

ゾウリムシの大核に発現している 36B 抗原の解析

桃井 勇貴, 柳 明
(石巻専修大・院理工・生命科学)Analysis of a macronuclear 36B antigen in *Paramecium caudatum*Yuki MOMOI and Akira YANAGI
(Dept. Biol. Engn., Fac. Sci. Engn., Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

Ciliates have two functionally distinct nuclei, a germinal micronucleus and a somatic macronucleus. The macronucleus is responsible for gene transcription but it is lost at each sexual cycle, whereas the micronucleus transmits the genetic information to the next sexual generation. To identify and characterize protein components of the two kinds of nuclei, we produced several kinds of monoclonal antibodies against nuclear antigens in *Paramecium caudatum*. In this study, we examined a macronuclear 36B antigen by electrophoresis and Western blotting. Western blot analysis of proteins separated by one-dimensional SDS-PAGE showed that two bands (55- and 70-kDa) were identified with the anti-36B antibody in samples solubilized in SDS sample buffer, while only the 70-kDa band was detected in samples solubilized in sample buffer for isoelectric focusing. In Western blot analysis of proteins separated by two-dimensional SDS-PAGE, one spot at the size of 70-kDa was identified with the anti-36B antibody. We will purify the 70-kDa protein in the spot to determine its partial amino acid sequence.

【目的】ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は大核と小核という構造と機能が異なる 2 種類の核を持っている。小核は多細胞動物の生殖細胞に相当し、有性生殖 (接合) を通して子孫に遺伝子を伝える働きがある。一方、大核は体細胞に相当し、遺伝子発現を活発に行っている。この大核と小核の違いを理解するうえで核を構成しているタンパク質を知ることが重要である。そこで、大核特異的な抗原に対するモノクローナル抗体 (36B 抗体) を作った¹⁾。この大核特異的な 36B 抗原の機能を明らかにするために、この抗原の遺伝子をクローニングしたいと考えている。本研究では、その前段階として 36B 抗原を精製するために SDS-PAGE, 2 次元電気泳動, ウェスタンブロットングを行った。

【方法】**SDS-PAGE**

細胞をホモジェナイザーで破碎し、遠心して得られた大核を含む沈殿を SDS サンプル調製液で可溶化し、10% アクリルアミドゲル (BIO RAD READY GELS J) を用いて電気泳動 (SDS-PAGE) した。

ウェスタンブロットング

ブロットングにはニトロセルロース膜を使用し、1 次抗体 (36B 抗体を含むハイブリドーマ培養上清)、2 次抗体 (AP 標識抗マウス IgA 抗体) と反応させて 36B 抗体特異的なバンドを検出した。

2 次元電気泳動用のサンプル調製液の検討

SDS-PAGE と同様の方法で大核を含む沈殿を集

め、この沈殿に 2-D Protein Extraction Buffer-Trial Kit (GE Healthcare) の各サンプル調製液 (4 種類) を加え可溶化した。このサンプルを遠心した上清に SDS サンプル調製液を加え SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロットングを行った。

2 次元電気泳動

SDS-PAGE と同様の方法で大核を含む沈殿を集め、この沈殿に 2-D Protein Extraction Buffer-Trial Kit の Buffer-VI (Urea, Thiourea, CHAPS, NDSB 201) を加え、ホモジェナイザーを使って可溶化し、遠心した上清をサンプルとした。等電点電気泳動には pH 範囲 3-10 のアガロースゲル (ATTO Agar GEL) を使用し、300 V 定電圧で 210 分間泳動した。2 次元目の SDS-PAGE には 10% アクリルアミドゲル (ATTO e・バジェル) を使用し、20 mA で 85 分間泳動した。

【結果】まず、SDS-PAGE (1 次元) で分離したサンプルのウェスタンブロットングを行った。SDS-PAGE 用のサンプル調製液でサンプルを可溶化したところ、36B 抗体と特異的に反応する分子量約 55-kDa と 70-kDa のバンドが主に検出された。次に、ウェスタンブロットングの条件を検討するために、1 次抗体を 5, 25, 50 倍に、2 次抗体を 2,000, 4,000, 8,000 倍に希釈し、泳動するサンプルの量を考えてウェスタンブロットングを行ったところ、やはり 55-kDa と 70-kDa のバンドが検出された。一方、泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルー

(CBB) で染色したところ、多くのバンドが確認され 36B 抗原のバンドを特定することはできなかった。

次に、2次元電気泳動用のサンプル調製方法を検討するために、2-D Protein Extraction Buffer -Trial Kit に含まれる4種類のサンプル調製液を用いてサンプルを作り、SDS-PAGE (1次元) を行い、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、4種類のサンプル調製液のどれを用いた場合でも分子量約 70-kDa のバンドだけが検出された。また、ゲルを CBB 染色したところ、4種類のサンプル調製液のうちの Buffer-VI が最も良くタンパク質を可溶化していた。そこで、この Buffer-VI を用いて2次元電気泳動を行うこととした。

2次元電気泳動後のゲルを用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、分子量約 70-kDa 付近にスポットを確認することができた。このスポットの等電点はアルカリ性側に寄っていたが正確な値はわからなかった。また、2次元電気泳動したゲルを CBB 染色および銀染したが、ウエスタンブロッティングで確認された 70-kDa のスポットと同じところにはスポットが検出できなかった。

【考察】 SDS-PAGE 用のサンプル調製液でサンプルを可溶化した場合、ウエスタンブロッティングで 36B 抗体と特異的に反応するバンドが 2本 (55-kDa, 70-

kDa) 検出されたので、この両者かあるいは一方が 36B 抗原であると考えられる。しかし、このどちらの可能性が正しいのかを検証するためには、さらに検討を重ねる必要がある。また、2次元電気泳動用のサンプル調製液を用いた場合、ウエスタンブロッティングで 36B 抗体と特異的に反応するバンドは 70-kDa のものだけになった。これは、2次元電気泳動用のサンプル調製液では、55-kDa のタンパク質が可溶化できなかったか、あるいは、このサンプル調製液で 55-kDa のタンパク質が変性して抗原性を失った可能性が考えられる。

2次元電気泳動後のゲルをウエスタンブロッティングして 70-kDa のスポットが検出されたが、染色 (CBB 染色と銀染) したゲル上の同じ場所にスポットが検出できなかったことから、この 70-kDa のスポットに含まれるタンパク質量は、質量分析等で解析するにはかなり少ないものと考えられる。今後は、サンプルに使用する細胞数を増やして、核分画を精製するなどした後で、サンプル調製することを考えている。そして、この 70-kDa のタンパク質を精製し、部分アミノ酸配列を決定して、この遺伝子のクローニングにつなげたい。

【文献】

- 1) Yanagi (1992) Dev. Growth Differ., 34, 613-618.