

*Euglena gracilis*の2種類のIP39タンパク質のペプチド抗体を用いた解析

竹内 喬平¹, 末友 靖隆², 洲崎 敏伸¹ (¹神戸大・院理・生物, ²岩国市立ミクロ生物館)

Analysis of two types of IP39 proteins from *Euglena gracilis* using specific peptide antibodies

Kyohei TAKEUCHI¹, Yasutaka SUETOMO² and Toshinobu SUZAKI¹
(¹Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ., ²Iwakuni City Microlife Museum)

SUMMARY

The plasma membrane of *Euglena gracilis* possesses a densely-arranged array of intra-membrane proteins, IP39, which are implicated in the mechanism of rounding-up of the cell (euglenoid movement). Molecular cloning of cDNA encoding IP39 has been carried out and two types of cDNA were identified. In this study, anti-peptide antibodies were generated against deduced amino acid sequences of the two types of IP39 proteins, α - and β -IP39, to examine molecular arrangement and cellular localization of these protein isoforms. Immunofluorescence microscopy showed that both α - and β -IP39 are uniformly localized around the cell cortex. Immunoblot analysis showed that both types of IP39 exist in the membrane fraction in either monomeric or dimeric form. SDS-PAGE of IP39 in the presence of various concentrations of β -mercaptoethanol suggested that disulphide bonding is not involved in the dimerization of IP39. Analysis of phosphorylation levels of IP39 showed that IP39 is constitutionally phosphorylated, regardless of whether IP39 proteins were prepared from elongated or rounded cells, indicating that protein phosphorylation is not involved in euglenoid cell shape change.

【目的】ユーグレナ類に属する生物は、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。ユーグレナ運動は未解明の細胞運動であるが、運動には Ca^{2+} とATPを必要とし¹⁻³⁾、その原動力は細胞表層に存在していると考えられている³⁾。*Euglena gracilis*の細胞表層部の原形質膜にはIP39と呼ばれる膜内在性タンパク質が規則正しく密に配列しており、ユーグレナ運動に関して重要な役割を果していると考えられている。先行研究でIP39のcDNAクローニングが行われ、塩基配列の違う2つのIP39タンパク質が発現していることが示され、 α -IP39、 β -IP39と名付けられた。これらのIP39はC末端側にアミノ酸配列が大きく異なる領域が存在することが予想された。そこで、この部分を抗原とし、 α -IP39と β -IP39を識別可能なペプチド抗体を作製し、それらを用いた解析を行いIP39とユーグレナ運動の関係を解明しようとした。

IP39が単量体に加えて2量体を形成していることは、過去の研究⁴⁻⁶⁾により明らかになっているが、2量体の構造は分かっていない。そこで、2量体が分子間S-S結合で形成される可能性を β -MEの有無によるSDS-PAGEの結果への影響を調べることで検証した。

また、IP39のC末端細胞質露出部位にはプロテインキナーゼC (PKC) リン酸化ターゲット部位が1ヶ所予測された。PKCの多くは Ca^{2+} 結合ドメインを持ち、ATPを用いて標的タンパク質をリン酸化させる。そこで、運動とリン酸化の関係を調べるため、細胞球形化時と細胞伸長時それぞれにおけるIP39のリン酸化状態を解析した。

【方法】 Kören-Hutner培地で培養したSM-ZK株の*E. gracilis* 細胞をIsolation Medium (50 mM PIPES (pH

7.0), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, 2.5% DMSO)に懸濁し、氷上で超音波破碎し、percollを用いた密度勾配遠心分離法⁷⁾を用いて細胞表層構造 (pellicle) を単離した。氷上でpellicleを10 mM NaOHで30分間処理し、単離原形質膜を得た。コンパクトゲルを使ったSDS-PAGEで単離原形質膜を電気泳動した後、一次抗体として抗 α -IP39抗体と抗 β -IP39抗体を使った免疫ブロットを行った。

単離膜分画を用いて、 β -ME濃度を9%, 6%, 3%, 2%, 1%, 0%に調整した $\times 2$ サンプルバッファーを用いたSDS-PAGEを行った。

次に、*E. gracilis*をExtraction Medium (100 mM Hepes-KOH, 20 mM Pipes, 10 mM EGTA, 50 mM sucrose, 1 mM DTT, 7.5% (v/v) glycerol, 4% (v/v) Triton X-100, 4% (v/v) Nonidet P-40, pH 7.0)で5分間処理したセルモデルに、6%ホルムアルデヒド in PB (pH 7.4)を等量加えて30分間固定したサンプルを、一次抗体に抗 α -IP39抗体と抗 β -IP39抗体を使い、蛍光抗体法で観察した。

*E. gracilis*をmethyl celluloseで球形化を誘導^{6),8)}したものと、未処理で伸長状態のものに分け、上述の原形質膜単離法を用いることで、球形化した細胞、伸長状態の細胞の、それぞれの精製原形質膜分画を得た後、methanolとchloroformで含有タンパク質を精製した。これを乾燥させたサンプルでSDS-PAGEを行った。泳動後、Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stainを用いてリン酸化タンパク質を検出した後、そのゲルをCBB染色した。

【結果】免疫ブロットの結果、 α -IP39と β -IP39が共に原形質膜に存在し、両者共に単量体と2量体を形成していることを見出した。還元剤の量を変化してもSDS-PAGEでのIP39の単量体と2量体の量比には変化が無いことが分かった。また、セルモデルを蛍光観察した結果、 α -IP39と β -IP39は細胞全域にわたって細胞の辺縁に局在し、その局在性には α -IP39と β -IP39と

の顕著な差は観察できなかった。さらに、IP39は細胞の伸長や収縮とは関係なく、常にリン酸化していた。

【考察】今回の研究で、 α -IP39と β -IP39の2種類のIP39が共に原形質膜にタンパク質レベルで発現している事が確認できた、さらに、IP39は単量体だけでなく2量体も形成していることが分かった。IP39のS-S結合は2量体には形成関与せず、単量体の立体構造を安定化している可能性が高いことが分かった。しかし、2量体が α -IP39と β -IP39のヘテロダイマーであるのかあるいはホモダイマーであるのかは不明である。蛍光抗体法によって、2種類のIP39は共に細胞全域の辺縁に局在していることを見出したが、局在性に違いはなかった。過去の研究により、原形質膜内のタンパク質顆粒は大きさの異なる2種類からなることが示されている。これらの顆粒が α -IP39と β -IP39とどのように対応しているのかは今後の免疫電顕などによる解析を待たなければならない⁶⁾。

【文献】

- 1) Murata, K. and Suzaki, T. (1998) Protoplasma, 203, 125-129.
- 2) Suzaki, T. and Williamson, R.E. (1985) Protoplasma, 124, 137-146.
- 3) Suzaki, T. and Williamson, R. E. (1986) J. Cell Sci., 80, 75-89.
- 4) Dubreuil, R. R., Rosiere, T. K., Rosner, M. C. and Bouck, G. B. (1988) J. Cell Biol., 107, 191-200.
- 5) Dubreuil, R. R. and Wang, P. (2000) J. Muscle Res. Cell Motil., 21, 705-713.
- 6) Murata, K., Okamoto, M. and Suzaki, T. (2000) Protoplasma, 214, 73-79.
- 7) Murray, J. M. (1981) J. Cell Sci., 49, 99-117.
- 8) Suzaki, T. and Williamson, R. E. (1983) Plant Sci. Lett., 32, 101-107.