

繊毛虫ブレファリズマにおける接合誘導物質ガモン1抗体を用いた受容体の探索

杉浦 真由美^{1,2}, 春本 晃江³, 洲崎 敏伸¹

(¹神戸大・院理・生物, ²学術振興会特別研究員PD, ³奈良女子大・理・生物科学)

Analysis of gamone 1 receptor in the ciliate *Blepharisma japonicum* using a gamone 1 antibody

Mayumi SUGIURA^{1,2}, Terue HARUMOTO³ and Toshinobu SUZAKI¹

(¹Dept. Biol., Grad. Sch. of Sci., Kobe Univ., ²JSPS Research Fellow, ³Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

Most ciliated protozoa undergo conjugation under food-deprived conditions. In some species, conjugation-inducing substances (mating substances, mating pheromones or gamones) have been identified. However, receptors for these substances have not been well studied. Conjugation of *Blepharisma japonicum* is induced by specific cell-cell interaction between cells of complementary mating-types I and II, and involves conjugation-inducing substances called gamones. The glycoprotein gamone1, is secreted by type I cells, and is a trigger molecule for conjugation that is specifically recognized by mating type II cells. Previously, we purified gamone1 protein and isolated the *gamone1* gene. In this study, an antibody was raised against a peptide of 14 amino acids in the C-terminal region of gamone1 (named G1_P6 antibody). We showed by western blotting that G1_P6 antibody could detect a small amount of gamone1 in a cell-free fluid, and that the antibody-bound gamone1 retained its conjugation-inducing activity. Using G1_P6 antibody, we localized presumptive gamone1-receptors in gamone1-stimulated type II cells with a confocal laser scanning microscope. After incubation with gamone1 for 1.5 hrs, strong fluorescence signals were detected in the adoral zone of membranelles (AZM), cilia and ciliary rows.

【目的】多くの繊毛虫は、富栄養条件下では無性生殖により二分裂で増殖するが、貧栄養条件下におかれると分裂をやめ、相補的な接合型細胞間で有性生殖（接合）を開始する。繊毛虫における接合開始の分子機構の解明に向けて、これまでにいくつかの種で接合誘導物質が同定された。繊毛虫の接合誘導物質に関しては、膜結合型と分泌型の2つのタイプの存在が示唆されているが、これまでに分子的特徴が明らかにされているのは分泌型の接合誘導物質のみである。また、接合誘導物質に対する受容体に関する研究は乏しく、接合開始機構の全容解明には至っていない。本研究では、2種類の接合型（I, II）と接合誘導物質（ガモン1, ガモン2）をもつ繊毛虫ブレファリズマにおいて、ガモンに対する受容体を探索し、接合へと導くガモン-受容体相互作用を分子レベルで解析することを将来的な目標とした。ブレファリズマでは、I型細胞が分泌するガモン1が接合の開始シグナルとしてはたらき、II型細胞に特異的に作用してガモン2の合成、分泌と接合対形成を誘導する¹⁾。そこで本研究では、ガモン1に対するペプチド抗体を作製し、その特性を調べ、II型細胞が有すると考えられるガモン1受容体の検出を試みた。

【材料と方法】細胞は*Blepharisma japonicum*のI型細

胞（R1072株）およびII型細胞（Hotta株）を用いた。培養は、小麦若葉粉末（WGP）抽出液に *Enterobacter aerogenes* を接種し、25°Cで2日間培養したものをを用いて行った。細胞を初期定常期に達するまで25°Cで培養した後、生理的塩類溶液（SMB）で洗い、集めた細胞をSMBに浮遊させて25°Cで一晩インキュベートすることにより飢餓状態においた。実験に用いたCFF1（cell-free fluid 1；ガモン1を含む細胞外液）は、上記のように調製したI型細胞の浮遊液に0.01%BSAと合成ガモン2を添加し一晩置いた後、遠心と吸引ろ過によって細胞を完全に取り除くことによって得た。作製したガモン1ペプチド抗体のガモン1に対する感受性を調べるため、I型細胞のwhole cell sampleおよびCFF1をSDS-PAGEにかけPVDF膜へブロットニングし、1次抗体としてガモン1抗血清（1:5,000）、2次抗体にHRP標識抗ウサギIgG抗体（1:100,000）を用いてウエスタンブロットニングを行った。また、ガモン1抗体の接合阻害活性を調べるため、ガモン1が含まれるCFF1に1/50, 1/100, 1/250, 1/500の濃度になるようにIgG精製処理を行ったガモン1抗血清またはウサギ正常血清を加え、室温で1時間インキュベートした。各サンプルにテスター細胞（II型細胞）を加え、接合対形成頻度を比較しガモン1活性を測定した。次に、ガモン1抗体が未変

性状態のガモン1と結合することを確認するため、CFF1とガモン1抗血清またはウサギ正常血清を1:100の割合で混合し4°Cで1時間インキュベートした後、プロテインAビーズで処理して上清と沈殿物に分けた。上清をフィルターを過し、ウエスタンブロッティングを行うことによって上清中に残存するガモン1量を検出した。さらに、II型細胞がもつと考えられるガモン1受容体の局在を検出するため、II型細胞をCFF1で処理し1.5時間後に細胞を固定した。1次抗体としてガモン1抗体 (1:100) を、2次抗体としてAlexa Fluor 488標識抗ウサギIgG抗体 (1:500) を用いて蛍光抗体法を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果と考察】 ガモン1のアミノ酸配列と推定上の立体構造をもとに、抗原性が高くガモン1の接合誘導活性に影響を及ぼさないと予測される領域 (C末端領域14アミノ酸: G1_P6) に対するペプチド抗体を作製した。ウエスタンブロッティングを行い、作製したガモン1抗体 (G1_P6抗体) の感受性を調べた結果、CFF1中に約30kDaのガモン1が強いシグナルとして検出され、今回作製したG1_P6抗体はCFF1に含まれる微量なガモン1タンパクを認識できることが示された。また、I型細胞のwhole cell sample中には弱いシグナルとしてしか検出されず、タンパクとして翻訳されたガモン1は細胞内に蓄積されず比較的短時間で細胞外へ分泌される可能性が考えられた。次に、

G1_P6抗体の接合阻害活性を調べた結果、G1_P6抗体またはコントロールIgGとインキュベートしたCFF1中のガモン1活性には顕著な違いは見られなかった。このことより、G1_P6抗体はガモン1の接合誘導活性を阻害しないことが示された。実際にG1_P6抗体が未変性状態のガモン1と結合するかどうかを確認するため、プロテインAビーズを用いて免疫沈降法を行った。その結果、コントロールとして用いたウサギ正常血清とインキュベートした場合に比べて、ガモン1抗血清を用いたときの方がプロテインAビーズ処理の上清中に残存するガモン1の量が著しく減少した。このことよりG1_P6抗体は、未変性状態のガモン1に結合し得るが、その接合誘導活性は阻害しない、つまりガモン1の受容体認識部位とは異なる部位でガモン1と結合する性質をもつと考えられた。次に、G1_P6抗体を用いて、II型細胞が細胞表面に有すると考えられるガモン1受容体の検出を試みた。II型細胞をガモン1で処理し、約10%の細胞で接合対形成が見られたガモン1添加1.5時間後に細胞を固定した。G1_P6抗体を1次抗体として用いて蛍光抗体法を行ったところ、ガモン1で処理した細胞において、口部膜板帯と繊毛、および繊毛列に強いシグナルが検出された。

【文献】

- 1) 春本晃江, 杉浦真由美 (2003) 原生動物学雑誌, 36 (2), 147-172. 総説