

核内共生細菌ホロスボラオブツサの感染型ペリプラズム特異的 63-kDa タンパク質の DNA 結合能

河野 英明, 宮川 勇, 藤島 政博
(山口大・院理工・環境共生系)

DNA binding ability of 63-kDa periplasmic protein of the infectious form of the edonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa*

Hideaki KAWANO, Isamu MIYAKAWA and Masahiro FUJISHIMA
(Dept. Environm. Sci. Engn., Grad. Sch. Sci. Engn., Yamaguchi Univ.)

SUMMARY

Gram-negative bacterium *Holospora obtusa* is a macronucleus-specific symbiont of the ciliate *Paramecium caudatum*. Infection of this bacterium is known to change the host's gene expressions. A 63-kDa periplasmic protein with two DNA-binding motifs of the infectious form of this bacterium is secreted into the host macronucleus soon after bacterial invasion into the nucleus. Results of SDS-DNA PAGE containing calf thymus DNA and immunoblotting with a monoclonal antibody specific for the 63-kDa suggest that the 63-kDa can bind DNA. Fractionation of supernatants of the sonicated infectious forms of this bacterium with a DNA-cellulose column also showed DNA-binding ability of the 63-kDa protein. These results suggest that the protein functions somehow change the host's gene expressions by binding to the host macronuclear DNA.

【目的】 グラム陰性細菌ホロスボラオブツサはゾウリムシの大核特異的共生細菌である。ホロスボラを持つゾウリムシではヒートショックタンパク質遺伝子の *hsp60* と *hsp70* の発現量が増加する⁴⁾。さらに、ホロスボラを持つゾウリムシはホロスボラを持たないゾウリムシが泳げない 40°C の高温や、4°C の低温でも遊泳できる³⁾。ホロスボラが感染すると宿主の遺伝子発現が変化する⁵⁾。ホロスボラには感染型と増殖型の 2 つの形態が生活環の中にあり、63-kDa タンパク質は感染型のペリプラズムに局在し、増殖型には存在しない。この 63-kDa タンパク質は、感染型ホロスボラオブツサが宿主大核内に侵入すると菌体外に分泌される。また、宿主核内で増殖型から感染型に分化すると菌体外に分泌される。このタンパク質の遺伝子からの推定されるアミノ酸配列を GENOMENET 内の BLOCKS データベースで検索すると、2 つの DNA 結合領域を持つことが示された¹⁾。ホロスボラが菌体外に分泌するタンパク質で宿主核 DNA と結合する可能性が示されたものは、これが最初である。これらの結果は、63-kDa タンパク質が宿主 DNA に結合して、遺伝子発現を調節する可能性を示唆している。そこで本研究では、子牛胸腺 DNA を含む分離ゲルを用いた SDS-DNA PAGE と DNA セルロースカラムを用いて 63-kDa タンパク質の DNA 結合能の有無を調べた。

【材料と方法】

培養と *Holospora obtusa* の単離

Holospora obtusa の F1 株を維持した *Paramecium caudatum* の RB-1 株をレタスジュース培養液中、25°C で培養した。感染型 *H. obtusa* の単離は宿主のホモジネートを 70% (v/v) パーコールで密度勾配遠心して単離した²⁾。

SDS-DNA PAGE

単離した *H. obtusa* を Laemmli's 溶解バッファーで処理して溶解した。分離ゲルは 10 µl ml⁻¹ の子牛胸腺 DNA (Worthington biochemical corporation) を含むものを用いた。電気泳動後の分離ゲルを TE バッファーで洗浄し、1 µg ml⁻¹ のエチジウムブロミドで染色して紫外線照射下で観察した。

DNA カラムクロマトグラフィー

DNA セルロース (Amersham Biosciences) カラム (150 µl) に、1.0 × 10⁸ の感染型 *H. obtusa* を超音波破碎し、20,000 g で 10 分の遠心上清 50 µl を通した。次に、カラムを 1 mM EDTA を含む 10 mM Na₂K-PB を用いて 100 µl ずつ合計 1 ml で洗浄した。その溶出液は 100 µl ずつ回収した。その後、0.2 M NaCl を含む Na₂K-PB を 100 µl ずつ合計 1 ml で洗浄し、その溶出液を 100 µl ずつ回収した。全ての溶出分画は、SDS-PAGE とイムノブロットに用いた。

【結果】

SDS-DNA PAGE

イムノブロットの結果、分子量 63-kDa の位置にバンドが検出され、SDS-DNA PAGE でも分子量 63-kDa の位置にエチジウムブロミドの蛍光が消失した

バンドが確認され、63-kDa タンパク質が DNA に結合する性質を持つことが示された。SDS-DNA PAGE では 63-kDa 以外にも 65-, 57-, 53-, 40-, 36-kDa にもバンドが検出され、DNA に結合する性質を持つ物質が複数存在することが示された。

DNA カラムクロマトグラフィー

カラムに通したサンプルでイムノブロットを行った。その結果、DNA 結合分画に 63-kDa が検出された。SDS-PAGE ゲルを銀染色すると、63-kDa 以外に分子量 81-, 65-, 61-, 53-, 40-, 38-, 36-, 35-, 33-, 32-kDa のバンドが検出され、SDS-DNA PAGE と同様に 63-kDa 以外にも DNA に結合する性質を持つ物質が複数存在することが示された。

【考察】 イムノブロットの結果は抗原の分子量が 63-kDa であることを示した。これは Abamo et al.¹⁾の結果と一致した。SDS-DNA PAGE と DNA カラムクロマトグラフィーの結果から、63-kDa は DNA 結合能があることが証明された。さらに、63-kDa 同様に、65-, 53-, 40-, 36-kDa のバンドも DNA 結合能があることが示唆されが、57-kDa のバンドは SDS-DNA PAGE では検出されたが、DNA カラムクロマトグラ

フィーで検出できなかった。DNA カラムクロマトグラフィーでのみ検出された 81-, 61-, 38-, 35-, 33-, 32-kDa のバンドは DNA 結合タンパク質に結合して複合体を形成する物質の可能性がある。我々の実験結果は、特定の塩基配列を認識して DNA に結合するのではなく、単に塩基性のために DNA に結合した可能性があるバンドの存在を排除できない。しかし、63-kDa には DNA 結合能があることが証明された。この結果は大核内に分泌された 63-kDa が、宿主 DNA に結合し、遺伝子発現を変化させる可能性を示唆している。

【文献】

- 1) Abamo et al. (2008) FEMS Microbiol. Lett., 280, 21-27.
- 2) Fujishima et al. (1990) Zool. Sci., 7, 849-860.
- 3) Fujishima et al. (2005) FEMS Microbiol. Lett., 243, 101-105.
- 4) Hori and Fujishima (2003) J. Eukaryot. Microbiol., 50, 293-298.
- 5) Nakamura et al. (2004) FEMS Microbiol. Lett., 240, 209-213.