

*Peranema trichophorum*におけるマスティゴネマの単離と 構成タンパク質の分析

吉見 英明, 洲崎 敏伸 (神戸大・院理・生物)

Isolation of mastigonemes and analysis of the component proteins in *Peranema trichophorum*

Hideaki YOSHIMI and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe University)

SUMMARY

Peranema trichophorum cells show unique unidirectional locomotion, gliding on the substratum at speeds up to 30 $\mu\text{m/s}$, which is the highest among all protozoans. We have previously shown that mastigonemes on the anterior flagellum are involved in gliding motility of *P. trichophorum*. In this study, we attempted to elucidate the molecular machinery of this motility by analyzing the mastigoneme proteins of *P. trichophorum*. We first developed a new culture method, adding commercial milk to the *P. trichophorum* culture medium to obtain higher yields. Excretory substances were removed from the cell suspension by passing through a filter paper, followed by gentle centrifugation to collect the cells. We isolated flagella from the cell body by repeated cold shocks, and mastigonemes were successfully detached. The mastigonemes were collected as a pellet by centrifugation for 15 min at 20,000 g. SDS-PAGE showed a major band at 40 kDa. This is a candidate protein that is localized in the mastigoneme.

【目的】 ペラネマは単細胞生物で最も高速の滑走運動を行う事で知られているが、その滑走運動は、鞭毛上にあるマスティゴネマと基底面における相互作用により生み出される¹⁾。本研究は、この滑走運動に関わる分子メカニズムを解明するため、ペラネマのマスティゴネマを構成するタンパク質を同定し、その機能を解析する事を目標としている。ここでは、マスティゴネマ構成タンパク質の同定ため、より高密度の細胞が得られる培養法と細胞体からのマスティゴネマの単離・精製へ焦点をあて検討する。

【材料と方法】 従来の培養液²⁾に市販の成分無調整牛乳を最終濃度1%になるように加えたものを新培養液とした。ペラネマは、*Chlorogonium*を餌として用いる無菌二者培養法にて培養し、細胞数の変化を従来の培養液の場合と比較した。マスティゴネマの単離は、以下の手順で行った。2号ろ紙を用いて、ペラネマが十分に増殖した培養液をろ過し、凝集した排泄物を除去した。細胞は、ろ液を400 gで5分間遠心して集め、沈殿した細胞に洗浄液 (0.01% Knop にpH 7.0のHepes-KOHを最終濃度が10 mMになるように加えたもの)を加え再懸濁した。この遠心操作を2回行い、上清に含まれる微細な夾雑物を除去し、細胞を洗浄した。この後、以下の冷却処理を行い、細胞体から鞭毛を分離した。細胞の入ったチューブを約-16°Cの冷却塩水に浸すことで50秒間冷却し、さらに室温 (約26°C)で4分間静置するプロセスを1サイクルとし、この冷却・加温サイクルを7回繰り返して脱鞭毛を行った。脱鞭毛したサンプルは、60 gで1分間遠心して上清を新しいチューブへ回収する処理を

3回行い、沈殿を細胞体分画とした。次に、回収した上清を10回ピペティング処理した後に、400 gで5分間、さらに2,000 gで15分間の遠心分離を行い、沈殿を鞭毛分画とした。上清は、20,000 gにて15分間に遠心分離を行い、得られた沈殿をマスティゴネマ単離分画として回収した。各分画処理は、上清の一部を回収して酢酸ウランによるネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡でマスティゴネマの状態を確認しながら行った。単離した各分画は、SDS-PAGEとCBB染色、および銀染色によって解析し、それぞれの構成タンパク質を比較検討した。

【結果】 従来の培養液では、培養開始後11日前後で餌が全て消費され、ペラネマの細胞密度は約 2.64×10^4 cell/mlにまで達し最大値となった。その後細胞は減少し、培養開始18日前後でペラネマはほぼ死滅した。一方、牛乳を加えた新培養液では、培養開始後14日前後で餌が全て消費されたが、この時点におけるペラネマの細胞密度は約 7.20×10^4 cell/mlであった。その後も細胞の増殖は見られ、培養開始後21日前後で細胞密度は約 1.06×10^5 cell/mlへ達した。その後、細胞数は緩やかに減少し、培養開始後約60日でペラネマはほぼ死滅した。ろ紙を用いてろ過することにより、ペラネマ培養液中に含まれる排泄物が効果的に除去できた。冷却処理によって、約6割以上の細胞から鞭毛が離脱しており、段階的に繰り返す遠心分離によって細胞体と鞭毛を除去することができた。マスティゴネマ分画となる20,000 gで遠心処理した沈殿を観察した結果、マスティゴネマが精製されており、鞭毛等の夾雑物は見られなかった。SDS-

PAGE解析したところ、20,000 gの遠心処理をしたマスティゴネマ分画から分子量約40 kDaに相当するバンドが検出された。このバンドは、細胞体分画や鞭毛分画ではほとんど見られず、マスティゴネマ分画では最も濃いバンドとして確認できた。

【考察】牛乳を用いた新たな培養法では、従来の手法より約4倍以上も高い細胞密度までペラネマを培養する事に成功した。牛乳には微小な固形脂肪分などが含まれており、餌である*Chlorogonium*が死滅した後もこれらの脂肪分を摂食することによって、ペラネマが増殖した可能性がある。ろ紙による前処理により排泄物は除去できたが、マスティゴネマ分画に微小な夾雑物が混入する場合も見られた。これは、細胞の遠心洗浄から細胞体除去を行うまでの間で、ペラネマが微小な排泄物を出している可能性を示唆していると考えられ、対処法を検討中である。透過型電子顕微鏡観察により、マスティゴネマ分画で夾雑

物の混入はほとんど見られず、SDS-PAGEで検出した40 kDaのバンドが、マスティゴネマの主要構成タンパク質に由来する事が強く示唆された。しかし、CBB染色が示す目的タンパク質のタンパク質量は少なく、詳細な解析を行うにはまだ不十分である。この問題を解決するため、より多くのマスティゴネマを鞭毛から脱離させる方法、あるいはより多くの培養を行う等、より多くのタンパク質を得る方法を考える必要がある。今後はこのタンパク質のアミノ酸配列を解析してマスティゴネマ遺伝子を特定することや、モノクローナル抗体を作成してこのタンパク質がマスティゴネマ由来であることの確認をする予定である。

【文献】

- 1) Saito, A. et al. (2003) Cell Motil. Cytoskel. 55, 244-253
- 2) Suetomo, Y. et al. (2006) Jpn. J. Protozool. 39, 37-45