

織毛虫ブレファリズマ属のガモン1の接合対誘導能の解析

小林 真弓¹, 三浦 満美子¹, 杉浦 真由美², 春本 晃江³

(¹奈良女子大・院人間文化・生物, ²神戸大・院理・生物, ³奈良女子大・理・生物)

Analysis of the ability of Gamone1 to induce conjugation among four species
in the genus *Blepharisma*

Mayumi KOBAYASHI¹, Mamiko MIURA¹, Mayumi SUGIURA² and Terue HARUMOTO³
(¹Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Culture and Humanities, Nara Women's Univ. ²Dept. Biol., Grad. Sch.
Sci., Kobe Univ. ³Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

In the genus *Blepharisma*, 21 morphologically distinct species are classified into four groups according to the

macronuclear shape. Conjugation usually begins after mating type I secretes mating pheromone Gamone1 under a food-deprived condition. Gamone1 is a glycoprotein in *B. japonicum*; it reportedly functions as species-specific signaling molecule. Therefore, Gamone1 can be a barrier to interspecies conjugation. However, our previous report suggested the possibility of interspecies conjugation in the genus *Blepharisma*. In this study, we examined the ability of Gamone1s of *B. undulans* (binodal macronuclei, group II), *B. americanum* (multinodal macronuclei, group III) and *B. japonicum* (filiform macronuclei, group IV) to induce pair formation in *B. stoltei* (group IV), and attempted to determine the extent of effect of Gamone1 as barriers. Results showed that Gamone1 of *B. japonicum*, but not the other two species, induced pair formation in type II cells of *B. stoltei*. We examined *gamone1* genes in these four species. The amino-acid sequence homology of Gamone1 was approximately 90% in the same macronuclear group and 75% in the different groups. Each Gamone1 has four presumptive N-glycosylation sites, and our results suggest that Gamone1 of these species have N-linked oligosaccharide with binding affinity to ConA beads. Furthermore, Gamone1 molecular weights were suggested as differing among the three species, which might be attributable to the difference of sugar residues attached to the Gamone1. Consequently, barriers to conjugation in the genus *Blepharisma* might have been established among macronuclear groups by difference in conformation or/and sugar arrangement of Gamone1.

[目的] *Blepharisma* 属には形態により分類された 21 種が存在し、大核の形態により大きく 4 つのグループに分けられる¹⁾。それぞれの種は相補的な接合型である I 型と II 型を持ち、飢餓状態になると、I 型から Gamone1 が分泌され、接合過程が始まる。Gamone1 は、糖タンパク質²⁾で種特異的³⁾であると報告されている。そのため、異種間での接合を防ぐバリアとしての働きがあると考えられる。しかし、*Blepharisma* の場合、異種間で接合が起こった例が報告されており^{3,4)}、Gamone1 が異種間での接合を防ぐバリアとして完全には機能していない可能性が示唆された。そこで、Gamone1 が接合過程でどの程度バリアとして働いているかを明らかにするため、Gamone1 の種特異性について再検討を行った。

[材料と方法]

本研究に用いた細胞

接合型 I 型の *B. undulans* (大核のグループ II)、*B. americanum* (グループ III)、*B. japonicum* (グループ IV)、そして II 型の *B. stoltei* (グループ IV) を用いた。

異種に対する Gamone1 の接合対誘導能

B. stoltei の II 型細胞とそれぞれの種の I 型細胞の細胞外液 (CFF) を混ぜ合わせ、*B. stoltei* の接合対形成を誘導できるかを Unit 法により測定した。また、使用した CFF 中に Gamone1 が含まれていることを Western blotting により確認した。一次抗体として、*B. japonicum* の Gamone1 の C 末端を認識するペプチド抗体 (G1-P6 抗体) を用いた。

Gamone1 遺伝子の単離と Gamone1 の一次構造の比較

新たに *B. undulans* の Gamone1 遺伝子を単離し、配列を決定した。PCR のプライマーには Gm-30Fw (5'-ctatattaagccgatcttc-3') および Gm1138Rv (5'-gtgatttgcctcagagttc-3') を使用した。そして、推定 mature-Gamone1 の一次構造の比較を行った。また、モチーフ検索を行い糖鎖結合部位を推測した。

各 Gamone1 の ConA に対する親和性

ConA beads (VECTOR: AL-1003) と CFF を混ぜバッチ精製を行い、Gamone1 が ConA に結合するかどうかを調べた。

Gamone1 の分子量の比較

I 型の CFF を用いて SDS-PAGE を行い、Western blotting により Gamone1 のバンドを検出し、検量線をもとに分子量を求めて比較した。

[結果と考察] 同じ大核のグループに属する *B. japonicum* の CFF のみ *B. stoltei* の II 型細胞の接合対形成を誘導できた。一方、異なるグループに属する *B. undulans* および *B. americanum* の CFF は、接合対形成を誘導できなかった。よって、Gamone1 は同じ大核のグループに属する比較的近縁と考えられる種の接合対形成は誘導できるが、異なる大核のグループの種の接合対形成は誘導できない可能性が示唆された。

続いて、Gamone1 の分子構造について調べた。4 種間での Gamone1 の相同性は、大核のグループが同じ場合はアミノ酸レベルで約 90%、異なる場合は約 75% であった。*B. japonicum* の Gamone1 に結合している糖鎖が接合対形成を誘導するうえで重要な役割を果たしていると考えられること⁵⁾から、モチーフ検索では糖鎖結合部位に注目した。各 Gamone1 のアミノ酸配列中に N 結合型糖鎖結合部位はいずれも推定で 4 か所あったが、*B. undulans* は他の 2 種と分布が異なっていた。さらに、*B. japonicum* の Gamone1 は ConA と高い親和性を持つ N 結合型糖鎖を持つことが報告されている⁶⁾が、*B. undulans* および *B. americanum* の Gamone1 も同様に N 結合型糖鎖を持つことが示唆された。SDS-PAGE より明らかになった I 型 3 種の Gamone1 の推定分子量の差は、アミノ酸配列から算出された分子量の差より大きかった。そのため、結合している糖鎖が異なる可能性が示唆された。

以上の結果より、*Blepharisma* 属における接合を防ぐバリアは、Gamone1 の分子構造の違い (アミノ酸配列の違いによる立体構造の違い、または糖鎖の結

合位置, 数, 種類の違い) により大核のグループごとに構築されている可能性が示唆された。

今後, さらに多くの種においても同様に調べ, Gamone1 の分子構造と接合対形成能について検討を行い, Gamone1 が接合過程でどの程度バリアとして働いているかを調べたい。さらに, Gamone1 受容体にも注目したい。この研究を通して, *Blepharisma* 属内で生殖隔離が成立した過程を明らかにすることも期待できる。

【文献】

- 1) Giese (1973) *Blepharisma*, Stanford University Press, 304-333.
- 2) Braun and Miyake (1975) *FEBS lett.*, 53, 131-134.
- 3) Miyake and Bleyman (1976) *Genet. Res., Camb.*, 7, 267-275.
- 4) Kobayashi et al. (2010) *Jpn. J. Protozool.*, 43, 31-32.
- 5) Iwasaki et al. (2009) *Jpn. J. Protozool.*, 42, 75-76.
- 6) Sugiura and Harumoto (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14446-14451.