

核内共生細菌による標的核ターゲティングを調節するセンサーと リセプター分子の精製およびその応用開発

研究代表者 理学部 藤島 政博

研究の目的

ホロスボラ属細菌はこれまでに9種類が発見されているが、いずれも、多細胞生物の体細胞核と生殖細胞核に相当するゾウリムシ属の大核と小核の違いを識別して特定の核に感染して増殖する細菌で、このような2種の核の識別能力を持つ生物はホロスボラ属以外には知られていない。ホロスボラは細胞の外液から食細胞活動で食胞に取り込まれ、食胞から細胞質に脱出し、標的核を識別してその核内に侵入する。細胞外液から標的核内侵入に要する時間はわずか10分である。

我々は、ホロスボラが持つと予測された標的核識別センサーと標的核の核膜に存在すると予測されたリセプターの性質について調べ、大核特異的なホロスボラ・オブツサのセンサーが16キログルトン、小核特異的なホロスボラ・ウンドウラータのセンサーが13キログルトンの細胞外膜に存在するリポ多糖であることを明らかにし、その精製方法を確立した。精製したセンサーを宿主から単離した大核と小核と混合し、2種のセンサーに対するモノクローナル抗体を使って間接蛍光抗体法と免疫電顕で観察すると、大核特異的なホロスボラ・オブツサのセンサーは大核膜と特異的に結合し、小核特異的なホロスボラ・ウンドウラータのセンサーは、小核膜とのみ特異的に接合することが確認された。この結果は、同時に、標的核の核膜には、細胞質側に露出して存在するリセプターが存在することを示している。このリセプターはウエストウエスタン法では30キログルトンと推定された。

平成12年度は下記の3種の内容を目的にして研究を行った。(1)ホロスボラが持つ標的核膜識別能力を利用して生殖核と体細胞核を区別して標的核に遺伝子などの物質を導入する新技術を開発する。(2)ホロスボラの標的核膜識別センサーが結合する核膜上のリセプターを精製する。(3)ホロスボラは、細胞外膜上のリポ多糖で標的核膜を識別することが明らかになったが、標的核の核膜をどのようにして貫通するかがまだ明らかではない。ホロスボラは常に片方の末端に存在する特殊な構造部分で標的核膜を貫通するので、この特

殊な末端に含まれる物質が核膜貫通の機能を持つと予測。そこで、この物質を精製する。

研究成果

ゾウリムシの大核特異的なホロスボラ・オブツサの感染型とアミドグルコシド3'ホスフォートランスフェラーゼを組み込んだベクターを宿主外液に加えると、ホロスボラが宿主食胞に取り込まれる時にベクターも同時に食胞に取り込まれ、ホロスボラが標的核（大核）に侵入する時にそのベクターも標的核に持ち込まれることが期待される。ゾウリムシのタンパク質合成阻害剤のジェネティシンはこの酵素で分解されるので、ベクターが標的核に運搬されて組み込んだ遺伝子が発現すれば、ゾウリムシはこの阻害剤に耐性に形質転換することが期待される。筆者らは、この方法で宿主を効率よく形質転換させることに成功し、ゾウリムシの大核に選択的に遺伝子を導入する新たな技術を開発した（特許出願準備中）。

次に、筆者らは、感染型ホロスボラ・オブツサの片方の末端に対するモノクローナル抗体の作成を行った。宿主から単離した約3,400細胞の感染型の特殊な末端部分を含む約1ミクロンの長さの末端をマイクロダイセクションシステム（オリンパス）で切り取り、これを電気泳動して銀染色すると2本のバンドが出現した。この2本のバンドの両方か片方が特殊な末端に存在する物質と考えて、試料調整用電気泳動ゲルからこの分子量のゲル断片を切り取り、内容物を電気的に抽出し、これを抗原に使用してモノクローナル抗体産生ハイブリドーマをクローニングした。間接蛍光抗体法を使ってアッセイし、特殊な末端に対する抗体産生ハイブリドーマを選択した。その結果、1種類のモノクローナル抗体を得ることに成功した。この抗体を使って間接蛍光抗体法を行うと、核膜を貫通する機能を持つことが予測される特殊な末端のみを染色した。イムノプロットで抗原の分子量を調べると、予測された2本のバンドのうちの高分子量のバンドとほぼ同じ分子量であることが明らかになっ

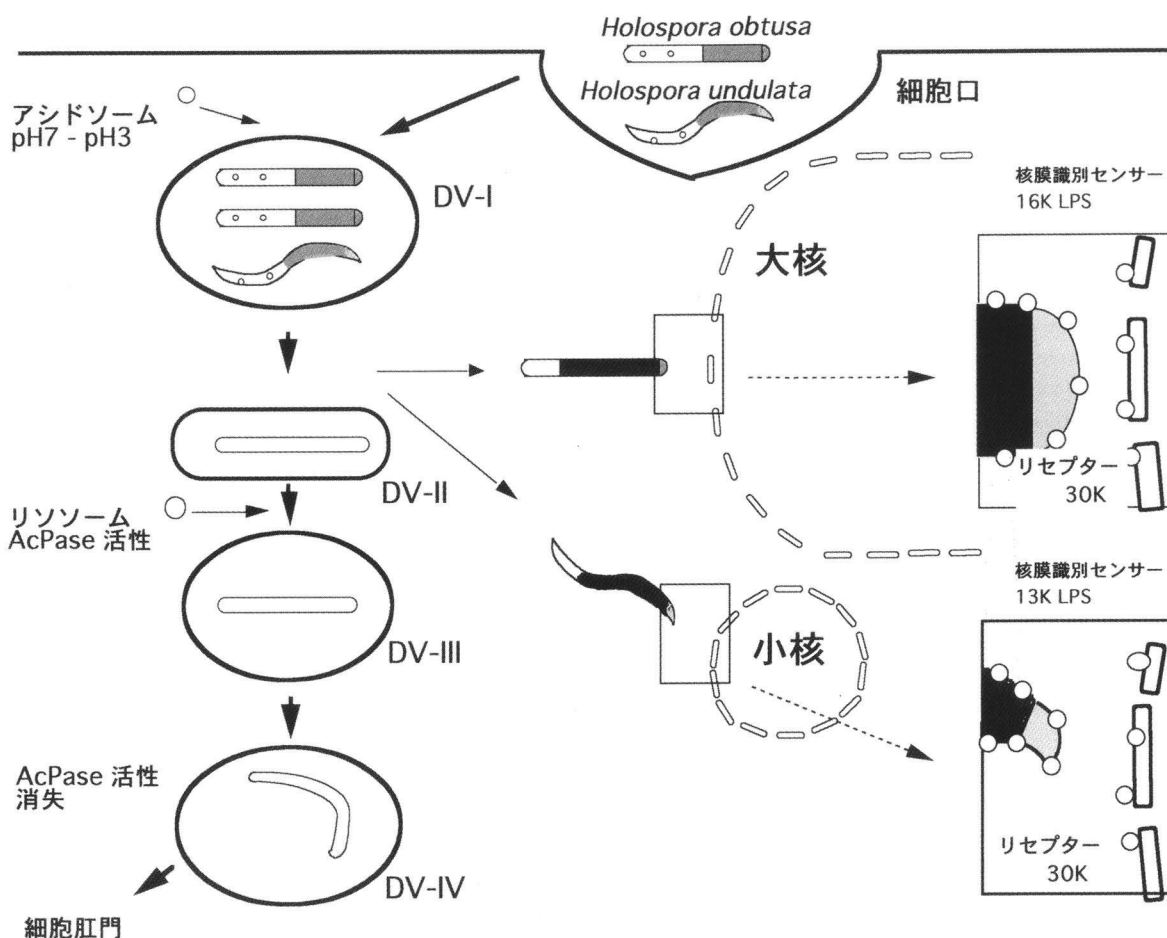


図1 ホロスボラの感染過程と核膜識別機構
 食胞を脱出したホロスボラは、標的核に移動し、細胞外膜のセンサーで標的核膜上のリセプターと結合する。

た。今後は、免疫電顕で詳細な抗原の存在場所を確認し、抗原を精製してそのアミノ酸配列を調べ、既知のタンパク質との相同性から機能を推測する。また、他種のホロスボラにも同じ抗原性の物質が標的核膜貫通部位に存在するかどうかを調べる。

産業技術への貢献

ホロスボラは、外液から僅か10分で生殖核と体細胞核を識別して特定核に感染する能力を持つ。このように、2種の核識別能力を有する細菌はホロスボラ以外には知られていない。したがって、ホロスボラの感染域を広げることができれば、遺伝子を有用生物の生殖核と体細胞核を選択して導入できる新しい技術の開発が可能になるはずである。現在、この細菌はパラメシウム属にしか感染しないが、ホロスボラの宿主外

培養には成功したので、有用動植物の核にも感染する突然変異ホロスボラの作製が可能になるかもしれない。また、ホロスボラの標的核の核膜識別センサーと結合する核膜側のリセプターの遺伝子が明らかになれば、それを有用生物に導入し、ホロスボラに対する被感染能を獲得させることが可能と思われる。ホロスボラの核識別能力を利用すれば、たとえば、生殖核と体細胞核を識別した遺伝子導入によって、有用生物の品種改良や遺伝病の治癒を、1世代に限定するか、世代を越えて行なうかを選択できるようになるはずである。

研究発表

- 1) M. Kawai and M. Fujishima; 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 (2000).
- 2) M. Murata-Hori and M. Fujishima; Effects of G1 arrest substances on cells in the G1, S and G2 phases of the cell cycle in *Tetrahymena*; *Europ. J. Protistol.*, 36, 316-318 (2000).
- 3) Eriko Oosaki, Manabu Sugii, and Masahiro Fujishima; Purification of germinal-vesicle-breakdown-inducing proteins from *Tetrahymena pyriformis*; *Europ. J. Protistol.* 36, 459-464, (2000).
- 4) Ilya N. Skovorodkin, Sergei I. Fokin and Masahiro Fujishima; Fates of the endonuclear symbiotic bacteria *Holospora obtusa* and *Holospora undulata* injected into the macronucleus of *Paramecium caudatum*; *Europ. J. Protistol.*, 37, in press.
- 5) Manabu Sugii and Masahiro Fujishima; Purification of GVBD-inducing protein from the ciliate *Tetrahymena thermophila*; *J. Euk. Microbiol.*, in press.
- 6) 堀 学、富川泉、藤島政博. hsp70 配列から推測される *Paramecium* 属の系統関係;第33回日本原生動物学会(金沢)講演要旨集 p.21(2001).
- 7) 中村欽光、堀 学、藤島政博;大核内共生細菌 *Holospora obtusa* は宿主の遺伝子発現に変化を及ぼす. 第33回 日本原生動物学会(金沢)講演要旨集 p.50 (2001).
- 8) 原山幸子、藤島政博;核内共生細菌 *Holospora obtusa* は froEL ホモログを菌体外に放出する. 第33回日本原生動物学会(金沢)講演要旨集 p.54 (2001).
- 9) 藤島政博、塚脇紀和;核内共生細菌 *Holospora obtusa* の宿主外培養;第33回日本原生動物学会(金沢)講演要旨集 p.68 (2001).
- 10) Y. Nakamura, M. Hori, M. Fujishima; Infection of endosymbiotic bacterium *Holospora obtusa* depresses i-antigen A homologous gene expression of *Paramecium caudatum*; International Conference on *Paramecium*. Honolulu, March 25-28 (2001).
- 11) M. Hori, I. Tomikawa, M. Fujishima; Analysis of phylogenetic relationships of the genus *Paramecium* using cytosolic hsp70; sequences. International Conference on *Paramecium* ; Honolulu, March 25-28 (2001).
- 12) M. Fujishima and L. Wang; Timing of appearance and disappearance of macronuclear envelopespecific antigens in nuclear differentiation of *Paramecium caudatum*; International Conference on *Paramecium*. Honolulu, March 25-28 (2001).

グループメンバー

氏名	所属	職(学年)
藤島 政博	理・自然情報	教授
河合 美紀	VBL	非常勤研究員
百武 晃宏	理工学研究科	前期課程1年
木下 正美	理・自然情報	4年

連絡先

電話 083-933-5712

FAX 083-933-5712

E-mail: fujishim@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp