



Studies on sexual agglutinin and cell wall lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*

齊藤，達昭

(Degree)

博士（学術）

(Date of Degree)

1988-03-31

(Date of Publication)

2015-04-27

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0764

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000764>

※ 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・(本籍)	さい とう たつ あき (兵 庫 県)
学 位 の 種 類	学 術 博 士
学 位 記 番 号	学博い第122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	昭和63年3月31日
学 位 論 文 題 目	Studies on sexual agglutinin and cell wall lytic enzyme in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (クラミドモナスの性的凝集物質と細胞壁溶解酵素に関する研究)

審 査 委 員	主査 教授 坪 由 宏
	教授 小 野 一 教授 新 家 龍

論 文 内 容 の 要 旨

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* は、プラス型とマイナス型と呼ばれる一対の接合型を持っている。両接合型株は、それぞれ別々に無性的栄養増殖を繰り返すが、窒素源飢餓状態になると配偶子に分化する。両配偶子を混合すると、鞭毛表層に備わる性特異的な凝集物質によって、直ちに相手型配偶子の認識と凝集がおこる。さらに、この鞭毛凝集反応を引きがねとして、細胞壁溶解酵素の分泌による細胞壁の離脱がおこり、やがてプロトプラストになった一対の細胞は、原形質融合をおこなって接合子となる。

本研究の目的は、まず本藻の接合過程の前半で大切な役割を果たしている2つの物質、性的凝集物質と細胞壁溶解酵素の存在形態及び存在場所を明らかにすることである。第二に、両物質の消長やプロセッシングを通して、クラミドモナスの性分化あるいはその逆反応である脱分化の過程を明らかにすることである。第三に、細胞破碎液を用いる簡便なアッセイシステムの開発によって、多くの接合変異株を分類し、さらに、配偶子分化に関係する新しい突然変異株を得ることである。

第1章では、性的凝集物質が、配偶子の鞭毛表面ばかりでなく、細胞内部にもプールとして多量に存在することを明らかにした。細胞内部に存在する凝集物質(細胞体凝集物質)は、細胞破碎液を用いて簡単に定量でき、これによって細胞体凝集物質量は、鞭毛に存在する凝集物質量の約100倍にも達することを見出した。さらに、細胞体凝集物質は、配偶子が未凝集の時には約12時間の半減期でゆっくりと代謝回転されるが、ひとたび凝集を始めると、非常に短時間(15分以内)の半減期で失われることが明らかになった。細胞融合のできない *fus* 株と野性型株を混合したと

きには、凝集は数時間にわたって持続されるが、このとき細胞体凝集物質量は、最初の30分間で凝集前の10%まで低下した後、シクロヘキシミド (CHI) に感受性のタンパク質合成によって回復することがわかった。配偶子をEDTAやタンパク質分解酵素たとえばトリプシンなどで処理すると、鞭毛凝集能が失われるだけでなく、細胞体凝集物質も全て培養液中に失われた。EDTA処理液には、配偶子が細胞内に持っていた凝集活性とほぼ同程度の活性が認められ、また、プラス型配偶子をキモトリプシンやプロテイナーゼKで処理した場合にも、処理液に活性が認められた。トリプシン処理を行った配偶子にトリプシンインヒビターを加えると、まず鞭毛凝集能の回復が見られ、その後細胞体凝集物質の再蓄積が見られた。この過程は、CHIやツニカマイシンによって阻害を受けた。

第2章では、プラス型とマイナス型凝集物質の間で、S-S結合還元剤に対する感受性が違っていることを明らかにし、プラス型凝集物質の認識部位にはS-S結合が存在することを示唆した。プラス型配偶子にジチオスレイトール (DTT) を加えると、運動能を保持したままで30分以内に凝集能だけが失われ、同時に不活性型に変化した凝集物質が培養液中に放出された。さらに、プラス型凝集物質は、DTT により *in vitro* でも不活性化され、SH 基酸化剤であるジアミドの添加により再活性化されることがわかった。プラス型配偶子の単離鞭毛を DTT 処理した時には、凝集物質は、鞭毛に付着したまで不活性化された。一方、マイナス型凝集物質は、高濃度のDTTに対して *in vivo* でも *in vitro* でも全く不活性化されなかった。

第3章では、第一に、鞭毛凝集にともなって分泌される細胞壁溶解酵素が、配偶子だけでなく栄養細胞にも存在することを見出し、さらに栄養細胞内ではその存在形態が不活性型 (V型) であることを明らかにした。V型酵素は、あらかじめ細胞を凍結融解処理したり細胞破碎液を超音波処理することによって活性化され、活性型に変化させた酵素は、配偶子破碎液に見出される活性型 (G型) 酵素や分泌酵素と、分子量 (ゲル濾過では67,000, SDSゲル電気泳動では62,000) や金属キレート剤・SH基修飾剤によって活性阻害を受ける点で一致した。V型酵素は、分画遠心やパーコール密度勾配遠心の結果から、活性酵素やG型酵素に比べてより高分子量であると推定された。

第二に、細胞壁溶解酵素は、V型酵素、G型酵素とも、細胞内では細胞壁と細胞膜の間のいわゆるペリプラズム部にほぼ局在することを明らかにした。栄養細胞や配偶子の細胞壁を外から加えた酵素で溶解したところ、得られたプロトプラストの破碎液中には、V型酵素もG型酵素も検出できなかった。また、細胞壁を持たない突然変異株の破碎液にもほとんど酵素活性はなかった。栄養細胞のプロトプラストは、細胞壁の再生に伴って再び細胞内にV型酵素を蓄積した。両接合型配偶子のプロトプラストを混合したときには、正常な凝集と接合子形成が見られたが、培養液中への酵素の分泌は殆ど無かった。

第4章では、クラミドモナスの配偶子分化やその逆反応である脱分化に伴って、凝集物質と細

胞壁溶解酵素が、時間的及び量的・質的にどのように変化するかを明らかにした。液体培養を行った栄養細胞が配偶子に分化する過程では、鞭毛凝集能や融合能の獲得は、窒素源を含まない培地（-N培地）に移した後4時間目から7時間目にかけおこったが、細胞体凝集物質の蓄積は、それより約1時間程度遅れて進行した。細胞壁溶解酵素は、最初の4時間はV型のままで存在し、凝集能や融合能の獲得とはほぼ平行してG型に変化した。配偶子が栄養細胞に脱分化する過程では、鞭毛凝集能や融合能の消失と並行して細胞体凝集物質の活性が失われ、溶解酵素もG型からV型にもどった。寒天培養を行った細胞は、-N培地に懸濁した後2時間以内に配偶子に分化したが、寒天上で鞭毛を失った状態の細胞は、両物質の活性が検出できなかったところから栄養細胞であり、液体培地に移した後速やかに活性を上昇させた。さらに興味あることに、たとえ配偶子を-N培地の寒天上に置いた場合でも、その細胞は“固体”上ではやがて栄養細胞に脱分化することがわかった。クラミドモナスの配偶子分化は、“液体”環境下においてのみ進行することが示唆された。

第5章では、まず、凝集物質と細胞壁溶解酵素の活性測定を組み合わせることによって、様々な内容をもつ接合変異株を、少なくとも4クラス（I 配偶子分化不能、II 凝集物質欠失、III 溶解酵素欠失、IV 融合不能）に分類できるということを示した。次いで、これまでに得られた接合変異株や新しく単離した変異株を実際に分類した。この方法は、特に表面的には凝集能を持たない一群の変異株をクラスIとIIに明確に分類でき、これまで凝集変異株として単離された *imp-2*, *imp-8*, *imp-12* は、全てクラスII変異株であることが明らかになった。新しく単離した3つの凝集変異株もクラスII変異株であった。そのうちの *agl-1* は、マイナスの性遺伝子座に関連した劣性遺伝子であると推定された。また、表面的に細胞融合ができない変異株 *imp-1*; *imp-11*, *fus* は、全てクラスIV変異株であった。

第6章では、配偶子分化に関する温度感受性突然変異株（クラスI）の初めての単離に成功し、その生理・生化学的及び遺伝的特性を明らかにした。得られた二つの温度感受性変異株 *dif-1* と *dif-2* は、ともに-N培地中、25°Cでの誘導では正常に配偶子に分化したが、35°Cでは全く分化せず、*dif-1* 株では鞭毛も失われた。35°Cで誘導した細胞の破碎液には凝集物質の活性がなく、溶解酵素はV型であったところから、栄養細胞の状態で留まっていることがわかった。また、25°Cで配偶子にしたあと35°Cに移すと、-N培地中であるのにも拘らず3-5時間後に栄養細胞に戻り、再び25°Cに移すと、配偶子に分化した。これらの変換はCHIにより阻害された。遺伝解析の結果、*dif-1* と *dif-2* は別々の遺伝子座に位置する劣性遺伝子であり、性遺伝子座とも関連していないことがわかった。

論文審査の結果の要旨

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* は、雌雄同型配偶、雌雄異株であり、プラス型（雌）とマイナス型（雄）と呼ばれる一対の接合型を持っている。両接合型株は、それぞれ無性的な栄養細胞として増殖を繰り返すが、窒素源飢餓状態に移されることにより、配偶子への分化が誘導される。両配偶子を混合すると、鞭毛表層に備わる性特異的な凝集物質（糖タンパクであることが知られている）により直ちに相手型配偶子の認識が行われ、異性間に鞭毛部位での凝集がおこる。次に、この鞭毛凝集反応を引きがねとして、細胞壁溶解酵素が分泌され、細胞壁の離脱がおこる。プロトプラストになった一対の細胞は、やがて原形質融合を行って接合子となる。

本論文は、まず接合過程の前半で大切な役割を果たしている性的凝集物質と細胞壁溶解酵素の存在形態の変化や、これらの物質のプロセッシングに着目し、栄養細胞と配偶子の差異を明らかにした。さらに、接合に関する突然変異株の単離や、これを用いて実験を進めるなど、独自の方法によって、栄養細胞から配偶子への分化及び脱分化の課題について研究を展開させ、その結果をまとめたものである。

第一章では、性的凝集物質の定量法を確立し、これに基づいて、配偶子細胞内における存在部位の指摘と、これの代謝回転の速さに関する研究を行った。ここでは、この物質が配偶子の鞭毛表面ばかりでなく、細胞内部にもプールとして（細胞体凝集物質）鞭毛表面にあるものの100倍量も存在することを明らかにした。さらに、細胞体凝集物質は、配偶子が未凝集の時には約12時間の半減期でゆっくりと代謝回転されるが、ひとたび凝集を始めると、非常に短時間（15分以内）の半減期で失われることを明らかにした。また凝集物質の形成にはタンパク質合成が関与することを明らかにした。

凝集はできるが、細胞融合のできない異変株 *fus* と野性型株を混合した場合、凝集は数時間にわたって持続することが認められるが、このとき細胞体凝集物質量は、最初の30分間で凝集前の10%にまで低下した後、シクロヘキシミド (CHI) に感受性のタンパク質合成によって回復する。また、配偶子をEDTAやトリプシンなどで処理すると、鞭毛凝集能が失われるだけでなく、細胞体凝集物質も全て培養液中に失われた。EDTA処理液には、配偶子が細胞内に持っていた凝集活性とほぼ同程度の活性が認められた。トリプシン処理を行った配偶子にトリプシンインヒビターを加えると、まず鞭毛凝集能の回復が見られ、その後細胞体凝集物質の再蓄積が見られた。この過程は、CHIやツニカマイシンによって阻害を受けた。

第2章では、プラス型とマイナス型凝集物質の間で、S-S結合還元剤に対する感受性に明確な違いがあることを明らかにし、プラス型凝集物質の認識部位にはS-S結合が存在することを示唆した。プラス型配偶子にジチオスレイトール (DTT) を加えると、運動能を保持したままで30分以内に凝集能だけが失われ、同時に不活性型に変化した凝集物質が培養液中に放出された。さらに、プラス型凝集物質は、DTTにより *in vitro* でも不活性化され、SH基酸化剤であるジアミドの添

加により再活性化されることがわかった。プラス型配偶子の単離鞭毛をDTT処理した時には、凝集物質は、鞭毛に付着したままで不活性化された。一方、マイナス型凝集物質は、高濃度のDTTに対して *in vivo* でも *in vitro* でも全く不活性化されなかった。

第3章では、第一に、鞭毛凝集に伴って分泌される細胞壁溶解酵素は、配偶子だけでなく栄養細胞にも存在すること、さらに、栄養細胞内ではその存在形態が不活性型(V型)であることを明らかにした。V型酵素は、細胞をあらかじめ凍結・融解処理したり細胞破碎液を超音波処理することによって活性化され、活性型に変化させた酵素は、配偶子破碎液中に見出される活性型(G型)酵素や分泌酵素と、分子量(ゲル濾過では67,000, SDSゲル電気泳動では62,000)や金属キレート剤・SH基修飾剤によって活性阻害を受ける点で一致した。V型酵素は、分画遠心やパーコール密度勾配遠心の結果から、活性型酵素やG型酵素に比べて、より高分子量であると推定された。

第二に、細胞壁溶解酵素は、V型酵素、G型酵素ともに、細胞内では細胞壁と細胞膜の間のいわゆるペリプラズム部にほぼ局在することを明らかにした。栄養細胞や配偶子の細胞壁を外から加えた酵素で溶解したところ、得られたプロトプラストの破碎液中には、V型酵素もG型酵素も検出できなかった。また、細胞壁を持たない突然変異株の破碎液にもほとんど酵素活性はなかった。栄養細胞のプロトプラストは、細胞壁の再生に伴って再び細胞内にV型酵素を蓄積した。両接合型配偶子のプロトプラストを混合したときには、正常な凝集と接合子形成が見られたが、培養液中への酵素の分泌は殆ど無かった。

第4章では、クラミドモナスの配偶子分化やその逆反応である脱分化に伴って、凝集物質と細胞壁溶解酵素が、時間的及び量的・質的にどのように変化するかについて研究した。液体培養を行った栄養細胞が配偶子に分化する過程では、鞭毛凝集能や融合能の獲得は、窒素源飢餓状態(−N培地)に移された後、4時間目から7時間目にかけておこったが、細胞体凝集物質の蓄積は、それより約1時間程度遅れて進行した。細胞壁溶解酵素は、最初の4時間はV型のままで存在し、凝集能や融合能の獲得とほぼ平行してG型に変化した。配偶子が栄養細胞に脱分化する程度では、鞭毛凝集能や融合能の消失と並行して細胞体凝集物質の活性が失われ、溶解酵素もG型からV型にもどった。

寒天培養を行った細胞は、−N培地に懸濁した後2時間以内に配偶子に分化したが、寒天上で鞭毛を失った状態の細胞は、両物質の活性が検出できなかったことから、それらは栄養細胞であり、液体培地に移された後速やかに活性を上昇させるものであることが確認された。さらに興味あることに、たとえ配偶子を−N培地の寒天上に置いた場合でも、その細胞は“固体”上ではやがて栄養細胞に脱分化することがわかった。クラミドモナスの配偶子分化は、“液体”環境下においてのみ進行することが示唆された。

第5章では、凝集物質と細胞壁溶解酵素の活性測定を組み合わせることによって、様々な内容をもつ接合変異株を、少なくとも4クラス(I 配偶子分化不能, II 凝集物質欠失, III 溶解酵素欠失, IV 融合不能)に分類できることを示した。そして、これまでに得られた接合変異株や新しく単離した変異株を実際に分類した。この方法は、特に表面的には凝集能を持たな

い一群の変異株をクラス I と II に明確に分類でき、これまで凝集変異株として単離された *imp*-2, *imp*-8, *imp*-12 は、全てクラス II 変異株であることが明らかになった。新しく単離した 3 つの凝集変異株もクラス II 変異株であった。そのうちの *agl*-1 は、マイナスの性遺伝子座に関連した劣性突然変異であると推定された。また、細胞融合ができない変異株 *imp*-1, *imp*-11, *fus* は、全てクラス IV 変異株であった。

第 6 章では、配偶子分化に関する温度感受性突然変異株 (クラス I) の初めての単離に成功し、その生理・生化学的及び遺伝的特性を明らかにした。得られた二つの温度感受性変異株 *dif*-1 と *dif*-2 は、ともに -N 培地中、25°C での誘導では正常に配偶子に分化したが、35°C では全く分化せず、*dif*-1 株では鞭毛も失われた。35°C で誘導した細胞の破碎液には凝集物質の活性がなく、溶解酵素は V 型であったところから、栄養細胞の状態で留まっていることがわかった。また、25°C で配偶子にした後に 35°C に移すと、-N 培地中であるのにも拘らず 3-5 時間後には栄養細胞に戻っていること、及び、再び 25°C に移すと配偶子に分化することがわかった。これらの変換は CHI により阻害された。遺伝解析の結果、*dif*-1 と *dif*-2 は別々の遺伝子座に位置する劣性突然変異であり、性遺伝子座とも関連していないことがわかった。

以上のように本論文は、クラミドモナスの接合に関連する二つの物質、性的凝集物質と細胞壁溶解酵素について、生物学的検定法の確立や細胞内における存在様式の確認などに関する基礎的研究を行い、さらに、それらの研究に基づいて、この生物を研究材料として利用できる最も興味深い課題の一つである生殖の分化、すなわち、栄養細胞から配偶子への分化、脱分化の研究を進め、この分野に少なからざる重要な新知見を提供している。

よって、本論文提出者齊藤達昭は学術博士の学位を得る資格があると認める。