

## ユーグレナ類鞭毛虫ペラネマ (*Peranema trichophorum*) における IP39 類似タンパク質遺伝子の存在

竹内 喬平<sup>1</sup>, 末友 靖隆<sup>2</sup>, 洲崎 敏伸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大・院理・生物, <sup>2</sup>岩国市立マイクロ生物館)

### Presence of IP39-homologous genes in the euglenoid flagellate *Peranema trichophorum*

Kyohei TAKEUCHI<sup>1</sup>, Yasutaka SUETOMO<sup>2</sup> and Toshinobu SUZAKI<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ. <sup>2</sup>Iwakuni City Micro life Museum)

#### SUMMARY

The plasma membrane of *Euglena gracilis* possesses a densely arranged array of intra-membrane proteins, IP39, which are implicated in the mechanism of rounding-up movement of the cell (euglenoid movement). *Peranema trichophorum* is regarded as an ancestral species of euglenoid flagellates, and also shows typical euglenoid movement. Western bolt analysis using anti-peptide antibodies against IP-39 showed the presence of homologous proteins in the membrane fraction of *P. trichophorum*, and PCR using gene-specific primers for IP39 amplified three DNA sequences in *P. trichophorum*. We further determined DNA sequences of these PCR products. We found that they have a high homology to the partial sequence of IP39 gene. These results reveal the existence of protein(s) in *P. trichophorum* that are homologous to IP39.

**【目的】** IP39 は *Euglena gracilis* の原形質膜内に緻密に存在し、ユーグレナ運動に関わっている可能性があると考えられている。我々は以前に *E. gracilis* より原始的な捕食性ユーグレナ類 *Peranema trichophorum* の原形質膜に IP39 類似タンパク質が発現し、ユーグレナ運動に関与している可能性が免疫学的・遺伝学的な研究により示した。そこで今回は、*P. trichophorum* に IP39 相同遺伝子が存在している可能性を IP39 遺伝子特異的な primer を用いて増幅された PCR 産物の配列を決定することで検証した。

**【材料と方法】** 実験に用いた *P. trichophorum* は、野外 (USA) より単離した。細胞の培養液には 20% *Chlorogonium* 培地 + 0.01% milk in 0.01% Knop 液を 120°C で 15 分オートクレーブして用い、餌として無菌的に培養した *Chlorogonium capillatum* と共に 150 ml フラスコで3週間培養した。*P. trichophorum* から CTAB 法によって全ゲノムを精製し PCR 実験に用いた。PCR 実験では全ゲノムに対して IP39 遺伝子特異的 primer を用いた PCR を行った。PCR 産物は Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、pGEM®-T Easy Vector systems (Promega) を用いてプラスミドへと組み込んだ。プラスミドをヒートショックによりコンピテントセルに取り込ませ、形質転換を誘導し、増幅されたプラスミドを blue-white セレクションとアルカリ-SDS 法で回収した。シークエンスは BigDye キット (Applied Biosystems) を用いて作製したサンプルを

3130 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) を用いて解析した。同定された配列の DNA、アミノ酸配列の各相同性検索には、BLAST<sup>1)</sup> を利用した。膜タンパク質の判定と膜貫通領域予測には SOSUI<sup>2)</sup> を利用した。タンパク質のリン酸化サイトの予測には NetPhos analysis<sup>3)</sup> を利用した。

**【結果と考察】** IP39 遺伝子特異的 primer を用いた PCR によって増幅が確認された3つのバンドに含まれる PCR 産物の塩基配列を決定したところ、600 bp のバンドに含まれていた配列が IP39 遺伝子に対して高い相同性を示した。しかし、その配列は α-IP39 に対して相同性の高い領域と β-IP39 に対して相同性が高い領域とが交互に現れることが確認でき、実験の過程で生じた人工配列である可能性も考えられた。そこで、再度、ゲノム DNA の精製から全ての工程を試行したが同様な配列が同定され、実験の再現性が確認された。さらに、この primer を用いた *E. gracilis* に対する PCR 実験と泳動結果が異なり、α-IP39 と β-IP39 の部分配列と完全に一致する配列は検出されていないことから *E. gracilis* ゲノムのコンタミネーションの可能性は低いと考えられた。これらのことから、今回同定された 3 つの配列が *P. trichophorum* に存在する IP39 相同遺伝子であると判断した。次に、これらの配列から、アミノ酸配列を推定すると、配列 3 は全域に渡って IP39 との相同性が高かったが、配列 1 と 2 では DNA 上での 1 塩基大きく異なっていた。そこで、2 次構造を推定し

たところ、配列 3 だけでなく配列 1 と 2 の推定 2 次構造でも IP39 との大きな構造上の際は確認できなかった。しかし、配列 1 と 2 では、2 つ目の細胞外ループの長さが IP39 と異なり、C 末端側の細胞内側領域で、アミノ酸残基の電荷が大きく異なっており、リン酸化可能部位が IP39 より 1 つ多いなど、C 末端側に差異が集中していた。α-IP39 と β-IP39 の間で差異が確認されるのもこの C 末端側の細胞内領域であることから、N 末端側の細胞内領域や第 1 細胞外ループが IP39 の機能の維持に重要である可能性も考えられる。今後、この *P. trichophorum* の IP39 相同配列の全長配列を決定すると共に発現解析を行

い、*P. trichophorum* に IP39 相同タンパク質が存在している可能性を検証し、IP39 とユーグレナ運動の関係性の検証に役立てていきたい。さらに、他のユーグレナ類の生物でも IP39 相同遺伝子の存在可能性を検証し、IP39 とユーグレナ運動の関連について広範な知見を得ていきたい。

#### 【引用文献】

- 1) <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>
- 2) [http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)
- 3) <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/Phos>