

核内共生細菌ホロスポラオブツサの先端特異的タンパク質89Kの感染時における動態

岩谷 綱一¹, 道羅 英夫², B. Franz LANG³, Gertraud BURGER³, 堀 学¹, 藤島 政博¹

(¹山口大・理・生物, ²静岡大・遺伝子実験施設, ³Université de Montréal, Département de Biochimie, Canadian Institute for Advanced Research)

Dynamics of an 89-kDa protein localizing at a specialized tip of the endonuclear symbiotic bacterium *Holospora* in infection

Koichi IWATANI¹, Hideo DOHRA², B. Franz LANG³, Gertraud BURGER³, Manabu HORI¹ and Masahiro FUJISHIMA¹

(¹Biological Institute, Faculty of Science, Yamaguchi University, ²Institute for Genetic Research and Biotechnology, Shizuoka University, ³Université de Montréal, Département de Biochimie, Canadian Institute for Advanced Research)

SUMMARY

The symbiotic bacterium *Holospora obtusa* infects the macronucleus of the ciliate *Paramecium caudatum*. After ingestion by its host, an infectious form of *Holospora* with an electron-translucent tip passes through the host digestive vacuole, and penetrates the macronuclear envelope with this tip. To investigate the underlying molecular mechanism of this process, we raised a monoclonal antibody against a tip-specific 89-kDa protein, partially sequenced this protein and identified the corresponding complete gene. The deduced protein sequence carries two actin-binding motifs. Indirect immunofluorescence microscopy shows that during escape from the host digestive vacuole, the 89-kDa protein translocates from the inside to the outside of the tip. When the bacterium invades the macronucleus, the 89-kDa protein is left behind at the entry point on the nuclear envelope. Transmission electron microscopy shows the formation of fine fibrous structures that co-localize with the antibody-labeled regions of the bacterium. Our findings suggest that the 89-kDa protein plays a role in *Holospora*'s escape from the host digestive vacuole, migration through the host cytoplasm, and invasion into the macronucleus.

[目的] ゴウリムシの大核内共生細菌 *Holospora obtusa* (オブツサ) の感染型は細胞質領域とペリプラズム領域で二分された細胞であり、ペリプラズム領域の先端に電子密度の低い物質の詰まった特殊な先端領域 (侵入先端) が透過型電子顕微鏡で観察される。感染型は常に侵入先端を先頭にして大核に感染するため、侵入先端が感染で重要な役割を演じていると予測される (1,2)。我々は、侵入先端特異的モノクローナル抗体 (抗89K) を作成し、侵入先端の物質の遺伝子をクローニングし、間接蛍光抗体法と透過型電子顕微鏡 (TEM) で感染過程を調べ、侵入先端の機能を推定した。

[材料と方法] 侵入先端は60-90 kDa の物質を含んでいるため (福井ら、未発表)、感染型オブツサの SDS-PAGE の60-90 kDa ゲル抽出物を抗原としてモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成し、抗89K 抗体を得た。抗体が感染型オブツサの二次元電気泳動で反応するスポットから部分アミノ酸配列を決定し、塩基配列を推定した。この塩基配列からプライマーを設計し、89K 遺伝子をゲノム DNA から PCR で増幅して全塩基配列を決定し、全アミノ酸配列を推定した。このアミノ酸配列について、BLAST、FASTA および PSI-BLAST で、既知蛋白質との相同性を調べ、BLOCKS と PRINTS で、motif を

検索した。感染過程の89K タンパク質（以後89K と呼ぶ）の動態は、オブツサを感染させたゾウリムシを固定後、一次抗体に抗89K を用い、二次抗体に FITC-抗マウス IgG を用いた間接蛍光抗体法で調べた。大核侵入時の89K の動態は、感染後のゾウリムシを固定後、ホモジナイズして大核を露出させ、同様な間接蛍光抗体法で観察した。さらに、感染後のゾウリムシをアルデヒド混液とオスミウム酸で二重固定し、スパー樹脂に包埋して TEM で観察した。

【結果と考察】 89K 遺伝子は2253 bp、GT 含量は32.5%であり AT rich であった。AT rich は細胞内共生細菌や寄生細菌にみられる一般的な特徴である。89K は、アミノ酸数750、分子量は約84800、等電点は8.75と推定され、N 末端(aa 1-26 or 1-31)にシグナル配列を有し、細胞骨格関連蛋白質が約20%の相同性を示した。N 末端には2箇所の actin-binding motif(aa 37-46, 81-90)の存在が示唆された。ゾウリムシの食胞は、細胞口から形成されてアシドソームが融合して食胞内 pH が低下する DV-I、ライソゾームが融合して膜置換が起きる DV-II を経て、DV-III、DV-IV と変化することが知られており(3)、オブツサは DV-I からのみ脱出できる。間接蛍光抗体法で、ゾウリムシに感染したオブツサは、DV-I 内で89K を侵入先端

に表出した。89K を表出したオブツサは、DV-I から脱出し、細胞質内を移動して大核に到達した。大核侵入中のオブツサの89K は菌体の侵入の程度に関係なく大核膜との接点付近に見られた。従って、89K は、菌体が大核内に侵入するにつれて菌体の後方に移動する可能性が考えられた。TEM では、オブツサの宿主食胞からの脱出時、細胞質中移動時および大核への侵入時に、間接蛍光抗体法で89K の存在が確認された部位で菌体から宿主細胞質に向かって繊維状構造が観察された。従って、89K は DV-I 侵入先端から表出し、繊維状構造を形成して DV-I からの脱出、大核への移動および大核への侵入に関与していると考えられた(4)。

【文献】

- 1) Fujishima, M. & Fujita, M. (1985) *J. Cell Sci.*, 76: 179-187.
- 2) Görtz, H. D. & Wiemann, M. (1989) *Europ. J. Protistol.*, 24:101-109.
- 3) Fok, A.K. & Allen, R. D. (1988) *Paramecium*. (ed. Görtz, H.D.) 301-324 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York).
- 4) Iwatani, K., Dohra, H., Lang, B. F., Burger, G., Hori, M. & Fujishima, M. BBRC, in press.