

ホロスポラが認識するゾウリムシの標的核膜物質の探索

田中 健也, 藤島 政博
(山口大・院理工・環境共生系)

Search for a macronuclear envelope substance of *Paramecium* recognized by
endonuclear symbiotic bacterium *Holospora*

Kenya TANAKA and Masahiro FUJISHIMA
(Dept. Environm. Sci. Engn., Grad. Sch. Sci. Engn., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

To identify a macronuclear envelope-specific substance of the ciliate *Paramecium caudatum* that can be recognized by 16-kDa lipopolysaccharides of the outer membrane of the macronucleus-specific bacterium *Holospora obtusa*, a monoclonal antibody MA-22 was developed. Immunoblotting shows that the antigen is 30-kDa in molecular weight, as expected from results of a gel-overlay experiment with the anti-16-kDa antibody in our previous study. Indirect immunofluorescence microscopy shows that the 30-kDa antigens appear in macronuclear anlagen immediately after appearance of heterochromatic aggregates in the nuclear differentiation process. Cross-reactivity of the antibody using indirect immunofluorescence and immunoblotting shows that the epitopes are present around the macronuclear envelopes not only in infection-capable strains of *P. caudatum*, *P. multimicronucleatum*, *P. tetraurelia*, and *P. jenningsi*, but also in infec-

tion-incapable strains of *P. jenningsi*, *P. calkinsi*, *P. polycaryum*, *P. nephridiatum*, and *P. putrinum*. The infection-incapable strain of *P. bursaria* did not react with the antibody. The MA-22 antigens bounded to the outer membrane of the bacteria. These results indicate that the antigen of *P. caudatum* and closely related species with *P. caudatum* have the epitope against the antibody. Possible relations between this epitope and the binding site for the 16-kDa lipopolysaccharides of *H. obtusa* are discussed.

[目的] グラム陰性細菌 *Holospira obtusa* は、繊毛虫 *Paramecium caudatum* の大核特異的共生細菌である。*H. obtusa* は、その生活環に形態と機能を異にする 2 種類の型 (増殖型と感染型) を持ち、宿主の生理状態に適応して増殖型から感染型に分化する。感染型 *H. obtusa* は感染能力を持ち、外液から宿主食胞を經由して細胞質に侵入し、宿主の 2 種類の核の核膜 (大核膜と小核膜) を識別して大核に感染する。

これまでの研究は、感染型 *H. obtusa* の細胞外膜に露出して存在するリポ多糖 (分子量, 16-kDa) が、宿主大核膜上のリセプター物質 (分子量, 30-kDa) と結合して標的核を識別することを示し¹⁾、ゾウリムシの大核原基内にクロマチン顆粒が出現すると感染型 *H. obtusa* が大核原基に感染することから、この時期には感染型 *H. obtusa* が識別する標的核膜物質が出現することが示唆されている²⁾。また、感染型 *H. obtusa* は、*P. caudatum* 以外に *P. tetraurelia*, *P. multimicronucleatum*, *P. jenningsi* の大核にも感染することが報告されている³⁾。

この研究では、感染型 *H. obtusa* が識別する標的核膜物質特異的モノクローナル抗体を作成することを目的とし、今回得られた大核特異的モノクローナル抗体 (mAb MA-22) を用いて、抗原の分子量、抗体の *Paramecium* 種間における交叉反応性、核分化過程での抗原の出現時期を調べた。そして、感染型 *H. obtusa* が識別する大核膜特異的物質の特徴と MA-22 抗原の特徴を比較した。また、*in vitro* で MA-22 抗原と *H. obtusa* の細胞外膜物質との接着性を間接蛍光抗体法で調べた。

[材料と方法]

大核特異的モノクローナル抗体の作成

P. caudatum 株 Rb-1s58a2 (接合型 E⁴) の単離核を BALB/c マウスに感作し、ハイブリドーマの培養上清を間接蛍光抗体法でアッセイして、大核を認識する抗体を産生するハイブリドーマを 2 回の限界希釈法でクローニングし、mAb MA-22 産生ハイブリドーマを得た。

間接蛍光抗体法

9 種の *Paramecium* (*P. caudatum* 株 Rb-1s58a2, *P. multimicronucleatum* 株 TH103, *P. tetraurelia* 株 stock51, *P. jenningsi* 株 30998, 30999, *P. calkinsi* 株 GN5-3, *P. polycaryum* 株 YnA, *P. nephridiatum* 株 Rw-1, *P. putrinum* 株 OM4, SW2, *P. bursaria* 株

Yad1w) を 4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し、間接蛍光抗体法で調べた。また、接合過程における抗原の出現時期は、相補的接合型株 (株 Knz2, 接合型 E³, 株 Knz5414, 接合型 O³) を用い、接合過程におけるステージの分類は、藤島 (1988)⁴⁾ の分類にしたがった。*in vitro* での MA-22 抗原と *H. obtusa* の細胞外膜との接着性については、*P. caudatum* の単離核のホモジネート上清と *H. obtusa* を混合し、固定せずに MA-22 抗体との結合性を間接蛍光抗体法で調べた。

SDS-PAGE とイムノブロット

上記の 9 種類の *Paramecium* の whole-cell を Lemmli's lysis buffer で処理したサンプルを用いて SDS-PAGE とイムノブロットで調べた。

[結果と考察] *P. caudatum* を用いた間接蛍光抗体法とイムノブロットの結果から、MA-22 抗原は、大核特異的に局在し、分子量は 30-kDa を示した。また、Axio Vision 4.5 を用いた画像処理では、その抗原が大核膜付近に局在することが示された。核分化過程では、抗原はステージ 19 (大核原基内にクロマチン顆粒が出現する時期) で初めて大核原基に出現した。*P. caudatum* 以外の種を用いた間接蛍光抗体法では、*P. bursaria* を除く全ての種の大核で蛍光が検出された。また、イムノブロットでも同様に、*P. bursaria* を除く全ての種で約 30-kDa にバンドを検出した。そして、*in vitro* において *P. caudatum* の単離核のホモジネート上清と *H. obtusa* を混合し、間接蛍光抗体法で観察すると、*H. obtusa* の細胞外膜に蛍光が検出され、MA-22 抗原と *H. obtusa* の細胞外膜との接着性が確認された。

これらの結果は、MA-22 抗体が感染型 *H. obtusa* が識別する標的核膜特異的物質を認識している可能性を示唆している。しかし、間接蛍光抗体法とイムノブロットの結果では *H. obtusa* に対する被感染能を持たない種の大核にも MA-22 抗原決定基が存在することから、MA-22 抗原決定基は、感染型 *H. obtusa* の細胞外膜に露出して存在するリポ多糖 (分子量, 16-kDa) が結合する部位ではないと考えられた。

[文献]

- 1) Fujishima and Kawai (2004) Endocytobiosis Cell Res., 15, 71-76.
- 2) Fujishima and Görtz (1983) J. Cell Sci., 64, 137-146.