

核膜を識別する核内共生核内共生細菌ホロスポラのプロテオーム解析と特殊機能の応用開発

●藤島 政博

山口大学大学院理工学研究科環境共生系専攻

＜研究の目的と進め方＞

グラム陰性細菌ホロスポラ属は、リケッチアに近縁の細菌で、ゾウリムシ属の小核か大核（多細胞生物の生殖核と体細胞核に相当）に感染して増殖し、宿主外では増殖できない（図1）。ホロスポラは、真核細胞の2種の核の核膜を識別する唯一の細菌である。ホロスポラが持つ特殊能力（宿主食胞からの脱出、宿主アクチンの重合による細胞質内移動、標的核膜の識別と核膜貫通機構、宿主の栄養状態に合わせた形態変化、宿主の特定遺伝子発現の促進と抑制）に関与する遺伝子とタンパク質を検出し細胞内共生の成立に必要な条件を分子レベルで解明し、任意の細胞の組み合わせで人為的に細胞内異境性を誘導して有用細胞を作成する技術開発を目指す。ホロスポラ属細菌は10種類発見され、いずれも宿主特異性と核特異性を持ち、宿主外では増殖しない。鞭毛はない。この細菌の増殖型は2分裂で増殖するが、宿主がタンパク質合成を低下させて分裂を停止すると、増殖型も分裂をやめて感染型に分化する。感染型は宿主細胞を殺害して細胞外液に脱出し、新たな宿主の食胞を経由して細胞質に脱出し、標的核に移動して、標的核膜を識別して核内に侵入（感染）する。感染型の片方の末端には電子密度の低い特殊な構造があり、これを先頭にして標的核に感染する。食胞を経由して標的核に感染する時間は約10分である。2種の核の核膜を識別する生物は他には知られていないため、3つのグループ（日本、ドイツ、ロシア）が核識別分子の発見をめざして約20年競争したが、筆者らが、小核特異的なホロスポラ種と大核特異的なホロスポラ種の各細胞外膜から標的核の核膜と結合するセンサー物質（リボ多糖）の精製に最初に成功した。さらに、標的核膜には、センサーと結合する30Kのリセプターが存在することを発見した。この発見は、受精核から生殖核と体細胞核が分化する時に核膜が質的に分化することを示した最初の例で、核膜機能の新たな研究を展開させるものである。さらに、ホロスポラの特異機能を用いて2種の核を識別して特定核に遺伝子等を導入するなどの応用面での技術開発を開拓する。

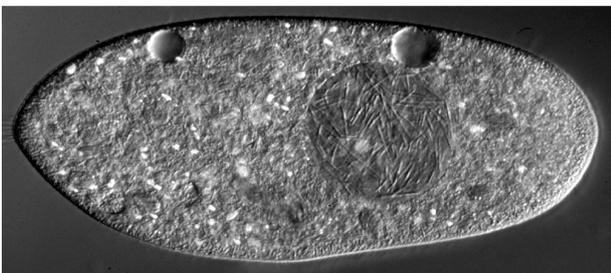


図1 *Holospora obtusa*を大核に持つゾウリムシ。大核内の棒状構造が感染型H. *obtusa*。

＜研究開始時の研究計画＞

特殊な生存戦略能力を持つホロスポラについて下記の内容を明らかにする。

(1) 国外共同研究者のLangとBurger氏の協力で大核特

異的なホロスポラの全ゲノム塩基配列（約1.7Mbp）を解読する。

(2) 大核特異的なホロスポラのタンパク質を2D-SDS-PAGEゲルから網羅的に精製し、部分アミノ酸配列を決定し、それをコードするORFを解読済み塩基配列から探索する。感染機能に関わると想定された遺伝子産物については、抗体を作成し、生活環での抗原の局在性と量的変化から機能を明らかにする。感染に関わる全遺伝子とその遺伝子産物を明らかにする。

(3) 核膜識別センサー（リボ多糖）のどの部分がセンサーとしての活性基を持つかを明らかにする。

(4) 分子量約30kDaの核膜リセプターに対する抗体を作成して抗原を宿主から精製し、感染のための機能を調べる。

(5) 小核特異的なホロスポラを使って、大核と同様に、小核にも遺伝子を導入する方法を確立する。

(6) ホロスポラの感染で発現が変化する宿主遺伝子をDifferential display法で検出する。細胞内共生によって宿主に生じる遺伝子発現の変化から、細胞内共生の成立に必要なとされる普遍的な遺伝子発現の変化を解明する。

＜研究期間の成果＞

(1) 接蛍光抗体法でアッセイしてホロスポラの侵入先端（感染型の片方の末端に存在する電子密度の低い構造で、常に、虎口像を先頭にして宿主食胞を脱出し、標的核めがけて細胞質を移動し、標的核膜を貫通する）に対するモノクローナル抗体を作成した。2D-SDS-PAGEのイムノプロットで抗原のスポットを検出し、ゲル精製し、その部分アミノ酸配列を調べた。このアミノ酸配列から推定される塩基配列を持つORFを解読済みゲノムから検出し、89-kDaタンパク質の全長の遺伝子をクローニングした。さらにモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法で、感染過程での食胞脱出、細胞質移動、核膜貫通時のこのタンパク質の動態を明らかにした（図2）(12)。

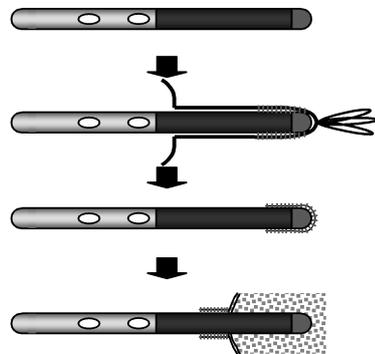


図2 *Holospora obtusa*の感染過程での89-kDaタンパク質の動態。感染型の右端の末端（標的核に侵入取の際にこの末端を先頭にして入るので侵入先端と呼ぶ）内部に存在する89-kDaタンパク質は、宿主食胞内で親友末端の表面に露出しこの部分で食胞膜を突き破って細胞に脱出する。細胞質では宿主アクチンが89-kDaタンパク質に集

合し標的核に移動する。標的核膜を貫通する際は、表出下89-kDaタンパク質は核膜上に円筒状に残る。間接蛍光抗体像と透過型電顕像を模式化した(12)。

(2) ホロスポラの感染によって発現が変化する宿主遺伝子をmRNAのDifferential display法で探し、30見つけた。その中の1つは真核生物で最初に細胞核のコドンの逸脱性が発見された細胞表層タンパク質(GPI-anchored protein)であった。さらに、HSP70の過剰発現等が誘導され、宿主は熱ショック耐性を獲得することが明らかになった(3, 8, 10)。

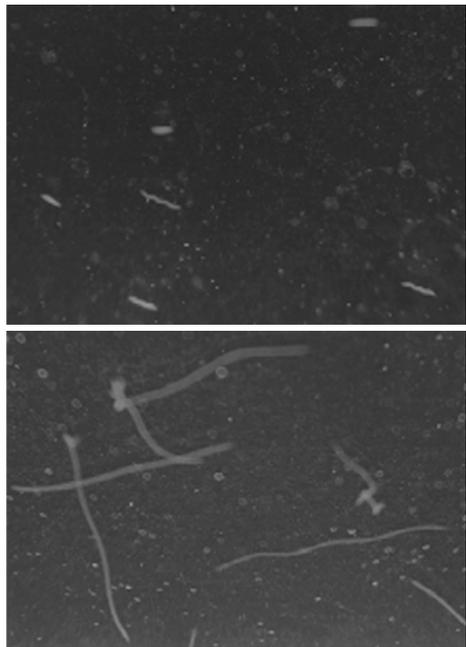


図3 H.obtusaは宿主を熱ショック耐性に形質転換させる。25度で培養したゾウリムシを顕微鏡のステージの上で40度にすると、H. obtusaが感染していないゾウリムシは直ぐに遊泳を停止して殺されるが(写真上)、H. obtusaが感染したゾウリムシは25度同じ速度で遊泳を続ける。2秒の露出の遊泳軌跡(10の論文の写真を一部改編)。

(3) 新種のホロスポラ(H. hiwatashii)を発見した。ミドリゾウリムシの大核に共生する新種のホロスポラを発見した(投稿準備中)。日本で発見された最初のホロスポラである。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ホロスポラと宿主との相互作用、及び、感染機構を調べているのは、国内外をつうじて当研究室だけである。特に、ホロスポラに対する抗体はこれまでに取られた抗体の95%は当研究室で作成したものである。ホロスポラの研究を行っている下記の研究者がこれまでに当研究室に協同研究のために滞在した。Stuttgart大学のHans-Dieter Gortz教授、Montreal大学のB. Franz Lang教授とGetraud Burger助教授、St.Petersburg大学のSergei Fokin助教授とMaria Rautian助教授、ロシア科学アカデミーのIlya Skovorodkin研究員。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

(1) ホロスポラオプツサの全ゲノム塩基配列を決定できず、65%の解読にとどまった。予算不足が原因であった。新たに予算を獲得してゲノムプロジェクトを完了させたい。できれば、宿主のゾウリムシのゲノムプロジェクト

も同時に行いたい。

(2) ホロスポラがその細胞外膜に持つ標的核膜と結合する物質は精製したが、その活性基の構造は不明。また、それが結合する核膜上のリセプターも、まだ検出できていない。現在、核膜特異的モノクローナル抗体を作成している。これまでに7種の大核膜特異的抗体を取ったが、いずれもリセプターではなかった。今後も継続して抗体を作成し、これらの抗原の中から目的のリセプター分子を検出したい。

(3) 2D-SDS-PAGEでの感染型H. obtusaの主なスポットの部分アミノ酸配列の決定は終了したが、増殖型のそれはまだ終わっていない。スポットが近接し、1個だけを切り出すのが困難であった。

〈今後の課題〉

今後は、これまでの実験計画の未完成部分を含めて、下記のことを明らかにしたい。

- (1) H. obtusaの全ゲノム塩基配列の解読を完了させる。
- (2) 増殖型H. obtusaのプロテオーム解析を行なう。
- (3) 宿主食胞脱出、細胞質内移動、標的核膜貫通を調節する遺伝子を検出する。
- (4) H. obtusaの感染による宿主の特定遺伝子発現の変化の誘導のメカニズムを解明する。
- (5) H. obtusaの細胞内共生によって各種ストレス耐性を獲得した宿主が生態系に与える影響を解明する。
- (6) これまでの細胞内共生の研究は、主に、宿主と1種類の共生生物との相互作用も研究が行なわれてきたが、今回、クロレラを細胞内共生させているミドリゾウリムシの大核に新種のH. hiwatashiiが発見されたので、宿主とクロレラとホロスポラの3者間の相互作用を明らかにする。
- (7) 細胞内共生の成立に必要な普遍的現象の調節機構をあきらかにし、任意の組み合わせで細胞内共生を誘導する技術開発を行う。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

1.

Kawai M. and Fujishima M., Invasion of the macronucleus of Paramecium caudatum by the bacterium Holospora obtusa: Fates of the bacteria and timings of invasion steps, Europ. J. Protistol., 36, 46-52 (2000).

2. 0203221818

Skovorodkin, I.N., Fokin, S.I. and Fujishima, M., Fates of the endonuclear symbiotic bacteria Holospora obtusa and Holospora undulata injected into the macronucleus of Paramecium caudatum, Europ. J. Protistol., 237(2), 137-145 (2001).

3.

Hori, M. and Fujishima, M., The endosymbiotic bacterium Holospora obtusa enhances heat-shock gene expression of the host Paramecium caudatum, J. Euk. Microbiol., 50 (4), 293-298 (2003).

4.

Fokin, S. I., Schweikert, M., Gortz, H.-D. and Fujishima, M. Bacterial endocytobionts of Ciliophora, Diversity and some interactions with the host. EJP 39 (4), 475-480 (2003).

5. E. Przybos, M. Fujishima and Y. Nakaoka. *Paramecium decaurelia* and *Paramecium dodecaurelia* from the *P. aurelia* spp. complex in Japan. *Folia biologica*, 51, 223-224 (2003).
6. Fujishima, M. and Kawai, M.. Endonuclear symbiotic bacteria *Holospora* species distinguish the host nuclear envelopes, *Endocytobiosis Cell Res.*, 15, 71-76 (2004).
7. Fokin, S.I., Przybos, E., Sergei, S.I., Chivilev, M., Beier, C.L., Horn, M., Skotarczak, M., Wodecka, B. and Fujishima, M., Morphological and molecular investigations of *Paramecium schewiakoffi* sp. nov. (Ciliophora, Oligohymenophorea) and current status of paramecia distribution and taxonomy, *Europ. J. Protistol.*40 (2), 225-243, 2004.
8. Nakamura, Y., Aki, M., Aikawa, T., Hori, M., Fujishima, M., Differences in gene expression of the ciliate *Paramecium caudatum* caused by endonuclear symbiosis with *Holospora obtusa*, revealed using differential display reverse transcribed PCR, *FEMS Microbiol. Letters*, 240, 209-213 (2004).
9. Fokin, S.I., Schweikert, M. and Fujishima, M., Recovery of the ciliate *Paramecium multimicronucleatum* following bacterial infection with *Holospora obtusa*, *Europ. J. Protistol.* 41, 129-138 (2005).
10. Fujishima, M. Kawai, M. and Yamamoto, R. *Paramecium caudatum* acquires a heat-shock resistance in ciliary movement by infection of endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa*, *FEMS Microbiology Letters*, 243, 101-105 (2005).
11. Hori, M., Tomikawa, I. and Fujishima, M., Phylogenetic Relationships of the Genus *Paramecium* using Cytosol-type Hsp70 Sequences, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Available online, Nov.15 (2005).
12. Iwatani, K., Dohra,H., Lang,B.F., Burger, G., Hori, M. and Fujishima, M., Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospora* infection, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337, 1198-1205 (2005).
13. Lang,B.F., Brinkman, H., Koski, L., Fujishima, M., Gortz, H.-D. and Gertraud Burger, On the origin of mitochondria and *Rickettsia*-related eukaryotic endosymbionts, Review article, *Japanese Journal of Protozoology*, 38 (2) 171-183 (2005).