

緑藻ユードリナの精子束形成誘導の活性測定 系の確立と活性因子精製の試み

ONO, Makoto / 大野, 真

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

64

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2023-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00026446>

緑藻ユードリナの精子束形成誘導の 活性測定系の確立と活性因子精製の試み

ESTABLISHMENT OF AN ASSAY SYSTEM
FOR SPERM-PACKET-INDUCING FACTORS IN *EUDORINA*

大野真
Makoto ONO
指導教員 廣野雅文

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Eudorina sp. (*Eudorina*) is a volvocine green algae at an evolutionarily intermediate stage between *Chlamydomonas* and *Volvox*, in which gametogenesis is induced by nitrogen depletion or by a pheromone. Although previous studies suggest that gametogenesis (formation of sperm packets) in *Eudorina* is induced by proteinaceous factors in male culture supernatant, its molecule has not been identified, mainly because the sperm-packet is not efficiently produced in the current assay system for the activity. To establish an efficient experimental system, I first selected male strains that efficiently form sperm packets from progenies of a cross between males and females strains. Next, I examined cell-culture conditions for efficient sperm-packet differentiation and found an improved condition. The inducing activity of sperm packet in male culture supernatant was fractionated by a CM-Sepharose column chromatography, and the activity in the eluted fraction was measured using the new assay system. Result shows that the factor is partially bound to the cation exchange resin, suggesting that the factor has a positive net charge in a neutral pH condition. Further purification will identify the factor for sperm packet formation and reveal mechanisms for gametogenesis in *Eudorina*.

Key words: *Volvocine, spermatogenesis, fractionation, cation-exchange chromatography*

1. 緒言

緑藻・ボルボックス系列はモデル単細胞緑藻クラミドモナスとその近縁種が多細胞緑藻からなる単系統群である。有性生殖において、クラミドモナスの配偶子形成は窒素飢餓によって誘導されるが[1]、この系列で最も進化した段階にある多細胞のボルボックスは、雄株が分泌する性フェロモンが雄株と雌株の配偶子形成を誘導する[2]。したがって、この系列の緑藻は進化の過程で有性生殖の誘導機構を変化させたと考えられるが、この系列のどの段階でその変化が起きたのかはわかっていない。

16 または 32 細胞からなる多細胞のユードリナは、この系列の進化の中間段階に位置する[3]。ユードリナの配偶子形成（精子束形成）は、雄株の培養上清によって誘導され、その誘導因子はタンパク質性であることが示唆されている[4, 5]。この誘導因子の分子実体を解明することは、ボルボックス系列の有性生殖の進化を理解する上で重要

である。しかし、ユードリナの精子束形成を安定して検出する実験手法が確立されておらず、誘導因子の活性を再現性よく解析できないことなどから、未だに精子束誘導因子の実体は明らかになっていない。

本研究では、ユードリナ精子束誘導因子の分子同定を目指し、使用するユードリナ株の改善と誘導活性を感受する細胞の培養条件などを検討し、安定して精子束誘導活性を検出する実験系を確立した。この実験系を用い、雄株の培養上清を陽イオン交換クロマトグラフィーによって分画した後に活性の検出を試みた。その結果、誘導因子は中性の pH 領域では正の電荷をもつことが明らかとなった。

2. 実験方法

(1) 精子束誘導活性の高い子孫株の作製

既存の雄株 (BF2-15) と雌株を交配し、形成された接合子を暗所で 1 ヶ月静置した。明所に移してから数日後に発

芽した栄養群体をクローン化して複数の子孫株を確立した。そのうち雄株2株 (EF3-H3 と EF3-M6) について、精子束の形成効率を調べた。

(2) 精子束誘導活性の測定方法

雄の栄養群体を窒素源と炭素源を含む培地で 32°C、180–220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、16 時間明期/8 時間暗期の条件で 3 日間培養した。この培養液から細胞分裂前の 8 体の栄養群体を 2 ml の窒素欠乏培地に移し、そこに 10% (v/v) の雄株培養上清を投与して、32°C、280–380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、16 時間明期/8 時間暗期の条件で培養した。約 48 時間後、培養液を終濃度 0.25% (v/v) のグルタルアルデヒドで固定し、培養液中の精子束および未分化群体 (栄養群体) の数を計測してその形成効率を調べた。すべての測定は、独立の個体群と培養液で 3 回繰り返した。

(3) 陽イオン交換クロマトグラフィーによる精子束誘導因子の分画

雄株の培養上清 50 ml に 終濃度 0.2 μM の Leupeptin、終濃度 2.5 mM の Pefabloc、終濃度 50 mM の HEPES 緩衝液を加えて pH6.6、7.2 または 7.8 に調整した後、同じ pH で平衡化した CM セファロースカラムに通し、素通り画分と洗浄画分を得た。カラムに 1 M NaCl を含む同じ pH の 50 mM HEPES 緩衝液 10 ml を通して溶出画分を得た。分画液を透析で脱塩した後、雄の栄養群体に投与してその精子束誘導活性を測定した。分画と脱塩操作は全て低温で行った。

3. 結果と考察

(1) 子孫株の精子束形成能の検討

既存株 (EF2-15) と新しく得た雄株 (EF3-H3 と EF3-M6) に対して精子束を誘導し、その形成効率を比較した。その結果、子孫株 EF3-H3 は既存株よりも 5.5 倍、子孫株 EF3-M6 は 17 倍精子束の形成効率が高かった (図 1)。このことからユードリナは有性生殖を経ると精子束形成能が高い子孫株が出現することがあることがわかった。以後の解析では EF3-M6 をユードリナ雄株として用いた。

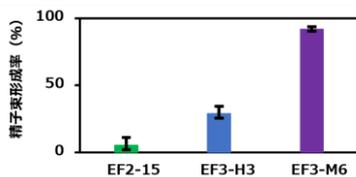


図 1 子孫株の精子束形成能

(2) 培養上清の投与量と精子束形成率の関係

精製した精子束誘導因子の活性を正確に測定するためには、活性の測定値が培養上清の量と比例する範囲で活性を測定する必要がある。そこで雄の栄養群体に投与する培養上清の量を 0, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5% (v/v) と変

化させたときの精子束の形成効率を調べ、測定系で用いる培養上清の投与量を検討した。その結果、1.25% (v/v) 以下の培養上清で精子束形成率が飽和することがわかった (図 2)。したがって精子束誘導活性の測定に 1% (v/v) の培養上清を用いることで、培養上清に存在する因子の活性を定量的に測定できると判断した。

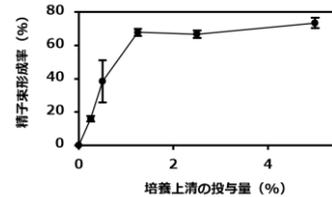


図 2 培養上清の投与量と精子束形成率の関係

(3) 精子束誘導活性の定性的な解析

確立した測定系を用いて、培養上清の分画液を雄の栄養群体に投与し、精子束誘導因子が存在する画分を調べた。しかし、1% (v/v) の培養上清では活性の測定値がなぜか安定しなかったため、活性を定性的に解析することにした。複数の pH 条件 (6.6、7.2、7.8) で分画した培養上清の活性を測定した結果、pH7.2 の条件で溶出画分に活性が検出された (図 3)。このことから pH7.2 の条件で精子束誘導因子の一部が CM セファロースに吸着する、すなわち正の電荷をもつことがわかった。

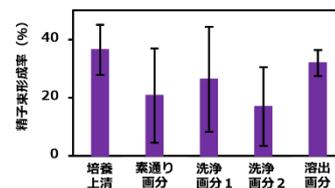


図 3 分画した培養上清の精子束誘導活性

4. 結言

本研究では、作製した精子束誘導活性の高い子孫株で活性測定に適した精子束の誘導条件を検討し、精子束誘導活性の測定系を確立した。確立した測定系を用いてカラムで分画した精子束誘導因子の活性を調べた結果、誘導因子の一部が陽イオン交換体に吸着することがわかった。今回明らかにした精子束誘導因子の性質をもとに、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー等で精製を行い、誘導因子の実体に迫りたい。

参考文献

- Harris. (2009) The *Chlamydomonas* Source Book, 2nd ed. Academic Press
- Tschochner et al. (1987) *EMBO J.* **6**, 2203–2207
- Hamaji et al. (2018) *Commun. Biol.* **1**, 17
- Szostak et al. (1973) *J. Phycol.* **9**, 215–218
- 豊岡ら, 未発表データ