

ゾウリムシの大核特異共生細菌ホロスポラ・オブツサと  
宿主の大核ヒストンとの相互作用

村上 崇史, 藤島 政博 (山口大・院理工・環境共生系)

Interaction between the macronucleus-specific bacterium *Holospora obtusa* and the  
macronuclear histones of the host *Paramecium caudatum*

Takashi MURAKAMI and Masahiro FUJISHIMA

(Dept. Env. Sci. and Eng., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

The Gram-negative bacterium *Holospora obtusa* is a macronucleus-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. In the host macronucleus, *H. obtusa* interacts with the macronuclear chromatin. Gel-overlay blotting with a monoclonal antibody specific for the outer membrane of *H. obtusa* demonstrated that macronuclear proteins, including histone H4, adhered to the outer membrane. Immunoblot with a monoclonal antibody specific for histone H4 of *P. caudatum* showed that the H4 molecules were present not only on the outside of the bacteria but also inside *H. obtusa*. Furthermore, the amount of the intrinsic H4 proteins per cell was almost the same in all stages of the bacterial life cycle. Indirect immunofluorescence microscopy showed that histone H4 is localized inside the outer membrane or periplasm of the bacterium. In contrast, histone H2B-YFP was not present inside the bacteria. These results indicate that *H. obtusa* imports histone H4, but not histone H2B, selectively from the host nucleus and that an unknown function of the imported H4 may be responsible for the macronucleus-specific habitat of this bacterium.

【目的】 繊毛虫 *Paramecium caudatum* の大核特異的共生細菌 *Holospora obtusa* は生活環の中に増殖型と感染型という異なる形態を持つ。増殖型の細胞外膜は宿主大核クロマチンと高い親和性を持ち、表面に多数の核内物質が結合している<sup>1)</sup>。また、感染型も宿主核タンパク質と結合するタンパク質を持つことが報告されている<sup>2)</sup>。更に、ヒストンH3とH4を含む複数

の宿主核タンパク質が、増殖型と感染型双方の細胞外膜と結合することが明らかになった。この現象は *H. obtusa* の宿主大核内における安定化と維持に、役割を果たすと考えられる。本研究では、宿主ヒストンH4特異的モノクローナル抗体MA-13を用いて、ヒストンH4と *H. obtusa* との相互作用を調べた。また、ヒストンH2B-YFP形質転換体<sup>3)</sup>を用いて、*H. obtusa*

に対するH2Bの性質をH4と比較した。

**[材料と方法]** *P. caudatum*のRB-1 s58a2株 (接合型E<sup>4</sup>)、H2B-YFP形質転換体、及び*H. obtusa*のF1株を用いた。

*H. obtusa*の細胞外膜と結合する宿主核タンパク質の検出は、宿主単離核のSDS-PAGE後の転写膜を増殖型及び感染型*H. obtusa*の超音波破碎ホモジネートの遠心上清で処理し、*H. obtusa*の細胞外膜特異的モノクローナル抗体IR4-1を用いたGel-overlay blottingで行った。

一次抗体としてMA-13抗体を用いたイムノブロットと間接蛍光抗体法で*H. obtusa*とヒストンH4の相互作用を調べた。間接蛍光抗体法では、単離した*H. obtusa*を風乾し、カルノア固定液で固定後、20 mM NaOHで2.5分処理したものと、未処理のものをそれぞれ試料として用いた。

生細胞内における*H. obtusa*とヒストンH2Bの関係を調べるため、H2B-YFP形質転換体に対して感染型を1:100の細胞数の割合で混合して再感染させ、15分後に15 µmナイロンメッシュで濾過した後、ドリルの液で細胞を洗浄して外液の感染型を除去し、蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察した。

**[結果と考察]** Gel-overlay blottingによって*H. obtusa*の細胞外膜と結合する宿主核タンパク質として検出されたヒストンH4の性質を明らかにするため、MA-13抗体を用いてイムノブロットを行った結果、*H. obtusa*からも宿主単離核のH4と同じ分子量のバンドが検出された。続いて間接蛍光抗体法を行ったとこ

ろ、NaOH処理により細胞外膜に傷を付けた細胞で強い蛍光が観察された。増殖型のH4は細胞外膜近辺を囲むように局在したが、中間型では蛍光が途切れ途切れになり、感染型では細胞全体で点状に分散した。これらの結果は、*H. obtusa*の生活環の全過程でH4が細胞外膜内部または細胞外膜直下のペリプラズムに存在することを示している。

ゾウリムシのヒストンH4遺伝子は、ユニバーサルコドンでは終始コドンのTAAでコードされたグルタミンを含むため、*H. obtusa*で翻訳が行われた場合には、分子量が約1-kDa小さくなる。しかし、イムノブロットの結果では分子量は宿主H4とほぼ同じであることから、*H. obtusa*は宿主が合成したH4を菌体内に取り込んでいる可能性が高い。

一方、ヒストンH2B-YFP形質転換体に対する*H. obtusa*の感染実験の結果から、核内に存在する活性型、増殖型、及び中間型の*H. obtusa*は、周囲をクロマチン物質に覆われているが、H2Bとは強く結合していないことが観察された。また、宿主から単離した*H. obtusa*からはH2Bが検出されなかった。

以上の結果は、選択的に菌体内に輸入される大核ヒストンH4の未知の機能が*H. obtusa*の大核特異性の理由になっている可能性を示唆している。

#### [文献]

- 1) Wiemann, M. (1989) J. Protozool., 36 (2): 176-179.
- 2) Ehrt, E. and Götz, H.-D. (1999) Europ. J. Protistol., 35: 304-308.
- 3) Takenaka, Y., Yanagi, A., Masuda, H., Mitsui, Y., Mizuno, H. and Haga, N. (2007) Gene, 395: 108-115.