

核内共生細菌 *Holospora obtusa* の侵入先端特異的76kDa タンパク質の性質藤瀬 弘子¹, 道羅 英夫², 藤島 政博¹(¹山口大・理・自然情報科学, ²静岡大・遺伝子実施設)A 76-kDa protein specific to the invasion tip of the endonuclear symbiotic bacterium
*Holospora obtusa*Hiroko FUJISE¹, Hideo DOHRA², Masahiro FUJISHIMA¹(¹Dep. of Physics, Biol. and Informatics, Fac. of Sci., Yamaguchi Univ. and²Inst. Genet. Res. and Biothech., Shizuoka Univ.)

SUMMARY

The gram negative bacterium *Holospora obtusa* is a macronucleus-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. The invasion tip of an infectious form of this bacterium produces three proteins of 89, 76 and 63 kDa. We have already developed a monoclonal antibody against the 89-kDa protein and showed that this protein has important functions in infection. In the present study, we developed a monoclonal antibody specific for the 76-kDa protein. This antibody reacted with the invasion tip of the infectious form of *H. obtusa*, but not with the reproductive form of *H. obtusa* or the infectious form of a micronucleus-specific form of *H. obtusa*.

[目的] 繊毛虫 *Paramecium caudatum* の大核内に共生するグラム陰性細菌 *H. obtusa* 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構造を持つ。透過型電子顕微鏡ではペリプラズム領域の先端に電子密度の低い特殊な末端が観察され、invasion tip と呼ばれている。感染型は invasion tip を先頭にして大核に感染するため、これが感染に重要な役割をしていると予測される。この invasion tip には、63, 76, 89kDa の3種のポリペプチドが存在することが明らかにされ、89kDa タンパク質は精製されて遺伝子もクローニングされ、宿主食胞からの脱出、宿主細胞質内移動、標的核膜貫通に関与することが示唆されている (Iwatani et al. 2005)。この研究では、感染過程での invasion tip の役割を調べるため、invasion tip の 76kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体を作成し、抗原の性質を89kDa タンパク質と比較した。

[材料と方法] モノクローナル抗体の作成は、感染型 *H. obtusa* の二次元電気泳動ゲルから76kDa のスポットを切り取り、そのゲル抽出液をマウス腹腔に

2週間おきに3回注射して、invasion tip 特異的抗体産生ハイブリドーマを作成した。抗体のアッセイは間接蛍光抗体法で invasion tip を染色できるかどうかで行った。間接蛍光抗体法は、感染型 *H. obtusa* をマイクロカバーガラスの上に置き、風乾し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBS で洗浄し、20mM NaOH で1分処理し、再び PBS で洗浄した。次に、一次抗体処理と二次抗体処理を各2時間行い、PBS 洗浄を行った後に0.1% DAPI で染色して蛍光顕微鏡で観察した。20mM NaOH 処理は *Holospora* の細胞外膜に穴を開け *Holospora* 内部に抗体が出入りできるようにさせるために行った。抗原の分子量の決定は、一次元 SDS-PAGE とイムノプロットで行った。

[結果と考察] 感染型 *H. obtusa* の equilibrium pH gradient 二次元電気泳動ゲルの76kDa のスポットを抗原にしてハイブリドーマを作成した結果、三種類の抗体産生ハイブリドーマ (invasion tip 特異的抗体産生ハイブリドーマ、細胞外膜特異的抗体産生ハイブリドーマ、ペリプラズム特異的抗体産生ハイブリ

ドーマ) が作成された。この結果は、76kDa のスポットに3種類のポリペプチドのスポットが重なって含まれていたことを示している。そこで、non-equilibrium pH gradient 二次元電気泳動 (NEPHGE) を行い、Invasion tip 特異的抗体でイムノプロットを行ったところ、抗体で標識されるスポット1個を検出できた。このスポットをゲル精製し、プロテインシーケンサで N 末端の部分アミノ酸配列を調べようとしたが、N 末端はブロックされていた。現在、内部配列の解読を行っている。Invasion tip 特異的抗体を用いて感染型 *H. obtusa* の間接蛍光抗体法を行った結果、20mM NaOH 処理を行わなかった場合は、抗体は感染型の invasion tip と反応しないが、20mM NaOH 処理を行うと抗体は invasion tip と反応した。このことから抗原の76kDa タンパク質は、すでに我々によって解析済みの invasion tip 特異的89kDa タンパク質¹⁾と同様に、細胞外膜には露出されず、感

染型の invasion tip のペリプラズム内部に存在すると考えられる。増殖型 *H. obtusa* は、20mM NaOH 処理を行っても抗体が反応しなかった。また、感染型と増殖型 *H. obtusa* のイムノプロットは、感染型のみで抗体で標識されたバンドが出現した。このことから、76kDa タンパク質が感染型特異的であることが分かる。ゾウリムシの小核特異的な *H. elegans* の感染型では、20mM NaOH 処理を行っても抗体は invasion tip と反応しなかった。この結果は、感染型 *H. elegans* の invasion tip にはこの抗原決定基が存在しないことを示している。

[文献]

- 1) Iwatani, K., Dohra, H., Lang, B.F., Burger, G., Hori, M. and Fujishima, M. (2005), Biophys. Biochem. Res. Comm., 337:1198-1205.