

Sorogena stoianovitchae の子実体形成に関わる糖鎖の探索

杉本大樹 (金沢大・自然科学)

Different glycans are expressed during fruiting body development in the aggregative ciliate *Sorogena stoianovitchae*

Hiroki SUGIMOTO (Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University)

SUMMARY

The aggregative ciliate *Sorogena stoianovitchae* forms an aerial fruiting body. Under conditions such as high cell density and mild starvation, a number of *Sorogena* cells aggregate beneath the water surface and the aggregate rises aerially by secreting stalk material that consists of polysaccharides (probably mucopolysaccharides). This suggests that some kind of glycan may be involved in the development of the fruiting body. Here, I survey the expression patterns of glycans using fluorescein (FITC)-labeled lectins (Con A, WGA, RCA120, DBA, UEA I, SBA, and PNA) during the development of the fruiting body. When using Con A, I observed punctate fluorescence of organelles similar to mucocysts over the whole cytoplasm at all the examined stages of the development; however, the fluorescence gradually decreased as the development proceeded. When using WGA, I observed fluorescence around the oral structure of the preaggregation cell and small dots of cytosolic fluorescence widely dispersed in the cells after the aggregation. When using the other lectins, I observed no fluorescence. These results suggest that *Sorogena* mainly utilizes the high-mannose type N-linked glycan and proteoglycan. The decrease of punctate fluorescence after the secretion stage labeled by Con A suggests that N-linked glycan is secreted as the mucous matrix and stalk material. The fluorescence patterns in the oral structure and the cytosol, labeled by WGA, show that the proportions of the cell change before and after the aggregation, although functions of these glycans are unclear.

【目的】 集合性繊毛虫 *Sorogena stoianovitchae* は、高密度で飢餓状態に置かれたとき、数百の細胞が集合する。そして、集合体は粘液物質や柄物質を分泌し、最終的に水面から突き出た子実体を形成する。この子実体形成過程は、形態的特徴や、タンパク質合成阻害の結果から、集合期、接着期、分泌期、上昇期、完成期の五つのステージに分けることが出来る。これまでの研究から、柄に含まれる多糖が集合体の上昇に重要な働きをしていることや、集合物質がムコ多糖から構成されている可能性が示唆されている。これらのことから、*Sorogena* の子実体形成は、ステージ特異的に糖鎖を発現して進行していくと考えられる。今回、それぞれ特異的な糖構造を認識する7種類の蛍光レクチンを用い、子実体形成中の染色パターンの違いを比較した。

【方法】 子実体形成の誘導は、高密度にした *Sorogena stoianovitchae* (ATCC#50031)をシャーレにまき、明暗サイクル (12 h:12 h) で行った。暗期開始を0 hとした。

レクチン染色は0, 6(集合前), 12(集合期), 13(接着期), 13.5(分泌期), 14(上昇期), 15(完成期) hの細胞を用いた。遊泳細胞(0, 6 h)は、遠心し集めた後、5%ホルマリンで固定した。洗浄後、FITCでラベルされた各レクチン(Con A, WGA, DBA, PNA, RCA120, SBA, UEA I)を加えた。暗期で1 hインキュベートした後、洗浄し退色防止剤(1,4-diazabicyclo[2,2,2]octan)を加え、蛍光顕微鏡(B励起)で観察した。集合後の場合(12 h以降)、集合体をつまみ、ディプレッションスライド上で5%ホルマリン固定し、洗浄した。そして、レクチン染色した後、洗浄し、蛍光顕微鏡(B励起)で観察した。コントロールとして、各レクチンに

に対する競合糖を加えインキュベーションした後に、レクチン染色を行った。

【結果】Con A で染色した場合、細胞全体に、ムコシストに似た細胞小器官に蛍光が観察された。この蛍光は、すべてのステージで観察されたが、集合期や接着期に最も多く、分泌期、上昇期と子実体形成が進むにつれて、細胞内の蛍光の数は減少した。そして、上昇期の細胞では、蛍光が観察されないものもあった。WGA で染色した時、集合前の細胞 (0, 6 h) は、口部で顕著な蛍光を示した。この蛍光は、集合後の細胞では観察されなかった。一方、集合後の細胞は、細胞質全体に小さなドット状の粒子が観察された。繊毛は、WGA によってすべての時期で染色された。他のレクチンを使用した場合、細胞は染色されなかった。

【考察】今回、Con A と WGA でしか蛍光が観察されなかったことから、*Sorogena* の子実体形成には、他のレクチンが認識する、N-アセチルガラクトサミン、フコース、ガラクトースを含む糖鎖ではなく、Con A が認識するマンノースやグルコース、WGA が認識する N-アセチルグルコサミンやシアル酸を含む

糖鎖を主に使用していると考えられる。今回染色された糖鎖は、マンノースと N アセチルグルコサミンから構成されるハイマンノース型 N-グリカン、主にアセチルグルコサミンからなるプロテオグリカンの一種である可能性が考えられる。Con A によって観察された蛍光の数の減少は、この物質が細胞外へ分泌され、粘液物質や柄物質として働いているためと考えられる。また、WGA で観察された、口部蛍光の減少は、おそらく、飢餓やシスト化に向けた口部の退化を示しているのだろう。細胞内の小さなドット状のパターンは、集合後から見られたが、何らかの細胞状態の変化を表していると考えられる。また、観察した全時期で、繊毛に対するレクチン染色パターンは変化せず、子実体形成に繊毛は関与していないと考えられる。

【文献】

- Bardele C.F., Foissner W. & Blanton R.L. (1991) J. Protozool. 38:7-17.
Blanton R.L., Warner S.A. & Olive L.S. (1983) J. Protozool. 30:617-624.
Sugimoto H. & Endoh H. (2006) J. Eukaryot. Microbiol. 53:96-102.