

核内共生細菌が持つ宿主核の生殖核と体細胞核の核膜識別センサーとそのリセプターの分子間識別の研究

河合 美紀 (理工学・藤島 政博)

研究の目的

地球上の生物は単一の祖先細胞に由来し、長い間に多様な種に進化したと考えられている。しかし、ミトコンドリアや葉緑体の起源が細胞内共生細菌であるように、細胞が他の細胞内に寄生し、やがて共生して新機能を持つ細胞が進化する現象も同時に行われてきた。したがって、細胞内寄生から細胞内共生への過渡期に起こった変化の解明は、細胞内共生成立機構の解明の重要課題の一つである。この変化を分子レベルで明らかにするためには、現在の過渡期にあり、寄生細菌と共生細菌の両方の特徴を備えたホロスボラ属細菌は恰好の材料であるといえる。原生動物の繊毛虫類は、その細胞内に1個の受精核に由来する大核(体細胞核)と小核(生殖核)を持つ。グラム陰性細菌のホロスボラ属細菌は、特定の種類の繊毛虫(宿主)の大核か小核のどちらか一方の特定の核内に侵入し、増殖する。つまり、この細菌は宿主の2種の核膜を識別する能力を持っている。本研究では、ホロスボラの核特異的感染のしくみを明らかにすることを目的とし、大核特異的な*H. obtusa*と小核特異的な*H. undulata*の核識別センサーと宿主核膜リセプターの同定を試みる。

研究成果

(a) 核膜識別センサーの構造解析

核膜識別センサーの構造を明らかにするために、大核特異的な*H. obtusa*と小核特異的な*H. undulata*のそれぞれの電気泳動ゲルからセンサー物質部分を切り出し、抽出、透析後に再び電気泳動を行い、センサー物質を認識するモノクローナル抗体によるイムノブロットと、LPS(Lipopolysaccharide)検出用の過ヨウ素酸ナトリウムを用いた銀染色を行った。その結果、センサー物質を認識する抗体により検出された

バンドと銀染色によって検出されたバンドの分子量が一致した(図1)。Lane1はプレステインマーカー、lane2は*Holospora obtusa*(F1)のwhole cell、lane3は*H. obtusa*の抽出したセンサー物質、lane4は*H. obtusa*の抽出したセンサー物質をタンパク質分解酵素のproteinase Kで処理した試料、lane5は*H. undulata*のwhole cell、lane6は*H. undulata*の抽出したセンサー物質、lane7は*H. undulata*の抽出したセンサー物質をproteinase Kで処理した試料をapplyした。図1パネルA左はmAb IR-4-1によるイムノブロットの結果、パネルA右は銀染色、パネルB左はmAb RIu-1によるイムノブロットの結果、パネルB右は銀染色の結果を示した。さらに、精製試料を凍結乾燥後に北里研究所に送付し、GC-MSを用いた脂肪酸の化学分析によって構造解析を依頼した。現在分析結果待ちである。さらに、ホロスボラの生活環において、LPSの構造が変化するかどうか、ホロスボラの核特異性との間に関連性があるか、ゾウリムシの異物侵入防御機構と関わっているかどうかなどを検討する。

(b) リセプター分子の同定

核膜識別センサーに対するリセプターの分子量は約30kDaであることが明らかになっているので、単離核の1次元電気泳動ゲルから約30kDa部分の全タンパク質を抽出し、マウスに注射した。間接蛍光抗体法によるアッセイで核膜抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマはまだ得られていない。このリセプターに対するモノクローナル抗体が得られれば、免疫沈降法によって抗原を精製し、タンパク質の場合はアミノ酸配列を決定し、抗原の機能を推測する。また、リセプター遺伝子をクローニングし、他種の細胞核膜にもこのリセプター遺伝子が存在するの、また発現可能なかを検討する。

(c) 自然突然変異株、B1株のセンサー機能

*H. obtusa*の突然変異株B1はF1株とは異なって、細胞壁物質を分泌するが大核膜には沈着していないために、宿主は細胞分裂速度を損なわれず、B1株の抗細胞壁物質抗体も大核内に入って抗原と結合することが分かっていたが、センサーとしての機能は調べられていなかった。そこで、B1株から細胞壁物質を抽出し、宿主の単離核と混合し、間接蛍光抗体法によって核膜に結合するかどうかを調べた。また、走査型電顕レベルでF1とB1株の細胞壁表面の構造が異なるかどうかも調べた。その結果、B1の細胞壁物質も単離核の大核と結合し、センサー機能を持っていることが明らかになった。また、電顕の結果は細胞壁表面の構造にF1とB1で顕著な差は見られなかった。

研究発表

M. Kawai and M. Fujishima.(2000). Invasion of the Macronucleus of *Paramecium caudatum* by the Bacterium *Holospora obtusa*: Fates of the Bacteria and Timings of Invasion Steps. *Europ. J. Protistol.* 36, 46-52.

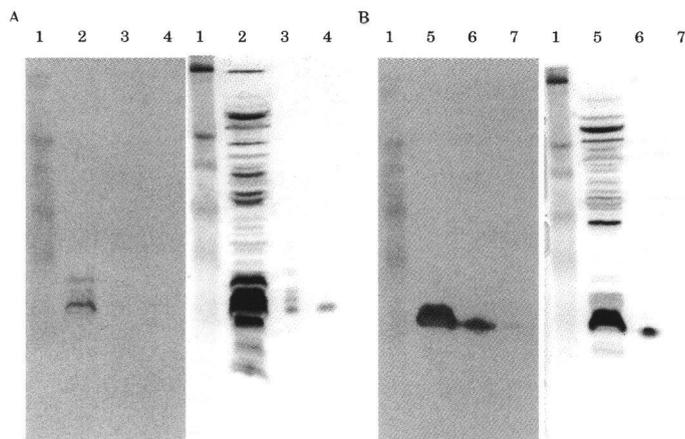


図1: センサー物質の抽出後のイムノブロットと銀染色

連絡先

電話 083-930-5721
Fax 083-930-5712
e-mail: mk3200@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp