

ユーグレナ類 *Euglena gracilis* の膜内在性タンパク質 IP39 は 2 タイプ存在する
末友 靖隆^{1,2}, 竹内 恭平³, 洲崎 敏伸⁴ (¹神戸大学大学院自然科学研究科, ²岩国市立ミクロ生物館, ³神戸大学理学部, ⁴神戸大学大学院理学研究科)

Two types of intramembrane proteins IP39 are present in the plasma membrane of
Euglena gracilis

Yasutaka SUETOMO^{1,2}, Kyohei TAKEUCHI¹ and Toshinobu SUZAKI¹ (¹Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe University, ²Iwakuni City Microlife Museum)

SUMMARY

Flagellates of the genus *Euglena* perform a characteristic movement called euglenoid movement. The intramembrane proteins, called IP39, which are regularly and densely arranged in the plasma membrane of *Euglena gracilis*, have been implicated in this movement. In this study, we cloned two types of cDNAs that encode IP39, and predicted their amino acid sequences. Northern and western blot analysis confirmed that both cDNAs encode IP39. Consequently, we called these proteins α - and β -IP39, respectively. The α - and β -IP39 proteins consist of 264 and 265 amino acid residues, respectively. Differences between the predicted amino acid sequences were restricted to the C-terminal region, except for two residues in the middle part. The predicted amino acid sequences were analyzed using

various programs (ALL IN ONE SEQ-ANALYZER, BLAST, SOSUI, The Predict Protein Server, MOTIF, NetOGlyc3.1, NetNGlyc1.0, ProtParam, NetPhos analysis, iPSORT and DISULFIND). The molecular weights of both IP39 were predicted to be 29-kDa, and both IP39 proteins were predicted to contain four transmembrane domains. A homology search of cDNA sequences showed that there was no significant sequence homology with any other known proteins. This result indicates that both types of IP39 are novel proteins that have not yet been reported. Additionally, both IP39 were similar to claudin, which is an approximately 23-kDa transmembrane protein found in the tight junction of mammalian cells.

[目的] ユーグレナ類の鞭毛虫の多くはユーグレナ運動と呼ばれる特徴的な細胞変形運動を行う。この運動の機構として、原形質膜の伸縮がユーグレナ運動を引き起こすという仮説¹⁾が提唱されている。この仮説では、原形質膜に規則的かつ密に配列する膜内在性タンパク質 IP39 の構造変化が原形質膜の伸縮に関与すると考えられている。近年、哺乳類内耳外有毛細胞の原形質膜中に局在し、IP39 と同様、膜上に規則的かつ密に配列している膜貫通型タンパク質 prestin が、その構造を変化させることで原形質膜を直接伸縮させることが明らかとなり^{2,3)}、局在性が似る IP39 にも同様の機能が存在する可能性が高まった。そこで本研究では、IP39 遺伝子の cDNA クローニングと塩基配列の決定、ならびに種々の免疫学的解析や構造解析を行った。

[方法] IP39 の N 末端配列情報を基に縮重プライマーを設計し、cDNA クローニングを行った。塩基配列、アミノ酸配列の各種解析には ALL IN ONE SEQ-ANALYZER, BLAST, SOSUI, The Predict Protein Server, MOTIF, NetOGlyc3.1, NetNGlyc1.0, ProtParam, NetPhos analysis, iPSORT, DISULFIND の各解析プログラムを用いた。Trypsin や papain で加水分解される領域、既知の脂質修飾部位は、既知の各標的配列情報から決定した。DNA プローブは両 IP39 の 3'非翻訳領域を、抗ペプチド抗体は両 IP39 の C 末端付近の配列の違いを利用して設計した。免疫電顕解析、免疫ブロット解析、ノーザンブロット解析、各種電気泳動は一般的な方法をベースに行った。

[結果と考察] IP39 の縮重プライマーから 2 タイプの cDNA が増幅された。各 ORF はそれぞれ 792 bp、795 bp であり、塩基配列の違いは全体にみられ、相同性は約 88%であった。推定アミノ酸配列の相同性は約 94%であり、配列の違いは C 末端付近に偏っていた。両 cDNA が mRNA レベルで細胞内に発現していることがノーザンブロット解析で、タンパク質レベルで細胞表層に局在していることが免疫ブロット解析で、それぞれ確認されたため、これらのタンパク質をそれぞれ α -IP39、 β -IP39 と命名した。両 IP39 の分子量は約 29 kDa であり、SDS-PAGE による見かけの分子量である 39 kDa より小さなものとなったが、この原因としては N 型糖鎖の結合が考えられた。2 次構造予測の結果、両 IP39 とともに N 末端、C 末端が細胞質側に存在する 4 回膜貫通型タンパク質

であると推定された。また、細胞外露出部位に共有結合サイトが 4 ヶ所、C 末端細胞内露出部位に 1 ヶ所の PKC 標的リン酸化部位が見出された。ユーグレナ運動の原動力は細胞表層に存在し、運動には Ca^{2+} と ATP が必要である^{4,5,6)}ことから、PKC 標的リン酸化部位を持つ IP39 はユーグレナ運動において重要な機能を持つと考えられる。さらに、IP39 は多量体を形成する^{7,8)}が、免疫ブロット解析の結果、多量体形成には α -IP39、 β -IP39 が共に関与しており、IP39 が持つ共有結合サイトは多量体形成には関与しないことが示唆された。細胞表層膜骨格構造の主要構成タンパク質 artuculin と IP39 との結合性、それに IP39 の持つキナーゼ活性は、膜分画に対する trypsin 処理では失われないが、papain 処理では消失する⁹⁾。Papain 標的残基は IP39 のアミノ酸配列全体に存在するが、trypsin 標的残基は第 4 膜貫通領域手前から C 末端にかけて存在しないため、C 末端細胞内露出部位にこれらの活性が存在すると考えられる。加えて、両 IP39 と密着結合主要構成 4 回膜貫通型タンパク質 claudin との間に、claudin family signature と細胞外ループ構成アミノ酸配列全体で類似性がみられた。Claudin では、family 内の claudin どうしが共重合してストランドを形成し、これがヘテロフィリックに接着し合うことで密着結合が形成されると考えられている^{10,11)}。また、claudin の配列は原形質膜直下の ZO-1 タンパク質と C 末端領域で結合することでもたらされている^{12,13)}。IP39 の規則的な配列は、IP39 と結合している artuculin によるものかもしれない。IP39 はフリーズフラクチャー E 面に偏在する^{7,8)}が、今回、両 IP39 の細胞外、細胞内露出部位の構成アミノ酸数の差は殆ど無いことが明らかとなった。このことは、両 IP39 が細胞外露出部位で相互に強固な結合を形成している可能性を示唆している。今後は、 α -IP39 と β -IP39 がどのように多量体構造や細胞表層構造を形成し、ユーグレナ運動時にその構造を変化させているか調べることで、IP39 の原形質膜伸展機構を解明したい。

[文献]

- 1) Suzuki, T. and Murata, K. (1997) 10th international congress of protozoology. Abstr., pp.192.
- 2) Zheng, J. et al. (2000) Nature, 405, 149-155.
- 3) Dallos, P. and Fakler, B. (2002) Audiol. Neurootol., 7, 9-12.
- 4) Suzuki, T. and Williamson, R. E. (1985) Protoplasma, 124, 137-146.

- 5) Suzaki, T. and Williamson, R. E. (1986) *J. Cell Sci.*, 80, 75-89.
- 6) Murata, K. and Suzaki, T. (1998) *Protoplasma*, 203, 125-129.
- 7) Dubreuil, R. R. et al. (1988) *J. Cell Biol.*, 107:191-200.
- 8) Murata, K. et al. (2000) *Protoplasma* 214:73-79
- 9) Rosiere, T. K. et al. (1990) *J. Cell Biol.*, 110:1077-1088.
- 10) Kubota, K. et al. (1999) *Curr. Biol.*, 9, 1035-1038.
- 11) Furuse, M. et al. (1999) *J. Cell Biol.*, 147, 891-903.
- 12) Itoh, M. et al. (1999) *J. Cell Biol.*, 147, 1351-1363.
- 13) Ikenouchi, J. et al. (2007) *J. Cell Biol.*, 176, 779-786.