

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ナマコのキャッチ結合組織を軟化させるタンパク質の研究
Title(English)	
著者(和文)	竹花康弘
Author(English)	Yasuhiro Takehana
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9403号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:本川 達雄,濱口 幸久,本郷 裕一,田中 幹子,鈴木 崇之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9403号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻:	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野):	博士 (理学)
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of
学生氏名:	竹花 康弘		指導教員 (主):	本川 達雄 教授
Student's Name			Academic Advisor(main)	
			指導教員 (副):	
			Academic Advisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

ナマコの体壁真皮は代表的なキャッチ結合組織である。キャッチ結合組織は硬さを素早く変化させることが出来る結合組織で、結合組織の細胞外成分の硬さが変わる。硬さには、軟らかい状態・標準状態・硬い状態の3つの状態がある。硬さの変化は、神経支配下で分泌細胞が刺激され、そこから硬さ調節因子が分泌され、それが細胞外成分に直接働きかけて硬さ変化が起こると考えられている。過去の研究において組織の硬さを変化させるいくつかの化学的因子が報告されてきたが、細胞外成分に直接働きかけることが実験的に示された因子は無く、硬さ変化機構には未だ不明な点が多い。細胞外成分に直接働きかけて硬さを変化させる因子を発見することは、硬さ変化の分子機構を明らかにするために不可欠である。本研究では、細胞外成分に働いてナマコ真皮を軟化させる因子を、ナマコから抽出することを試みた。

軟化因子の抽出にはシカクナマコ *Stichopus chloronotus* の体壁真皮を用いた。緩衝液中に浸した真皮をステンレス棒で刺激して溶かし、この抽出液をカラムクロマトグラフィーで精製していくことで軟化因子を追った。抽出液及び精製した画分の軟化活性は、動的力学試験により確かめた。この試験に用いたナマコ真皮はシカクナマコとニセクロナマコ *Holothuria leucospilota* のものであり、前者は界面活性剤 Triton X-100 処理によって細胞を破壊した真皮「トリトンモデル」を、後者はトリトンモデルだけでなく、トリトンモデルを凍結融解処理して細胞外成分間の相互作用を解除した真皮「トリトン凍結融解モデル Triton-Freeze-Thaw-model」(TFT モデル)、そして細胞破壊処理を行っていない生きた真皮の3種類の試料を用いた。これらの真皮に±5%の引張圧縮歪みを繰り返し加え、その時に真皮が示す応力を測定した。引張歪みが+5%の時に真皮が最大の応力を発揮したため、これを1周期中の硬さの指標とした。抽出液及び精製物を真皮に与えた時の硬さの変化から軟化活性の有無を判別した。

シカクナマコの真皮抽出液には、シカクナマコのトリトンモデルを軟化させる活性があった。抽出液中には細胞外成分に直接働きかける軟化因子が含まれていると考え、陰イオン交換クロマトグラフィーと2種類のゲルろ過クロマトグラフィーを利用して軟化活性を持つ画分の精製を進めた。3段階のカラムクロマトグラフィーで精製された画分を SDS-PAGE で泳動したところ、見かけの分子量が 20 kDa の単一のバンドが得られ、このタンパク質を軟化因子だと見なした。これは糖鎖検出試薬で染まる糖タンパク質である。軟化因子の N 末端アミノ酸配列を解析し、SEXVPPSTSYTPVXITK という 17 残基分の配列を得た。3 残基目は修飾があって決定出来ず、14 残基目はプロリンまたはフェニルアラニンのどちらかである。BLAST を用いて相同性解析を行ったが、この配列と高い相同性を持ち、軟化の作用を説明し得るような既知タンパク質は見つからなかった。そのため、このタンパク質は新発見のものであると考え、キャッ

チ結合組織を軟化させるという働きからソフニン(softenin)と命名した。

トリトンモデルは、シカクナマコとニセクロナマコどちらのものでもソフニンを与えると軟化した。この結果は、ソフニン及びその相同タンパク質がナマコに広く分布する、共通の軟化因子であることを示唆している。ソフニンはトリトンモデルだけでなくニセクロナマコの生きた真皮も軟化させたことから、細胞が生きているかどうかはその活性に関係がない。TFTモデルはトリトンモデルよりも軟らかく、ソフニンを与えても軟化しなかったが、硬化タンパク質テンシリン(tensilin)を与えることで硬化した。テンシリンはニセクロナマコの単離コラーゲン繊維を凝集させる作用があることから細胞外成分に直接働きかけている可能性を指摘されていたが、この結果はソフニンと同じくテンシリンが細胞外成分に働きかけていることの初めての実験的証拠である。ソフニンはテンシリンを与える前の TFT モデルを軟化させることはなかったが、テンシリンを与えて硬化させた後の TFT モデルを、テンシリンを与える直前と同程度の硬さにまで軟化させた。これらの結果は、トリトンモデルは標準状態、TFTモデルは軟らかい状態の生きた真皮の力学的状態に対応し、ソフニンはテンシリンを与えることによって起こった軟らかい状態から標準状態への硬化を打ち消すことを示唆している。

ニセクロナマコの体壁真皮から単離したコラーゲン繊維を用いた凝集検定を行った。コラーゲン懸濁液に対しテンシリンを与えたところ凝集が起き、単一の大きく密な凝集塊が出来た。この凝集塊を含む溶液に対しソフニンを与えると、この大きな凝集塊は沢山の小さな低密度の凝集塊に分散した。また、繰り返し凍結融解処理を施すことによっても同様な分散が見られた。これらの結果は、テンシリンを与えることによって促され、凍結融解処理によって破壊されるようなコラーゲン繊維間の架橋生成を、ソフニンが妨害することで真皮の硬さを減少させていることを強く示唆している。ソフニンは細胞外成分間の架橋に働きかけることが示された初めての軟化因子である。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名 : Student's Name	竹花 康弘		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	本川 達雄	教授
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

The dermis in the holothurian body wall is a typical catch connective tissue that shows rapid stiffness changes. Some chemical factors that change the stiffness of the tissue were found in previous studies, but the molecular mechanisms of the changes are not yet fully understood. Detection of factors that change the stiffness by working directly on the extracellular matrix was vital to clarify the mechanisms of the change. We isolated from the body wall of the sea cucumber *Stichopus chloronotus* a novel glycoprotein, softenin, that softened the body-wall dermis whose cells had been disrupted by Triton X-100. This implied that softenin changed dermal stiffness through directly affecting stiffness of extracellular materials. The apparent molecular mass of softenin was 20 kDa. The N-terminal sequence of 17 amino acids had low homology to that of known proteins. Catch connective tissue takes three different mechanical states, soft, standard, and stiff. Triton-treated dermis corresponded to the dermis in the standard state. Triton-Freeze-Thaw (TFT) dermis, which was prepared by repetitive freeze-and-thawing of Triton-treated dermis, corresponded to the soft dermis. TFT dermis did not respond to softenin whereas it was stiffened by tensilin, a sea-cucumber derived stiffening protein. Tensilin-stiffened TFT dermis became soft when softenin was applied, suggesting the antagonism between softenin and tensilin. The antagonism was also observed in the suspended solution of collagen fibrils isolated from the sea-cucumber dermis. Tensilin caused fibril aggregation while softenin suppressed it. Freeze-and-thawing not only caused stiffness change from standard to soft state in Triton-treated dermis but also induced dissolving the tensilin-aggregated collagen fibrils. These results suggested that softenin decreased dermal stiffness through inhibiting some mechanical interactions between collagen fibrils. Thus, softenin is the first softener shown to work directly on the mechanical interaction between extracellular materials.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).