



Analysis of the feeding behavior and related proteins in the heliozoon *Actinophrys sol*

Kakuta, Soichiro

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Date of Publication)

2012-11-27

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4184

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004184>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	角田 宗一郎
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学 位 記 番 号	博い第 381 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Analysis of the feeding behavior and related proteins in the heliozoon Actinophrys sol（原生動物 Actinophrys sol における捕食行動と関連タンパク質の解析）

審 査 委 員

主 査	教 授	尾崎	まみこ
	准教授	洲崎	敏伸
	教 授	林	文夫
	教 授	齋藤	尚亮

原生生物タイヨウチュウ *Actinophrys sol* は、捕食性の原生動物であり、その捕食行動に関してこれまで様々な研究がなされてきた。*A. sol* は軸足と呼ばれる有軸仮足を持ち、それによって餌となる生物を接着させて捕らえる。また細胞膜直下にはエクストルソームと呼ばれる分泌小胞（顆粒）が存在し、このエクストルソーム内容物が餌を捕獲するために放出されると考えられている。これまでに、gp40 と呼ばれる糖タンパク質がエクストルソーム中に存在し、餌の認識・接着に関わっているという報告がなされている。このことから gp40 は原始的な細胞認識に関わる分子であると推測されてきた。本稿では、第一章で *A. sol* の捕食行動に関連するこれまでの研究経過について概説し、捕食行動および関連するタンパク質について私が行った3つの研究について第二章から第四章に記した。最後に第五章で、これらの実験結果から考えられる *A. sol* の捕食機構、そして他の生物における研究との関連性について議論した。

第二章では、*A. sol* の食胞における餌の消化分解に関わるタンパク質の同定と遺伝子のクローニングを行った。PCR クローニングにより単離した cDNA の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を用いて相同性検索を行ったところ、sedolisin もしくはセリンカルボキシルプロテイナーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素（セリンプロテアーゼ）と高い相同性を示した。さらにこの sedolisin 様タンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し、蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法を行って細胞内での局在性を調べた。その結果、このタンパク質がリソソームと後期ファゴソームに存在することが分かった。以上の結果と相同なタンパク質の性質とを合わせて、このタンパク質が sedolisin ファミリーに分類されるリソソーム酵素であることが示された。

第三章では、*A. sol* による餌の捕獲に関わる因子を調べた。細胞外液の組成を変えて捕食実験を行うことで、餌の捕獲が細胞外 Ca^{2+} 依存性であり、 Ca^{2+} チャネル阻害剤により阻害されることが分かった。この結果からエクストルソームの放出機構に Ca^{2+} の細胞内への流入が関与していることが示唆された。これは繊毛虫 *Paramecium* での過去の研究結果や多細胞動物における分泌顆粒のエキソサイトーシスで知られている機構と一致する。カルモジュリンの阻害剤を用いた実験においても同様の結果が得られ、過去の研究結果と一致した。また外液中にレクチンの一種コンカナバリン A を加えた場合も同様に餌の捕獲が阻害された。さらにこの阻害効果はコンカナバリン A のハプテン糖であるマンノシドを加えることにより打ち消された。このことからコンカナバリン A 結合性の糖鎖が餌の接着に関与していることが示された。餌の認識・接着に関与すると考えられる gp40 がコンカナバリン A に結合性を有することから、この実験結果に gp40 が関与している可能性が考えられる。一方コンカナバリン A による前処理実験においては、コンカナバリン A 結合性の糖鎖は *A. sol* の細胞表面にあることが示された。これらの結果はこの糖質複合体が餌細胞と相互作用し、餌の認識そしておそらくはエク

ストルソームの放出に関与していること示唆する。

第四章では gp40 cDNA のクローニングを行い、タンパク質の性質を調べた。gp40 のアミノ酸配列は glycosyl hydrolase family 16 と呼ばれるグルカナーゼドメインをもち、無脊椎動物の自然免疫系で働く β -1,3-グルカン認識タンパク質と高い相同性を示した。また様々な糖類・グルカンへの結合実験を行い、gp40 が β -1,3-glucan に対する特異的な結合性を持つことを確かめた。さらに、gp40 同様に餌の捕獲に関連していると推定されるタンパク質を発見した。このタンパク質は、*Staphylococcus* 由来のプロテイン A に結合させて単離することができる約 50 kDa のタンパク質で、餌生物 (*Chlorogonium* sp.) 由来のタンパク質を添加するとプロテイン A への結合が阻害される。またプロテイン A 金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法により、エクストルソームからプロテイン A 結合性の内容物が放出されていることが分かった。餌生物との相互作用が推測されたこととその局在性から、このタンパク質は餌の捕獲に関与していると考えられる。

これらの研究から *A. sol* の捕食機構に関わる因子を明らかにし、原生動物の捕食行動についての新しい知見を得ることが出来た。これをもとにより詳細な餌の認識、エクストルソームの放出機構の研究が進むことが期待出来る。また捕食に関与すると推定されるタンパク質と自然免疫系のタンパク質とが関連づけられたことから、単細胞原生動物における餌の認識機構と多細胞動物の免疫系における自己非自己の認識機構との間には進化的な繋がりがある可能性が示された。

氏名	角田 宗一郎		
論文 題目	Analysis of the feeding behavior and related proteins in the heliozoon <i>Actinophrys sol</i> (原生動物 <i>Actinophrys sol</i> における捕食行動と関連タンパク質の解析)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	尾崎 まみこ
	副 査	教授	林 文夫
	副 査	教授	齋藤 尚亮
	副 査	准教授	洲崎敏伸
要 旨			
原生生物タイヨウチュウ <i>Actinophrys sol</i> は、捕食性の原生動物であり、その捕食行動に関してこれまで様々な研究がなされてきた。<i>A. sol</i> は軸足と呼ばれる有軸仮足を持ち、それによって餌となる生物を接着させて捕らえる。また細胞膜直下にはエクストルソームと呼ばれる分泌小胞（顆粒）が存在し、このエクストルソーム内容物が餌を捕獲するために放出されると考えられている。これまでに、gp40 と呼ばれる糖タンパク質がエクストルソーム中に存在し、餌の認識・接着に関わっているという報告がなされている。このことから gp40 は原始的な細胞認識に関わる分子であると推測されてきた。本稿では、第一章で <i>A. sol</i> の捕食行動に関連するこれまでの研究経過について概説し、捕食行動および関連するタンパク質について行った3つの研究について第二章から第四章に記した。最後に第五章で、これらの実験結果から考えられる <i>A. sol</i> の捕食機構、そして他の生物における研究との関連性について議論した。 第二章では、<i>A. sol</i> の食胞における餌の消化分解に関わるタンパク質の同定と遺伝子のクローニングを行った。PCR クローニングにより単離した cDNA の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を用いて相同性検索を行ったところ、sedolisin もしくはセリンカルボキシルプロテイナーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素（セリンプロテアーゼ）と高い相同性を示した。さらにこの sedolisin 様タンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し、蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法を行って細胞内での局在性を調べた。その結果、このタンパク質がリソソームと後期ファゴソームに存在することが分かった。以上の結果と相同なタンパク質の性質とを合わせて、このタンパク質が sedolisin ファミリーに分類されるリソソーム酵素であることが示された。 第三章では、<i>A. sol</i> による餌の捕獲に関わる因子を調べた。細胞外液の組成を変えて捕食実験を行うことで、餌の捕獲が細胞外 Ca^{2+} 依存性であり、Ca^{2+} チャネル阻害剤により阻害されることが分かった。この結果からエクストルソームの放出機構に Ca^{2+} の細胞内への流入が関与していることが示唆された。これは繊毛虫 <i>Paramecium</i> での過去の研究結果や多細胞動物における分泌顆粒のエキソサイトーシスで知られている機構と一致する。カルモジュリンの阻害剤を用いた実験にお			

氏名	角田 宗一郎
----	--------

いても同様の結果が得られ、過去の研究結果と一致した。また外液中にレクチンの一種コンカナバリリン A を加えた場合も同様に餌の捕獲が阻害された。さらにこの阻害効果はコンカナバリリン A のハプテン糖であるマンノシドを加えることにより打ち消された。このことからコンカナバリリン A 結合性の糖鎖が餌の接着に関与していることが示された。餌の認識・接着に関与すると考えられる gp40 がコンカナバリリン A に結合性を有することから、この実験結果に gp40 が関与している可能性が考えられる。一方コンカナバリリン A による前処理実験においては、コンカナバリリン A 結合性の糖鎖は *A. sol* の細胞表面にあることが示された。これらの結果はこの糖質複合体が餌細胞と相互作用し、餌の認識そしておそらくはエクストルソームの放出に関与していること示唆する。

第四章では gp40 cDNA のクローニングを行い、タンパク質の性質を調べた。gp40 のアミノ酸配列は glycosyl hydrolase family 16 と呼ばれるグルカナーゼドメインをもち、無脊椎動物の自然免疫系で働く β -1,3-グルカン認識タンパク質と高い相同性を示した。また様々な糖類・グルカンへの結合実験を行い、gp40 が β -1,3-glucan に対する特異的な結合性を持つことを確かめた。さらに、gp40 同様に餌の捕獲に関連していると推定されるタンパク質を発見した。このタンパク質は、*Staphylococcus* 由来のプロテイン A に結合させて単離することができる約 50 kDa のタンパク質で、餌生物 (*Chlorogonium* sp.) 由来のタンパク質を添加するとプロテイン A への結合が阻害される。またプロテイン A 金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法により、エクストルソームからプロテイン A 結合性の内容物が放出されていることが分かった。餌生物との相互作用が推測されたこととその局在性から、このタンパク質は餌の捕獲に関与していると考えられる。

これらの研究から *A. sol* の捕食機構に関わる因子を明らかにし、原生動物の捕食行動についての新しい知見を得ることが出来た。これをもとにより詳細な餌の認識、エクストルソームの放出機構の研究が進むことが期待出来る。また捕食に関与すると推定されるタンパク質と自然免疫系のタンパク質とが関連づけられたことから、単細胞原生動物における餌の認識機構と多細胞動物の免疫系における自己非自己の認識機構の間には進化的な繋がりがある可能性が示された。

本研究はこのように、原生動物タイヨウチュウ *Actinophrys sol* における自己・非自己認識の分子機構について詳細に研究したものであり、原生動物の細胞生物学に関する重要な新知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって学位申請者 角田 宗一郎 は博士（理学）の学位を得る資格があると認める。