
Mini Review

クラミドモナスのマトリクス・メタロプロテアーゼ・ファミリー

久保 雄昭

岡山理科大学理学部基礎理学科 日本学術振興会特別研究員
〒700-0005 岡山市理大町1-1

The structure and function of the matrix metalloproteinase gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*

Takeaki KUBO

Department of Applied Science, Faculty of Science, Okayama University of Science, Okayama 700-0005, Japan

SUMMARY

MMP (Matrix metalloproteinase) is a zinc-binding metalloproteinase functions in degrading and remodeling extracellular matrix (ECM). They identified in plants, in *Arabidopsis*, soybean, cucumber, or green algae *Volvox*. But the exact functions of MMP in plants are still not known. There are at least three matrix metalloprotease (MMP) genes in *Chlamydomonas reinhardtii*: 1) MMP1 gene encodes gametolysin (EC 3.4.24.38), which is responsible for removal of cell walls of gametes of both mating types during mating as a necessary prelude to cell fusion; 2) MMP2 gene is tandemly oriented with MMP1 gene and codes for a protein that is 54% identical to gametolysin; 3) MMP3 is found by a search of the EST library and codes for a protein with 65% identity to gametolysin. All three proteases have characteristic motifs of MMP. Specific antibodies were raised against the oligopeptides derived from cDNA sequences of MMP2 and MMP3, respectively. MMP2 was synthesized during 4-20 hrs after zygote cells

1. はじめに

動、植物細胞が生命の基本的生命活動である成長・分化・有性生殖などを行うには細胞外マトリ

クス (ECM) の一時的かつ局所的な破壊と再構築が必要である。植物においては細胞壁が植物の ECM と認知されることも多くなってきた。この植物 ECM の破壊には、これまで主にムラミダーゼやグリコシダーゼなどのような細胞壁の主要成分であるヘミセルロースやペクチンなどの糖類を分解する酵素群の重要性が指摘されてきた (Taize, 1984)。しかし、近年においてダイズやキュウリ、シロイヌナズナにおいて MMP の存在が確認され (Pak et al., 1992; Delorme et al., 2000; Maidment et al., 1999)、とくに单

Tel & Fax: +81-86-256-9408
e-mail: kubo@das.ous.ac.jp

(Received: 31 Jan 2006)

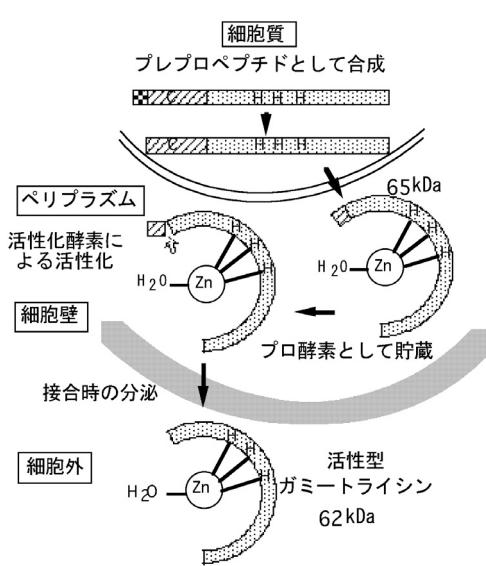


図1. クラミドモナスの MMP1 であるガミートライシンの合成、活性化、分泌の模式図 (Matsuda and Kubo, 2004 より改変)

細胞性の緑藻であるクラミドモナスでは細胞をとりまく ECM の破壊に関して生理的な役割が明確になっている (Matsuda and Kubo, 2004)。このミニ・レビューでは、近年新たに同定されたクラミドモナスの三種の MMP ファミリーを中心に研究を紹介したい。

2. クラミドモナスのマトリクス・メタロプロテアーゼ、ガミートライシン

クラミドモナスは緑藻綱ボルモックス目に属する单細胞性の緑藻である。2本の等長の鞭毛で自在に遊泳する一方で、細胞壁や葉緑体などの植物的な細胞小器官を有する原生動物である。クラミドモナス・ラインハーディ (*Chlamydomonas reinhardtii*) は有性生殖の生活環を有した雌雄異株であり、相補的な一対の接合型をプラス型とマイナス型と読んで区別する。形態的には両接合型ともほとんど同一で、別々に無性的栄養増殖を繰り返す (図 3)。一方、雌雄の栄養細胞は窒素源飢餓がシグナルとなって雌雄配偶子に分化する。分化した両配偶子を混合するとダイナミックな鞭毛凝集が起こる。この鞭毛凝集がシグナルとなって、両配偶子が細胞壁を脱ぎ捨ててプロトプラスト化し、同時にプラス型細胞から接合管

が伸長してマイナス型細胞の接合構造と接着、原形質連絡橋が形成される。その後両配偶子細胞が融合し、数分後に接合子を形成する (図 3)。

クラミドモナスの MMP は上述した雌雄配偶子が細胞融合の前に細胞壁を離脱させるときに機能する酵素であり、ガミートライシンと命名されている。ガミートライシンは、その cDNA 配列に基づく一次構造から全長 639 アミノ酸残基のうち 28 アミノ酸残基のシグナルペプチド、155 残基のプロペプチド、455 残基とのマチュアペプチドからなるプレプロペプチドとして細胞内で合成される (Kinoshita et al., 1992)。アミノ酸配列のモチーフとして、動植物の MMP ファミリーに共通して存在する HEXXHXXGXXH 配列からなる Zn²⁺ 結合モチーフがマチュアペプチドの中に存在し、プロペプチドの中には、システイン・スイッチと呼ばれる Cys 残基が活性中心の Zn²⁺ に配位することによってプロ型の MMP 活性を抑制する構造をもつた共通モチーフが存在する。またマチュアペプチドの C 末端領域には、Ca²⁺ 結合モチーフがある。

ガミートライシンのプロ型酵素は細胞壁と細胞膜の間、すなわちペリプラズム空間に貯蔵されることがわかっている (Matsuda et al., 1985)。特異抗体を用いたウエスタンプロット実験では、栄養細胞のペリプラズム空間中には 65kDa のバンドが、また鞭毛凝集により細胞壁が離脱した際の上清中には 62kDa のバンドが検出されることから、ガミートライシンは、鞭毛凝集を通じて分泌される活性化酵素によりプロセッシングを受け、65kDa のプロ型から 62kDa の活性型すなわちマチュア型酵素に変換され、細胞壁に対する分解活性を持つと考えられている (Matsuda and Kubo, 2004) (図 1)。

3. クラミドモナスの MMP ファミリー

近年、私たちはクラミドモナスのインデックス・ゲノム PAC ライブラリーからガミートライシン遺伝子を単離し、その構造を詳細に解析した (Kubo et al., 2000)。その結果、ガミートライシン遺伝子はおよそ 3.5kb にわたって 7 つのエキソンと 6 つのイントロンからなる構造をもっていた。プロモーター領域には TATA 配列及び CAAT 配列も存在していた。

興味深いことに、ガミートライシン遺伝子の 1kb ほど上流に、ガミートライシン遺伝子様の遺伝子がもう一つ存在していることがわかった。この遺伝子を詳細に解析したところ、10 のエキソンと 9 つのイントロンを持っていること、またこの遺伝子のプロモーター領域にはガミートライシン遺伝子にみられた TATA 配列及び CAAT 配列は存在していないことがわ

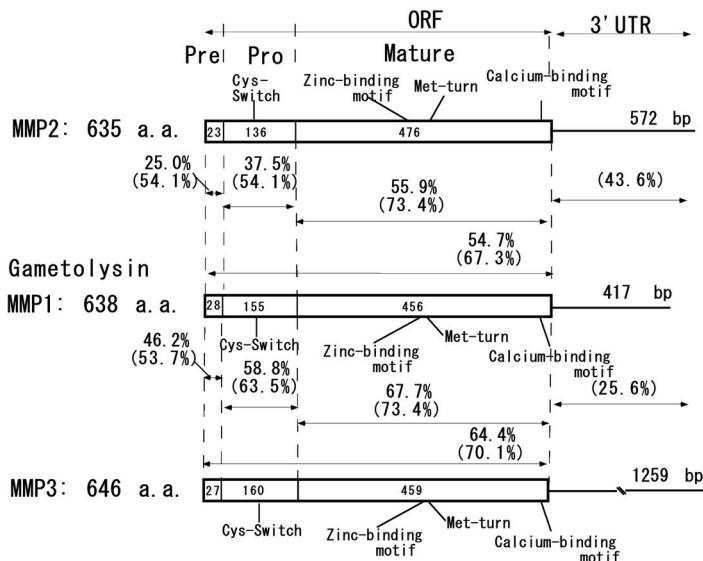


図2. クラミドモナスに存在する3種類のMMPファミリー、MMP1 (gametolysin)、MMP2、MMP3の間でのcDNA塩基配列と推定アミノ酸配列の相同性比較。ボックス中の数字は、推定プレ、プロ、マチュア領域のアミノ酸残基数。塩基レベルでのホモジニー%は括弧内に示す。

かった。次に、この遺伝子の推定ORF及び3'UTR領域をプローブとして、クラミドモナスESTライブラリーの検索を行い、5'RACE法により完全長のcDNAを単離したところ、およそ2.5kBのcDNAが得られた。この遺伝子にコードされているタンパク質は、全長635アミノ酸残基で、ガミートライシン(639残基)と54.7%の相同性を有し、推定のマチュア領域においては55.9%の相同性を示した。活性中心を形成するHEXXHXXGXXH配列からなるZn²⁺結合モチーフも存在し、その存在位置もガミートライシンと酷似していた。またこのタンパク質もプロ領域内にシステイン・スイッチ、C末端領域には、Ca²⁺結合モチーフが存在していた。私たちはこの遺伝子をmmp2と命名し、同時にガミートライシン遺伝子をmmp1とした(Kubo et al., 2000) (図2)。

更なるクラミドモナス・MMPファミリーを検索することを目的としてESTライブラリーを検索したところ、第3のMMPであるMMP3を得た(Kubo et al., 2001)。MMP3は全長646アミノ酸残基、MMP1(ガミートライシン)、MMP2と比較して、全長においてはそれぞれ64.4%、45.3%を示し、推定マチュア領域においてはそれぞれ67.7%、51.2%もの相同性を示し

た。MMP1、MMP2と同様にこのタンパク質もプロ領域にシステイン・スイッチ、マチュア領域に活性中心であるZn²⁺結合モチーフ、そしてC末端にCa²⁺結合ドメインを保持していた。

4. クラミドモナスの生活環におけるMMPファミリーの発現制御と機能

雌雄配偶子の鞭毛凝集時において配偶子の細胞壁に対して活性をもつMMP1は、栄養細胞の状態でも一定量が発現され、クラミドモナス配偶子誘導過程においてその発現量が上昇する制御を受けることがわかっている(Kinoshita et al., 1992)。それでは他の二つのファミリーであるMMP2とMMP3はクラミドモナスの生活環のどの段階でそれぞれ発現し、機能するのであろうか。

MMP2およびMMP3の特異抗体を作製して、それぞれの挙動の解析をおこなった。まず両者共にその発現をウエスタンプロットで解析した結果、MMP2は76kDaのバンドとして検出され、栄養細胞、配偶子、接合子の細胞において、接合子で特にその発現が顕

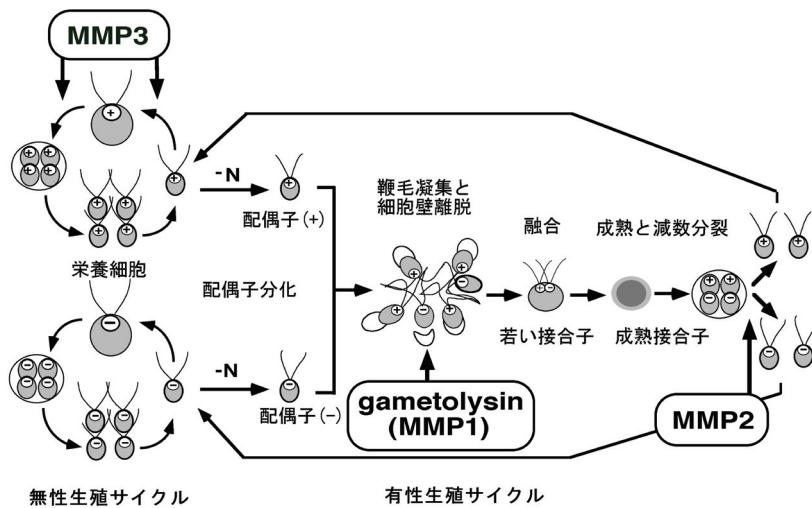


図3.クラミドモナスのライフサイクルとMMP2およびMMP3の機能

著に高まっていた。接合子形成過程でみてみると、接合子形成4時間後から合成が開始され、20時間後でその合成量が最大になった。MMP3は、65kDaのバンドとして検出され、配偶子や接合子での発現は受けられず、栄養細胞のみで発現していることがわかった。またMMP3は同調化した栄養細胞周期において、G₁期の中期から後期にかけてその合成量が一過的に増大していた（Kubo et al.,未発表）。またこれらの結果は、MMP2、MMP3遺伝子のmRNAの転写の時期とそれっぽく一致していた（Kubo et al., 2000）。

MMP2およびMMP3は、MMP1とのアミノ酸配列の相同性の高さや、システイン・スイッチや活性中心であるZn²⁺結合モチーフなどの存在から、両者共に何らかの形で細胞壁溶解に関与する酵素である可能性は高い。MMP2は接合子成熟過程で合成されるところから、この酵素は接合子細胞壁中で減数分裂後に生じた娘細胞が接合子細胞壁を破ってハッヂするときに機能するのかもしれない（図3）。一方MMP3は細胞が急激に伸長成長するG₁期の中期から後期にかけて一過的に蓄積されることから、この酵素は細胞体積の増大に伴い細胞壁の拡張のために、細胞壁に部分的な分解に関与している可能性が考えられる（図3）。いずれにしても両方の酵素についてその局在場所を解析し、さらに精製を行って細胞壁に対する感受性を解析していくことでMMP2、MMP3のより詳細な生理的機能や動態が明らかになっていくだろう。

5. おわりに

クラミドモナスのMMPファミリーの発現や機能を解析することで、植物細胞の異なった分化した細胞では、細胞壁の分解がそれぞれ異なったMMPによって引き起こされることが分かってきた。上記で述べてきたクラミドモナス・MMPファミリーの他にも、同じ目に属する群体性の*Volvox carteri*でもVMPと呼ばれるMMPファミリーの存在が確認されている（Hallman et al., 2001）。これらのVMPは*Volvox*の細胞体が傷ついたときに、また有性生殖時を行う際に放出する性フェロモンによっても転写が誘導されることがわかっている。VMPの酵素としての機能は未知ではあるが、群体型の緑藻においてもクラミドモナスのMMPファミリーと同様に、有性生殖時などの分化した細胞などに応じて、異なったVMPが細胞壁などのECMに対して働きかけているならば、発生学的また進化学的な見地からも見ても興味深い。

謝辞

本研究の指導をしていただいた松田吉弘先生（神戸大・理）と、原稿の校閲をしていただいた齋藤達昭助教授（岡山理科大・理）に深く感謝致します。

参考文献

- Delorme VCR., McCabe PF., Kim DJ and Leaver CJ. (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.* 123:917-927
- Hallman A., Amon P., Godl K., Heitzer M., Sumper M (2001) Transcriptional activation by the sexual pheromone and wounding: a new gene family from Volvox encoding modular proteins with (hydroxy) proline rich and metalloproteinase homology domains. *Plant Journal* 26:5833-593
- Kinoshita T., Fukuzawa H., Shimada T., Saito T and Matsuda Y. (1992) Primary structure and expression of a gametic lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: similarity of functional domains to matrix metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4693-4697
- Kubo T., Saito T., Fukuzawa H. and Matsuda Y.(2001) Two tandemly-located matrix metalloprotease genes with different expression patterns in the *Chlamydomonas* sexual cell cycle. *Curr. Genet.* 40:136-143
- Kubo T., Abe J., Saito T and Matsuda Y (2001) Genealogical relationships among laboratory strains of *Chlamydomonas reinhardtii* as inferred from matrix metalloprotease genes. *Curr. Genet.* 41:115-122
- Maidment J., Moore D., Murphy GP., Murphy G and Clark I.(1999) Matrix metalloproteinase homologous from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 274:34706-34710
- Matsuda Y. and Kubo T. (2004) *Gametolysin*. Handbook of proteolytic enzymes, second edition. Academic Press, New York
- Mastuda Y., Saito T., Yamaguchi T. and Kawase H.(1985) Cell wall lytic enzyme released by mating gametes of *Chlamydomonas reinhardtii* is a metalloproteinase and digests the sodium perchlorate-insoluble component of cell wall. *J. Biol. Chem.* 260:6373-6377
- Pak JH., Liu CH., Huangpu J. and Graham JS.(1997) Construction and characterization of the soybean leaf metalloproteinase cDNA. *FEBS Lett.* 404:283-288
- Taize, L.(1984) Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:585-657

