

Title	棘皮動物ヒトデ胚と幼生を用いたTGFb1機能とその活性化メカニズムの解析
Sub Title	Study on molecular function TGFb1 and its activation mechanisms in starfish embryos and larvae
Author	金子, 洋之(Kaneko, Hiroyuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>ヒトデ胚間充細胞に発現するアスタチン属の膜型メタロプロテアーゼ (MC5分子) には増殖誘起能があり、胚成長に必須であると考えられる。その分子機序として、MC5分子は潜在型Transforming growth factor (TGFb1)の分子内切断を行い、活性型に変換させている可能性がある。本研究では、この仮説を検証した。</p> <p>(1) RNAseq法で得たヒトデ原腸胚の発現遺伝子情報をもとに、TGFb1遺伝子を単離した。これをもとに、N端とC端の両端をヒスチジンで標識したHisタグ融合タンパク質を培養下でHEK293細胞に合成させ、分泌前と分泌後のTGFb1の状態を比較した。Hisタグ親和性カラムでの精製を介し、還元条件下でのSDS-PAGE後、抗His抗体で両TGFb1のウエスタンブロットを行った。その結果、分泌後TGFb1では少なくとも4本の実体予測が困難なバンド (Unexplainable: UE) が検出されるのに対し、分泌前TGFb1では潜在型を示すTGFb1の分子量46kDaの1本の濃いバンドと17kDaの1本の薄いUEバンドが認められた。以上から、HEK293細胞細胞内の分泌前TGFb1の方が本実験の使用には合致していた。</p> <p>(2) MC5分子が潜在型TGFb1を分子内切断していることをin vivoで検証する実験系として、3日幼生から外胚葉細胞を除去した原腸複合体 (Archenteron complex: AC) を作成した。ACには、原腸細胞以外に間充細胞と細胞外マトリックスが含まれていることに加え、試験管内でのTGFb1との反応操作が容易である。約150個体分のACを25μlのTGFb1中で24時間、室温、メトロノーム式振盪下でインキュベートした。上記 (1) と同条件でウエスタンブロット解析を行ったところ、非AC下で検出されていた分泌前TGFb1の2本のバンドは消失し、新たに活性型と思われる15kDaの薄いバンドが検出された。一方、この実験で期待される活性型TGFb1のカセット機能を果たす31kDaのLAP領域のバンドは検出されなかった。今後、潜在型TGFb1を1本のバンドとして検出可能な無細胞系でのタンパク合成、ACでなく純粋な間充細胞集団への変更、インキュベート時間の検討など実験系をさらに洗練させることを考えている。</p> <p>Astacin metalloprotease (MC5 molecule) is equipped with the plasma-membrane of embryonic and larval mesenchyme cells of the starfish, <i>Asterina pectinifera</i>. We have previously shown that MC5 molecule involves to proliferative induction against the embryonic cells during growth of body-size. Here, we examine the hypothesis that MC5 molecule lets transforming growth factor (TGFb1) to change from latent- to active-form via its intramolecular dissection.</p> <p>(1) A TGFb1 gene was isolated through RNA seq method on embryos at the gastrula-stage. Then, in culture system of HEK 293 cells, TGFb1 protein was synthesized, while being tagged with poly histigine amino acids at the both N- and C-terminal sites, and purified by His tag-affinity column. In order to compare state of the pre- and post-secreted TGFb1, each TGFb1 was conducted to western blot analysis with anti-His tag antibody after SDS-PAGE in a reduction condition. It was shown, in the post-secreted TGFb1, that the antibody reacts to at least four bands, in which latent form of TGFb1 was unexplainable (UE-band). On the other hand, in the pre-secreted TGFb1, it was obviously detected a MW46kDa-band corresponded with active form of TGFb1, although an UE-band was also reacted with the antibody. We, therefore, proceeded the next experiment by using of pre-secreted TGFb1.</p> <p>(2) In order to examine whether MC5 molecule dissects intramolecularly TGFb1, we prepared archenteron complex (AC) of 3 day-larva in which the ectodermal cells were removed, but the mesenchyme cells were remained in enclosure of the blastocoelic extracellular matrix in around the archenteron. The AC is available to interact the mesenchyme cells with TGFb1 simply in incubation without any injection techniques. When approximately one hundred fifty ACs were incubated with TGFb1 for 24h at room temperature in a gentle shaking experiment of the 25ul-scale volume and then carried out western blot as done in (1), it was shown that the two bands described in (1) was not detected and one 15kDa-band newly appeared. Although the 15kDa-band was faintly detectable, this band size corresponds to active form of TGFb1. On the other hand, we could not detect any 31kDa-band corresponded to the LAP domain that has a cassette-function for TGFb1.</p> <p>At the present, it is necessary to elaborate experimental system in the terms of adoption of cell free</p>

	protein synthesis system for TGFb1, utilization of a pure population of mesenchyme cells instead for AC, further examinations of incubation time, and so on.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000006-20180391

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	文学部	職名	教授	補助額	786 千円
	氏名	金子 洋之	氏名（英語）	Hiroyuki Kaneko		
研究課題（日本語）						
棘皮動物ヒトデ胚と幼生を用いた TGFb 1 機能とその活性化メカニズムの解析						
研究課題（英訳）						
Study on molecular function TGFb1 and its activation mechanisms in starfish embryos and larvae						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
金子洋之（Hiroyuki Kaneko）		文学部、教授				
倉石立（Ritsu Kuraishi）		文学部、准教授				
古川亮平（Ryohei Furukawa）		文学部、助教（有期）				
松本緑（Midori Matsumoto）		理工学部、准教授				
佐藤由紀子（Yukiko Sato）		経済学部、講師（非常勤）				
1. 研究成果実績の概要						
<p>ヒトデ胚間充細胞に発現するアスタチン属の膜型メタロプロテアーゼ（MC5 分子）には増殖誘起能があり、胚成長に必須であると考えられる。その分子機序として、MC5 分子は潜在型 Transforming growth factor (TGFb1) の分子内切断を行い、活性型に変換させている可能性がある。本研究では、この仮説を検証した。</p> <p>(1) RNAseq 法で得たヒトデ原腸胚の発現遺伝子情報をもとに、TGFb1 遺伝子を単離した。これをもとに、N 端と C 端の両端をヒスチジンで標識した His タグ融合タンパク質を培養下で HEK293 細胞に合成させ、分泌前と分泌後の TGFb1 の状態を比較した。His タグ親和性カラムでの精製を介し、還元条件下での SDS-PAGE 後、抗 His 抗体で両 TGFb1 のウエスタンブロットを行った。その結果、分泌後 TGFb1 では少なくとも4本の実体予測が困難なバンド (Unexplainable: UE) が検出されるのに対し、分泌前 TGFb1 では潜在型を示す TGFb1 の分子量 46kDa の 1 本の濃いバンドと 17kDa の 1 本の薄い UE バンドが認められた。以上から、HEK293 細胞細胞内の分泌前 TGFb1 の方が本実験の使用には合致していた。</p> <p>(2) MC5 分子が潜在型 TGFb1 を分子内切断していることを in vivo で検証する実験系として、3日幼生から外胚葉細胞を除去した原腸複合体 (Archenteron complex: AC) を作成した。AC には、原腸細胞以外に間充細胞と細胞外マトリックスが含まれていることに加え、試験管内での TGFb1 との反応操作が容易である。約 150 個体分の AC を 25 μl の TGFb1 中で 24 時間、室温、メトロノーム式振盪下でインキュベートした。上記 (1) と同条件でウエスタンブロット解析を行ったところ、非 AC 下で検出されていた分泌前 TGFb1 の 2 本のバンドは消失し、新たに活性型と思われる 15kDa の薄いバンドが検出された。一方、この実験で期待される活性型 TGFb1 のカセット機能を果たす 31kDa の LAP 領域のバンドは検出されなかった。</p> <p>今後、潜在型 TGFb1 を 1 本のバンドとして検出可能な無細胞系でのタンパク合成、AC でなく純粋な間充細胞集団への変更、インキュベーション時間の検討など実験系をさらに洗練させることを考えている。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>Astacin metalloprotease (MC5 molecule) is equipped with the plasma-membrane of embryonic and larval mesenchyme cells of the starfish, <i>Asterina pectinifera</i>. We have previously shown that MC5 molecule involves to proliferative induction against the embryonic cells during growth of body-size. Here, we examine the hypothesis that MC5 molecule lets transforming growth factor (TGFb1) to change from latent- to active-form via its intramolecular dissection.</p> <p>(1) A TGFb1 gene was isolated through RNA seq method on embryos at the gastrula-stage. Then, in culture system of HEK 293 cells, TGFb1 protein was synthesized, while being tagged with poly histigine amino acids at the both N- and C-terminal sites, and purified by His tag-affinity column. In order to compare state of the pre- and post-secreted TGFb1, each TGFb1 was conducted to western blot analysis with anti-His tag antibody after SDS-PAGE in a reduction condition. It was shown, in the post-secreted TGFb1, that the antibody reacts to at least four bands, in which latent form of TGFb1 was unexplainable (UE-band). On the other hand, in the pre-secreted TGFb1, it was obviously detected a MW46kDa-band corresponded with active form of TGFb1, although an UE-band was also reacted with the antibody. We, therefore, proceeded the next experiment by using of pre-secreted TGFb1.</p> <p>(2) In order to examine whether MC5 molecule dissects intramolecularly TGFb1, we prepared archenteron complex (AC) of 3 day-larva in which the ectodermal cells were removed, but the mesenchyme cells were remained in enclosure of the blastocoelic extracellular matrix in around the archenteron. The AC is available to interact the mesenchyme cells with TGFb1 simply in incubation without any injection techniques. When approximately one hundred fifty ACs were incubated with TGFb1 for 24h at room temperature in a gentle shaking experiment of the 25ul-scale volume and then carried out western blot as done in (1), it was shown that the two bands described in (1) was not detected and one 15kDa-band newly appeared. Although the 15kDa-band was faintly detectable, this band size corresponds to active form of TGFb1. On the other hand, we could not detect any 31kDa-band corresponded to the LAP domain that has a cassette-function for TGFb1.</p> <p>At the present, it is necessary to elaborate experimental system in the terms of adoption of cell free protein synthesis system for TGFb1, utilization of a pure population of mesenchyme cells instead for AC, further examinations of incubation time, and so on.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			