

太陽虫*Actinophrys sol*における
グルカン結合タンパク質GP40のcDNAクローニング
角田 宗一郎, 洲崎 敏伸 (神戸大・理・生物)

cDNA cloning of a putative glucan binding protein GP40
from the heliozoon *Actinophrys sol*

Soichiro KAKUTA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

The heliozoon *Actinophrys sol* is a predatory protozoan which has a number of axopodia radiating from the cell body. *A. sol* captures food organisms with its axopodia, and a 40-kDa glycoprotein (GP40) is considered to play an important role in prey recognition and adhesion. In the present study, the cDNA encoding GP40 was cloned and sequenced. The deduced amino acid sequence of GP40 showed significant homology to glucan binding proteins (GBPs), which are known to be involved in invertebrate immunity. Invertebrates can recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) using their GBPs. In addition, we examined the glucan-binding ability of GP40. These results suggest that GP40 interacts with prey organisms through its glucan-binding domain, and that an evolutionary relationship is likely to exist between prey recognition in protozoa and pathogen recognition in innate immunity.

[目的] 太陽虫 *Actinophrys sol* は捕食性の原生動物で、軸足と呼ばれる仮足を用いて餌となる生物を捕らえる。細胞表層にあるエクストルソームは、その際に放出されて餌の接着に関与すると考えられている。過去の実験結果から、GP40という糖タンパク質がエクストルソーム内に存在し、餌の認識・接着に関与することが示唆されている。またGP40はレクチンの一種 Concanavalin A (Con A) に結合性があり、Con A によって捕食が阻害されることが分かっている。そこで本研究ではこのGP40のcDNAのクローニングと塩基配列の決定を行った。

[材料と方法] *A. sol*の細胞からmRNAを抽出・精製し、Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用いてcDNAを作製した。GP40の内部アミノ酸配列を元にしてプライマーを設計し、このプライマーと前述のcDNAを用いてPCRを行い、増幅産物の塩基配列を決定した。またGP40とグルカンとの結合性を調べるために、不溶性のb-1,3-グルカンであるカードラン及びb-1,4-グルカンであるセルロースに*A. sol*から抽出したタンパク質を吸着させ、結合したタンパク質をSDS-PAGE及びウェスタンブロットティングにより解析した。

[結果] PCRによって増幅された2種類のcDNAをクローニングし、塩基配列を決定した。それらの推定アミノ酸配列とGP40の既知のアミノ酸配列とが一致したことから、これらがGP40のcDNAであることが確認できた。データベースによるアミノ酸配列解析の結果、GP40はグリコシルヒドロラーゼ16というタンパク質ファミリーで保存されたドメインを持ち、無脊椎動物のグルカン結合タンパク質と特に高い相同性を示すことが分かった。またタンパク質の吸着実験の結果、GP40はカードランには結合したがセルロースには結合しなかった。

[考察] クローニングの結果からGP40は、無脊椎動物の自然免疫系において真菌や細菌のような病原体の認識に関わっているグルカン結合タンパク質と相同なタンパク質であることが分かった。またグルカンとの結合実験から、GP40はb-1,3-グルカンに特異的に結合することが確認できた。これらの結果から、*A. sol*はGP40のおそらくグルカン結合部位を介して餌生物の細胞表面分子を認識・接着することで、捕食を行っていると考えられる。また、多細胞動物のグルカン結合タンパク質との相同性から、原生動物における餌の認識機構が、多細胞動物の非自己の認識機構と分子レベルで進化的な関連性があることが示唆された。