

(26) 生殖核と体細胞核の核膜を識別する 核内共生細菌ホロスポラのセンサーの研究

研究代表者 理学部 藤島政博

研究目的

グラム陰性細菌ホロスポラ属は、単細胞動物パラメシウム属の特定種の小核（生殖核）か大核（体細胞核に相当）の中で増殖する核内共生細菌で、これまでに9種類が発見されている。この細菌の増殖型（長さ約1.5 μ m）は宿主のタンパク質合成存在下で二分分裂で増殖するが、宿主のタンパク質合成活性が低下すると、自身の遺伝子発現を伴って感染型（長さ約13 μ m）に分化する。感染型は宿主を殺害して外液に脱出し、新しい宿主の食胞を経由して細胞質に出現し、核に感染する。つまり、感染型は生殖核と体細胞核を識別するセンサーを持ち、一方、生殖核と体細胞核はそのリセプターとして機能する物質を核膜の細胞質側に露出させていると考えられる。

本研究では、ホロスポラの宿主核膜識別センサーとそのリセプターの実体を明らかにする。同時に、感染可能な宿主域を広げた突然変異株作成のための、増殖型ホロスポラの宿主外培養と増殖型から感染型への分化の誘導法を確立する。この研究成果は、生殖核と体細胞核を区別して、遺伝子やタンパク質などの生体高分子を核内に輸送する新しい微生物機能の開発に貢献すると期待される。

研究成果

1. 大核特異的なホロスポラオブツサの細胞壁物質（IR-4-1抗原）に対するモノクローナル抗体を取り、抗原をSDS-PAGEゲルから切り出して精製した。この抗原と単離した宿主核を混合すると、細胞壁物質は大核とは結合するが小核とは結合しないことが明らかになった。この結果は、感染型ホロスポラの核膜識別センサーがホロスポラの細胞壁物質（IR-4-1抗原）であることを示している。
2. 大核と小核は、ホロスポラの核識別センサーに

対するリセプターとして機能する物質を核膜の細胞質側に露出させていると考えられる。そこで、単離大核を抗原にして間接蛍光抗体法でアッセイし、大核核膜付近と反応する3種類のモノクローナル抗体を作った。抗原が真に核膜上に存在するかどうかは、現在、免疫電顕で確認中である。また、前述のIR-4-1抗原との親和性の有無についても、現在確認中である。

3. 宿主から単離した増殖型ホロスポラオブツサを大核のホモジネートと混合して、増殖型の増殖に成功した。長期の宿主外培養系では、感染型も出現するので、増殖型から感染型への分化の誘導も宿主外で可能になると期待される。現在、宿主外培養の最適条件を調べている。

産業技術への貢献

ホロスポラは、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。このような核識別能力を有する細菌はホロスポラ以外には知られていない。したがって、ホロスポラの特異能力を利用すれば遺伝子やタンパク質などの生体高分子を生殖核と体細胞核のそれぞれに導入できる新しい技術開発が可能になる。現在、この細菌はパラメシウム属にしか感染しないが、ホロスポラの宿主外培養が成功したので、有用動植物の核にも感染する突然変異の作製が可能になると予測される。また、ホロスポラのセンサー物質と親和性を持つ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、ホロスポラを使って生殖核や体細胞核に任意の遺伝子を運ばせ、品種改良や遺伝病の治療を、1世代に限ったり、世代を越えて行ったりできるようにになると期待される。

研究発表

- 1) M. Fujishima, H. Dohra and M. Kawai . Quantitative changes in periplasmic proteins of the macronuclear-specific bacterium *Holospora obtusa* in the infection process of the ciliate *Paramecium caudatum*. *J. Euk. Microbiol.*, 44 : 636-642, 1997.
- 2) H. Dohra, Kazuo Yamamoto, M. Fujishima and H. Ishikawa. Cloning and sequencing of a periplasmic 5.4 kDa peptide gene of the macronucleus-specific symbiont *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Zool. Sci.*, 14, 69-75, 1997.
- 3) H. Dohra, M. Fujishima and H. Ishikawa (1997). Structure and expression of a *groE* operon homolog of the macronucleus-specific *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. *J. Euk. Microbiol.*, in press.
- 4) 藤島政博、ゾウリムシとホロスポラの共生における宿主-共生生物間相互作用。原生動物学雑誌, 30 : 1-13, 1997.
- 5) H. Dohra, M. Fujishima, H. Ishikawa. Cloning and sequencing of gene coding for a periplasmic 5.4 kDa peptide of the macronucleus-specific symbiont *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. 10th Int. Congr. Protozool., abstract p. 77, 1997.
- 6) M. Fujishima, M. Kawai. Acidification in *Paramecium* digestive vacuole is an early event required for symbiotic bacterium *Holospora*'s escape from there to appear in the host cytoplasm. 10th Int. Congr. Protozool., abstract p. 87, 1997.
- 7) M. Kawai, M. Fujishima. Selfish endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. 10th Int. Congr. Protozool., abstract p. 87, 1997.
- 8) M. Fujishima and M. Kawai. Acidification in digestive vacuoles is an early event

required for *Holospora* infection of *Paramecium* nucleus. In, *Eukaryotism and Symbiosis* (Eds. H.E.A. Achenk, R.G. Herrmann, K.W. Jeon, N.E. Muller and W. Schwemmler), pp. 367-370, 1997, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg.

- 9) M. Kawai and M. Fujishima. Monoclonal antibody specific for activated form of *Holospora obtusa*, a macronucleus-specific bacterium of *Paramecium caudatum*. In, *Eukaryotism and Symbiosis* (Eds. H.E.A. Achenk, R.G. Herrmann, K.W. Jeon, N.E. Muller and W. Schwemmler), pp. 371-374, 1997, Springer-Verlag Berlin. Heidelberg.

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
堀 学	理・自然情報	助手
道羅 英夫	理工・自然共生	学振特別研究員
花田 聡子	理工・自然共生	非常勤研究員
河合 美紀	理工・自然共生	D 1

連絡先

TEL/FAX : 0839-33-5712

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