

令和元年6月7日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07077

研究課題名(和文) 緑藻ボルボックスの親個体のみを適切な時期に分解する機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms to degrade only parental spheroids at the proper timing in the green alga Volvox.

研究代表者

西村 真由子 (Nishimura, Mayuko)

北里大学・一般教育部・助教

研究者番号：00525785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ボルボックス娘個体のふ化におけるLSG2(Late Somatic Gene 2)の役割を調べるためLSG2を阻害剤により阻害したところ、ふ化の時期が遅れた。ただし、阻害剤の特異性が十分でないことも分かった。また、LSG2とVheA(Volvox hatching enzyme A)の標的分子を調べるため、LSG2とVheAによる細胞外マトリックスの分解反応を行なった。その結果、LSG2とVheAによってそれぞれ分解された複数の成分が分離された。さらに、娘個体によるVheAの分泌に親個体が必要かを調べたところ、予め親個体と分離した娘個体においてもVheAの分泌が起こることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボルボックスの次世代が適した時期にふ化するための機構は不明であるが、本研究により阻害剤が阻害する生体内の因子が、ふ化の時期を適切に規定することに必要であることが示唆された。また、通常細胞外マトリックス成分は高度にクロスリンクされ分離できないが、LSG2およびVheAにより複数の成分へと分解されることから、これらの成分を分析することが可能となり、LSG2およびVheAによる親個体の分解機構を理解する足がかりとなると考えられる。さらに、娘個体が親個体に依らず自律的にVheAを分泌していることから、VheAのふ化の時期を決める機構は娘個体自身に備わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of LSG2(Late Somatic Gene 2) in Volvox hatching, the effects of LSG2 inhibitor were examined, showing the delay of the hatching although the inhibitor did not seem specific only to LSG2. To search the target molecules of LSG2 and VheA(Volvox hatching enzyme A), the extracellular matrix extracts were incubated with LSG2 or VheA. As the result, the cross-linked extracts were separated into several components by their degradation. To show if the parental spheroids were required for the daughters to secrete VheA, daughters were separated from parental spheroids in advance, which still showed VheA secretion by themselves.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ボルボックス 細胞外マトリックス マトリックスメタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの多細胞生物において細胞外マトリックス (extracellular matrix、ECM) は大きな容積を占め、その分解制御は、個体の発生や細胞運動、細胞増殖、細胞機能など多岐にわたって重要な役割を果たしている。緑藻ボルボックスの成体においては、体の体積の 95%以上は ECM によって構成され、その主成分は糖タンパク質である。ボルボックスの成体の内部には約 12 - 16 個の娘個体が存在し、胚発生を終え成熟した後に、親個体の ECM が分解されて親個体に穴が開き、その開口部から娘個体がふ化する (図)。その際には、娘個体が Volvox hatching enzyme A (VheA) というタンパク質分解酵素を分泌し親個体の ECM を分解する。VheA タンパク質は、生活環の全ての段階において膜結合型として発現しているが、娘個体がふ化する際に修飾・切断されて、細胞外に放出される。さらに我々の研究グループは、ふ化に先立って親個体も、自らを分解する酵素 Late Somatic Gene 2 (LSG2) を発現し、親個体を壊れやすくしていることを見出した。LSG2 は、クラミドモナスの Gamete Lytic Enzyme (GLE) や他の Matrix metalloproteinase (MMP) と相同性を持ち、ボルボックスの親個体において発現していることが知られていたが、その機能や活性は知られていなかった。興味深いことに LSG2 と VheA の両方をボルボックスに付与すると、全ての時期のボルボックスが分解され、内部の娘個体まで分解されてしまうことが分かった。すなわち、「(1) 親個体が発現する LSG2 が、あらかじめ自分自身を部分的に分解する。(2) ふ化に適した時期になると、娘個体が VheA を分泌して親個体を分解する。(3) LSG2 と VheA の両方が作用した部分で親個体に穴が開き、娘個体がふ化する。」と考えられる (図)。よって、親個体の分解のためには親個体と娘個体の双方からの作用が重要と考えられる。また、娘個体は胚発生を終え成熟した後にふ化するが、この適したタイミングでふ化が起こるように制御する仕組みがあると考えられる。例えば、娘個体が胚発生を終えた後に親個体における LSG2 の発現を誘導したり、外界の環境 (光強度や個体密度など) がふ化に適した状態になった時に親個体が娘個体からの VheA の分泌を促すといった親個体と娘個体の相互作用が考えられる。

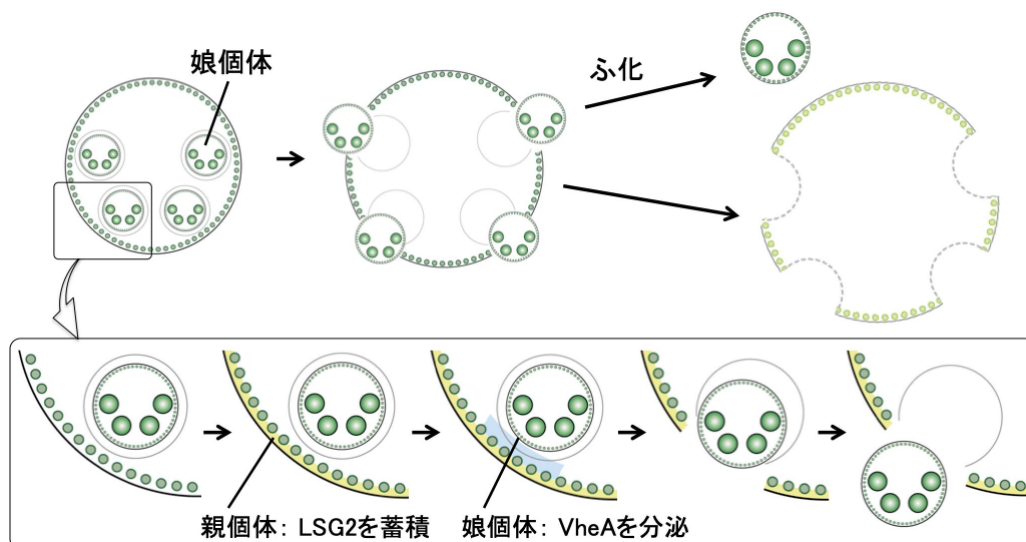


図 娘個体のふ化の模式図 (上; 娘個体は 4 個のみ示す) と LSG2 と VheA による親個体分解のモデル (下)

2. 研究の目的

(1) LSG2 はふ化に先立って親個体において蓄積し、あらかじめ自分自身を部分的に分解して壊れやすくしていると考えられるが、実際に生体内でふ化において機能しているかは不明である。そこで、生体内での LSG2 の役割を調べることを目的とした。

(2) ECM の主要成分は糖タンパク質であることから、LSG2 と VheA は糖タンパク質の分解に関わると考えられるが、どの分子が LSG2 と VheA の分解ターゲットとなっているのかは分かっていない。可能性としては、LSG2 と VheA がそれぞれ親個体の ECM の異なる糖タンパク質を分解し、LSG2 と VheA の両方が作用した部分で親個体に穴が開くことが考えられる。そこで、LSG2 と VheA が親個体のどの成分を分解しているのか、その標的分子を調べることを目的とした。

(3) ふ化に適した時期に親個体のみが分解され娘個体は分解を免れるためには、親個体における LSG2 の発現と娘個体における VheA の分泌が厳密に制御されていなくてはならないと考えられる。特に、VheA の分泌は、娘個体のふ化のタイミングを規定する上で重要な鍵となっていると考えられる。そこで VheA の分泌がどのように誘導されるのかを調べるため、まず VheA の分泌には親個体からの作用が必要なのか、それとも娘個体自身が自律的に VheA を分泌するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生体内での LSG2 の役割を調べるため、阻害剤による LSG2 の阻害実験を行った。阻害剤として MMP inhibitor I (FN-439, Merck #444250) を用いた。まず、阻害剤によって LSG2 の活性が阻害されるかを調べるため、VheA (2.5 U) と LSG2 (2.5 U) を含む培養液 (Standard Volvox medium) の中に、阻害剤を最終濃度がそれぞれ 5 μ M、100 μ M、500 μ M、900 μ M となるように加え、32 °C で 5 時間インキュベートし、そこに熱処理した若いボルボックス個体を加えて 32 °C で 1 時間インキュベートした。そしてボルボックス個体の分解が起きたかを顕微鏡で観察した。次に、生きたボルボックス個体において、阻害剤のふ化への影響を調べるため、ボルボックス個体を含む培養液に、実際のふ化が起こる 21 時間前に阻害剤 (最終濃度 500 μ M) を加え、娘個体のふ化に影響を与えるかを調べた。また、MMP inhibitor I の VheA 活性に対する影響について調べるために、VheA (2.5 U) を含む SVM に MMP inhibitor I を最終濃度がそれぞれ 500 μ M と 900 μ M となるように加え、32 °C で 5 時間インキュベートし、そこに熱処理したふ化前のボルボックス個体を加えて 32 °C で 1 時間インキュベートしてボルボックス個体の分解が起こるかを観察した。

(2) LSG2 と VheA が分解する標的分子を調べるため、生育ステージを揃えて培養したボルボックスを回収し、分離した親個体を、2% SDS/10 mM Tris-HCl (pH8.0) または 2 M 過塩素酸ナトリ

ウム/10 mM Tris-HCl (pH8.0) で 30 分間室温でインキュベートした。その後遠心 (10,000 rpm、10 分間、4) と洗浄を繰り返し、SDS または過塩素酸ナトリウムに不溶な沈殿物を回収した。回収した成分に、HEPES buffer と精製した LSG2 または精製した VheA を加えて 32 °C で 60 分間反応させた。反応液を遠心し (10,000 rpm、10 分間、4) 上清を回収して、SDS-PAGE により分解産物を分離し銀染色を行った。

(3) VheA の分泌には親個体からの作用が必要なのか、それとも娘個体自身が自律的に VheA を分泌するのかを調べるため、生育ステージを揃えて培養したボルボックスを回収し、ホモジナイザーを用いて親個体を破壊した。7%(v/v) percoll を加えて遠心し (100 g、2 分) 沈殿したインバージョン期の娘個体を回収して培養液に懸濁し、目開き 30 μm のナイロンメッシュを用いて親個体の体細胞を取り除いた。培養液に、分離した娘個体のみ、または分離した娘個体と親個体を両方混ぜたもの、または分離した親個体のみを、それぞれ加えて 32 °C で 24 時間 (16 時間明/8 時間暗) 培養した。その後遠心し (2,000 rpm、5 分) 上清をさらに遠心し (30,000 rpm、30 分) 上清をそれぞれ回収して、VheA 活性の有無を調べた。VheA 活性については、ふ化前の個体を熱処理し (55 °C、5 分) それぞれの上清を加えて 32 °C で反応させ、親個体が破壊されるかによって調べた。

4 . 研究成果

(1) 生体内での LSG2 の役割を調べるため、阻害剤による LSG2 の阻害実験を行った。MMP inhibitor I を、VheA と LSG2 と熱処理したボルボックス個体を含む培養液に加えたところ、100 μM の濃度においては部分的にボルボックス個体の分解が阻害され、500 μM と 900 μM の濃度においては、ほぼ完全にボルボックス個体の分解が阻害された。また、生きたボルボックス個体を含む培養液に、MMP inhibitor I (500 μM) を加え、娘個体のふ化に影響を与えるかを調べたところ、阻害剤を加えない対照実験と比べて、ふ化が起こる時期が約 3 時間遅れた。しかしながら、MMP inhibitor I (500 μM および 900 μM) には、VheA の活性を阻害する効果も見られた。すなわち、VheA を含む培養液に MMP inhibitor I (500 μM と 900 μM) を加えた後熱処理したふ化前のボルボックス個体を加えたところ、VheA によるボルボックス個体の分解が阻害された。よって MMP inhibitor I は LSG2 だけでなく VheA の活性にも影響することが示唆され、MMP inhibitor I の特異性が十分でないことが分かった。実験結果から、MMP inhibitor I が阻害する生体内の因子が、ふ化の時期を適切に規定することに必要であると考えられる。

(2) LSG2 と VheA が分解する標的分子を調べるため、ボルボックスの親個体から SDS または Na-perchlorate に不溶な成分を回収し、LSG2 または VheA または緩衝液を加えて反応させ、SDS-PAGE で分離した。その結果、コントロールの反応液 (緩衝液のみ添加) では、沈殿物と上清のいずれにおいてもタンパク質はゲル上に検出されなかった。このことから、SDS または

Na-perchlorate に不溶な ECM 成分は、おそらく高度にクロスリンクされているために泳動されなかった可能性があると考えている。これに対し、LSG2 または VheA を添加して反応させた成分については、どちらも SDS-PAGE により複数のバンドを検出した。よって、SDS または Na-perchlorate に不溶な、高度にクロスリンクされていた ECM 成分は、LSG2 または VheA の作用によりそれぞれ分解されて SDS-PAGE により分離可能となったと考えられる。すなわち、分離された各バンドのペプチドは、LSG2 または VheA の標的分子である可能性が高いと考えられる。ただし、LSG2 と VheA がそれぞれ親個体の ECM の異なる成分を分解するという予想とは異なり、LSG2 と VheA のそれぞれを作用させた場合に、分解されて現れたバンドパターンはほぼ同じであり、中には VheA の作用に特異的なバンドも検出された。よって LSG2 と VheA はほぼ同じ ECM 成分を分解する活性があることが考えられた。別の可能性として、LSG2 や VheA の量が過剰であったために非特異的に ECM 成分の分解が起こったことも考えられる。

(3)ふ化の時期を規定するための鍵であると考えられる VheA の分泌が、親個体からの作用を必要とするのか、それとも娘個体自身で自律的に起きるのかを調べるため、親個体と娘個体を分離して培養し、娘個体が VheA を分泌するかを調べた。その結果、発生途中の早い段階（インバージョン期）で親個体から分離した娘個体について、その培養上清において VheA の活性があることが分かった。分離した娘個体によって分泌された VheA の活性は、分離した娘個体と親個体を両方混ぜてインキュベートした場合と同等か、それよりも高かった。よって、娘個体による VheA の分泌には親個体は必要でなく、娘個体が自律的に VheA をプロセッシングして分泌している可能性が高いと考えられる。

<引用文献>

Fukada K, Inoue T, Shiraishi H. A posttranslationally regulated protease, VheA, is involved in the liberation of juveniles from parental spheroids in *Volvox carteri*. *Plant Cell*. 2006, 18(10):2554-2566.

Nishimura M, Nagashio R, Sato Y, Hasegawa T. Late Somatic Gene 2 disrupts parental spheroids cooperatively with *Volvox* hatching enzyme A in *Volvox*. *Planta*. 2017, 245(1):183-192.

Shimizu T, Inoue T, Shiraishi H. Cloning and characterization of novel extensin-like cDNAs that are expressed during late somatic cell phase in the green alga *Volvox carteri*. *Gene*. 2002, 284(1-2):179-187.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

西村真由子、長塩亮、佐藤雄一、長谷川孝幸、緑藻ボルボックスのふ化時に親個体を特異的に分解する機構の研究、日本分子生物学会、2018 年

6. 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。