

ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) の PV 膜と食胞膜の
SDS-PAGE 解析

熊野 吾郎, 平岡 三和, 洲崎 敏伸 (神戸大・院理・生物)

Comparative SDS-PAGE study of peri-algal and food vacuole membranes
in the ciliate *Paramecium bursaria*

Gorou KUMANO, Sawa HIRAOKA and Toshinobu SUZAKI
(Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Kobe Univ.)

SUMMARY

Paramecium bursaria normally harbors several hundred symbiotic *Chlorella* cells. Each symbiotic *Chlorella* is enclosed in a perialgal vacuole membrane that is derived from the host food vacuole membrane. We isolated food vacuoles and perialgal vacuoles from *P. bursaria* to compare proteins in those membranes using SDS-PAGE. The host paramecia were incubated with a mixture of fluorescent and magnetic beads for food-vacuole formation. The paramecia were gently homogenized by passing them through a 30-gauge needle, and the food vacuoles were collected on a magnet. Peri-

algal vacuoles were isolated using Percoll density gradient centrifugation. Comparative SDS-PAGE showed that the protein constituents of the perialgal vacuoles differ from those of the food vacuoles, but they do have some proteins in common.

【目的】 繊毛虫ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* は、その細胞内に数百個のクロレラを共生させている。クロレラはひとつずつがミドリゾウリムシの食胞に由来する一重の膜からなる小胞 (Perialgal vacuole: PV) で包まれており、PV 膜は共生の確立、維持に重要な役割を果たしていると考えられている。PV 膜はライソソームが融合しないことなどから食胞膜とは区別されているが、その膜タンパク質構成や膜の生理学的特性などは明らかになっていない。本研究では PV 膜に特異的なタンパク質の同定を目指し、高純度の PV 膜を単離し、食胞膜と比較しつつ SDS-PAGE 解析を行った。

【方法】 クロログニウムを用いた無菌二者培養法で大量培養したミドリゾウリムシを洗浄・濃縮し、3 $\mu\text{g/ml}$ のリゾチーム溶液を加えトリコシストを放出させた。PV 膜は、平岡の方法¹⁾に従いを単離した。ミドリゾウリムシを洗浄・濃縮し、蛍光ビーズと磁性ビーズの混合懸濁液を与え、1 時間室温で攪拌した。その後、PV の単離と同様にトリコシスト放出、破碎、遠心除去と Percoll 密度勾配遠心によって不要成分を除去した。食胞膜分画は遠心管の底にペレットを形成した。この食胞を Percoll 溶液とともに回収し、強力な磁石表面に滴下した。この作業により、食胞形成に使われなかった磁性ビーズと磁性ビーズを含有する食胞を、磁石表面に回収できた。この食胞に新しい破碎液を滴下して洗浄し、SDS-PAGE 用サンプルバッファーを滴下して食胞膜を溶解した。以上の方法で得た PV 膜サンプルと食胞膜サンプルを電気泳動にかけて解析をおこなった。

【結果と考察】 食胞の形成は蛍光ビーズを取り込んだ食胞を蛍光顕微鏡によって観察することによっ

て確認した。その結果、約 1 時間でほぼすべての細胞で食胞の形成が確認された。食胞は細胞内に数百個含まれる PV と違い、1 個体あたり多くても 30 個前後しか形成されなかった。そのため、食胞の単離には PV 単離の 10 倍量の細胞を使用した。単離した食胞にをグルタルアルデヒド・オスミウム同時二重固定法により固定し透過型電子顕微鏡で観察を行ったところ、磁性ビーズを内包した食胞が認められ、単離に成功していたことが確認できた。また、電気泳動の結果、PV 膜と食胞膜それぞれに特徴的なバンドや、PV 膜で濃く検出されるもの、食胞膜で濃く検出されるものなど、PV 膜と食胞膜では明らかに泳動パターンに違いが認められた。これらのバンドが PV 膜と食胞膜の機能や性質の違いに関わるタンパク質であると思われる。その一方で、共通の構成タンパク質と思われるバンドも見られた。今回食胞単離に用いたミドリゾウリムシは細胞内に共生クロレラを保持している。これらの共生クロレラは PV 膜に包まれており、このような PV 膜は食胞単離の過程で除去しきれず、少量が混入した可能性がある。そのため、食胞を単離し行った電気泳動の結果で見られたバンドは、本当に食胞由来のタンパク質であるのか、PV 膜の混入によるものかは判断できない。そこで今後は共生クロレラを除去した白いミドリゾウリムシを用いて食胞を形成させることで、PV 膜の含まれていない食胞膜分画を得る方法を確立したい。高純度の食胞膜と PV 膜を比較解析することができれば、PV 膜特異的に発現しているタンパク質を同定しその機能や修飾の有無を解析することが可能となる。

【文献】

- 1) 平岡三和ら (2008) 原生動物学雑誌, 41, 93-94.