

ゾウリムシ核内共生細菌ホロスポラ・オブツサの共生系の 成立機構に関する分子細胞生物学的研究

道羅英夫*

【目 的】

原生動物であるゾウリムシはさまざまな細胞内共生体を持っていることで知られている。中でもゾウリムシの大核内に共生するグラム陰性細菌ホロスポラ・オブツサはその特有な生活環と大核への特異的な感染性を示すという点で非常に興味深い共生細菌である。ホロスポラ・オブツサは宿主が増殖している間は増殖型と呼ばれる形態を示し、宿主大核内で二分裂によって増殖する。ところが、宿主が飢餓状態になると増殖型は分裂をやめて伸長し、感染型へと分化する。感染型はゾウリムシの食胞に取り込まれ、細胞質に出た後、大核核膜を貫通して核内に侵入する。このとき、必ず大核にのみ感染し、小核に感染することはない。感染型は宿主大核に再感染した後、しばらくするといくつかのくびれを生じて多分裂を行い、増殖型へと分化する。

ゾウリムシとホロスポラ・オブツサの共生系が成立するためには、まずホロスポラ・オブツサが宿主の消化機構を回避して大核内へ感染するメカニズムが必要である。これまでの研究において、抗生物質で感染型ホロスポラ・オブツサのタンパク質合成を阻害しても感染が起こることから、感染型はその後の感染過程に必要なタンパク質を感染前から有していることが明らかになっている¹⁾。そこで、感染型に特異的なタンパク質のモノクローナル抗体を作製してその局在性を調べたり、感染に関与していると予想されるペプチドやタンパク質の遺伝子をクローニングしたりすることによって、感染機構の解明を試みてきた。その結果、感染には複数のタンパク質が関与していることが示唆されているが、未だに感染機構は明らかになっていない。そこで、本研究では、ホロスポラ・オブツサの感染に関与しているタンパク質を網

* 静岡大学遺伝子実験施設 准教授

羅的に探索するために、飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) を用いたペプチドマ
スフィンガープリント法 (PMF法) によるタンパク質同定法の検討を行った。

【方 法】

まず、感染型ホロスボラ・オブツサをSDSを含むバッファー中で煮沸して完全に可溶化した
後、2-D Clean-Up Kit (GEヘルスケア) を用いてSDSを除去して通常の8M Ureaを含むサン
プルバッファーに溶解し、これをサンプルとした。1次元目の等電点電気泳動はゲルに
Immobiline DryStrip pH 3-10, 11cm (GEヘルスケア) を使用し、電気泳動はMultiphor II (GE
ヘルスケア) で行った。サンプルのアプライは、サンプルカップを用いてゲルの陽極側にサン
プルをアプライする方法 (サンプルカップ法) とゲルを膨潤させる際にサンプルを染み込ませ
る方法 (膨潤法) の比較を行った。2次元目の電気泳動は12.5%のアクリルアミドゲルを用い
てSDS-PAGEを行った。

感染型ホロスボラ・オブツサのタンパク質を分離した2次元電気泳動ゲルはCBBで染色し
てタンパク質スポットを検出した。これを1mm角に切り出し、DTTとiodoacetamideで還元アル
キル化を行った後、アセトニトリルで脱水し、トリプシン消化液 (Promega) を染みこませて37°C
で一晩消化を行った。トリプシンで消化されたペプチドフラグメントは、ZipTip μ -C18
(Millipore) で脱塩し、ペプチド分析用のマトリックス: α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸
(CHCA) と混合し、ターゲットプレートに滴下してMALDI-TOF-MS: autoflex (BRUKER
DALTONICS) で質量分析を行った。検出されたペプチドフラグメントの分子量のリスト (ピー
クリスト) を検索エンジンMASCOT (MATRIX SCIENCE) で検索し、タンパク質の同定を行っ
た。

【結果および考察】

まず、感染型ホロスボラ・オブツサのタンパク質を2次元電気泳動により分離するための可
溶化の方法を検討した。ホロスボラ・オブツサは細胞壁が非常に堅固で、通常の可溶化方法
では可溶化できなかったため、SDSを含むバッファー中で煮沸して完全に可溶化した後、
2-D Clean-Up Kitを用いてSDSを除去し、通常の8M Ureaを含むサンプルバッファーに溶解

し、2次元電気泳動にかけた。2次元電気泳動ゲルをCBBで染色してタンパク質スポットを検出し、サンプルカップ法と膨潤法の比較を行った(図1)。ゲルは左側が酸性、右側が塩基性を示す。

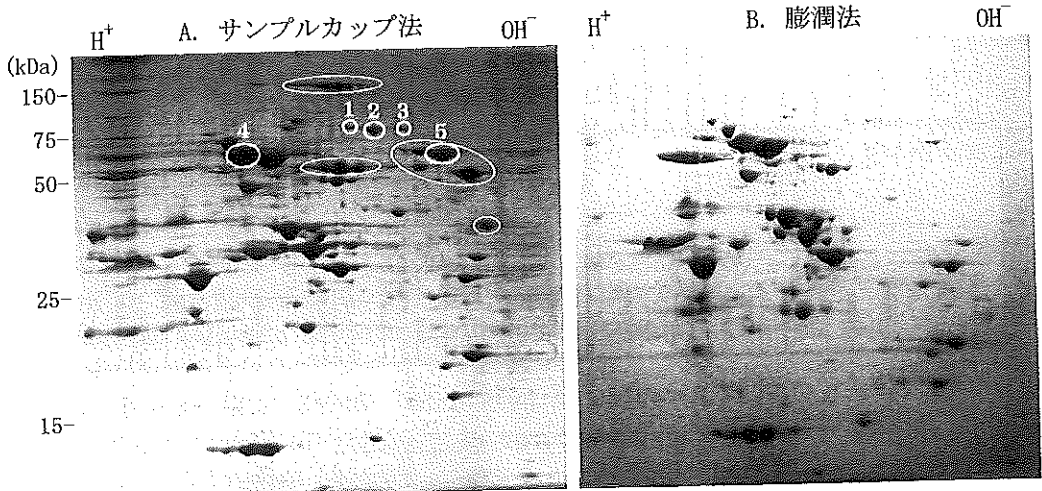


図1. 感染型ホロスポラ・オブツサの2次元電気泳動像

サンプルカップ法では酸性側のサンプル添加点にタンパク質の凝集が見られ、水平方向に筋が出ているが、膨潤法ではタンパク質がきれいにフォーカシングされている。しかしながら、膨潤法では青色の円で囲ったタンパク質が検出されておらず、スポット数はサンプルカップ法に比べて少なくなっていた。一方、赤色の円で囲ったタンパク質は膨潤法でのみ検出されたが、膨潤法でのみ検出されたタンパク質の数は少なかった。そこで、本研究ではサンプルカップ法を用いることにした。ただし、実際に網羅的なプロテオーム解析を行う場合には、サンプルの可溶化法やアプライ法をさらに検討する必要があると考えられる。

図1のサンプルカップ法でサンプルをアプライした2次元電気泳動ゲルからいくつかのタンパク質スポットを切り出し、トリプシン消化してPMF法によってMASCOT検索を行った結果、タンパク質が同定されたのは図1の黄色の円で囲ったスポット1から5であった。このうち、スポット1から3は非常によく似たピークパターンを示し(図2)、すべてホロスポラ・オブツサの89-kDaペリプラズムタンパク質に同定された。

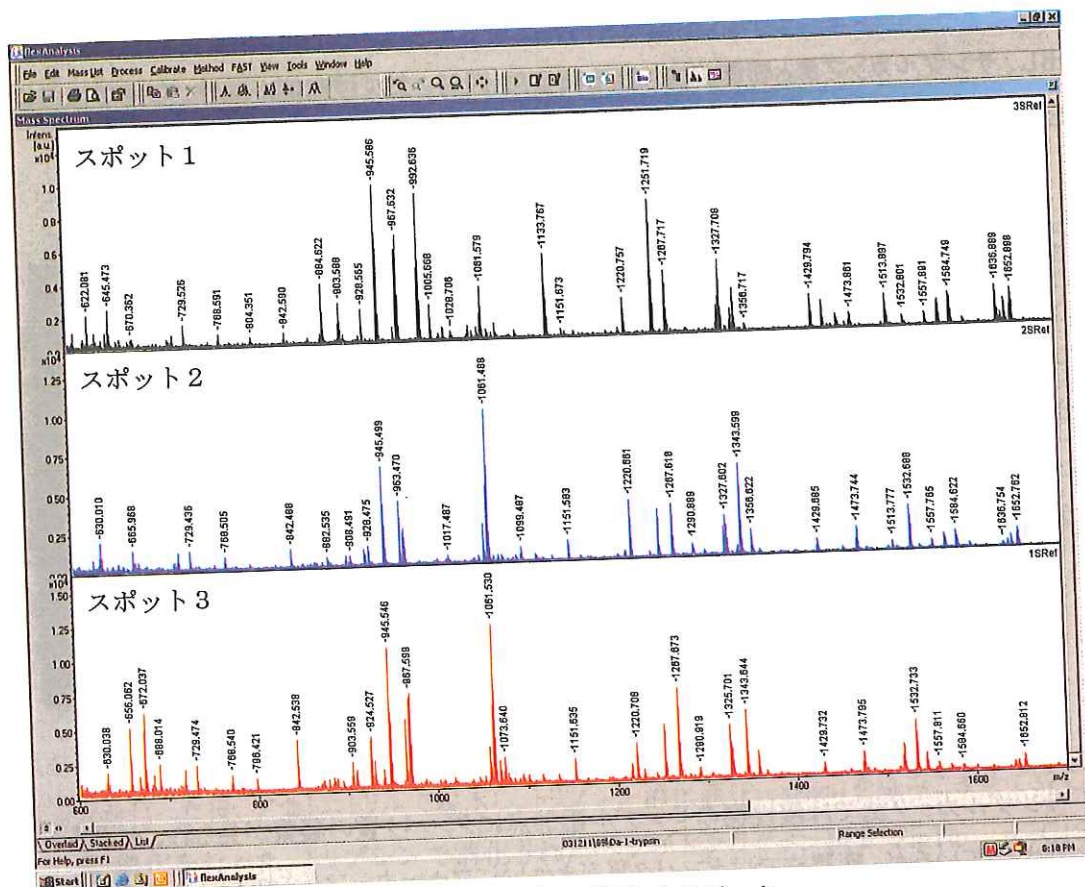


図2 スポット1～3のトリプシン消化物のピーク

89-kDaタンパク質は、以前に我々の研究グループで感染に関与するタンパク質として、遺伝子をクローニングしているタンパク質である²⁾。同じタンパク質が異なる等電点を示すスポットとして分離されていることから、翻訳後修飾を受けている可能性が考えられる。そこで、最も酸性側に検出されているスポット1をMASCOTで「Variable modifications」に「Phospho(ST)」と「Phospho(Y)」を選択して検索を行った結果、AA479-494: NVTDTLFFQQSLSDIKKのフラグメントとAA596-604: TTDLDVDLTKのフラグメントがリン酸化されている可能性があることが示された。DNASIS(日立ソフト)により89-kDaタンパク質のアミノ酸配列のモチーフ検索を行った結果、これらのフラグメント内の488番目のセリンと597番目のスレオニン(下記青色の□)はリン酸化部位であることが明らかになった。さらに、スポット2も同様に「Variable modifications」に「Phospho(ST)」と「Phospho(Y)」を選択してMASCOT検索を行った結果、AA596-604:

TTDLVDVLKのフラグメントがリン酸化されている可能性があることが示された。この結果は、スポット1は488番目のセリンと597番目のスレオニンの2ヶ所、スポット2は597番目のスレオニンがリン酸化されているために等電点の異なるスポットとして検出されている可能性を示唆している。しかしながら、MALDI-TOF-MSでは実験的にこれらのアミノ酸がリン酸化されていることを証明することはできなかった。今後はLC-MS/MSで詳細な翻訳後修飾解析を行う必要があるとともに、リン酸化による機能の制御について注目すべきであると考えている。スポット1~3のMASCOT検索結果を以下に示す。

◆スポット1~3

Match to: [gi|89000545](#) Score: 264 Expect: 4e-20
89-kDa periplasmic protein [*Holospira obtusa*]

Nominal mass (M_r): 84946; Calculated pI value: 8.51
NCBI BLAST search of [gi|89000545](#) against nr
Taxonomy: *Holospira obtusa*

Number of mass values searched: 59
Number of mass values matched: 42
Sequence Coverage: 42%

Matched peptides shown in Red

1 MKFSINQNTT KKIKMIFILV YFLTYAGPIF SSSNKKPSPT PTPTPLIIVE
51 RPEQQISPYC FDGLGQTLV SGEIKNGPNA LILRIGHTMY DASKFHKDPN
101 TNIIKFKEESV NYIFNYCKSK QAELDIEYMF LTHPETFGKT QAEQEKNTLI
151 LRGFKKDAKM DLYLPLNVID NNGAPQRFLK EDKKYLLLQI DKKGLMSEES
201 LQTVSSIRLK KIFLAVDQMM EKAQDLSSSG IKIDMGGLKN QFEGQLKIGE
251 LYTNNITSAT TQIPLKKYS YIELEQAVSK ILNYFTYFTI GDTGPSDAPF
301 SEIAQLYANT TKIVSEIRAI KDRVRTPFNE MYNLAKSLPG DEINGVEDFV
351 NSPKKYTIPM RFVHDASGQD INTTKLFYIC DEWWNQLLENL QGKISAVQTV
401 KQGFLPDLRK DISAISSQIA SVQAQKKSFE EALQVSAQQG NMQDINGSVS
451 KAKSVVEEKI NEIITLYNKI SASIESVKNV TDTLFOQLS DIKKQPSLIA
501 PKVEVEIYK NEIPAKIQNA YKSADEQKKS SFTQLGNAVK EHITKLDITFL
551 DPVKVELQDS TKNPVPTWSE KYANISYMVN VLRDDLSSHA QLLARTDLD
601 VDLKNFLKDL DQSIHLKLD IQSVGNQVEI KKMYPQYILS LDLVQKMTGS
651 PVATPDSFPE ALKQYQADKN INVLIKYEK IKTITVQTKN TLEENWRKLN
701 KMDQGLTEVK LLSDKIKPLI SSTSSSYIIA VFNTHVNAKM PENNRPAPLL

次にスポット4の結果を示す。スポット4は高いスコアでホロスポラ・オブツサの60kDaシャペロン(熱ショックタンパク質: GroELホモログ)と同定された。Sequence Coverageも43%と非常に高い数値を示している。GroELホモログも我々の研究グループにおいて、すでに遺伝子のクローニングを行っている³⁾。GroELは大腸菌に存在する熱ショックタンパク質で、タンパク質のFoldingやAssemblyに関与している。GroELホモログは細胞内共生系において重要な機能を果たしていると考えられており、ホロスポラ・オブツサでは増殖型はGroELホモログをほぼ選択的に合成していることが明らかになっている。

◆ スポット 4

Match to: gi|6225129 Score: 239 Expect: 1.3e-17

RefName: Full=60 kDa chaperonin; AltName: Full=Protein Cpn60; AltName: Full=groEL protein

Nominal mass (M_r): 59122; Calculated pI value: 5.41

NCBI BLAST search of gi|6225129 against nr

Taxonomy: Holospora obtusa

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
gi|1754520 from Holospora obtusa

Number of mass values searched: 49

Number of mass values matched: 24

Sequence Coverage: 43%

Matched peptides shown in Red

1 MSVKQIAFGS KVGESLLNGV IKLANCVQVT LGPNGRNVLI EQSFGDPRVT
51 KDGVTVAKHV ELEDRYENLA AQLVKS VASK TADMVGDGTT TATVLARSIY
101 SEAFKGSAG MNSMELRAGI DHAVEIVVEK LKELSI PVKG DYQKISQVAT
151 VSANGDTEIG DMIAQAMEKV GSDGVITVEE AKSFKTELDV VPGMQFDRGY
201 ISPYFITRQD KGIAELERSY ILLYDGKISS AQSLLPVLEK CAKESASLLI
251 IAEDVEGEAL RMLVVNKL RG VLKVA AVKSP GFGDRRKAML GDI AVL TNGY
301 VVSSEVMRL EDVRIEDLGR ADTIVIEKDN TTVIVNGPAR SSVKERC DK I
351 RSEIQEATSD YDKEKLQERL AKLSGGVAVI RVGGATEVEL KERKDRVEDA
401 MHATKAAVEE GIIPGGGTAF LRCVKPLEEV IKS AKVQERG RDFICGIDAV
451 RKALSSPCYQ IASNAGKEGG VVVAEVLKAS DVNVGYDARH DQYVDMIKSG
501 IIDPTKVART ALQNAGSVAG LLNTTEVIIA QVPEKEKPNM GGGMGGGMGG
551 GMDF

次に、スポット5の結果を示す。スポット5は高いスコアと高いSequence Coverageでホロスポラ・オブツサの63-kDaペリプラズムタンパク質と同定された。63-kDaタンパク質の遺伝子もすでに我々の研究グループにおいてクローニング済みである⁴⁾。このタンパク質は感染初期過程において、宿主大核内にも出現することが明らかになっており、どのような機能を果たしているのか注目すべきタンパク質である。

Match to: gi|148524519 Score: 177 Expect: 2e-11
63-kDa periplasmic protein [*Holospira obtusa*]

Nominal mass (M_r): 65088; Calculated pI value: 8.80
NCBI BLAST search of gi|148524519 against nr
Taxonomy: *Holospira obtusa*

Number of mass values searched: 78
Number of mass values matched: 30
Sequence Coverage: 40%

Matched peptides shown in Red

1 MFKTKKSIYL FMSVLYLCSN VAFSGSETAK TSQDTYKEIT QKIVDKFRTL
51 VVPSFENNPE QFNSEILNLH EQLLNIVNHN LELNSELKLE KNNDKHIFRA
101 ISLKFHPDKI NQYIEKNSPL YNDALSLGKK FFEINNLYSK VKPEHDNDSY
151 YIPVRFDPSP VFSQFKENIV NSIKKSEVSK FYSWLKDKDS YARQTEGMNE
201 IQKRQFEHQR QERAKKELEQ KEREKQEQQK HYEKQKYVSY VDEKIRQIQQ
251 LFSKLNLDYM KDILTLPKFV DSKKYSQDMA VKHSLKKELE QDIGIKPFEH
301 DADDFTSSIK NLIEKNVEDE KMSVEQVKMY KKFGDNLRT SSVPSKLIYS
351 LFTFLKEASN VREAREQRQD YIPETVRLLG PNTVILSDLC DSLKDIQFPS
401 YSGEWTEADR SHHYNPKKYS DLVKITHQKT LNALRKKTSL QKFLEGRIL
451 FEKMKDLTEF FTSSGNNKEM DNVYSNCKNL KNNFLKIERL QNDFEKIIEG
501 EKEKKIFIPT GYVDQGVSKW FMEDEQLRQY DFKTGEWIKK IRKTIYS

【今後の展望と課題】

本研究において、PMF法による感染型ホロスポラ・オブツサのタンパク質の同定を試みた。しかしながら、同定されたタンパク質はすべてすでに我々の研究グループにおいて遺伝子をクローニングしているタンパク質のみであった。特にGroELホモログは非常に多くのバクテリア

から遺伝子がクローニングされているにもかかわらず、今回の方法ではMASCOT検索により、トップスコア50の中に類似したタンパク質としてヒットするものはなかった。ホロスポラ・オブツサのGroELホモログは他種のバクテリアのGroELホモログと最大約60%の相同性を示すが、この程度の相同性ではPMF法によるタンパク質の同定は困難であると考えられる。現在、ホロスポラ・オブツサのゲノムプロジェクトが進行中であり、静岡大学遺伝子実験施設にも次世代シーケンサーが導入されることになっているので、ゲノム情報が整備されれば、すべてのタンパク質を容易に同定することができるように期待される。

また、本研究において、初めて89-kDaタンパク質がリン酸化修飾を受けている可能性が示された。しかしながら、MALDI-TOF-MSによる測定ではリン酸化ペプチドは脱リン酸化されやすいため、リン酸化修飾解析は困難であった。静岡大学遺伝子実験施設にLC-MS/MSも導入されることになっているため、今後は89-kDaタンパク質が本当にリン酸化修飾を受けているのかを明らかにする予定である。また、LC-MS/MSではトリプシン消化したペプチドフラグメントの分子量情報によるPMF法だけでなく、MS/MSによるDe novoアミノ酸配列推定も可能になるため、ゲノム情報が整備されていない生物種のタンパク質でも同定できる可能性が高まると期待される。

【参考文献】

- 1) Effects of antibiotics on the early infection process of a macronuclear symbiotic bacterium *Holospira obtusa* of *Paramecium caudatum*. H. Dohra and M. Fujishima. FEMS Microbiol. Lett. 179: 473-477 (1999).
- 2) Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospira infection*. K. Iwatani, H. Dohra, B. F. Lang, G. Burger, M. Hori and M. Fujishima. Biochem. Biophys. Res. Commun. 337(4): 1198-1205 (2005).
- 3) Structure and expression of a groE-homologous operon of a macronucleus-specific symbiont *Holospira obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. H. Dohra, M. Fujishima and H. Ishikawa. J. Euk. Microbiol. 45 (1): 71-79 (1998).

- 4) Fate of the 63-kDa periplasmic protein of the infectious form of the endonuclear symbiotic bacterium *Holospira obtusa* during the infection process. F. Abamo, H. Dohra and M. Fujishima. FEMS Microbiol. Lett. 280(1): 21-27 (2008).