

## 繊毛虫*Blepharisma japonicum*における接合誘導物質ガモン1の糖鎖の役割

岩崎 祥子<sup>1</sup>, 杉浦 真由美<sup>2</sup>, 春本 晃江<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>奈良女子大学大学院人間文化研究科生物科学専攻, <sup>2</sup>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), <sup>3</sup>奈良女子大学理学部生物科学科)

## Role of the oligosaccharide attached to gamone 1 in the conjugation-inducing activity of the ciliate *Blepharisma japonicum*

Shoko IWASAKI<sup>1</sup>, Mayumi SUGIURA<sup>2</sup> and Terue HARUMOTO<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Biological Science, Graduate School of Human Culture, Nara Women's University, <sup>2</sup>Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University (JSPS Research Fellow), <sup>3</sup>Department 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 via gamones. Gamone 1 (produced by mating type I) was the first glycoprotein discovered as a conjugation-inducing substance in ciliates. It was suggested that the oligosaccharide attached to gamone 1 is an *N*-linked type without fucose modification. Recently, we investigated whether the oligosaccharide attached to gamone 1 is indispensable for conjugation-inducing activity, using glycopeptidase F-treated gamone 1. We found that gamone 1 lacking the oligosaccharide showed much-reduced activity, suggesting that the oligosaccharide may be indispensable for inducing conjugation. In this study, we constructed a new expression system for gamone 1 and expressed a recombinant gamone 1 lacking oligosaccharide to obtain proof of involvement of the oligosaccharide in conjugation-inducing activity. Prepro- or mature-gamone 1 was expressed from a pCold TF vector in *E. coli* strain JM109, by inducing with 1 mM IPTG for 24 hours at 15°C. The pCold TF vector is a cold-shock expression vector that can express Trigger Factor (TF) chaperone as a soluble tag. The products were separated into soluble and insoluble fractions, and the proteins were subjected to SDS-PAGE. Prepro- and mature-gamone 1 were found in both soluble and insoluble fractions, indicating that the pCold TF vector had facilitated efficient production of recombinant gamone 1 in the soluble fraction. We purified the recombinant gamone 1 with TALON Resin in batch procedure and removed the tags attached to the recombinant gamone 1 with HRV 3C Protease. We investigated whether the recombinant gamone 1, which lacks the oligosaccharide, showed conjugation-inducing activity. The present study strongly supports our previous finding that the conjugation-inducing activity is associated with the oligosaccharide attached to gamone 1.

**【目的】** *Blepharisma japonicum* I型細胞が合成、分泌する接合誘導物質ガモン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 kDaと大きく、温度感受性などの性質をもつ<sup>1,3)</sup>。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。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<sup>2)</sup>。これまでに我々は、酵素Glycopeptidase F (TAKARA, 以下GPF)によりガモン1の糖鎖を切り離し、糖鎖をもたないガモン1の接合誘導活性について報告した。本研究では、これをさらに検討すると共に、新しい試みとして、大腸菌で糖鎖が付加されていないガモン1を大量に発現させ、その活性の有無を調べることにし、ガモン1の糖鎖の必要性について検討した。

#### 【材料と方法】

##### I. 糖鎖を切断したガモン1の接合誘導活性

ガモン1を合成し、分泌させるために*Blepharisma japonicum*のR1072株(I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にHotta株(II型)を用いた。酵素処理は、ガモン1の含まれるI型の細胞外液(CFF 1)を用い、非変性条件下において行った。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ガモン1の分子量が変化することを確認した。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、糖鎖をもつガモン1は、Concanavalin A(Con A)に結合することを利用し、糖鎖をもつものと糖鎖を持たないものをCon Aを用いたバッチ法により精製した。このとき、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た。これらをDISMICフィルター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。

##### II. 大腸菌を用いて作製した組換えガモン1の接合誘導活性

まず、preproガモン1とmatureガモン1配列をPCRで増幅後、pCR2.1-TOPOベクターでクローニングし、pCold TFベクターでサブクローニングしてプラスミドの構築を行った。次に、作製したプラスミドを大腸菌株(JM109)に導入し、15°C条件化で1 mM IPTGを添加してタンパク合成を誘導した。誘導から24時間後にサンプリングし、可溶性分画、不溶性分画を抽出してSDS-PAGEで分離した。また、SDS-

PAGE後、抗ガモン1抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。さらに、可溶性分画に回収されたサンプルをTALON Resinを用いたバッチ精製により、組換えガモン1を回収し、SDS-PAGEで検出した。さらに、組換えガモン1のタグを切り離すため、HRV 3C Proteaseを作用させた後、バッファー交換を行い、組換えガモン1に接合誘導活性があるかどうかをバイオアッセイにより調べた。

#### 【結果と考察】

I. 以前の報告において、ガモン1の糖鎖を切断するための酵素Glycopeptidase F処理条件の検討を行った。さらに、その最適処理条件に基づき、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、接合誘導活性はわずかしか見られなかった。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要であり、何らかの働きをしていることが示唆された。今回は本実験の再現性を確認した。

II. これまでに、Hisタグ標識した組換えガモン1、GST融合ガモン1の大量発現系の構築が行われたが、発現したガモン1は、不溶性画分に回収され、活性のあるガモン1を回収することが困難であった。そこで、今回は新たな発現ベクター(pCold TF DNA, TAKARA)を用いて発現系を構築した。これは、コールドショックベクターで、さらにシャペロンとの融合タンパク質として発現することができるベクターである。preproガモン1またはmatureガモン1遺伝子の全長を含む配列をpCold TFベクターに組み込み、大腸菌で発現を試みた。その結果、IPTGによる誘導時に、可溶性分画、不溶性分画共に特異的に発現量の上がるタンパク質が同定でき、ウエスタンブロットティングにより組換えガモン1であることを確認した。さらに、可溶性分画に回収された組換えガモン1をTALON Resinを用いたバッチ精製により、溶出分画に特異的に回収できることを確認した。その後、溶出分画に回収されたガモン1にHRV 3C Proteaseを作用させ、タグ部分を除いた後、バッファー交換し、バイオアッセイを行った。その結果、組換えガモン1に接合誘導活性はみられなかった。このことはIの結果と矛盾せず、ガモン1の糖鎖は接合対形成のために必要であると考えられた。

#### 【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(25), 14446-14451.