

オクロモナス鞭毛のマスティゴネマの単離とタンパク質の精製

山田 周平¹, 有川 幹彦², 洲崎 敏伸¹

(¹神戸大・理・生物, ²奈良女大・理・生物科学)

Isolation and characterization of mastigoneme proteins of *Ochromonas* sp.

Shuhei YAMADA, Mikihiro ARIKAWA and Toshinobu SUZAKI

(¹Dep. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ., ²Dep. Biol. Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

The phytoflagellate, *Ochromonas* sp., has two flagella of different lengths projecting from the anterior end of the cell. The fine, threadlike projections, called tubular mastigonemes, are connected to the surface of the longer flagellum, which is considered to control the direction of flagellar swimming. In this study, to understand the molecular architecture of the tubular mastigonemes and their role in flagellar motility, we isolated mastigonemes from *Ochromonas* sp. and characterized constituent proteins. SDS-PAGE analysis of the mastigonemes showed four major protein bands, and one of these bound specifically to concanavalin A.

【目的】 オクロモナス *Ochromonas* は不等毛植物門に属する単細胞の鞭毛虫で、細胞前端に2本の長さの異なる鞭毛を持っており、長い方の鞭毛（長鞭毛）にはマスティゴネマ(mastigoneme)と呼ばれる毛状の構造物が左右2列に配列している。マスティゴネマは鞭毛運動により発生する推進力を逆転させる働きを持つと考えられているが、その詳しい構造・機能は明らかにされていない。そこでマスティゴネマによる推進力逆転のメカニズムの解析を行うために、マスティゴネマの単離方法を確立し、続いてマス

ティゴネマを構成しているタンパク質の精製を試みた。

【材料と方法】 研究に用いたオクロモナス *Ochromonas* sp. は、月井雄二博士（法政大学）より供与されたものを用いた。マスティゴネマの構成タンパク質を精製するにあたり、まずはオクロモナスのマスティゴネマの単離を行った。細胞は200 ml の培養液を入れた500 ml フラスコで行い、培養後10日経過した株を200 ml 使用した。遠心操作と vortex による物

理的ショックにより鞭毛を脱離させ、集めた鞭毛に1 mMメルカプトエタノールと1% Sarkosylを加えた。その後超遠心処理を行い、ほぼマスティゴネマのみを含む画分を得た。得られたマスティゴネマを電気泳動により解析した結果、4本の分子量の異なるバンドを得た。さらにマスティゴネマから Con A ビーズによって Con A 結合性を持つタンパク質のみを集め、その分子量を電気泳動によって推定した。また蛍光抗体法による観察には、細胞をグルタルアルデヒド (GA) で固定処理したあと Con A-Alexa 488を結合させた後に観察を行なった。また GA 処理を行なった細胞に Con A-goldを加え、電子顕微鏡による観察も行なった。

【結果と考察】 オクロモナスのマスティゴネマは糖タンパク質を含むことが知られていたため、レクチン的一种である Concanavalin A を用いてその結合性を

調べる実験を行った。その結果、GA 固定処理を行なったオクロモナスに Con A-Alexa 488を処理して免疫蛍光観察を行なったところ、鞭毛の本体には蛍光は認められなかったが、鞭毛周辺のマスティゴネマの存在する部位に結合性が認められた。さらに詳しく確認するため Con A-gold を処理したオクロモナスを電子顕微鏡で観察したところ、やはりマスティゴネマ部位にのみ結合性が認められた。単離したオクロモナスのマスティゴネマを SDS 電気泳動で解析した結果、マスティゴネマ由来のものを思われる分子量の異なるバンドが4本確認された。次に単離したマスティゴネマ画分を Con A ビーズによって Con A 結合性を持つタンパク質のみを集め、それを SDS 電気泳動で解析した。その結果、約54 kDa の単一のバンドが得られた。今後はこの54 kDa のタンパク質についてアミノ酸部分配列の決定と、遺伝子の同定を行う予定である。