

(17) 生殖核と体細胞核の核膜識別センサーの研究

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、単細胞動物ゾウリムシ属の特定種の小核（多細胞生物の生殖核）か大核（多細胞生物の体細胞核に相当）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し、標的核へのターゲティングの応用開発を行う。この研究成果は、生殖核と体細胞核を区別して、遺伝子を核内に導入する新しい微生物機能の開発を可能にするものとして期待される。

研究成果

1. 昨年度は、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粗精製し、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を明らかにした。

そこで、今年度は、同様に小核特異的ホロスポラウンドゥラータの粗精製細胞壁物質を単離核と混合した。その結果、細胞壁物質は小核の核膜とは結合するが大核核膜とは結合しないことが明らかになった。

これらの結果から、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であることが証明された。

- 粗精製した細胞壁物質をタンパク質分解酵素のproteinnase Kで処理すると、抗原の分子量がSDS-PAGEでやや低分子化した。しかし、ゲル中の抗原はCBB染色では染色されない。これらの結果は、細胞壁物質がタンパク質をごく少量含む糖か糖脂質（LPS）であることを示している。
- 一方、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6種類のモノクローナル抗体を作った。これらの抗原の中に、ホロスポラのセンサーのリセプターが見つかる可能性がある。
- ホロスポラの標的核ターゲティング機能を利用して、感染型ホロスポラオブツサをキャリアとしてゾウリムシの大核に薬剤耐性遺伝子を導入して形質転換させることに成功した。感染型ホロスポラとタンパク質合成阻害剤 geneticin 耐性遺伝子を組み込んだプラズミドを同時にゾウリムシに与えると、ホロスポラの感染に伴って、geneticin 耐性に形質転換したゾウリムシが得られた。形質転換の効率は最も良い時で約1/8000細胞であった。この値は、ニトロソグアニジンによるゾウリムシの繊毛逆転運動突然変異の誘導率の約1/28,000細胞（M. Takahashi, 1979）の約3倍の効率である。現在、実際に遺伝子が小核に導入されているかどうかの検証を行っているが、今後は、小核特異的ホロスポラウンドゥラータを使って小核に遺伝子導入を成功させ、2種の核を識別して遺伝子を導入する条件を確立する。

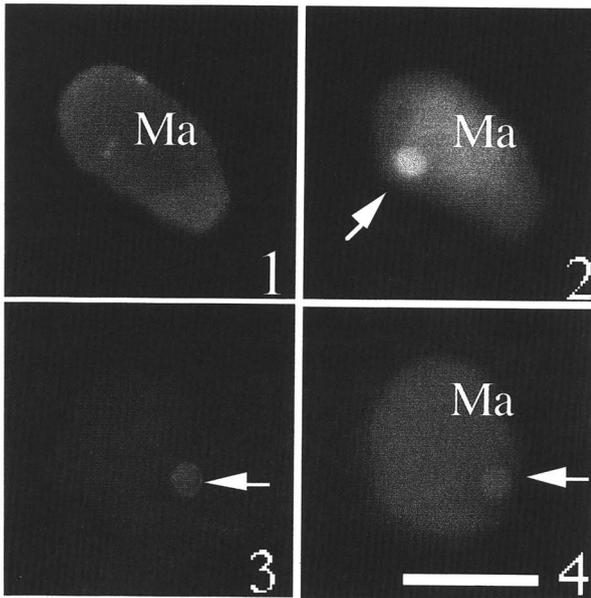


図1-4. ホロスポラの細胞壁物質に対する抗体を使った間接蛍光抗体法の顕微鏡写真

1と2、大核特異的ホロスポラオブツサの細胞壁物質 (IR-4-1抗原) は、単離した大核の核膜と結合する。3と4、小核特異的ホロスポラウンドゥラータの細胞壁物質は単離した小核の核膜と結合する。1と3、FITC 蛍光。2と4、DAPI 光。

矢印、小核。MA、大核。スケール、10 μ m。

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。このように、2種の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、ホロスポラの宿主外培養にはすでに昨年度に成功したので、有用動植物の核にも感染する突然変異ホロスポラの作製が可能になるかもしれない。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。ホロスポラの核識別能力を

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) H. Dohra, M. Fujishima and H. Ishikawa (1998). Structure and expression of a groE operon homolog of the macronucleus-specific *Holospora obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. *J. Euk. Microbiol.*, **45**, 71-79.
- 2) H. Dohra and M. Fujishima (1999). Cell structure of the infectious form of *Holospora*, an endonuclear symbiotic bacterium of the ciliate *Paramecium*. *Zool. Sci.*, **16**, in press.
- 3) 藤島政博(1999)。総説 パラメシウムの生殖核と栄養核の核膜を識別する核内共生細菌ホロスポラ。比較生理生化学、**16**、印刷中。
- 4) 藤島政博 (1999)。細胞内共生細菌とその遺伝。ゾウリムシの遺伝学(樋渡宏一編集)、東北大学出版会。印刷中。

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
河合 美紀	理工・自然共生	D 2
王 琳	理工・自然情報	M 1

連絡先

TEL/FAX : 0839-33-5712

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