端にシグナル配列の付加が予想され、渦鞭毛藻類の葉緑体多重共生に由来する葉緑体膜構造との関連が示唆された。

以上、機能タンパク質のアミノ酸配列から見た渦鞭毛藻類の分子系統、遺伝子構造から見た渦鞭毛藻類の特異性について*hcc1*と*fedQ*を指標に解析した。葉緑体型フェレドキシンを指標にした分子系統関係の解析は従来から行われてきたが、そのアミノ酸配列の保存性が極めて高いことから比較的近縁な生物群の間の系統関係について表現し得ない可能性がある。渦鞭毛藻類のたどった進化の道筋をより明確に示すために、より多くの分子進化マーカー遺伝子を用いた解析が期待される。また、遺伝子構造に関しては、本研究も含めて現在までに報告されている渦鞭毛藻類の遺伝子構造、例えば、tandem repeatによるgene familyの形成、イントロン構造、プロモーターの特異性は、18S rRNAの分子系統樹から渦鞭毛藻類と近縁であると指摘されているアピコンプレクサや繊毛虫類には認められない。むしろ渦鞭毛藻類はユーグレナ藻類に類似の特性を示している。渦鞭毛藻類の遺伝子構造についてその特異性を結論づけるにはより多くの機能タンパク質、構造タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列情報の蓄積とその解析が待たれるが、少なくとも渦鞭毛藻類

の系統関係についてはその核構造、遺伝子構造も含めてより多面的な解析が必要であり、またその解析を進めることによって渦鞭毛藻類の特殊性がより明確に指摘出来る可能性がある。

## Summary

The dinoflagellate is noticeable that certain species periodically cause both toxic and non-toxic algal blooms. The taxonomical and evolutionary relationships between dinoflagellates and other eukaryotes have been controverted because of their peculiar features of the nuclear division at mitosis and the chromosome structure suggesting the prokaryotic states. In this thesis, the genes coding the histone-like protein HCc1 and chloroplast-type ferredoxin were cloned and sequenced, and phylogenetic relationships among eukaryotes, and gene organizations of dinoflagellates were analyzed in relation to the peculiarity of the nuclear and chromosomal structures.

The HCc1 gene *hcc1* was amplified by the PCR and inverse PCR techniques and its nucleotide sequences were decided. Comparing with the nucleotide sequence of *hcc1* cDNA, four intervening sequences were found. They contained no conserved sequences which are existed at both intron-exon junction sites and the branchpoints of eukaryotic spliceosomal introns. *hcc1* was coded as a tandemly arranged gene family in the genomic DNA and may be transcribed each other. In the non-transcribed spacer regions of the *hcc1* gene family, no promoter consensus motifs such as TATA box, CAAT box, and GC box were found. These facts suggest that dinoflagellates have the peculiar intron splicing mechanism and transcription starting mechanism, which may correlate with their nuclear and chromosomal structures.

Using the PCR and TAIL-PCR methods, the chloroplast-type ferredoxin genes *fedQ* were amplified from dinoflagellates *Peridinium bipes*, *Alexandrium tamarense* (OF151, OF181), *A. catenella* OFX072, and *Gonyaulax polyedra*, and sequenced. Phylogenetic analysis between dinoflagellates and other eukaryotes inferred from the chloroplast-type ferredoxin amino acid sequences suggest the close relationship of dinoflagellates and chlorophytes. The 5' terminus flanking regions of dinoflagellate *fedQ* genes contained GC box consensus motif-like sequences. In addition, *cis*-elements such as G box, I box, and GATA box, which function for the photoregulatory gene expression, and ARL and CCAC box which are found in *fed* of land plants, were also recognized. From this fact, the photoregulation of dinoflagellate *fedQ* expression are expected. The transit peptides of the dinoflagellate ferredoxin had the similar characteristics to land plants. However, their length were very different from that of land plants which is derived from the signal peptide-like sequences added at amino-termini. These diversities are likely to be associated with the 3 membrane structure of dinoflagellate chloroplasts.

## 参考文献

- Alonso JM, Chamarro J, and Granell A: A non-photosynthetic ferredoxin gene is induced by ethylene in *Citrus* organs. *Plant Mol. Biol.*, 29, 1211-1221 (1995)
- Arnon DI and Buchanan BB: *Methods Enzymol.*, 23, 413-440 (1971)
- Barbier M, Albert M, Geraud M-L, Bhaud Y, Picard A, and Soyer-Gobillard M-O: Cell cycle regulation of the primitive dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Biecheler: Evidence for the presence of an homolog of cyclin B. *Biol. Cell*, 84, 35-42 (1995)
- Bhaud Y, Salmon J-M, and Soyer-Gobillard M-O: The complex cell cycle of the dinoflagellate protist *Cryptocodinium cohnii* as studied *in vivo* and by cytofluorimetry. *J. Cell Sci.*, 100, 675-682 (1991)
- Bhaud Y, Barbier M, and Soyer-Gobillard M-O: A detailed study of the complex cell cycle of the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Biecheler and evidence for variation in histone H1 kinase activity. *J. Euk. Microbiol.*, 41, 519-526 (1994)
- Bhaya D and Grossman A: Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol. Gen. Genet.*, 229, 400-404 (1991)
- Bodansky S, Mintz LB, and Holmes DS: The mesokaryote *Gyrodinium cohnii* lacks nucleosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88, 1329-1336 (1979)
- Bohme H and Haselkorn R: Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene coding for heterocyst ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *Mol. Gen. Genet.*, 214, 278-285 (1988)
- Caspar T and Quail PH: Promoter and leader regions involved in the expression of the *Arabidopsis* ferredoxin A gene. *Plant J.*, 3, 161-174 (1993)
- Cavalier-Smith T: Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. *Microbiol. Rev.*, 57, 953-994 (1993)
- Davies W, Jakobsen KS, and Nordby O: Characterization of DNA from dinoflagellate *Wolozynskia bostoniensis*. *J. Protozool.*, 35, 418-422 (1988)
- de Boer AD and Weisbeek PJ: Chloroplast protein topogenesis: import, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 1071, 221-253 (1991)
- De la Torre A, Lara C, Wolosiuk RA, and Buchanan BB: Ferredoxin-thioredoxin reductase: a chromophore-free protein of chloroplasts. *FEBS Lett.*, 107, 141-145 (1979)
- Dobres MS, Elliott RC, Watson JC, and Thompson WF: A phytochrome regulated pea transcript encodes ferredoxin I. *Plant Mol. Biol.*, 8, 53-59 (1987)
- Dodge JD: Chromosome structure in the Dinophyceae. II. Cytochemical studies. *Arch. Microbiol.*, 48, 66-80 (1964)
- Dodge JD: Chromosome structure in the dinoflagellates and the problem of the mesokaryotic cell. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.*, 91, 264-265, (1965)
- Donald RGK, and Cashmore AR: Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis* rbcS-1A promoter. *EMBO J.*, 9, 1717-1726 (1990)
- Douglas SE, Murphy CA, Spencer DF, and Gray MW: Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature*, 350, 148-151 (1991)
- Dutton JE, Rogers LJ, Haslett BG, Takruri IAH, Gleaves JT, and Boulter D: Comparative studies on the properties of two ferredoxins from *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.*, 31, 379-391 (1980)
- Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, Gunderson J, Ariztia-Carmona EV, and Sogin ML: Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptocodinium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 45, 147-154 (1991)
- Galleron C: The fifth base: A natural feature of dinoflagellate DNA. *Ori. Life*, 13, 195-203 (1984)
- Geraud M-L, Sala-Rovira M, Herzog M, and Soyer-Gobillard M-O: Immunocytochemical localization of the DNA-binding protein HCc during the cell cycle of the histone-less dinoflagellate protist *Cryptocodinium cohnii* B. *Biol. Cell*, 71, 123-134 (1991)
- Gierasch LM: Signal sequences. *Biochemistry*, 28, 923-930 (1989)
- Giesbrecht P: Über das "Supercoiling"-System der Chromosomen von Bakterien und Flagellaten und seine Beziehungen zu Nucleolus und Kugrundsubstanz. *Zentralbl. Bacteriol., Parasitenkd., Infektionskr. Hyg., Abt. 1: Orig.*, 183, 1-37 (1961)
- Giesbrecht P: Über das Ordnungsprinzip in der Chromosomen von Dinoflagellaten und Bakterien. *Zentralbl. Bacteriol., Parasitenkd., Infektionskr. Hyg., Abt. 1: Orig.*, 196, 516-519 (1965)
- Gillott MA and Gibbs SP: The cryptomonad nucleomorph: its ultrastructure and evolutionary significance. *J. Phycol.*, 16, 558-568 (1980)
- Giuliano G, Pichersky D, Malik VS, Timko MP, Scolnik PA, and Cashmore AR: An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7089-7093 (1988)
- Gray MW: The evolutionary origins of organelles. *Trend. Genet.*, 5, 294-299 (1989)
- Green MR: Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 559-599 (1991)
- Green PJ, Kay SA, and Chua NH: Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the rbcS-3A gene. *EMBO J.*, 6, 2543-2550 (1987)
- Gunderson JH, Elwood H, Ingold A, Kindle K, and Sogin ML: Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5823-5827 (1987)
- Haapala OK and Soyer M-O: Structure of dinoflagellate chromosomes. *Nature*, 244, 195-197 (1973)
- Haapala OK and Soyer M-O: Size of circular chromatids and amounts of haploid DNA in the dinoflagellates *Gyrodinium cohnii* and *Prorocentrum micans*. *Hereditas*, 76, 83-90 (1974)
- Hageman J, Robinson C, Smeekens S, and Weisbeek P: A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature*, 324, 567-569 (1986)

- Hall RP: Binary fission in *Oxyrrhis marina* Dujardin. *Univ. Calif., Berkeley, Publ. Zool.*, 26, 281-324 (1924)
- Hamkalo BA and Rattner JB: The structure of a mesokaryotic chromosome. *Chromosoma*, 60, 39-47 (1977)
- Hase T, Wakabayashi S, Wada K, Matsubara H, Juttner F, Rao KK, Fry I, and Hall DO: *Cyanidium caldarium* ferredoxin: a red algal type? *FEBS Lett.*, 96, 41-44 (1978)
- Herzog M and Soyer M-O: Distinctive features of dinoflagellate chromatin. Absence of nucleosomes in a primitive species *Prorocentrum micans* E. *Eur. J. Cell Biol.*, 23, 295-302 (1981)
- Herzog M and Soyer M-O: A high level thymine replacement by 5-hydroxymethyluracil in nuclear DNA of the primitive dinoflagellate *Prorocentrum micans* E. *Eur. J. Cell Biol.*, 27, 151-155 (1982)
- Herzog M and Soyer M-O: The native structure of dinoflagellate chromosomes and their stabilization by Ca<sup>+</sup> and Mg<sup>+</sup> cations. *Eur. J. Biol. Chem.*, 30, 33-41 (1983)
- Herzog M and Maroteaux L: Dinoflagellate 17S rRNA sequence inferred from the gene sequence: evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8644-8648 (1986)
- Hiller RG, Wrench PM, and Sharples FP: The light-harvesting chlorophyll a-c-binding protein of dinoflagellates: a putative polyprotein. *FEBS Lett.*, 363, 175-178 (1995)
- Hinnebusch AG, Klotz LC, Blanken RL, and Loeblich III AR: An evaluation of the phylogenetic position of the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* based on 5S rRNA characterization. *J. Mol. Evol.*, 17, 334-347 (1981)
- Holt JR and Pfister LA: A technique for counting chromosomes of armored dinoflagellates, and chromosome numbers of six fresh-water dinoflagellate species. *Am. J. Bot.*, 69, 1165-1168 (1982)
- Iglesias-Prieto R, Govind NS, and Trench RK: Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 340, 381-392 (1993)
- James HE, Bartling D, Musgrove JE, Kirwin PM, Herrmann RG, and Robinson C: Transport of proteins into chloroplasts: Import and maturation of precursors to the 33-kDa, 23-kDa, and 16-kDa proteins of the photosynthetic oxygen-evolving complex. *J. Biol. Chem.*, 264, 19573-19576 (1989)
- Jarvis EE, Dunahay TG, and Brown LM: DNA nucleotide composition and methylation in several species of microalgae. *J. Phycol.*, 28, 356-362 (1992)
- Kallen RG, Simon M, and Marmur J: The occurrence of a new pyrimidine base replacing thymine in a bacteriophage DNA: 5-hydroxymethyluracil. *J. Mol. Biol.*, 5, 248 (1962)
- Kessler F, Blobel G, Patel HA, and Schnell DJ: Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science*, 266, 1035-1039 (1994)
- Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16, 111-120 (1980)
- Kirwin PM, Elderfield PD, Williams RS, and Robinson C: Transport of proteins into chloroplasts: Organization, orientation, and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network. *J. Biol. Chem.*, 263, 18128-18132 (1988)

- Knaff DB and Hirasawa M: Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1056, 93 (1991)
- Ko K and Cashmore AR: Targeting of proteins to the thylakoid lumen by the bipartite transit peptide of the 33-kd oxygen-evolving protein. *EMBO J.*, 8, 3187-3194 (1989)
- Kroth-Pancic PG: Nucleotide sequence of two cDNAs encoding fucoxanthin chlorophyll a/c proteins in the diatom *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol.*, 27, 825-828 (1995)
- Kubai DF and Ris H: Division in the dinoflagellate *Gyrodinium cohnii* Schiller. *J. Cell Biol.*, 40, 508-528 (1969)
- Kyte J and Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132 (1982)
- Lara C, De la Torre A, and Buchanan BB: Ferredoxin: an iron-sulfur protein functional in enzyme regulation in photosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94, 1337-1344 (1980)
- Leadbeater B and Dodge JD: An electron microscopic study of nuclear and cell division in a dinoflagellate. *Arch. Mikrobiol.*, 57, 239-254 (1967)
- Lee D-H, Mittag M, Sczekan S, Morse D, and Hastings JW: Molecular cloning and genomic organization of a gene for luciferin binding protein from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *J. Biol. Chem.*, 268, 8842-8850 (1993)
- Lee RE: Basic characteristics of the algae. in "Phycology, Second Edition" (ed. by Lee RE), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 3-49 (1989)
- Leipe DD, Wainright PO, Gunderson JH, Porter D, Patterson DJ, Vlois F, Himmerich S, Sogin ML: The stramenopiles from a molecular perspective: 16S-like rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. *Phycologia*, 33, 369-377 (1994)
- Liu M-H, Reddy R, Henning D, Spector D, and Busch H: Primary and secondary structure of dinoflagellate U5 small nuclear RNA. *Nucl. Acid. Res.*, 12, 1529-1542 (1984)
- Liu Y-G, Mitsukawa N, Oosumi T, and Whittier RF: Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.*, 8, 457-463 (1995)
- Liu Y-G, and Whittier RF: Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 25, 674-681 (1995)
- Livolant F and Bouligand Y: Double helical arrangement of spread dinoflagellate chromosomes. *Chromosoma*, 80, 97-118 (1980)
- Loeblich AR III: Dinoflagellate evolution: speculation and evidence. *J. Protozool.*, 23, 13-28 (1976)
- MacNally KL, Govind NS, Thome PE, and Trench RK: Small-subunit ribosomal DNA sequence analyses and a reconstruction of the inferred phylogeny among symbiotic dinoflagellates (Pyrrophyta). *J. Phycol.*, 30, 316-329 (1994)
- Maier U-G, Hofmann CJB, Eschbach S, Wolters J, and Igloi GL: Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol. Gen. Genet.*, 230, 155-160 (1991)

Maroteaux L, Herzog M, and Soyer-Gobillard M-O: Molecular organization of dinoflagellate ribosomal DNA: Evolutionary implications of the deduced 5.8S rRNA secondary structure. *Biosystems*, 18, 307-319 (1985)

Masui R, Wada K, Matsubara H, and Rogers LJ: Properties and amino acid sequence of the ferredoxin from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* 6307. *Phytochem.*, 27, 2821-2826 (1988)

McFadden GI, Gilson PR, Hill DRA: *Goniomonas* rRNA sequences indicate that this phagotrophic flagellate is a close relative of the host component of cryptomonads. *Eur. J. Phycol.*, 29, 29-32 (1994)

McGeoch DJ: On the predictive recognition of signal peptide sequences. *Virus Res.*, 3, 271-286 (1985)

McNally KL, Govind NS, Thome PE, and Trench RK: Small-subunit ribosomal DNA sequence analyses and a reconstruction of the inferred phylogeny among symbiotic dinoflagellates (Pyrrophyta). *J. Phycol.*, 30, 316-329 (1994)

Minguez A, Franc S, and de la Espina SMD: Dinoflagellates have a eukaryotic nuclear matrix with lamin-like proteins and topoisomerase II. *J. Cell Sci.*, 107, 2861-2873 (1994)

Morrall S and Greenwood AD: Ultrastructure of nucleomorph division in species of Cryptophyceae and its evolutionary implications. *J. Cell Sci.*, 54, 311-328 (1982)

Muchhal US and Schwarzbach SD: Characterization of a *Euglena* gene encoding a polyprotein precursor to the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II. *Plant Mol. Biol.*, 18, 287-299 (1992)

Norris BJ and Miller DJ: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of the peridinin-chlorophyll a-binding protein from the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Plant Mol. Biol.*, 24, 673-677 (1994)

Oakley BR and Dodge JD: Kinetochores associated with the nuclear envelope in the mitosis of a dinoflagellate. *J. Cell Biol.*, 63, 322-325 (1974)

Oakley BR and Dodge JD: Mitosis and cytokinesis in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytobios*, 17, 35-46 (1976)

Perry SE and Keegstra K: Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell*, 6, 93-105 (1994)

Pilon M, Wienk H, Sips W, de Swaaf M, Talboom I, van't Hof R, de Korte-Kool G, Demel R, Weisbeek P, and de Kruijff B: Functional domains of the ferredoxin transit sequence involved in chloroplast import. *J. Biol. Chem.*, 270, 3882-3893 (1995)

Rae PMM: 5-Hydroxymethyluracil in the DNA of a dinoflagellate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 1141-1145 (1973)

Rae PMM: Hydroxymethyluracil in eukaryote DNA: A natural feature of the Pyrrophyta (dinoflagellates). *Science*, 194, 1062-1064 (1976)

Rae PMM and Steele RE: Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes: An examination of distributions and possible roles, with emphasis on hydroxymethyluracil in dinoflagellates. *Biosystems*, 10, 37-53 (1978)

Reddy R, Spector D, Henning D, Liu M-H, and Busch H: Isolation and partial characterization of dinoflagellate U1-U6 small RNAs homologous to rat U small nuclear RNAs. *J. Biol. Chem.*, 258, 13965-13969 (1983)

Rizzo PJ and Nooden LD: Isolation and partial characterization of dinoflagellate chromatin. *Biochim. Biophys. Acta*, 349, 402-414 (1974)

Rizzo PJ and Nooden LD: Partial characterization of dinoflagellate chromosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 349, 415-427 (1974)

Rizzo PJ and Burghardt RC: Chromatin structure in the unicellular algae *Olisthodiscus luteus*, *Cryptocodinium cohnii* and *Piridinium balticum*. *Chromosoma*, 76, 91-99 (1980)

Rizzo PJ: Comparative aspects of basic chromatin proteins in dinoflagellates. *BioSystems*, 14, 433-443 (1981)

Rizzo PJ and Burghardt RC: Histone-like protein and chromatin structure in the wall-less dinoflagellate *Gymnodinium nelsoni*. *Biosystems*, 15, 27-34 (1982)

Rizzo PJ and Morris RL: Some properties of the histone-like protein from *Cryptocodinium cohnii* (HCc). *BioSystems*, 16, 211-216 (1984)

Rizzo PJ, Choi J and Morris RL: The major histone-like protein from the nonphotosynthetic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* (Pyrrophyta) is present in stationary phase cultures. *J. Phycol.*, 20, 95-100 (1984)

Rizzo PJ: The enigma of the dinoflagellate chromosome. *J. Protozool.*, 38, 246-252 (1991)

Robinson C and Ellis RJ: Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.*, 142, 337-342 (1984)

Rodriguez M, Cho JW, Sauer HW, and Rizzo PJ: Evidence for the presence of a *cdc2*-like protein kinase in the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *J. Euk. Microbiol.*, 40, 91-96 (1993)

Rogers SO and Bendich AJ: Extraction of DNA from plant tissues, in "Plant molecular biology manual" (ed. by Gelvin SB and Schilperoort RA), Kluwer Academic Publishers, Bergium, p. A6.1-A6.10. (1988)

Rowan R, Whitney SM, Fowler A, and Yellowlees D: Rubisco in marine symbiotic dinoflagellates: form II enzymes in eukaryotic oxygenic phototrophs encoded by a nuclear multigene family. *Plant Cell*, 8, 539-553 (1996)

Saitou N and Nei M: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425 (1987)

Sala-Rovira M, Geraud ML, Caput D, Jacques F, Soyer-Gobillard M-O, Vernet G, and Herzog M: Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCc) from the histone-less eukaryote *Cryptocodinium cohnii* (Pyrrophyta). *Chromosoma*, 100, 510-518 (1991)

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T: Molecular Cloning-A laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)

Schnell DJ, Kessler F, and Blobel G: Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science*, 266, 1007-1012 (1994)

Schrautemeier B and Bohme H: A distinct ferredoxin for nitrogen fixation isolated from heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS Lett.*, 184, 304-308 (1985)

- Shashidhara LS, Lim SH, Shackleton JB, Robinson C, and Smith AG: Protein targeting across the three membranes of the *Euglena* chloroplast envelope. *J. Biol. Chem.*, 267, 12885-12891 (1992)
- Shupe KA and Rizzo PJ: Nuclease digestion of chromatin from the eukaryotic algae *Olisthodiscus luteus*, *Peridinium balticum* and *Cryptocodinium cohnii*. *J. Protozool.*, 30, 599-606 (1983)
- Shyam R and Sarma YSRK: Cytology of Indian freshwater Dinophyceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, 76, 145-159 (1978)
- Sigee DC: The dinoflagellate chromosome. *Adv. Bot. Res.*, 12, 205-264 (1986)
- Smeekens S, van Binsbergen J, and Weisbeek P: The plant ferredoxin precursor: nucleotide sequence of a full length cDNA clone. *Nucl. Acid. Res.*, 13, 3179-3194 (1985)
- Smeekens S, Bauere C, Hageman J, Keegstra K, and Weisbeek P: The Role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. *Cell*, 46, 365-375 (1986)
- Soll J and Alefsen H: The protein import apparatus of chloroplasts. *Physiol. Plant.*, 87, 433-440 (1993)
- Somers DE, Caspar T, and Quail PH: Isolation and characterization of a ferredoxin gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 93, 572-577 (1990)
- Soyer M-O and Haapala OK: Division and function of dinoflagellate chromosomes. *J. Microsc.*, 19, 137-146 (1974)
- Soyer-Gobillard M-O and Herzog M: The native structure of dinoflagellate chromosomes. Involvement of structural RNA. *Eur. J. Cell Biol.*, 36, 334-342 (1985)
- Spector DL, Vasconcelos AC, and Triemer RE: DNA duplication and chromosome structure in the dinoflagellates. *Protoplasma*, 105, 185-194 (1981)
- Spector DL: Dinoflagellate nuclei, in "Dinoflagellate" (ed. by Spector DL), Academic Press, Florida, p. 107-147 (1984)
- Steele RE and Rae PMM: Ordered distribution of modified bases in the DNA of a dinoflagellate. *Nucl. Acid. Res.*, 8, 4709-4725 (1980)
- Su Q and Boschetti A: Partial purification and properties of enzymes involved in the processing of a chloroplast import protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.*, 217, 1039-1047 (1993)
- Takahashi Y, Hase T, Waka K, and Matsubara H: Ferredoxins in developing spinach cotyledons: the presence of two molecular species. *Plant Cell Physiol.*, 24, 189-198 (1983)
- Tessier LH, Paulus F, Keller M, Vial C, and Imbault: Structure and expression of *Euglena gracilis* nuclear *rbcS* genes encoding the small subunits of the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A novel splicing process for unusual intervening sequences? *J. Mol. Biol.*, 245, 22-33 (1995)
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ: CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid. Res.*, 22, 4673-4680 (1994)
- Uchida A, Ebata S, Wada K, Matsubara H, and Ishida Y: Complete amino acid sequence of ferredoxin from *Peridinium bipes* (Dinophyceae). *J. Biochem.*, 104, 700-705 (1988)

Van Dolah FM, Leighfield TA, Sandel HD, and Hsu CK: Cell division in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* is phased to the diurnal cycle and accompanied by activation of the cell cycle regulatory protein, CDC2 kinase. *J. Phycol.*, 31, 395-400 (1995)

Vernet G, Sala-Rovira M, Maeder M, Jacques F, and Herzog M: Basic nuclear proteins of the histone-less eukaryote *Cryptocodinium cohnii* (Pyrrhophyta): two-dimensional electrophoresis and DNA-binding properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 1048, 281-289 (1990)

von Heijne G: Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, 133, 17-21 (1983)

von Heijne G: A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acid. Res.*, 14, 4683-4690 (1986)

von Heijne G, Steppuhn F, and Herrmann RG: Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.*, 180, 535-545 (1989)

Vorst O, Oosterhoff-Teertstra R, van Kan P, Smeekens S, and Weisbeek P: Plastocyanin of *Arabidopsis thaliana*: isolation and characterization of the gene and chloroplast import of the precursor protein. *Gene*, 65, 59-70 (1988)

Vorst O, van Dam F, Oosterhoff-Teertstra R, Smeekens S, and Weisbeek P: Tissue-specific expression directed by an *Arabidopsis thaliana* pre-ferredoxin promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.*, 14, 491-499 (1990)

Vorst O, van Dam F, Weisbeek P, and Smeekens S: Light-regulated expression of the *Arabidopsis thaliana* ferredoxin A gene involves both transcriptional and post-transcriptional processes. *Plant J.*, 3, 793-803 (1993)

Wada K, Onda M, and Matsubara H: Amino acid sequences of ferredoxin isoproteins from radish roots. *J. Biochem.*, 105, 619-625 (1989)

Wallrath LL, Lu Q, Granok H, and Elgin SCR: Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *BioEssays*, 16, 165-170 (1994)

Willey DL, Auffret AD, and Gray JC: Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. *Cell*, 36, 555-562 (1984)

Wolffe AP: Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 240-244 (1994)

Wolffe A: Chromatin. Structure and Function. Academic Press (1995)

佐伯和彦、松原 央：フェレドキシンの進化 in 「新生化学講座16 分子進化実験法」 p. 153-168、東京科学同人 (1993)

飯 哲夫：クロマチン構造とMARと遺伝子発現 in 「細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ5、植物のゲノムサイエンス」 p. 153-160、秀潤社

#### (著者関連文献)

Uchida A, Yoshikawa T, Ishida Y, and Saga N: Stable protoplast isolation and its regeneration into thallus of the marine green alga *Ulva pertusa*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 153-158 (1992)

Yoshikawa T, Uchida A, and Ishida Y: There Are 4 Introns in the Gene Coding the DNA binding Protein HCc of *Cryptothecodinium cohnii* (Dinophyceae). *Fisheries Sci.*, 62, 204-209 (1996)

Yoshikawa T, Takishita K, Ishida Y and Uchida A: Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene coding chloroplast-type ferredoxin from the dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Peridinium bipes*. *Fisheries Sci.* (論文投稿中)

## 謝辞

本研究を行うに当たり、終始ご懇切なご指導とご鞭撻を賜りました京都大学農学研究科海洋微生物学講座 内田 有恆教授に心から感謝申し上げます。また、絶えずご懇切なご指導とともに、暖かいご激励をいただいた京都大学名誉教授 石田 祐三郎先生に感謝の意を表します。更に、研究を展開するにあたって適切、有益なご助言をいただいた、海洋微生物学講座 左子 芳彦助教授、吉永 郁生助手、並びに、貴重な藻体試料を提供して下さった、鹿児島大学水産学部 前田 広人講師に感謝の意を表します。

最後に、実験に熱心に協力していただいた大学院生 滝下 清貴氏に感謝いたします。