

繊毛虫ブレファリズマにおける接合誘導物質ガモン 1 の糖鎖の研究 —糖鎖は接合誘導活性に必要なか?—

岩崎 祥子¹, 杉浦 真由美², 春本 晃江³

(¹奈良女子大学大学院人間文化研究科生物科学専攻, ²神戸大学大学院理学研究科生物学専攻 学術振興会特別研究員 PD, ³奈良女子大学理学部生物科学科)

Is the oligosaccharide attached to gamone 1 in the ciliate *Blepharisma japonicum* essential for conjugation-inducing activity?

Shoko IWASAKI¹, Mayumi SUGIURA² and Terue HARUMOTO³

(¹Department of Biological Science, Graduate School of Human Culture, Nara Women's University, ²Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University (JSPS Research Fellow), ³Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University)

SUMMARY

The complementary mating types I and II of the ciliate *Blepharisma japonicum* interact sexually by gamones. Gamone 1 (produced by mating type I) is the first glycoprotein that was discovered among conjugation-inducing substances in ciliates. It was suggested that the oligosaccharide of gamone 1 is an *N*-linked type without fucose modification. Its structure was estimated to have two additional *N*-acetylglucosamines attached to the mannose residue at the end of the common core structure [Man α 1-3 (Man α 1-6) Man β 1-4 GlcNAc β 1-4 GlcNAc-Asn] of the *N*-linked oligosaccharides. Gamone 1 is considered to have only one such simple oligosaccharide chain. To investigate whether the oligosaccharide attached to gamone 1 is indispensable for conjugation-inducing activity, we produced a gamone 1 that did not have an oligosaccharide by treating the gamone 1 with enzyme—glycopeptidase F. We then examined the treated gamone 1 by SDS-PAGE and by bioassay. We found that the gamone 1 without the oligosaccharide displayed a much reduced conjugation-inducing activity. We concluded that the oligosaccharide attached to gamone 1 may not be indispensable for conjugation-inducing activity.

【目的】 *Blepharisma japonicum* I型細胞が合成、分泌する接合誘導物質はガモン 1 であり、以前に単離、精製された¹⁾。ガモン 1 は糖タンパク質で、他の繊毛虫で知られている接合誘導物質と比べて分子量約 30,000 と大きく、温度感受性などの性質をもつ²⁾。繊毛虫の接合誘導物質の中で糖タンパク質として知られているものは、ガモン 1 のみであり、この糖鎖について研究することは、接合誘導機構の研究において意義深いことと考えられる。これまでに、ガモン 1 の糖鎖についてはおおまかな糖鎖構造が推定されている³⁾が、この糖鎖が接合誘導活性に関与しているかどうかについての実験報告はない。

本研究では、まず、酵素 Glycopeptidase F (以下、GPF)を用いてガモン 1 の糖鎖を切断する条件を設定することを目的とした。GPF は、糖ペプチドの糖部とペプチドとの結合部位 (GlcNAc-Asn) を特異的に切断することができる酵素である。次に、設定した酵素処理条件下で処理したガモン 1 タンパクを用いてバイオアッセイを行い、糖鎖をもたないガモン 1 によって、接合誘導が引き起こされるかどうかを調べた。

【方法】 *Blepharisma japonicum* の R1072 株 (I 型) を、ガモン 1 を合成し、分泌させるために用い、Hotta 株 (II 型) を、ガモン 1 の活性測定 (バイオアッセイ;

Unit 法) のためのテスター細胞として用いた。

まず、より高いガモン 1 活性を持つ CFF1 (Cell-free fluid 1; I 型の細胞外液) を実験に用いるために、I 型細胞の浮遊液に合成ガモン 2 を加え細胞を刺激し、多量のガモン 1 を放出させた。回収した CFF1 は酵素処理前にセントリコン (>10kDa) により濃縮した。

酵素処理は、CFF 1 を用い、非変性条件下において行った。緩衝液として、1M Tris-HCl (pH8.6) または modified SMB III (EDTA を除いた SMB III、以下 SMB; pH6.8) を用いた。酵素処理の条件については、緩衝液、酵素量、温度などを検討し、SDS-PAGE を行い、酵素処理を行ったサンプルと酵素処理を行っていないサンプルで分子量が変化することを確認して設定した。

また、酵素処理を行ったサンプルの中には、糖鎖の切断されなかったガモン 1 が含まれる可能性が考えられる。そこで、糖鎖をもつものと糖鎖を持たないものを分離するために、Concanavalin A (Con A) を用いた。糖鎖をもつガモン 1 は、Con A に結合し、活性を保持したまま精製することができる³⁾。このことを利用して、酵素処理した後のサンプルを、Con A を用いたバッチ法により精製すると、フロースルー分画に糖鎖が切断されたガモン 1、溶出分画に糖鎖をもつガモン 1 が回収されることが期待され

る。これらを DISMIC filter によりろ過滅菌したものをサンプルとして用い、バイオアッセイと SDS-PAGE を行った。

【結果と考察】 ガモン 1 の酵素処理を行う際に、バイオアッセイへの影響を最小限に抑えるため、Tris-HCl と GPF 量の検討を行った。また、ガモン 1 は温度感受性のタンパクであるため、処理温度、時間についての検討も慎重に行った。

その結果、Tris-HCl が低濃度であっても細胞にとって非常に毒性が高いことが分かった。また、反応後 GPF を取り除く手段がなかったため、糖鎖を切断できる最少の GPF 量と細胞の接合対形成に対する GPF の影響を調べた結果をもとに、酵素量を設定した。さらに、ガモン 1 は、GPF 処理の推奨温度である 37°C により、活性が低下する可能性が考えられたため、処理温度を 25°C に変更し、糖鎖を切断することができることを確認した。

これらの実験より、酵素処理については、CFF1 : SMB : GPF (25 mM) = 1 : 0.15 : 0.08 [volume] の割合で調整したサンプル溶液を 25°C、17 時間処理するという条件を決定した。Tris-HCl は細胞に毒性があったため、代わりの緩衝液として SMB (pH6.8) を用いた。

これらの結果を踏まえ、セントリコンによって濃縮した CFF1 を酵素処理し、これを ConA を用いたバッチ精製法によってフロースルー分画、洗浄分画 1~3、溶出分画 1~3 のフラクションに分取した。その後、各フラクションをろ過滅菌し、バイオアッセイを行った。

まず、GPF 処理を行っていない CFF1 (コントロール) の溶出分画 1 には、糖鎖をもつガモン 1 の大部分

を回収できることが期待された。そして、バイオアッセイの結果、フロースルー分画には接合活性が見られず、溶出分画 1 において十分な接合誘導活性が確認された。このことより、ガモン 1 の大部分が ConA に結合して溶出分画に回収されたと考えられた。一方、GPF 処理した CFF1 の溶出分画 1 には接合誘導活性が見られず、大部分のガモン 1 の糖鎖が切断されていることが示唆された。そして、わずかにフロースルー分画、つまり、糖鎖をもたないガモン 1 の回収分画において接合誘導活性が確認された。この結果より、糖鎖をもたないガモン 1 に接合誘導活性がある可能性が示された。

本研究により、ガモン 1 の糖鎖が、Glycopeptidase F によって切断されることを確認した。また、その処理条件の検討、決定を行った。さらに、その処理条件に基づき、糖鎖を切断したガモン 1 タンパクを用いてバイオアッセイを行ったところ、糖鎖をもつガモン 1 の回収分画と比較してわずかな反応ではあったが、接合誘導活性が見られた。つまり、接合誘導物質ガモン 1 の糖鎖は、接合対形成のために必ずしも必要ではないことが示唆された。

今後は、ガモン 1 の接合誘導活性に糖鎖が必要であるのかどうかについてさらに検討し、ガモン 1 の糖鎖の機能について明らかにしていきたい。

【文献】

- 1) Miyake, A. and Beyer, J. (1974) *Science* 185, 621-623.
- 2) 春本 晃江、杉浦 真由美 (2003) 原生動物学雑誌、36(2), 147-172. 総説
- 3) Sugiura, M. and Harumoto, T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14446-14451.