

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660168

研究課題名(和文)多核単細胞緑藻に特異的な細胞内容物からの細胞再構築現象の分子機構に関する研究

研究課題名(英文)Molecular mechanism of unique cell regeneration after wounding in polynuclear and unicellular marine green algae

研究代表者

堀 貫治 (HORI, KANJI)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：50116662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海産の多核単細胞性緑藻に見られる細胞内容物からの細胞再構築現象に複数の内在性レクチンタンパク質の複合体・会合体が関与することが示唆されるが、同会合体形成の機構は不明である。本研究では、新たに調製したハネモ3種レクチン(BPL54、BPL17および組換えBPL11)の高純度標品を用いて会合体形成機構を検討した。その結果、会合体形成はレクチン分子間のレクチン-糖鎖相互作用には起因しないこと、組換えBPL11は、BPL54とBPL17とは異なり、加熱処理物でもプロトプラスト形成能を示さないこと、しかし、これら3種レクチンの混合物は非加熱下でも有意のプロトプラスト形成能を示すことを認めた。

研究成果の概要(英文)：Polynuclear and unicellular marine green algae possess unique regeneration ability because new cells are spontaneously formed from the cell contents extruded in seawater after wounding of algal tissues. Our previous studies suggested that the complex and/or aggregates of endogenous lectin proteins might involve in cell regeneration. In this study, three lectins (BPL54, BPL17 and recombinant BPL11) of *Bryopsis plumosa* were prepared and examined for clarifying the aggregation mechanism. The results showed that the formation of aggregates is not triggered by lectin-sugar interaction among the lectin molecules. rBPL11 did not show the organelle-aggregation ability even after heat-treatment of the protein, unlike BPL54 and BPL17. However, the mixture of BPL54, BPL17 and rBPL11 significantly caused the organelle-aggregation without heat-treatment. Thus, the endogenous lectin molecules appear to interact with each other and function in the unique cell regeneration after wounding.

研究分野：海洋生命科学

キーワード：海藻 再生 分子機構 ハネモ

1. 研究開始当初の背景

緑藻ハネモ類を含む海産の多核単細胞性緑藻は特異な再生機能をもつことが知られている。すなわち、藻体が損傷を受けると、海水中に流れ出した細胞内容物(オルガネラを含む)は自然に凝集し凝集塊となり、数時間内に凝集塊を取り囲む細胞膜が形成されプロトプラストとなる(自然プロトプラスト形成)。このプロトプラストは細胞壁を新生し、もとの藻体(成体)に生長する。この細胞内容物からの細胞再生現象は、1970年に Tatewaki & Nagata (日本)によりハネモ *B. plumosa* に見出されたのが最初である。その後、本現象の生物学的研究は国内外で散発的に行われており、報告例としてはハネモ類に関するものが主である。本現象はハネモ類、バロニア類、ミル類およびイワツタ類など多核単細胞性緑藻に広く見られる現象で、細胞の損傷治療の一形態であり、これら海藻の生存戦略の一つと考えられている。この細胞内容物からの細胞再構築現象は高等植物細胞や動物細胞には見出されていない。しかし、ハネモの細胞質小胞と細胞内液が存在すると、高等植物の細胞内容物からもプロトプラストが一過的に形成されることが報告されており、この特異な細胞再生システムは高等植物にも適用できる可能性を示唆している。このように、本研究は人工植物細胞の作製など新しい方法論の提案にも繋がる可能性もあり、応用上も波及効果が高いと考えられる。

我々は、この現象の化学生物学的解明に興味をもち、オルガネラ凝集能およびプロトプラスト形成誘導能のアッセイ系を確立し、ハネモ類(ハネモ *Bryopsis plumosa* およびオオハネモ *B. maxima*)の各細胞内液から、それぞれ2種類のプロトプラスト形成誘導物質の単離に成功した。すなわち、両物質は糖結合性を有する17 kDa タンパク質(Man/高マンノース型糖鎖特異的 BPL17 および BML17) および 54 kDa タンパク質

(GalNAc/複合型糖鎖特異的 BPL54 および BML54)のレクチンとして単離され、それぞれ非加熱処理のものではプロトプラスト形成を誘導しないが、加熱処理して生じた高分子量会合体(多量体)は高い分子表面疎水度を有し同誘導活性を示すことを認めた。また、細胞内液から得られた高分子量画分(>200 kDa)は非加熱下でも同誘導活性を示し、両タンパク質(17 kDa と 54 kDa)を含むことを認めた。このことから自然条件下(生理条件下)での会合体形成機構および会合体のオルガネラ凝集能・プロトプラスト形成能の作用機構の解明が、細胞再構築の分子機構の全容を明らかにする上で重要な研究課題となっている。

この自然条件下での複合体・会合体形成の機構に関しては、先行研究から以下の仮説が想定された。すなわち、BPL54 は 27kDa サブユニットの SS 結合による 2 量体で、サブユニット当たり 1 カ所の N 型糖鎖付加配列を有すること、高マンノース型糖鎖特異的レクチンである GNA 及び ESA-2 を用いるレクチン染色に陽性であることから、高マンノース型糖鎖を含む糖タンパク質であることが強く示唆された。つまり、藻体内局在性が異なる 17 kDa タンパク質と 54 kDa 糖タンパク質が細胞損傷により初めて互いに遭遇し、両タンパク質間のレクチン(17 kDa)-糖鎖(54 kDa)相互作用により両者の高分子量複合体・会合体が形成され、プロトプラスト形成を誘導するに至る機構の存在が強く示唆された。

ハネモ属藻体内の複数種のレクチンタンパク質の相互作用を解析するためには、各レクチンタンパク質の高純度精製標品が必要とされる。しかし、ハネモ属に存在する 3 種レクチンタンパク質(17kDa、54kDa および 11kDa)は抽出および精製過程で互いに相互作用する傾向が見られ、高純度標品を十分量得ることが困難である。また、各レクチンの組換え体の調製を試みたが、大腸菌発現系での組み換え BPL54 の収量は低く、十分量が得られていない。このように、化学生物学的解析に必要な十分量の供試レクチンタン

パク質が得られていないために、複合体・会合体の形成機構の解明が遅れているのが現状である。なお、11kDa レクチンタンパク質の細胞再構築現象との関わりはまだ調べていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、ハネモ属における細胞内容物からの細胞再構築現象には藻体内の少なくとも 2 種レクチンタンパク質 (17kDa と 54 kDa) の複合体・会合体が関与し、同会合体形成は両者間の相互作用 (レクチン-糖鎖) により誘導されるとの仮説に立ち、(1) ハネモの 3 種レクチンタンパク質 (BPL17, BPL54 および BPL11) の高純度標品を調製し、(2) BPL17 と BPL54 間のレクチン-糖鎖相互作用を解析し、(3) 3 種レクチン間の相互作用とオルガネラ凝集能・プロトプラスト形成能を調べ、同藻の特異な細胞再構築の分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始当初は以下の研究を計画した。

(1) ハネモの 3 種レクチンタンパク質 (BPL17, BPL54 および BPL11) の高純度標品の調製

ハネモ培養藻体から 3 種レクチンタンパク質を抽出、精製する。抽出および精製の際に各タンパク質が相互作用することを防ぐために、抽出溶媒およびムチン固定化カラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーでの平衡化溶媒には 0.5 M マンノース含有緩衝液 (Man-PBS) を使用する。天然藻体から十分量のレクチンが得られない場合は、各組換えレクチンの調製を試みる。

(2) BPL17 と BPL54 間のレクチン-糖鎖相互作用の解析

高マンノース型糖鎖を含む BPL54 をエンド型糖分解酵素 (EndoH および PNGase F) 処理に付き、糖鎖切断および糖鎖除去 BPL54 を調製する。

BPL54 および上記 2 種類の酵素処理 BPL54 をセンサーチップ (CM5) 上に固定化し、BPL17 (アナライト) との分子間相互作用を BIAcore を用いる表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) を用いて解析する。この結果から、両タンパク質間にレクチン-糖鎖相互作用が介在することを明らかにする。次に、この高マンノース型糖鎖欠落 BPL54 と BPL17 の複合体・会合体形成能を調べ、同形成における BPL54 の糖鎖の機能を解析する。

(3) 3 種レクチンタンパク質 (BPL17, BPL54 および BPL11) の相互作用解析と混合物のオルガネラ凝集能・プロトプラスト形成能

ハネモ 3 種レクチンタンパク質を用いて、2 種レクチン間および 3 種レクチン間の相互作用の有無を各等量混合物の分子量変化を指標に検討する。また、3 種レクチンタンパク質混合物および BPL11 のオルガネラ凝集能・プロトプラスト形成誘導能を調べる。

4. 研究成果

(1) ハネモの 3 種レクチンタンパク質 (BPL17, BPL54 および BPL11) の高純度標品の調製

ハネモ雌株培養藻体の凍結保存試料 80g を液体窒素下で粉末化後、Man-PBS で抽出した。抽出液の 20-60%飽和硫酸沈殿画分を Man-PBS に透析後、Man-PBS で平衡化したムチン固定化カラムに供した。カラムを Man-PBS で十分洗浄後、PBS 中種々濃度 (0.001 ~ 0.5M) の GlcNAc および 0.2M GalNAc で順次段階的に溶出した。GlcNAc 溶出画分には BPL11 と BLP54 が混在したが、GalNAc 溶出画分は BPL54 のみを含んでいた。次に、ムチン固定化カラムでの非吸着画分を PBS に十分透析してマンノースを除去後、イーストマンナン固定化カラムに供し、カラムに吸着した BPL17 を 0.5M マンノースで特異的に溶出した。本精製で得た BPL54 (1 mg) および BPL17 (1.6 mg) の高純度標品を以降の実験に供した。BPL11 の精製標品が得られなかったため、研究室保存の

BPL11a 発現株 (SHuffle T7 Express/pET28a-BPL11a)を用いて発現誘導後、菌体抽出液の His-rBPL11a を Ni-キレートカラムを用いて精製した(15 mg/1L 培養液)。この 5 mg を Thrombin Kits(Novagen[®])を用いる酵素消化に供し、rBPL11a(4 mg)を得た。このようにして得られた各レクチン精製標品は SDS-PAGE でそれぞれほぼ単一のタンパク質バンドを与えることを確認した。なお、酵母発現系を用いて組換え BPL54 の調製を試みたが、成功しなかった。

(2) BPL17 と BPL54 間のレクチン-糖鎖相互作用の解析

標記解析に先立ち、BPL54 から高マンノース型糖鎖の除去を試みた。すなわち、BPL54 を加熱変性下および非変性下で、EndoH または PNGase F を用いて酵素処理 (37 °C、2 および 20 時間)に付し、消化物の SDS-PAGE での挙動変化を調べるとともに泳動後のゲルを Pierce[®] Glycoprotein Staining Kit (Thermo Scientific)を用いる糖染色に供した。その結果、BPL54 はいずれの酵素消化後も未処理のものと同じ挙動を示し、ゲル上の同バンドは糖染色に陰性であった。高マンノース型糖鎖含有のリボヌクレアーゼ B は酵素消化されること、陽性対照の西洋ワサビパーオキシダーゼは糖染色されたことから、本実験で供した BPL54 は糖を含まない単純タンパク質であることが判明した。このように、当初の仮説を否定する結果が得られた。この結果は、BPL54 のその後の MALDI-TOF-MS での分子量実測値と遺伝子配列から演繹したアミノ酸配列からの理論分子量との比較からも支持された。したがって、以前に BPL54 のレクチン染色で観察された高マンノース型糖鎖レクチン(GNA および ESA-2)との相互作用は BPL54 とそれらレクチンタンパク質との間にタンパク質-タンパク質相互作用が存在したことに由来している可能性が示唆された。同様に、BPL54 固定化チップに対する

BPL17 の低い親和定数 (100 μM レベル) も両者間にタンパク質-タンパク質相互作用が存在する可能性を示唆した。

(3) 3 種レクチンタンパク質 (BPL17, BPL54 および BPL11) の相互作用解析と混合物のオルガネラ凝集能・プロトプラスト形成能

ハネモの 3 種レクチンタンパク質 (BPL17, BPL17 および His-rBPL11a) の相互作用の有無を検討した。すなわち、各レクチンの 40 μg/ml 溶液を調製し、これらを等量ずつ混合することにより、2 種レクチン間の組み合わせ (3 種類) と 3 種レクチン間の組み合わせ (1 種類) の計 4 種類の組み合わせ混合物を調製した。これらを室温で 2 時間静置後、TSKgel G2000SW_{XL} カラムを用いるゲルろ過に供し、溶出位置の変化の有無を調べた。また、比較のために各レクチン単独の非加熱および加熱処理 (100 °C、30 分間) したものを調製し、それぞれ単独で同ゲルろ過に供した。その結果、2 種レクチンおよび 3 種レクチン混合物の溶出位置 (混合物中の各レクチンの溶出位置) は、加熱処理していない各レクチンの溶出位置といずれの場合も一致しており、本実験結果からは各レクチン間に相互作用が介在する現象は観察されなかった。なお、各レクチンの加熱処理 (100 °C、30 分) 液の遠心上清のゲルろ過結果から、加熱処理後の BPL54 および BPL17 は非加熱のものと比較して明らかに高分子量域に溶出することが確認された。この結果は、両レクチンは加熱処理後、高分子会合体を形成し、同会合体はオルガネラ懸濁液からのプロトプラスト形成を誘導するという先行研究結果と一致していた。しかし、rBCL11a については、加熱処理したもので溶出位置は変化しなかった。このように、本実験からは非加熱 (自然条件) 下でのレクチン間の相互作用による会合体形成は観察されなかった。しかし、興味深いことに、BCL17、BCL54 および rBCL11 の混合

物は再混合実験系で対照群と比較して有意のオルガネラ凝集能・プロトプラスト形成能の増大が観察された。

本研究ではハネモ雌株培養藻体に含まれる3種類の天然レクチンの精製を試み、BPL54とBPL17の単一標品を得たが、BPL11の単一標品を得ることはできなかった。ハネモ培養藻体中のBPL11含有量は元来低いものの、より効果的な精製法が必要と思われた。ハネモの再生現象は高マンノース型糖鎖をもつBPL54と高マンノース型糖鎖特異的なBPL17の相互作用が介在して進行すると推定していたが、糖分解酵素を用いた実験および糖染色試験の結果から、BPL54は糖鎖をもたない単純タンパク質であることが明らかとなり、同推測は否定される結果となった。また、ゲルろ過を用いてBPL54、BPL17およびHis/rBCL11aの各レクチン間の相互作用の有無を検討したが、本実験からは3種レクチン間に明確な相互作用の存在は観察されなかった。今後、ハネモの再生現象における内在レクチンの関与、作用についてさらなる検討を重ねる必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 貫治 (HORI KANJI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教

授

研究者番号：50116662

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：