

最下等真核生物, *Gyrodinium* sp. の染色体の微細構造 とその機能の変化から結論されたヒストンの新機能

石尾, 真弥
九州大学農学部水産化学教室

陳, 建初
中華民国基隆市台湾海洋学院

矢野, 友紀
九州大学農学部水産化学教室

<https://doi.org/10.15017/22276>

出版情報 : 九州大學農學部學藝雜誌. 35 (3/4), pp.105-119, 1981-07. 九州大學農學部
バージョン :
権利関係 :

最下等真核生物, *Gyrodinium* sp. の染色糸の微細構造と その機能の変化から結論されたヒストンの新機能

石尾真弥・陳 建初*・矢野友紀

九州大学農学部水産化学第一教室

(1981年3月11日 受理)

New Roles of Histones Concluded from the Changes of Both Fine Structures and Roles of Chromonemata in *Gyrodinium* sp., the Lowest Eukaryote

SHINYA ISHIO, JIANN CHU CHEN and TOMOKI YANO

Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-04, Fukuoka 812

緒 言

Chamberlin and Ring (1973) は, DNA 単鎖は, RNA への転写のための鋳型としての活性を有するが, DNA 複鎖は, この活性を殆ど有しないか, 有しても微弱であることを示した. しかし, Hay and Revel (1963) や Littau *et al.* (1964) は, DNA が複鎖からなる生物の細胞核内では, RNA への転写が活発なことを示し, 複鎖から単鎖への DNA の変化の容易さを想像させた. Wang (1971) や Molineux *et al.* (1974) は, DNA 複鎖の巻き戻しに活性を有するある種の蛋白質を単離した. Stedman and Stedman (1950) は高等生物の核内に Arg に富む histones の存在を示し, Yeoman *et al.* (1972), Iwai *et al.* (1972), DeLange *et al.* (1972) および DeLange *et al.* (1969) は, それぞれ H2A, H2B, H3 および H4 の各種 histones のアミノ酸配列を明らかにした. これらの histones 中には, 約4個に1個の割合で Lys, または Arg の塩基性アミノ酸が含まれる. Wilkins (1956) は DNA 複鎖の糖リン酸の PO_4^- 基に, これら histones の塩基性アミノ酸残基の側鎖 NH_3^+ 基が結合するモデルを提示した. Noll (1974), Olins and Olins (1974), Kornberg (1974), Thomas and Furber (1976), Morris (1976) および Finch and Klug (1976) は, histones が DNA と結合し, nucleosomes や nucleofilament の形成に

関与していることを明らかにしたが, Stedman and Stedman (1950), Huang and Bonner (1962), Allfrey *et al.* (1963), Balinsky (1970), Dowben (1971) および Prunell and Kornberg (1978) によれば, histones 自体の機能は, DNA から RNA への転写を抑制するものと理解されるに留まっている.

高等生物の核内における染色糸, あるいはクロマチン染色質の構造は複雑に過ぎて, 電顕像を通してこれを解析しようとしても, どのようにそれが連続しているかを追求することは難しく, Watson (1976) によれば, それ以上の研究は断念されてきたと言われている.

Loeblich (1976) によつて, 渦鞭毛藻は, 最も原始的な真核生物と看做された. この渦鞭毛藻は, 細菌と同様に, nonhistone 蛋白質をかなりの量に核内に含むが, histones を殆ど含まないことが Rizzo and Nooden (1972, 1974) によつて明らかにされた. したがつて, この単細胞生物は, 核内における histones の挙動を知るには, 適当な供試生物でないが, Giesbrecht (1962, 1965) が指摘するように, 染色体の構造は細菌とよく似て観察し易く, 電顕ならびに電顕オートラジオグラフ法を通して, 蛋白質と結合しながら変化する染色糸の微細構造と機能の関係を知らるのに適した生物のように見える.

Ishio *et al.* (1977, 1978) は, ある種の渦鞭毛藻, すなわち *Gyrodinium* sp. を用い, その電顕像と, thymidine- 3H 取り込みの電顕オートラジオグラフから, この生物の核内では, 顆粒状に巻いた DNA 複鎖

* 中華民国基隆市台湾海洋学院

からなる核質顆粒は、染色体内部からの張力を受け、DNA合成を行ない、更に巻きを解きながら、対をつくって染色糸の高次コイルに取り込まれることを報告した。

本研究では、著者らは最下等真核生物である渦鞭毛藻の1種、*Gyrodinium* sp. を再び用い、核内への Arg-³H ならびに uridine-³H の取り込みを調べ、これらの取り込み部位の超微細構造を示す電顕写真を得た。

この生物の核内では、70 から 80 Å の曲率半径をもつ DNA 複鎖からなる核質顆粒は、Arg-rich の蛋白質とは結合せず、染色体の中に存在する nucleofilaments から伸びる染色糸を通して、ある張力を受け、引き伸ばされた時に、同じ蛋白質と容易に結合しうることを示した。その理由としては、DNA の背骨をつくる糖リン酸残基中の原子配列 O-P-O-C-C-C の 7.11 Å の長さ、蛋白質の背骨をつくる dipeptide 残基中の原子配列 N-C-C-N-C-C の 7.43 Å の長さの間には、約 4% の長さの違いより存在せず、蛋白質が外側に、DNA が内側に位置し、約 409 Å の曲率半径で緩やかに湾曲すれば、DNA の PO₄⁻ 基と、蛋白質の側鎖 NH₃⁺ 基とは、極めて容易にイオン結合し易くなることが挙げられた。

個々の DNA 単鎖は、Vinograd and Lebowitz (1966) によれば、どのような回転力をも伝えないことは、分子中の糖リン酸残基中の 5' 炭素などの自由回転性から明白である。しかし、DNA 単鎖に Arg-、或は Lys-rich の蛋白質が結合した後に、結果としてつくられた結合体が回転力を受けると、DNA 単鎖は結合した蛋白質と縊りを生じ、この回転力を伝えるようになるだけでなく、自体の長さも縮まることが明白となりそこに隠された重要な意味を知りえた。すなわち、DNA 複鎖が蛋白質と PO₄⁻ 基および NH₃⁺ 基を通してイオン結合した後、左巻きのある強い回転力を受けると、この DNA 複鎖 (DNA-DNA) と蛋白質 (P) の結合体 (P-DNA-DNA-P) の内部に存在する DNA 複鎖の右巻きの縊りは解けるばかりでなく、DNA 単鎖に賦与された回転力伝達能のために、塩基対の水素結合は切断されることである。この切断はあるモデル実験を通してわれわれにより確認された。

このようにして結合体、P-DNA-DNA-P からつくられた2本の P-DNA 結合体は、Pb²⁺ に対して非染色性で約 20 Å の太さを有し、遊離塩基をもつはずである。このような性質を有する微小繊維は実際に染

色体内部の未熟の chromonemata の中に見出され、それらの1本については—完全な証明は難しいように見えるが—RNA への転写能を有することが uridine-³H の取込みから推測された。

また、このような性質を有する P-DNA 結合体、すなわち微小繊維の1対は、その中の1本の P-DNA 上で合成された RNA を分離しつつ、再び結合し、最初の P-DNA-DNA-P に変化せずに、nucleosome (DNA₂-P₂) に変化することが電顕像より確認され、この変化によつて Template P-DNA からの RNA の離脱が完成されるものと推測された。

核質顆粒の DNA 複鎖を緩く湾曲状に引き伸ばすことにより、蛋白質との結合を促すところの張力、P-DNA-DNA-P 複合体の塩基対の水素結合を切断し、RNA への転写能をもつ P-DNA の生成を誘導するところの左巻きの回転力とは、nucleosomes と nucleofilament の形成を通してつくられることを示す証拠がえられた。

DNA の複製が起こる場合にも、核質顆粒の状態にある DNA 複鎖は、単鎖に分離することが必要である。この分離には、DNA 複鎖に対する蛋白質の結合が必要である。したがって DNA および RNA 合成に先行して、DNA 複鎖と蛋白質との結合が起こらなければならない。しかも、この結合は nucleosomes と nucleofilament の形成によつて生じる力によつて誘導される。このような観点から DNA と RNA 合成は、これらの nucleosomes と nucleofilament の形成と共役していることが結論される。*Gyrodinium* sp. は、histones を核内に有しないが、その核内蛋白質の挙動は明らかに高等真核生物の histones の挙動を伝えるものである。したがって著者らは、核内における一群の histones の新しい機能がここに明らかにされたと述べるものである。

研究方法

1. *Gyrodinium* sp. の培養、固定ならびに包埋
Gyrodinium sp. の培養、固定ならびに包埋は、Ishio *et al.* (1977) が用いた方法に従った。

2. 切片の作製と電子染色

電顕写真ならびに電顕オートラジオグラフのために、Porter-Blum MT-1 型のマイクロトームに硝子ナイフを取り付け、厚さが 800 Å となるように、切片は調製された。これらの切片は Lecal (1972) の方法に従つて、lead acetate に 15 分間浸漬され、染色された。

3. 電顕オートラジオグラフ作製法

比放射能 2.31×10^8 dpm/ μ g をもつ *l*-Arg- 3 H が用いられた。 2.22×10^8 dpm/ml の Arg- 3 H 水溶液の 1 ml と、2 倍濃度の Provasoli *et al.* (1957) の ASP₂NTA 人工海水の 1 ml が共に 20 ml 容の固定壺に移された。 これらを混合してから、細胞数 10^5 cells/ml の, *Gyrodinium sp.* を含む培養液の 8 ml がその中に加えられた。 この培養液は、20°C で 6,000 lx の照度をもつ蛍光灯下に 9 時間、Arg- 3 H の取り込みを許された後に、グルタルアルデヒドを 12% の濃度に含む ASP₂NTA 人工海水 10 ml と混合され、その中の細胞は固定され、包埋された。超薄切片は既述の方法でつくられた。

切片は、水平・内田 (1969) の方法に従って、予めコロジオン薄膜で被った銅メッシュ上に置かれ、それから酢酸ウラニール飽和の 50% エタノール水溶液を用い、37°C で 40 分間染色された。これらの切片は蒸留水でよく洗浄され、乾燥された後、100 Å 程の厚さに、炭素蒸着され、それから銅メッシュに載つたままの切片は、そのメッシュの底部の端において、スライドガラスの一端に、両面接着テープではりつけられた。暗室中で、予め蒸留水で 1/14 に希釈されたサクラ NR-H2 乳剤が、中村 (1967) のタッチング法に従って切片上に塗布された。乾燥によつて切片上に生じたフィルムは、オートラジオグラフ用の小函に、乾燥用シリカゲルを詰めた通気性の袋と共に入れられ、4°C のもとに 4 週間、取り込まれた Arg- 3 H の β 線に触れさせた。切片上のフィルムは、Hasse and Jung (1964) の方法により、超微細銀粒子が生じるように、15°C で 1 分間だけ現象された。現像したフィルムからの脱ゼラチンのために、20°C で 1 時間、水平・内田 (1969) の方法で処理された。フィルムの洗浄ならびに乾燥後に、これらの超微細銀粒子の保護のために、切片上のフィルムは再び炭素蒸着を受けた。

DNA から RNA への転写部位を知るために、比放射能 2.55×10^8 dpm/ μ g をもつ uridine- 3 H が、細胞内でメチル化されないように充分量の thymidine と共に用いられた。20 ml 容の固定壺に 11.40×10^8 dpm/ml の uridine- 3 H 水溶液の 1 ml と 2 倍濃度の Provasoli の ASP₂NTA 人工海水の 1 ml が加えられた。これらを混合の後、 10^5 cells/ml に *Gyrodinium sp.* を含む培養液の 8 ml が、この固定壺に移された。60 分後に、10 ml の 12% グルタルアルデヒド-ASP₂NTA 人工海水溶液の添加によつて、細胞は固定された。超薄切片の作製と電顕オートラジオグラフ作製に必要なその他の方法は、Arg- 3 H の取り込

み試験に用いられたものと同じである。

4. 観察

Gyrodinium sp. の染色糸の超微細構造の電顕像ならびに Arg- 3 H や uridine- 3 H 取り込みの電顕オートラジオグラフを撮るために、日本電子の JEM-T7 型の電子顕微鏡が用いられた。

結 果

1. 核内における Arg- 3 H の取り込み部位と染色体の微細構造

Fig. 1-A は、*Gyrodinium sp.* の休止核内への Arg- 3 H の取り込み部位を示す。核内においては、大部分の Arg- 3 H は、染色体内部の染色糸の上に取り込

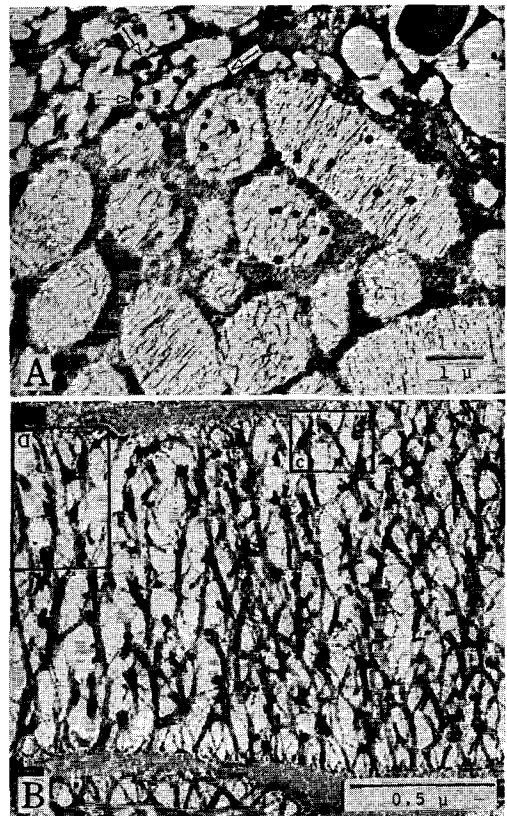


Fig. 1. A. Electron microscopic autoradiograph showing the locations of silver grains due to *l*-Arg- 3 H incorporated into the interphase nucleus and mitochondria (arrows) of *Gyrodinium sp.* B. Electron micrograph showing thick chromonemata and nucleolar granules which keep certain balance between chromosomes. Two frames with the codes C and D, which is attached up side down, indicate the regions for showing more in detail.

まれることが銀粒子の位置から明白である。核周辺の矢印で示すミトコンドリアにも取り込まれている。取り込みは9時間にわたつたために、染色体の殆ど中心部にも銀粒子が見られる。

Fig. 1-B は、休止核の染色体内部を示す。染色糸は、単に染色体を横切る1本の糸ではなく、短く切られた弧状の染色糸の集まりとして写されている。この超薄切片の厚さは約 800 Å であるから、右下方に示す尺度の1/6以下である。そのように厚さの薄い空間に見られる弧状の染色糸は、実際には円弧を画くものであり、それを示すように、染色体内部には、染色糸の多数の切口が見られる。これらの状態を詳しく知るために、CおよびDの枠内に存在する染色糸を23万倍と14万倍に拡大することにした。

2. 染色糸の微細構造

Fig. 2 は23万倍と14万倍に拡大された染色糸を示す。染色糸は高次コイルであることが判る。直径20 Å のDNAの2重らせんは、この図中ではそれぞれ0.46 mm および0.28 mmの太さに見える。図Cでは左上に、図Dでは右上にDNA 2重らせんの太さを示す尺度を載せた。図Cには、第1の矢印で、染色糸の高次コイルの断面が示されている。Pb²⁺ によつて強い電子染色を受けている。この断面は、染色糸の高次コイルが中空であることを示している。第2の矢印は、同じく染色糸高次コイルの断面を示すが、そこにはPb²⁺ では染色されない8の字状の微細繊維が見られる。第3の矢印は右巻きの染色糸高次コイルを示し、各コイルには、Pb²⁺ では染色されない微細繊維が見られ、太さは何れも20 Å程である。第4の矢印は、第1の矢印で示した染色糸高次コイルと連結するもう1個のコイルで、手前に倒れている。

図Dでは、第1の矢印は染色糸高次コイルの断面を示し、第2の矢印は、染色糸高次コイルの断面に見られるPb²⁺ 非染色性の微細繊維を示す。第3の矢印は染色糸高次コイルの側面に見られるPb²⁺ 非染色性の微細繊維を示す。この高次コイルは、急ピッチの左巻きを呈している。よく見ると、このコイルの中に見られる微細繊維は対をなしているのがわかる。

図E および E' は、Provasoli *et al.* (1957) のASP₂NTAの人工海水に微量のbenzanthroneを加え、培養した*Gyrodinium* sp.の染色体内部に見出された染色糸高次コイルの巨大な断面である。EとE'は同じ断面を示すが、Eはコイルを巻く黒線とコイルの厚さを知るために明暗差を弱く、E'は、コイルに接続するPb²⁺ 非染色性の微細繊維を示すために、明

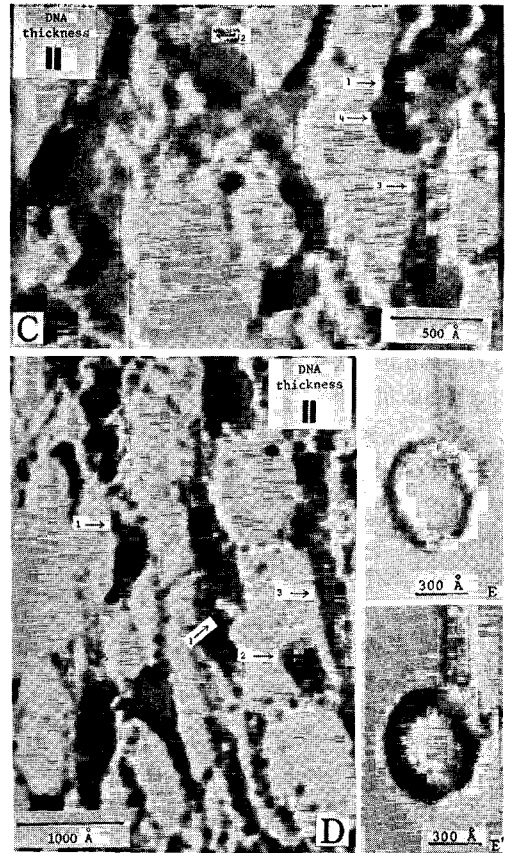


Fig. 2. Fine structures of chromonemata in the interphase chromosomes of *Gyrodinium* sp. C: Cross section (arrow 1) with the peripheral thickness of 80 Å. Oblique section (arrow 4) with the unit height of 150 Å. The other type of oblique section (arrow 2) with Pb²⁺ unstainable, 8-shaped microfibrils. Side view (arrow 3) with right handed coils in which the Pb²⁺ unstainable microfibrils are observed. D: Oblique sections (arrows 1) showing their hollow interiors. Oblique section (arrow 2) with the Pb²⁺ unstainable microfibrils. Side view (arrow 3) with left handed coils which possess a very steep pitch and include the Pb²⁺ unstainable microfibrils. E and E': Cross sections of a giant chromonemata with the peripheral thickness of about 80 Å to 100 Å. The coarse windings of DNA double strand (N-shaped black lines) can be seen around this coil (upper). The Pb²⁺ unstainable microfibrils can be seen in the string extending perpendicularly from the right shoulder of this coil (lower).

暗差を強く焼きつけている。Eからこのコイルの厚さは80~100 Åの範囲にあり、N字状を呈し、20 Å程の

太さをもつ黒い線が、コイルの処々に在るのが判る。E' に示すコイルの右肩から上方に垂直に伸びる染色糸の中にも Pb^{2+} 非染色性の微細繊維が見られる。

3. 核内における uridine- 3H の取り込み部位

Fig. 3 には, *Gyrodinium* sp. の休止核近傍におけ

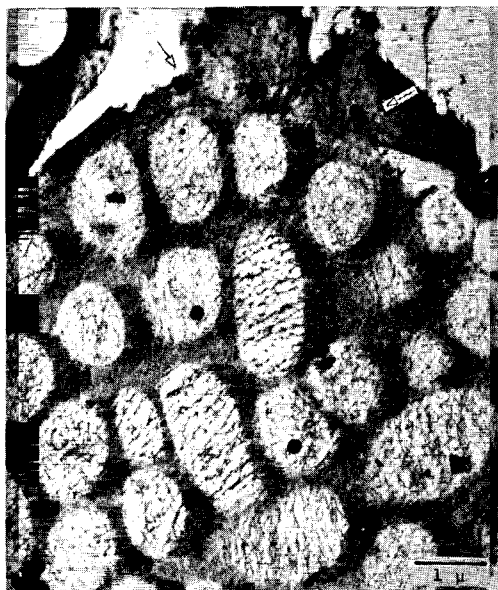


Fig. 3. Electron microscopic autoradiograph showing the locations of silver grains due to uridine- 3H incorporated into the interphase nucleus and mitochondria (arrows) of *Gyrodinium* sp.

る uridine- 3H の取り込み部位を示す。大部分の uridine- 3H は、銀粒子の位置から染色体内部の染色糸の上に取り込まれ、矢印で示す2個のミトコンドリアにも取り込まれている。核質顆粒にも取り込みが見られるが、移動中の RNA と推測される。

4. 染色体内の染色糸上における DNA および RNA の合成部位

Table 1 には, Ishio *et al.* (1978) が前報において示した *Gyrodinium* sp. の核内における thymidine- 3H の取り込み部位と, 本研究における uridine- 3H の取り込み部位についての比較を示した。取り込み部位は, thymidine- 3H もしくは uridine- 3H によって出現した銀粒子の位置が, 染色体の縁からの距離によって測定され, 染色体の半径に対する百分率で示されている。明らかに RNA の合成部位は, DNA の合成部位よりも染色体の内側に位置することがわかる。

5. 飢餓細胞の休止核内に見出された網状体

Fig. 4 は, 小容量の ASP_2NTA 人工海水中に 10^5 cells/ml の高密度に収容され, 飢餓状態に陥った *Gyrodinium* sp. に見出された異常細胞核の電顕像である。電顕像の最上部左右に核膜 (NM.) の一部が見え, 少し離れて毛胞 (Tr.) の断面が見られる。毛胞の位置と核膜の湾曲の関係から, これらの毛胞は核内に存在することが明白である。また, この電顕像に見られる3個の葉緑体 (Chl.) は, 核内に侵入したものであることも明白である。下方には, 直径約 1μ の初期休止期の染色体 (Chr.) が見られる。中央部には,

Table 1. The locations of DNA and RNA synthetic sites in the interphase chromosomes of *Gyrodinium* sp. The locations were decided from the positions of silver grains in the E. M. micrographs due to thymidine- 3H or uridine- 3H incorporated within 1 hr., and expressed as percent of the distance between the silver grain and the margin of the chromosome to the radius of the chromosome.

DNA			RNA		
Location of silver grain due to thymidine- 3H in mm	Radius of chromosome in mm	Location of synthetic site in percent	Location of silver grain due to uridine- 3H in mm	Radius of chromosome in mm	Location of synthetic site in percent
3.5	11.5	30.2	1.0	10.0	10.0
1.5	10.5	14.2	5.0	10.0	50.0
4.0	9.0	44.4	5.0	8.5	58.8
3.5	11.0	31.8	7.0	8.5	82.2
1.5	11.5	13.0	6.5	7.5	86.6
4.5	9.0	50.0	4.0	10.0	40.0
1.5	14.0	10.8	2.0	4.0	50.0
0	14.0	0	3.0	4.0	75.0
0.3	14.0	3.6	4.5	11.0	41.0
3.5	17.0	20.3			

21.8 ± 15.6
= 6.2~37.4

54.8 ± 28.2
= 26.6~83.0

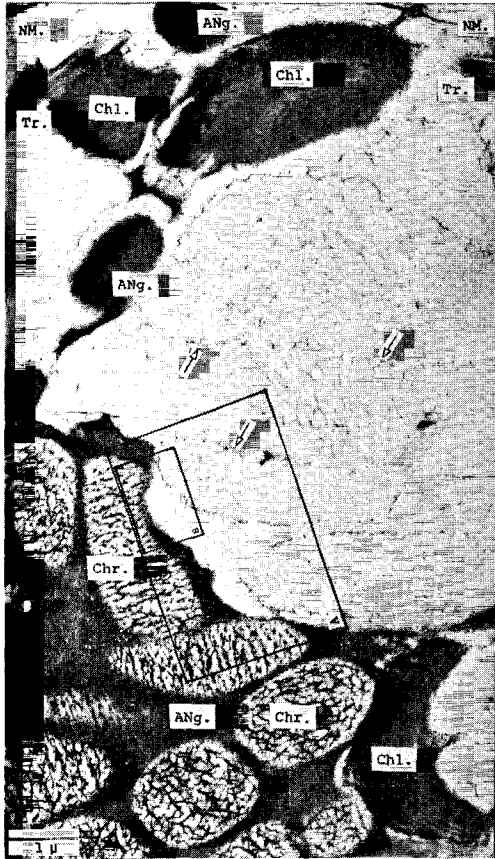


Fig. 4. Electron micrograph showing the inside of an interphase nucleus of *Gyrodinium* sp. stood under a certain starved condition. Chr., chromosomes with thick chromonemata; arrows, abnormal chromosomes with very thin chromonemata; ANg., aggregated nucleogranules; Chl., chloroplast; Tr., trichocyst; NM., nuclear membrane. From the concave presumed by two parts of the nuclear membranes, it is clear that these three chloroplasts invaded this nucleus.

細く縁どられた4個の網状体が矢印で示されている。上方の葉緑体の傍に、電子密度の高い核質顆粒の凝集体(ANg.)が見られる。また、下方の染色体の間には、核質顆粒の正常な分布が見られる。網状体を更に詳しく見るために枠AとBの部分は更に拡大される。

6. 核質顆粒の異常分布

Fig. 5-A は、幅の実測値が約 1μ の2個の網状体の拡大像である。網状体の縁は顆粒からなり、それらの顆粒は真つすぐに伸びた糸によつて、上方の核質顆粒(ANg.)に連結されている。網状体の内部には、斜めに走る多数の数珠状糸が見られる。枠Bの部分

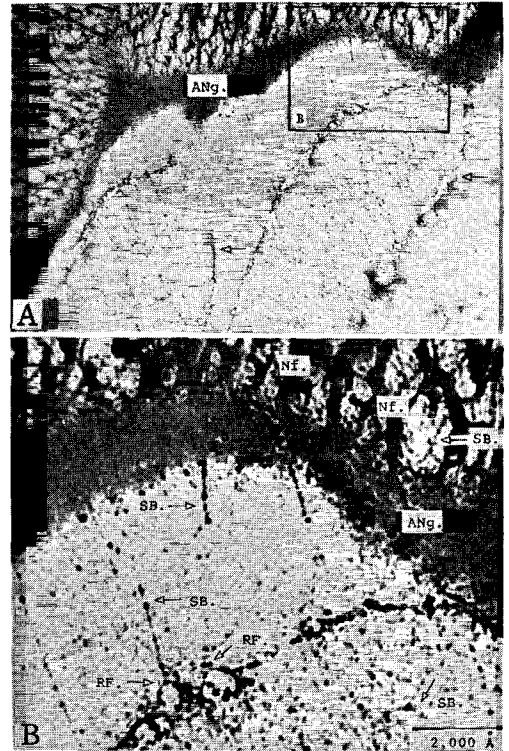


Fig. 5. A: Very many strings of beads inside the abnormal chromosomes (arrows) and nucleofilaments in the normal chromosome surrounded with aggregated nucleogranules (ANg.). B: One sided distribution of aggregated nucleogranules (ANg.) located actually inside this normal chromosome, because they are found among the terminals of nucleofilaments (NF.). Many stretched-strings of beads (SB.) are connecting these nucleogranules and margin of the abnormal chromosome, but the strings of beads inside the abnormal chromosome seem relaxedly.

は更に拡大される。

Fig. 5-B は、網状体の拡大像である。その縁は単に顆粒の集まりだけでなく、DNAの複製分岐(RF.)を含むことを示す。これらの分岐から凝集した核質顆粒(ANg.)に伸びる糸は数珠状糸(SB.)であり、この糸は直線状を呈し、張力を受けていることがわかる。網状体内部の糸も数珠状糸であり、核質顆粒もこれら数珠状糸の珠と同じものと判断できる。核質顆粒の分布域よりも上方に、直径 $240\sim 320\text{Å}$ の染色糸の高次コイルが多数見られる。後程この高次コイルは Finch and Klug (1976) が提示した nucleofilament と同じものであることが論議される。

Table 2. Thicknesses of nucleogranules, paired strings of beads and nucleofilament in the interphase nucleus of *Gyrodinium* sp. The nucleosomes which construct the nucleofilament seem to be identical with these beads making the nucleogranules, but these beads seem to be devoid of protein cores so that tend to collapse when pulled toward the inside of chromosome and change into such strings of beads.

Grade of thickness	Nucleogranules		Paired strings of beads		Nucleofilament	
	Diameter in Å	Nucleosomes in a bead	Diameter in Å	Nucleosomes in a bead	Diameter in Å	Peripheral nucleosomes in a turn
Maximum	300	6~8	140	1~2	540	11~15
Large	240	4~6	80	1	400	8~12
Common	200	3~4	60	3/5~3/4	300	6~8
Small	140	1~2	20	1/5~1/4	240	4~6

考 察

1. 染色糸の構造と蛋白質との結合性

Gyrodinium sp. の細胞中には、真核生物に広く見られる粗面小胞体がなく、リボゾームは葉緑体とミトコンドリア内に集中的に存在することは、Chen *et al.* (1979) によつて見出だされている。したがつて、Fig. 1-A において、Arg-³H を取り込んだことを示す銀粒子をもつミトコンドリアは、蛋白質を合成し、これを核に供給しているはずであり、銀粒子が核質顆粒の間に少なく、染色体内部に多いのは、Arg-³H を含む蛋白質は、核質顆粒の間には取り込まれず、染色体内部に取り込まれることを示すはずである。染色体内部には多数の染色糸が存在するので、この蛋白質は、染色糸と結合し易いことが明白である。核質顆粒も染色糸も共に DNA 複鎖のはずであるのに、蛋白質との結合に何故このような難易を生じるか、検討を試みる。

Fig. 1-B に示される染色体間の核質顆粒は直径が、140~240 Å の範囲にあり、また可成りの凝集力をもっている。しかし Pb²⁺ や UO₂²⁺ などの重金属イオンにより、これらの核質顆粒は容易に電子染色を受けるので、重金属イオンと置換し易いアルカリ土金属イオンのような 2 価陽イオンが、DNA 複鎖の外側に分布する糖リン酸 PO₄⁻ 基と結合し、核質顆粒を凝集させているものと推測される。しかし、Ishio *et al.* (1978) が電顕像で示したように、核質顆粒は、この凝集力に抗して染色体内部に取り込まれるので、核質顆粒に連結する染色糸には、可成りの張力が働いているはずである。その証拠として、核質顆粒 (nucleogranules) は、Table 2 に示すように、直径が 140~300 Å の範囲にあるが、染色体内部に対をなして取り込まれ、数珠状糸 (strings of beads) となる時は、

その糸の上に見られる球体の最大直径は 140 Å となり、最も小さな核質顆粒と同じになる。更にこの球体自身は壊され、80 Å から 20 Å の太さの糸に変化する。20 Å の太さの時には、核質顆粒は引き伸ばされて、殆ど DNA の 2 重らせんそのものとなる。

この渦鞭毛藻に含まれる核内の蛋白質は—nonhistone 蛋白質であることが Rizzo and Nooden (1972, 1974) の研究から判断できるが—histones のように直鎖分子であれば、球形の核質顆粒とは結合し難いように見えるが、引き伸ばされて直線状の DNA 複鎖となれば、容易なように見える。

Pauling (1960) によれば、DNA 単鎖の背骨をつくる糖リン酸の 1 残基中の原子配列、O-P-O-C-C-C の長さは 7.11 Å、また、蛋白質直鎖分子の背骨をつくるアミノ酸の 2 残基中の原子配列、N-C-C-N-C-C の長さは 7.43 Å と評価される。DNA 単鎖と蛋白質直鎖分子が、Fig. 6 に示すように、糖リン酸残基の PO₄⁻ 基とアミノ酸残基の側鎖 NH₃⁺ 基とが互いに向き合うように配列するためには、蛋白質直鎖分子が外側に位置し、曲率半径 409 Å の緩やかな円弧を画けば良いことがわかる。これに対して 140~160 Å 程の顆粒の数個の集まりである核質顆粒では、DNA

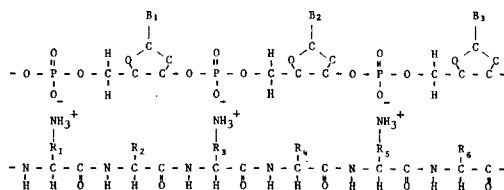


Fig. 6. Probable chemical structure of the microfibril with the characters of Pb²⁺ unstainability, template activity for transcribing to RNA, capability of forming nucleosomes by pairing and the thickness of about 20 Å.

複鎖は $70\sim 80\text{ \AA}$ の曲率半径を有するので、このような DNA 複鎖は、Fig. 6 に示すようなイオン結合によつて蛋白質直鎖分子と結合することは困難である。しかし、この DNA 複鎖が、引き伸ばされて、緩く湾曲すれば、この結合は容易となるのが、構造化学的に明白である。休止核内への Arg- ^3H の取り込みは、大部分が染色体内の染色糸で行なわれ、核質顆粒では殆ど見られないのは、このような理由によると推測される。

2. 染色糸高次コイルに見られる Pb^{2+} 非染色性の微細繊維

Fig. 2-C の 3 番目の矢印は右巻き染色糸高次コイルの所在を示し、Fig. 2-D の 3 番目の矢印は、急ピッチな左巻き染色糸の高次コイルの所在を示す。また、C、D とも、2 番目の矢印は、染色糸高次コイルの断面上に見られる Pb^{2+} 非染色性の微細繊維を示す。3 番目の矢印は同じく側面に見られる Pb^{2+} 非染色性の微細繊維を示す。これらの微細繊維は Pb^{2+} に対して非染色性であり、直径が 20 \AA 程に過ぎない。それらが DNA 複鎖とすれば、糖リン酸の PO_4^- 基は、2 重らせんの外側に分布するので、 Pb^{2+} 非染色性を説明し難い。また、その微細繊維が蛋白質から成るとすれば、 COO^- 基などは、Watson (1976) が述べるように分子の外側に向き、 Pb^{2+} と結合し易いので、 Pb^{2+} に対する非染色性を説明し難い。しかし、この微細繊維が、DNA 単鎖と Arg や Lys に富む蛋白質の直鎖分子が、前者の PO_4^- 基と後者の側鎖 NH_3^+ 基とのイオン結合を介してつくられたものとすれば、 Pb^{2+} に対する非染色性とその直径が約 20 \AA であることがよく説明できる。Fig. 1 に示す染色体内部の染色糸上への Arg- ^3H の取り込みもこれを支持するはずである。

3. DNA 複鎖から DNA 単鎖への分離

Pb^{2+} 非染色性の微細繊維が、DNA 単鎖と蛋白質直鎖分子から成り、DNA 複鎖と蛋白質直鎖分子の反応から誘導されたとすれば、その誘導の途中で DNA 2 重らせんは解け、 $\text{N-H}\cdots\text{N}$ や $\text{O}\cdots\text{H-N}$ などの多数の塩基対間水素結合の切断が起こらなければならない。しかし、DNA 単鎖と蛋白質直鎖分子を結合させている $\text{P-O}\cdots\text{H-N}^+$ のイオン結合の数は、前述の水素結合の数より遥かに少ない上に、結合エネルギーは、Watson (1976) が説明するように、水素結合のそれと変わらぬ小さなものと評価される。したがって、 Pb^{2+} 非染色性の微細繊維の生成は、DNA 複鎖と蛋白質直鎖分子から自動的に誘導されるはずはな

い。しかし、緩やかに円弧を画く DNA 単鎖が、蛋白質直鎖分子と容易に結合しうるように、DNA 複鎖も引き伸ばされた時には、DNA 複鎖の外側に右巻きに 2 列に並ぶ PO_4^- 残基に、側鎖 NH_3^+ をもつて、蛋白質直鎖分子が 2 列にイオン結合できるはずである。H2A, H2B, H3 および H4 の 4 分子の histones 中には、全アミノ酸残基は 491 個存在し、119 個が塩基性アミノ酸残基である。塩基性アミノ酸残基が隣接して 2 個配列されている時は、その中の 1 個は同じ糖リン酸の PO_4^- 基と結合できない。そのような塩基性アミノ酸残基数は 31 個存在し、88 個は 1 列の PO_4^- 基に結合できる。31 個の塩基性アミノ酸残基の中で、Wilkins (1956) が示すように、別の列の PO_4^- 基と結合できるものも存在しうるはずである。兎に角、このような結合がつかられても、特に塩基対間の水素結

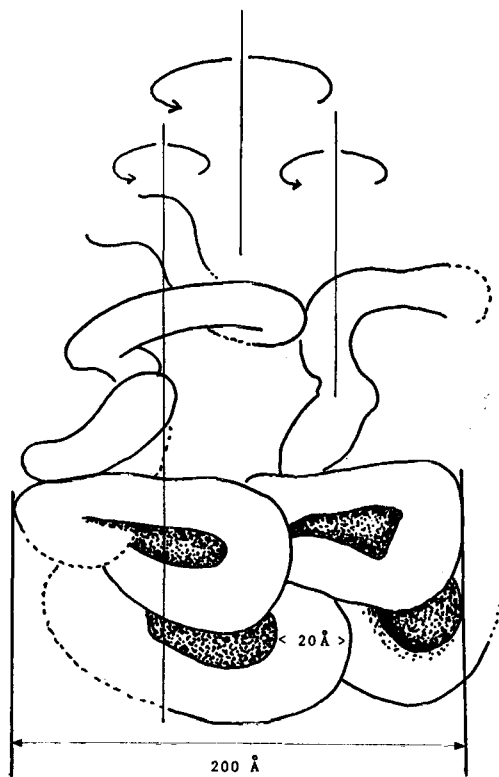


Fig. 7. Configurations of the microfibrils arranged side by side in the supercoils of an unmaturing chromonemata. These microfibrils seem to be influenced by a certain torque twisting them in left handed. Because the radii of the curvatures of their loops can be 75 \AA or so, even though their radii of the curvatures can be estimated to be 409 \AA when their chemical structures are regarded as shown in Fig. 6.

合は切れるはずもない。

このような理由から、塩基対間水素結合切断の手がかりをうるために、 Pb^{2+} 非染色性の微細繊維が、染色系高次コイルの中でどのような形をとるかを調べ、それを Fig. 7 に示した。

Fig. 7 から、隣接して並ぶ Pb^{2+} 非染色性の微細繊維は、お互いに酷似し、双子のように見える。これらの繊維の中で、DNA 単鎖と蛋白質直鎖分子が、Fig. 6 に示すような条件で結合できる最も自然的な配置は、蛋白質分子を外側にして、曲率半径 409 \AA で湾曲する場合であることは先に述べた。しかし、これらの双子の微細繊維の曲率半径は、僅か 75 \AA 程である。したがってこの場合、この繊維には、外から力が働いていることが判る。しかも、この力は、DNA 複鎖の右巻き 2 重らせんを解き、その上に、塩基対間水素結合の切断に働いたとすれば、左巻きに振る強い力のはずである。更に Wilkins (1956) が云うように、塩基性アミノ酸残基の側鎖 NH_3^+ 基が、DNA 複鎖上の 2 列の PO_4^- 基に跨がつて結合するとすれば、DNA の塩基対間の水素結合が切断される前に、一方の側の $PO_4^- \cdots NH_3^+$ 間の結合が切断されることが必要である。例えば結合蛋白質が、H2A, H2B, H3 および H4 である時には、31 個の結合の方が切られ、88 個の結合の方が残るはずである。すなわちこの振れの力によつて、弱い方の $PO_4^- \cdots NH_3^+$ 間の結合は切断され、強い方の結合だけが 1 列の PO_4^- 基に残ることとなる。

DNA 単鎖は、Vinograd and Lebowitz (1966) が指摘するように、糖リン酸中の 5' 炭素などの単結合の自由回転性のために、振れの力を伝えないことが明白である。したがって、DNA 複鎖を左巻きに振れば、塩基対間水素結合は残存した状態で左巻きに振れるだけに終わるはずである。

しかし、DNA 複鎖の外側に、 PO_4^- 基と NH_3^+ 基を介して、蛋白質の直鎖分子が結合すれば、この結合体の中の DNA 単鎖は、振れに対して、外側に結合した蛋白質と縊りを生じ、振れの力を伝える能力を獲得するはずである。したがって、この結合体が左巻きに振られれば、中心部の DNA 複鎖の右巻きらせんが解けると共に、多分、DNA 塩基対間の水素結合を切断するはずである。この点を確かめるために、次の実験を試みた。

ゴム紐は振れの力を伝える性質を持つので、DNA 単鎖に蛋白質直鎖分子が結合してできる双子の微細繊維の 1 本と同様な性質を有するはずである。著者ら

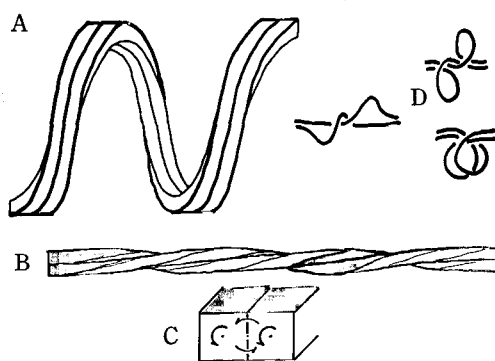


Fig. 8. Behaviors of two rubber strings observed when they are twisted in left handed by one and half revolutions after the bundle of both ends was made. A: A huge coil with one and half turns in which two strings are kept without detachment. No sharing force acts on two faces attached each other. B: Left handed revolutions of individual rubber strings brought about by pulling both ends of the huge coil of A. A certain sharing force act on two faces which have been attached each other. C: Directions of induced torques acting on individual rubber strings when a certain torque revolves the bundled rubber strings in left handed. D: Paired loops produced after the B is relaxed.

は、断面が正方形の 2 本のゴム紐を、振れを与えずに相接して並べ、上面にのみインクを塗り、振れ具合を調べるための目印とし、2 本のゴムの両端を束ねた後、一端を固定し、他端を 1.5 回転させた。その結果、2 本のゴム紐は、Fig. 8 の A に示すような、曲率半径の大きならせんとなり、ゴム紐の相接する面は、そのままの状態を保ち、面の間に何等の剪断力も働かないことが判つた。しかし、その両端を左右に引っ張ると、B に示すように、大きならせんは消失し、その代わりに 2 本のゴム紐は C に示すように、それぞれ左巻きに 1.5 回転する。したがって、相接する面の間に剪断力が働くことが明白である。また、このゴム紐に加えられた張力を弱めると、D に示すように、種々の形の一對の輪を形成した。

この実験から、DNA 複鎖に蛋白質直鎖分子が結合すれば、内部の DNA 単鎖は、振れの力を伝える能力を獲得し、この結合体全体が左巻きの振れの力を受け、更に張力を受け、それらの力が十分に大きければ、塩基対間水素結合が剪断されることが明白となった。

先に、 Pb^{2+} 非染色性の微細繊維は、DNA 単鎖に

蛋白質直鎖分子がイオン結合したものと推測した。またこれらの微細繊維のつくる輪の曲率半径が異常に小さいことから、外力が働いていること、しかもその外力は、これらの微細繊維が、DNA 複鎖に蛋白質直鎖分子が2列に結合したのから誘導されたものとするれば、左巻きに振る力であること、ゴム紐の実験から、更にその力は張力をも具えるべきであることが推論された。更に Arg-³H の取り込み部位は、この双子の微細繊維は、DNA 単鎖と蛋白質直鎖分子の結合体であると看做して矛盾しないことを教えた。しかし、微細繊維が実際にそうであるとする確証はえられていない。もし、この対をなす微細繊維のうちの1本が Marmur *et al.* (1963) および Bremer *et al.* (1965) の研究に見られるように、RNA への転写のために鋳型としての活性を有することが証明されるならば、この確証は得られたことになる。そうすれば DNA 複鎖が、DNA 単鎖に変化するための機構が明らかとなるはずである。

4. Pb²⁺ 非染色性微細繊維の RNA への転写能

Fig. 7 に見られる双子の微細繊維が示す輪の曲率半径は 75 Å 程の小さなものである。この輪の外周りは 471 Å と計算され、内周りは 345 Å と計算される。糖リン酸残基の O-P-O-C-C の長さは 7.11 Å, アミノ酸残基の2個分の N-C-C-N-C-C の長さは 7.43 Å である。したがって、内周りの 345 Å は、外周りの 471 Å の中に収容できる dipeptide 残基の数と同数の糖リン酸残基を収容するには短過ぎ、いずれかの残基が、内側か外側の一方を占めることはできない。したがって、この結合体の振れ具合によつて、free の状態の塩基が RNA への転写に都合の良い配位をとり、鋳型としての機能を示すはずである。この点を確認するために、uridine-³H の取り込みを電頭オートラジオグラフ法で調べたが、その結果は、殆どの uridine-³H は染色体内部に取り込まれることが判明した。しかし微細繊維の上に取り込まれたかどうかは判然としなかつた。また、実際にその上で RNA が合成されれば、Pb²⁺ に対する非染色性は失われることと、取り込まれた uridine-³H によつてつくられる銀粒子は巨大すぎるのがわかり、確認が難しいことが判明した。しかし、Littau *et al.* (1964) の研究に見られる仔牛胸腺の細胞核や、Hay and Revel (1963) の研究におけるトカゲ稚仔肋骨の細胞核に見られる RNA の生成部位は、Pb²⁺ や UO₂²⁺ などに対し、非染色性であることを考慮すれば、Gyrodinium sp. の核内に見られる Pb²⁺ に対し非染色性

の微細繊維は、euchromatin の小単位に相当するものと看做しうるかも知れない。しかし、これをもつても前述の確証とはなりえない。

5. 双子の Pb²⁺ 非染色性の微細繊維から nucleosomes および nucleofilament の形成

Fig. 2 の E および E' は、染色糸高次コイルの巨大な断面を示す。このコイルの壁の厚さは、80~100 Å であり、Olins and Olins (1974), Kornberg (1974), Baldwin *et al.* (1975) および Oudet *et al.* (1975) によつて報告された nucleosome の直径と近似している。このコイルの処々に、20 Å 程の太さの黒い線がN字型を呈して存在するのがわかる。電子染色性とその太さから、DNA 複鎖と推測できる。また、この黒色の線の疎い巻きは、Baldwin *et al.* (1975) が中性子散乱法によつて見出した nucleosome に見られる DNA 複鎖の巻きとよく似ている。したがってこの染色糸高次コイルの断面は nucleosomes からなり、この場合 11~15 個の nucleosomes からなるものと推測できる。Finch and Klug (1976) によつて提示された nucleofilament のモデルと照合すれば、これは nucleofilament の断面であることが判る。したがって、この渦鞭毛藻の染色体内部に見られる染色糸の高次コイルは nucleofilaments であり、Table 2 に示すように、その周囲は、細いもので4~6個、通常6~8個、太いもので8~12個の nucleosomes から成ることが明らかである。Fig. 2-E に示された断面は、異常に径の太い nucleofilament のものであり、恐らく最大のものと看做される。

また、この巨大コイルの右肩から、垂直に上方に伸び、太さが 180 Å 程の染色糸の中には、Pb²⁺ 非染色性の双子の微細繊維が見られるので、コイル断面中の nucleosomes は、この双子の微細繊維からつくることが明白である。また、この nucleosomes は nucleofilament へと変化することも明白である。したがって、双子の微細繊維に結合していた蛋白質直鎖分子は、Dubochet and Noll (1978) が示すような nucleosome cores に変化し、残された2本の DNA 単鎖は複鎖となり、これらの cores を取り巻くはずである。もしこの渦鞭毛藻の DNA 単鎖に結合している蛋白質が、高等生物と同様に、H2B, H2A, H3 および H4 からなる histones とすれば、nucleosome は双子の微細繊維の結合によつてつくられるので、nucleosome core は、Kornberg (1974) の指摘のように、(H2B, H2A, H3, H4)₂ の8量体となるはずである。

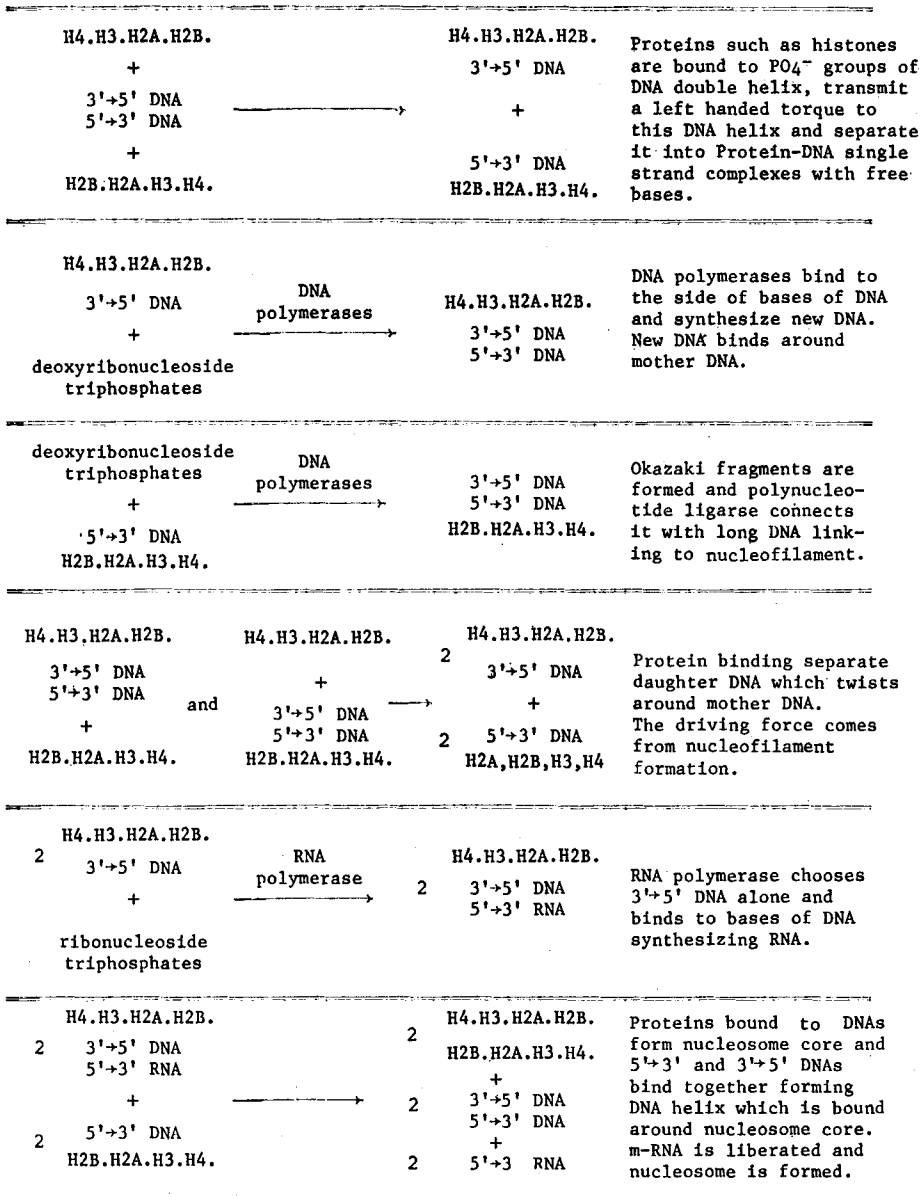


Fig. 9. DNA and RNA syntheses conjugated with the formations of nucleosomes and nucleofilament.

実際に双子の微細繊維から nucleosome がつくられることと、このような機構で nucleosome がつくられるとすれば、期待される core の蛋白質組成が、少なくとも高等生物については、現実に見出だされる histone octamer に一致することから、この現象は普遍的なものと推測される。したがって、Pb²⁺ に対して非染色性の 20 Å 程の太さをもつ双子の微細繊維は、DNA 単鎖と蛋白質直鎖分子が PO₄⁻ 基と NH₃⁺

基を介してイオン結合したものと看做すことにより、この nucleosome の生成が説明でき、DNA 複鎖に蛋白質直鎖分子が同じイオン結合によつて 2 列に結合したものが、左巻きの捩れの力と張力を受けることによつてつくられたものと推断できる。

Rizzo and Nooden (1972, 1974) によれば、*Gyrodinium cohnii* や、*Peridinium trochoideum* の核内には histones が殆ど存在しないので、nucleosome の生

成には、蛋白質が—多くの塩基性アミノ酸を含むことは必要であるが—histones である必要はないように見える。また、既に Table 2 に示したように、核質顆粒の性質から判断すれば、DNA 複鎖は、蛋白質の存否にかかわらず nucleosome と同様な球形となり易いことがわかる。これらの nucleosome 様の核質顆粒 (ANg.) は、Fig. 4 の網状体の附近に見られる。

6. DNA 単鎖上につくられた RNA の離脱

nucleosomes は、双子の微細繊維からつくられるので、その1本の DNA 単鎖上につくられた RNA の離脱は、もう1本の DNA 単鎖が再び塩基対を形成することによつてなされるはずである。しかし RNA の離脱を伴う DNA 塩基対の再形成反応における反応遊離エネルギーは極めて小さいはずである。したがつて、反応はある平衡に達して、RNA の離脱は完成しないはずである。このような時、RNA の完全離脱のためには、塩基対の形成後、反応生成物はこの反応系から除外されることが必要である。終局的な反応生成物が、DNA 複鎖の外側に蛋白質が2列に結合する元の結合体とならずに、nucleosomes に変化することは、hybrid RNA の離脱を完全化するのに必要と判断される。

7. 核質顆粒の染色体内部への取り込みの力と DNA 複鎖の塩基対水素結合切断の力の発生源

本来、核質顆粒は、染色体内部に存在する nucleofilament の基部から伸びる数珠状糸に引つ張られ、Fig. 1-B に示されるように、染色体間に均衡を保つて存在するが、Fig. 5-B に示す核質顆粒 (ANg.) は、nucleofilaments の基部の間に見られ、健全な染色体の内部に入り込んでいる。核質顆粒のこの異常分布は、隣接する染色体内部の nucleofilaments の蛋白質が加水分解され、核質顆粒を引つ張っている力が失われたためと推測される。すなわち、この図に示される網状体の縁を見ると、そこには DNA の合成分岐点 (RF.) が見られ、Ishio *et al.* (1978) の先の研究から、この網状体は染色体であつたことがわかる。しかし、その内部には nucleofilaments は全く見られず、数珠状糸 (SB.) が見られるだけである。この数珠状糸は、網状体の縁と核質顆粒 (ANg.) を連結する数珠状糸 (SB.) と同じものであり、珠の部分は張力によつて崩れ、DNA 複鎖そのものとなりうるので、蛋白質の core を含まないことが明白である。すなわち、核内に侵入した葉緑体 (Chl.) が生成する蛋白質分解酵素によつて、core の蛋白質が加水分解さ

れたことが明白である。何故ならば、この渦鞭毛藻の蛋白質合成器官は、高等生物のように粗面小胞体上のリボゾームではなく、Chen *et al.* (1979) が示すように、葉緑体もしくはミトコンドリア内に存在するリボゾームであり、核内には、今葉緑体が侵入しているからである。

このように nucleofilament の崩壊が起これば染色糸に働く張力が失われることは、nucleofilament の形成は張力を生み出すことを示すはずである。また、この張力は、既述のように左巻きの捩れの力を伴っているはずである。この左巻きの捩れの力は、nucleosome core を取り巻く DNA 複鎖の巻きが, Baldwin *et al.* (1975) がそのモデルに示すように、左巻きであり、更に Finch and Klug (1976) が示すように、nucleofilament のコイルが左巻きとなることが、実際に起こるためにつくられるものと推測される。

全体を要約するために、Fig. 9 には nucleosomes および nucleofilament の形成と共役する DNA および RNA 合成の反応機構を示した。

要 約

渦鞭毛藻に属する *Gyrodinium sp.* を用い、核質顆粒から nucleofilament までの染色糸の微細構造の変化とそれらの機能の変化を調べた。判明した新事実は次の通りである。

1. RNA 合成のために、DNA 複鎖が DNA 単鎖へ変化するには、DNA 複鎖に Arg もしくは Lys に富む蛋白質直鎖分子の結合が必要である。
2. この蛋白質の結合は、DNA 複鎖内の DNA 単鎖に捩れを伝える能力を賦与する。
3. この蛋白質が結合するためには、核質顆粒に張力が働き、DNA 複鎖を顆粒状から緩く湾曲させることが必要である。
4. 蛋白質結合の DNA 複鎖の塩基対の水素結合の切断には、張力を伴う左巻きの捩れの力が必要である。
5. 蛋白質結合の DNA 単鎖の2本の内の1本は RNA への転写能を有し、その上で合成された RNA の完全な離脱には、もう1本の蛋白質結合の DNA 単鎖による塩基対の相補的再形成が必要であり、このようにしてつくられた生成物が nucleosomes へと変化することが必要である。
6. 核質顆粒を直鎖状の DNA 複鎖に変える張力と蛋白質結合の DNA 複鎖を蛋白質結合の単鎖へと変える力は、nucleosomes および nucleofilament の形

成によつてつくられる。

7. nucleosomes および nucleofilament の形成は、RNA 合成ならびに DNA 合成と共役している。

これらの結果から、核内における一群の histones の新機能が見出だされたことが明らかである。

文 献

- Allfrey, V. G., V. C. Littau and A. E. Mirsky 1963 On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 49: 414-421
- Baldwin, J. P., P. G. Boseley and E. M. Bradbury 1975 The subunit structure of the eukaryotic chromosome. *Nature*, 253: 245-249
- Balinsky, B. I. 1970 *An Introduction to Embryology*. 3rd ed., W. B. Saunder Co., Philadelphia, pp. 550-553
- Bremer, H., M. W. Konrad, K. Gains and S. Stent 1965 Direction of chain growth in enzymic RNA synthesis. *J. Mol. Biol.*, 13 (2): 540-553
- Chamberlin, M. and J. Ring 1973 Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.*, 248 (6): 2235-2244
- Chen, J. C., S. Ishio and T. Yano 1979 Ultrastructural studies on *Gyrodinium* sp., a marine catenate dinoflagellate. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 6(2): 1-12
- DeLange, R. J., D. M. Frambrough, E. L. Smith and J. Bonner 1969 Calf and pea histone IV. *J. Biol. Chem.*, 244(2): 5669-5679
- DeLange, R. J., J. A. Hooper and E. L. Smith 1972 Complete amino acid sequence of calf-thymus histone III. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 69(4): 882-884
- Dowben, R. 1971 *Cell Biology*. Harper & Row, New York, pp. 199-200
- Dubochet, J. and M. Noll 1978 Nucleosome arcs and helices. *Science*, 202: 280-286
- Finch, J. T. and A. Klug 1976 Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 73(6): 1897-1901
- Giesbrecht, P. 1962 Vergleichende Untersuchungen an den Chromosomen des Dinoflagellaten *Amphidium elegans* und denen der Bakterien. *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 187: 452-492
- Giesbrecht, P. 1965 Über das "Supercoiling"-System der Chromosomen von Bakterien und Flagellaten und seine Beziehungen zu Nucleous und Kerngrundsubstanz. *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 196: 516-519
- Hasse, G. and U. G. Jung 1964 Herstellung von Einkornschichten aus photographischen Emulsionen. *Naturwissenschaften*, 51: 404-405
- Hay, E. D. and J. R. Revel 1963 The fine structure of the DNP component of the nucleus, an electron microscopic study utilizing autoradiography to localize DNA synthesis. *J. Cell Biol.*, 16(1): 29-51
- Huang, R. C. and J. Bonner 1962 Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 48(7): 1216-1230
- Ishio, S., J. C. Chen and T. Yano 1977 A certain catenate dinoflagellate tentatively applied for detecting carcinogens. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 43(3): 277-288
- Ishio, S., J. C. Chen and T. Yano 1978 Incorporation of nucleogranules into chromosomes in nuclei of *Gyrodinium* sp. from late anaphase to late interphase. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44(2): 185-192
- Iwai, K., H. Hayashi and K. Ishikawa 1972 Calf thymus lysine- and serine-rich histone III. Complete amino acid sequence and its implication for interactions of histones with DNA. *J. Biochem.*, 72(2): 357-367
- Kornberg, R. D. 1974 Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184: 868-871
- Lecal, J. 1972 Structure fine des Polykrikidae Kofoid et Swezy (Famille de Dinoflagellés). *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, 108: 302-304
- Littau, V. C., V. G. Allfrey, J. H. Frenster and A. E. Mirsky 1964 Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscope autoradiography. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 52(1): 93-100
- Loeblich III, A. R. 1976 Dinoflagellate evolution: Speculation and evidence. *J. Protozool.*, 23(1): 13-28
- Marmur, J., C. M. Greenspan, E. Palecek, F. M. Kahan, J. Levine and M. Mandel 1963 Specificity of the complementary RNA formed by *Bacillus subtilis* infected with bacteriophage SP8. *Cold Spring Harbor Symp., Quant. Biol.*, 28: 191-199
- 水平敏知・内田和子 1969 電子顕微鏡的オートラジオグラフィ. *Radioisotope*, 18(9): 74-93
- Molineux, I. J., S. Freidman and M. L. Gefter 1974 Purification and properties of the *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid-unwinding protein. *J. Biol. Chem.*, 249: 6090-6098
- Morris, N. R. 1976 Nucleosome structure in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 8(3): 357-363
- 中村 正 1967 光学顕微鏡レベルのオートラジオグラフィ. *化学と生物*, 5(3): 174-177
- Noll, M. 1974 Subunit structure of chromatin. *Nature*, 251: 249-251

- Olins, A. L. and D. E. Olins 1974 Spheroid chromatin units (ν bodies). *Science*, 183: 330-332
- Oudet, P., M. G. Bellard and P. Chambon 1975 Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4(4): 281-300
- Pauling, L. 1960, *The Nature of the Chemical Bond*. 3rd ed., Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, pp. 221-264
- Provasoli, L., J. J. A. McLaughlin and M. R. Droop 1957 The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, 25: 392-428
- Prunell, A. and R. D. Kornberg 1978 Relation of nucleosomes to DNA sequences. *Cold Spring Harber Symp., Quant. Biol.*, 42: 103-108
- Rizzo, P. J. and L. D. Nooden 1972 Chromosomal proteins in the Dinoflagellate alga, *Gyrodinium cohnii*. *Science*, 176: 796-797
- Rizzo, P. J. and L. D. Nooden 1974 Isolation and partial characterization of Dinoflagellate chromatin. *Biochim. Biophys. Acta*, 349: 402-414
- Stedman, E. and E. Stedman 1950 Cell specificity of histones. *Nature*, 166: 780-781
- Thomas, J. O. and V. Furber 1976 Yeast chromatin structure. *FEBS Lett.*, 66: 274-280
- Vinograd, J. and J. Lebowitz 1966 Physical and topological properties of circular DNA. *J. Gen. Physiol.*, 49, (Suppl. II): 103-125
- Wang, A. H. J., G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel and A. Rich 1979 Molecular structures of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature*, 282: 680-686
- Wang, J. C. 1971 Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein ω . *J. Biol.*, 55: 523-533
- Watson, J. D. 1976 *Molecular Biology of the Gene*. 3rd ed., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, California, pp. 103-104 and 150-151
- Watson J. D. and F. H. C. Crick 1953 Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171: 737-738
- Wilkins, M. H. E. 1956 Physical studies of the molecular structure of deoxyribose nucleic acid nucleoprotein. *Cold Spring Harber Symp., Quant. Biol.*, 21: 75-90
- Yeoman, L. C., M. O. J. Olson, N. Sugano, J. J. Jordan, C. W. Tayler, W. C. Starbuck and H. Busch 1972 Amino acid sequence of the center of the arginine-lysine-rich histone from calf thymus. The total sequence. *J. Biol. Chem.*, 247(19): 6018-6023
- Zubay, G. and M. R. Watson 1959 The absence of histone in the bacterium *Escherichia coli* I. Preparation and analysis of nucleoprotein extract. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5: 51-58

Summary

The present authors investigated the incorporations of Arg-³H and thymidine-³H into the nuclei of *Gyrodinium* sp. in Dinophyceae which is the most primitive eukaryote and were able to take the electron micrographs showing the ultrafine structures of these incorporative sites.

In these nuclei, nucleogranules which are DNA double strands with the radii of curvatures from 70 to 80 Å are hardly bound with Arg rich proteins, but changed to be bound with the same proteins when stretched by certain pulling forces through chromonemata extended from nucleofilaments in the chromosomes. The reason was attributed to the almost same length of both atomic arrangements of O-P-O-C-C-C (7.11 Å) in a sugar phosphate of the backbone of DNA and N-C-C-N-C-C (7.43 Å) in a dipeptide residue of the backbone of protein, consequently, to the easiness of the formation of the ionic bonds between PO₄⁻ and NH₃⁺ groups. Individual DNA single chains can not transmit any torque, because the single bonds such as those of 5' carbon in the sugar phosphate possess the nature of free rotation. But these DNA single chains bound with Arg or Lys rich proteins can transmit the torque by producing strands. Through a model test, it was confirmed that if DNA double strand receives a strong sinistral-torque after such proteins were bound, not only the right handed strands of the resulted com-

plex (P-DNA-DNA-P) are unwound, but the hydrogen bonds of the base pairs of this complex are splitted. The divided complexes (P-DNAs) can be Pb^{2+} -unstainable and one of them can be active as a template for transcribing to RNA. However, it was confirmed that a couple of P-DNAs again combine forming nucleosomes, consequently, liberating RNA synthesized on one P-DNA. The necessary forces for stretching the DNA double strand of nucleogranules to the state of a slow curve and accelerating protein bindings, and for splitting the hydrogen bonds of the base pairs of the complex of P-DNA-DNA-P and inducing the formation of a template P-DNA for transcribing to RNA were confirmed to be generated through the formation of nucleofilament. Therefore, both DNA and RNA syntheses were concluded to be conjugated with the formations of these nucleosomes and nucleofilament. Therefore, we can say that the new roles of a group of histones have been made clear here, since the behavior of proteins in the nuclei of *Gyrodinium* sp., the lowest eukaryote, are very similar to those of histones in higher eukaryote.