

## ミドリゾウリムシの PV 膜タンパク質の SDS-PAGE 解析

平岡 三和<sup>1</sup>, 大村 現<sup>2</sup>, 洲崎 敏伸<sup>1</sup> (<sup>1</sup>神戸大・理・生物, <sup>2</sup>神戸大学環境管理センター)SDS-PAGE analysis of proteins in the PV membrane of *Paramecium bursaria*.Sawa HIRAOKA<sup>1</sup>, Gen OMURA<sup>2</sup> and Toshinobu SUZAKI<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ. and <sup>2</sup>Center Env. Manag., Kobe Univ.)

## SUMMARY

The perialgal vacuole (PV) membrane must have a significant role in establishing and maintaining the symbiosis between host the *Paramecium bursaria* and symbiotic *Chlorella*. We attempted to isolate intact symbiotic *Chlorella* cells with their surrounding PV membranes to characterize the protein composition of the PV membrane. The host paramecia were gently homogenized by passing them through a 30-gauge needle, and the intact *Chlorella* cells were then isolated using Percoll density gradient centrifugation. The PV membranes were osmotically ruptured in distilled water and collected by centrifugation. SDS-PAGE and Western blot analyses showed that the PV membrane has a complex but characteristic pattern of proteins, with a specific concanavalin-A binding protein of about 70 kDa.

**【目的】** ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* に共生するクロレラは宿主細胞の食胞膜由来の PV (perialgal vacuole) 膜に包まれている<sup>1, 2)</sup>。PV 膜は共生の確立と維持に重要な役割を果たしていると考えられるが、その膜タンパク質構成や膜の特性は明らかにされていない。そこで今回は PV 膜に包まれた状態の共生クロレラを単離し、PV 膜の SDS-PAGE 解析を行った。

**【材料と方法】** クロロコニウムを利用した無菌二者培養法<sup>3)</sup>で大量培養したミドリゾウリムシ細胞を洗浄・濃縮し、30 µg/ml のライソザイム溶液を加えてトリコシストを放出させた。これをガーゼでろ過した後、細胞を再度洗浄・濃縮し、運動が見られなくなるまで氷冷した。その後 5 ml シリンジに付けた 30-G 注射針 (先端直径 0.31 mm) から射出してミドリゾウリムシ細胞を破碎した。大村の方法<sup>4)</sup>に従い、破碎物から大核や細胞膜を遠心除去した後、

75%と45%の Percoll 液を重層した上に破碎液を重層して遠心することで、クロレラのみを両 Percoll 液の境界面に集めて回収した。さらに回収したクロレラを遠心式フィルター(0.45  $\mu\text{m}$  径)で遠心し、濃縮した。そのペレットに少量の蒸留水を加えて軽く攪拌することで PV 膜を剥がし、再度遠心してクロレラをペレットにして除去し、PV 膜を上清として回収した。この上清をサンプルバッファーと合わせ、90°C で5分加熱し、電気泳動を行った。

**【結果と考察】** 電気泳動の結果、PV 膜の構成タンパク質には特徴的な泳動パターンが認められた。また、電気泳動後ウェスタンブロッティングを行い、レクチン染色を行ったところ複数のバンドが得られた。特に、Concanavalin A に特異的に結合する 70 kDa のバンドが認められた。上清として回収した PV 膜と、PV 膜を剥離したクロレラを、それぞれグルタルアルデヒド・オスミウム同時二重固定法により固定して透過型電子顕微鏡観察を行った結果、クロレ

ラから PV 膜が完全に剥離できていることが確かめられた。

今後は食胞膜についても精製して、電気泳動や、レクチン染色を行いたい。現在のところ、磁性ビーズを用いて食胞膜を作らせ単離することには成功したが、細胞膜や細胞小器官の混入が多く、解析には至っていない。高純度の食胞膜を精製できれば、PV 膜の解析結果と比較して、PV 膜特有に発現している共生に関与するタンパク質や糖鎖修飾を明らかにしたい。

#### **【文献】**

- 1) Krakashian, S.J. and Rudzinska, M.A. (1981) *Exp. Cell Res.*, 131: 387-393
- 2) Meier, R. and Wiessner, W. (1989) *J. Cell Sci.*, 93: 571-579
- 3) Omura, G. et al. (2004) *Jpn. J. Protozool.*, 39: 139-150
- 4) Omura, G. et al. (2006) *Jpn. J. Protozool.*, 40: 76-78