

## *Volvox globator* の性誘起物質と生理活性特性

高 知 滋

埼玉県立狭山清陵高等学校 (350-13 埼玉県狭山市上奥富34)

Kochi, S. 1991. A sex-inducing substance in *Volvox globator* and its physiological properties. Jpn. J. Phycol. 39: 49-54.

A sex-inducing substance (SIS) was extracted with water after homogenization of colonies in the sexual reproduction phase of *Volvox globator*, a monoecious species. The substance exhibited an intense physiological activity, a remarkable sex-inducing effect not only on *V. globator* itself but also on other species of *Euvolvox* including *V. merrilli*. It is remarkably stable against heat and organic solvents, and seems to be a relatively low-molecular weight protein that is deactivated by acid or base and by proteolytic enzyme pronase.

*Key Index Words:* culture—physiological property—sex-inducing substance—*Volvox globator*.  
Sigeru Kochi, Saitama Prefecture Sayama Seiryō Senior High School, Kamiokutomi 34, Sayama, 350-13 Japan

*Volvox* の性誘起に関する研究は *Volvox aureus* で Darden (1966) が, *V. carteri* で Starr and Jaenicke (1974) と Tschochner *et al.* (1987) が, *V. rousselletii* で McCracken and Starr (1970) が, いずれも雌雄異体の種を用いて, その雄性群体を誘起する MIS (male inducing substance) について報告している。

本研究では, 雌雄同体の種 *Volvox globator* の有性生殖期の群体を破碎し, 水によって抽出した物質を用いて, その生理活性と特性を調べた。

### 材料および方法

#### 1. 材 料

実験に用いた材料は *Volvox globator* (1974年神奈川県立教育センターの楠元守氏が神奈川県「子供の国」で採取したものを1984年8月に入手), *V. merrilli* (1987年5月26日埼玉県立戸田高校の小川なみ氏が戸田市新曾の水田で採取したものを入手), *Volvox* sp. 1 (1986年10月12日狭山湖で採取), *Volvox* sp. 2 (1987年7月2日狭山市下奥富の水田で採取) の *Euvolvox* 節に属する雌雄同体の4種と *V. aureus* (1986年10月10日埼玉県長瀬で採取), *V. carteri* ♂ (1986年7月14日一宮市立萩原中学校の小笠原義和氏が愛知県一宮市浅井の水田で採取したものを入手) である。

なお, *Euvolvox* 節の2種を sp. としたのは Smith (1944) の分類に合致しなかったためである。

#### 2. *V. globator* の生殖

#### (1) 無性生殖

*V. globator* の無性生殖群体は球状に近い楕円体形で, 群体を構成する細胞は太い連絡糸で互いに連結し, 各細胞は個体軸をもち, およそ8,000~17,000個の小型の栄養細胞の他に5~12個の大型の生殖細胞が散在する。生殖細胞 (gonidium) は細胞分裂をくり返しながら群体の中心部へ落ち込み, 反転 (inversion) し, 娘群体が完成する。娘群体は母群体内でゆるやかに回転しているが, その後遊出し, 次代の群体となる。

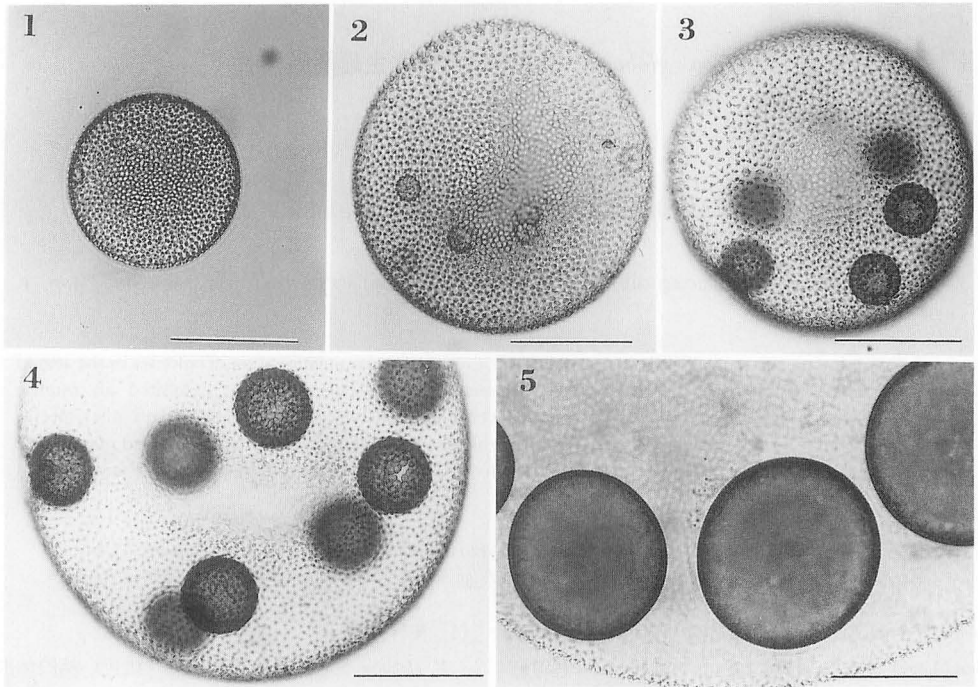
遊出した若い群体が成長し, 次代の群体を遊出するまでの過程を5つの stage に区分し, Table 1 と Figs. 1~5 に示す。

#### (2) 有性生殖

*V. globator* はホモタリック, 雌雄同体で, 同一群体内に卵と精子束を形成する。卵は通常30~40個, 精子束は3~7個形成し, 卵は受精後, 丸みを帯びた三角形の突起を有する接合子となる。成熟し, 橙褐色にな

Table 1. Developmental stages of vegetative colonies of *Volvox globator*.

Time (hr) after release	Developmental stage
0~12	Stage 1: Gonidia undivided~4-celled embryos
12~24	2: 8- ~ 32-celled embryos
24~36	3: 64- ~256-celled embryos
36~48	4: ~pre-inversion embryos
48~60	5: Inversion~daughter colonies



Figs. 1-5. Developmental stages of vegetative colonies of *Volvox globator*. 1. Stage 1 (gonidia undivided~4-celled embryos). 2. Stage 2 (8~32-celled embryos). 3. Stage 3 (64~256-celled embryos). 4. Stage 4 (pre-inversion embryos). 5. Stage 5 (inversion~daughter colonies). Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

った接合子を乾燥，保存し，1~2か月後に水を加えると発芽し，細胞分裂をくり返し，その後反転して新しい群体が誕生する。

Figs. 6~12に *V. globator* の有性群体と他の *Euvolvox* 節3種の接合子を示す。

### 3. 培養条件

培養は，VT 培地（市村1972）のうち Glycyl glycine を HEPES に変えた培地を用い，6,000 lux の照度で16時間明・8時間暗，23°C 恒温（市村1975）で行なった。また，培地，ガラス器具類はすべて滅菌して用いた。培地の組成は次の通りである。

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  11.8 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.0 mg, KCl 5.0 mg,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 5\text{HO}$  (Sodium- $\beta$ -glycerophosphate) 5.0 mg, Thiamine HCl 1.0  $\mu\text{g}$ , Vitamin  $\text{B}_{12}$  0.01  $\mu\text{g}$ , Biotin 0.01  $\mu\text{g}$ , HEPES 50 mg, P IV metals 0.3 ml,  $\text{H}_2\text{O}$  99.7 ml (1N NaOH で pH 7.5 とした)。

また，P IV metals の処方はこの通りである。

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  97 mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  41 mg,  $\text{ZnCl}_2$  5 mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  4 mg,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  750 mg,  $\text{H}_2\text{O}$  500 ml。

### 4. 性誘起物質の抽出

*Volvox globator* の有性生殖群体から次のようにして性誘起物質を抽出した。

(1) 有性生殖群体（受精卵を形成しはじめた時期のもの）およそ1,000群体を水 10 ml とともに密栓したバイアルビン中に 65°C で24時間保ち，その上清を 2-4°C に保存する。

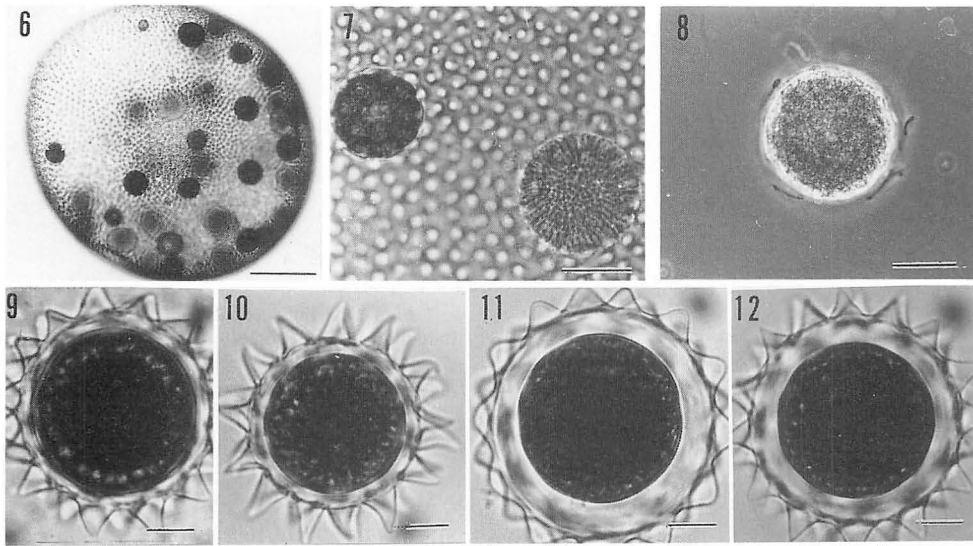
(2) 娘群体遊出寸前の無性生殖群体を培地 25 ml を加えた径 18 mm のネジ口試験管50本に1群体ずつ入れ7日間培養すると1本中の群体数は600となり，50本の総数は3万に達する。

(3) この無性生殖群体をナイロンメッシュ（150 MS）上に集め，培地でピーカーに洗い込む。

(4) 培地 1 l を加えた容器10本に（1）の上清を 1 ml ずつ加え，これに（3）の無性生殖群体を均等に加えて6日間さらに培養を続けると，無性生殖群体は次代においてほとんどすべて有性化し，群体内に受精卵を形成する（群体総数およそ20万）。

(5) この有性生殖群体をナイロンメッシュ上に集め，300 ml の水とともにピーカーに洗い込む。

(6) これを家庭用ミキサーに移し，細胞を破碎してジュースとし，200 ml 容のピーカーに 50 ml ずつ分注し，



Figs. 6-12. Sexual colony and zygotes of *Volvox*. 6. Sexual colony. 7. Egg and sperm packet. 8. Egg and sperm (*V. globator*). 9-12. Zygotes (9, *V. globator*; 10, *V. merrilli*; 11, *Volvox* sp. 1; 12, *Volvox* sp. 2). Scale bar, 100  $\mu$ m in Fig. 6, 10  $\mu$ m in Figs. 7-12.

65°C に保った定温器中でゆるやかに水を蒸発させつつ、細胞中に含まれる性誘起物質を水に抽出し、乾固物とする。

(7) この乾固物に水 50 ml を加えて懸濁液とし、これを遠心分離 (5,000 rpm, 10分) して得た上清をビーカーに移して再び 65°C で乾固する。さらに水 10 ml を加えて溶解、遠心、乾固する。この操作を再びくり返して得た帯黄色透明な上清をバイアルビン中で乾固、秤量し、低温で保存した。

この乾固物質を本研究では性誘起物質 (sex-inducing substance, SIS) とした。10万の有性生殖群体から上記の方法で抽出し得る SIS 量は 10~20 mg であった。

以下に述べる実験並びに以後の SIS 抽出のための有性生殖群体の形成は SIS 1 mg を 1 ml の水に溶解して原液とし、これを培地で希釈して用いた。

#### 5. 実験方法

実験は培地 10 ml を加えた径 18 mm のネジロ試験管を各区10本ずつ用いて行なった。また1容器に加えた群体数と SIS 量は実験ごとに後述の通りである。

有性化の有無と群体数は、供試群体の次代すなわち母群体から遊出した娘群体が24時間経過した時点で1容器中の群体を培養液とともに径 90 mm の時計皿に移し、ルーペ (×2) を用いて調べた。この時期の有性生殖群体 (Fig. 6) は群体内に多数の卵が点状に見え、無性生殖群体と容易に見分けることができた。なお、

有性化率は母群体から遊出した群体総数のうち有性化した割合で示した。

#### 結果と考察

##### 1. SIS の生理活性

##### (1) 無性生殖群体の stage の違いと有性化率

*V. globator* の無性生殖群体を Table 1 と Figs. 1~5 に示す5の stage に区分し、SIS 濃度  $10^{-3}$  g/l の培地に各区1容器あたり1群体入れて15回実験した結果を Table 2 に示す。Stage 1 と 2 の群体は100%に近い有性化率を示し、その後、stage が進むにつれて有性化率の低下が見られた。

Table 2. Effect of SIS on developmental stages of *Volvox globator*.

Medium	Stage	Sexual colony (%)	No. of colonies
Conditioned medium (SIS $10^{-3}$ g/l)	1	99.5	1,045
	2	98.5	1,284
	3	91.3	1,328
	4	74.1	1,301
	5	27.5	1,149
<i>Volvox</i> medium (Control)	1	0	1,232

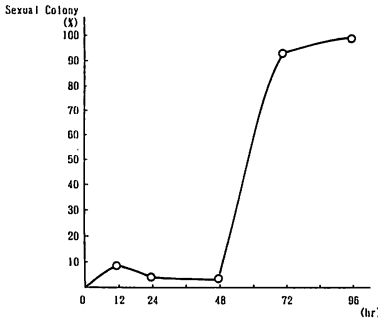


Fig. 13. Relationship between sexual induction and exposure time to SIS in *Volvox globator*.

この結果は若い群体ほど SIS に対する感受性が強い、あるいは性誘起をうながすためには一定時間以上 SIS の作用が必要なことを示唆していると考えられる。

(2) SIS の作用時間と有性化率

ごく若い群体 (stage 1 で生殖細胞が未分化の群体) を SIS 濃度  $10^{-3}$  g/l の培地で培養し、設定した時間 (12, 24, 48, 72時間) 後、群体を SIS を含まない培地で数回洗った後、SIS を含まない培地に移して培養し、その有性化率を調べた。なお SIS で96時間培養した区は、その時点ですでに有性化の有無を判別できる状態に達していたので、SIS を洗い流すことなく、そのまま判定した。

実験は各区 1 容器あたり 3 群体入れたもので、1 回、5 群体入れたもので 2 回実施した。その結果を Fig. 13 に示す。この図から、SIS の作用が48時間までの有性化率は極端に低く、10%以下で推移し、72時間後では96%と急激に上昇し、96時間後ではほぼ100%有性化したことが分る。

したがって性誘起をうながすためには、かなり長い時間 SIS の作用を必要とし、ほとんどの群体が有性化するには72時間以上 SIS の作用が必要なことが分

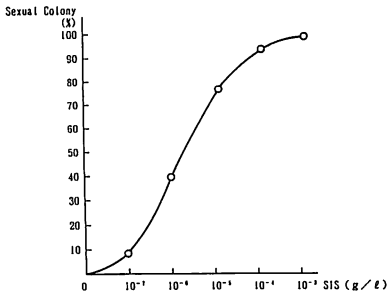


Fig. 14. Effect of SIS concentration on sexual induction in non-sexual colonies of *Volvox globator*.

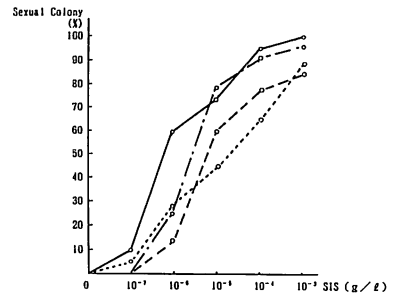


Fig. 15. Effect of SIS concentration on sexual induction in four species of Euvolvox. —, *Volvox globator*; --, *Volvox merrilli*; ···, *Volvox* sp. 1; - · - ·, *Volvox* sp. 2.

かった。

(3) SIS 濃度と有性化率

SIS を  $10^{-3}$  g/l から10倍ずつ希釈した濃度で含む培地に stage 1 の無性生殖群体を各区 1 容器あたり 1 群体入れて、25回実験した結果を Fig. 14 に示す。SIS 濃度  $10^{-3}$  g/l で99%、 $10^{-4}$  g/l で94%と高い有性化率を示し、 $10^{-5}$  g/l 以下では漸次低下がみられたが、 $10^{-7}$  g/l においてもなお生理活性が認められた。

しかし、*V. carteri* (Starr and Jaenicke 1974) の MIS が  $10^{-10}$  g/l で100%の有性化率を示したのと比較すると格段に低く、この段階の SIS は不純物を多く含むものと推定される。

(4) Euvolvox 節の他種に対する SIS の効果

*V. globator* の SIS が他種の有性化に及ぼす影響について、Euvolvox 節に属する 3 種 (*Volvox merrilli*, *Volvox* sp. 1, *Volvox* sp. 2) を用い、1 容器に 1 群体入れて 6 回実験した結果を Fig. 15 に示す。SIS は *V. globator* ばかりでなく、これら 3 種に対しても同様の効果を示すことが明らかとなった。しかし、Euvolvox 節以外の *V. aureus* および *V. carteri* にはまったく効果を示さなかった。

Table 3. Effect of heating (30 min.) on SIS.

Medium	Temp. (°C)	Sexual colony (%)	No. of colonies
SIS ( $10^{-3}$ g/l)	—	99.2	733
	60	100	704
	80	99.4	723
	100	100	689
	120	64.6	527
<i>Volvox</i> medium (Control)	—	0	891

Table 4. Effect of organic solvents on SIS.

Experiment	Sexual colony (%)	No. of colonies
SIS ( $10^{-3}$ g/l)	99.9	780
SIS treated with chloroform	98.6	766
SIS treated with ethanol	97.7	795
<i>Volvox</i> medium	0	879

## 2. SIS の特性

## (1) SIS に対する加熱の影響

SIS を  $10^{-3}$  g/l 含む培地を 60, 80, 100, 120°C でそれぞれ30分加熱した後、各区 1 容器に 5 群体入れて 2 回実験した結果を Table 3 に示す。100°C までは有性化率に変化が見られず、加熱の影響は認められなかった。また、120°C の加熱により、有性化率は65%に低下したものの、なお高い生理活性が認められた。この結果と 120°C で完全に失活した *V. aureus* の MIS (Darden 1966) を比較すると、*V. globator* の SIS は極めて熱に安定な物質であるといえる。

## (2) SIS に対する有機溶媒の影響

SIS の原液 1 ml にエタノールまたはクロロフォルムを 9 ml ずつ加え、振盪混和した後、密栓して 65°C で 2 時間放置し、その後乾固した。これを培地で希釈し (SIS 濃度  $10^{-3}$  g/l)、1 容器に 5 群体入れて 2 回実験した結果を Table 4 に示す。SIS はエタノールやクロロフォルムなどの有機溶媒に対し極めて安定であった。

## (3) SIS に対する酸・塩基の影響

SIS の原液 1 ml に 1N HCl または 1N NaOH を 9 ml ずつ加え、密栓して 65°C に 2 時間放置し、その後、栓をとり、そのまま乾固し、1N NaOH または 1N HCl を加えて pH 7.0 に調整し、培地で SIS 濃度が  $10^{-3}$  g/l になるように希釈して、1 容器に 5 群体入れて実験した結果を Table 5 に示す (培地中には pH 調整により生成した NaCl が含まれたままであるが、脱塩せず、そのまま実験した)。SIS の酸または塩基による失活が認められた。

Table 5. Effect of acid and base on SIS.

Experiment	Sexual colony (%)	No. of colonies
SIS ( $10^{-3}$ g/l)	99.4	361
SIS treated with HCl	0	358
SIS treated with NaOH	0	342
<i>Volvox</i> medium	0	329

Table 6. Effect of proteolytic enzymes on SIS.

Experiment	Time (min.) at 100°C	Sexual colony (%)	No. of colonies
SIS	30	98.6	1,449
SIS treated with pronase	30	0.8	1,456
SIS treated with trypsin	30	82.0	1,620
SIS treated with chymotrypsin	30	95.4	1,504
<i>Volvox</i> medium	0	0	1,575

## (4) SIS に対するタンパク分解酵素の影響

SIS 1 mg を含む培地 10 ml にプロナーゼ、トリプシン、あるいはキモトリプシンを 10 ml ずつ加え、23°C で 24 時間処理した後、濾過滅菌器 (Corning 社製、45  $\mu$ m) を通し、-20°C で保存した。

実験は上記酵素処理液を SIS 濃度が  $10^{-3}$  g/l になるよう培地に希釈し、酵素を失活させるため 100°C で 30 分間加熱した後、1 容器に 5 群体入れて 2 回実験した。その結果を Table 6 に示す。SIS はプロナーゼの作用を強く受け失活した。これは Darden (1966) および Tschochner *et al.* (1987) の結果と一致する。ただし、本実験では操作の過程で酵素を洗い出していない。

## (5) ゲル電気泳動による SIS の分子量の推定

SDS 処理した SIS を MW Marker (オリエンタル酵母社) とともにポリアクリルアミドゲル (ATTO 社、5-20% 濃度勾配ゲル) で泳動し、クマシーブリアントブルー R 250 で染色した結果を Fig. 16 に示す。SIS のバンドは MW マーカーの分子量 12,400 (チトク

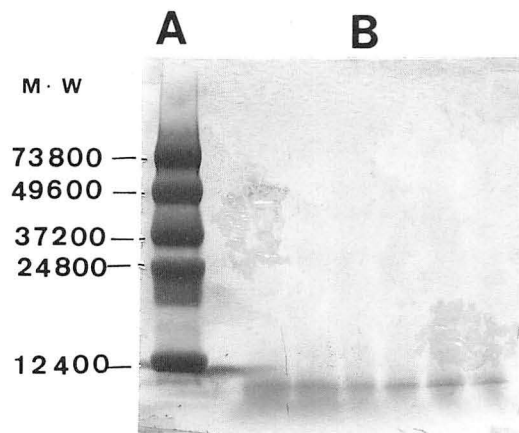


Fig. 16. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of SIS. A, Mol wt standard (Cytochrome c monomer~hexamer); B, SIS. Stained with Coomassie brilliant blue.

ロム C モノマー) より下に現われ, かなり低分子のタンパク質であることをうかがわせる。

なお, MIS の分子量は *V. aureus* では200,000以上 (Darden 1966), *V. carteri* では27,000~30,000 (Starr and Jaenicke 1974), *V. rousselletii* では10,000 (McCracken and Starr 1970) との報告がある。本研究の SIS は *V. aureus* および *V. carteri* の有性化にまったく効果を示さなかったことと, 分子量の違いから, 両者の MIS とは異なる物質であると考えられる。また, *V. globator* と同じ Euvolvox 節の *V. rousselletii* (雌雄異体) の MIS と分子量は近いと思われるが, *V. rousselletii* に対する SIS の効果はまだ調べていない。

#### 摘 要

雌雄同体の種 *Volvox globator* の有性生殖群体を破碎し, 水で抽出し, 乾固した物質 "SIS" は強い生理活性を示し, *V. globator* をはじめ, *V. merrilli* など Euvolvox 節の種の性誘起に著しい効果を示した。また, SIS は熱や有機溶媒に極めて安定で, 酸または塩基やタンパク分解酵素プロナーゼで失活する比較的低分子のタンパク質であると推定される。

#### 謝 辞

この実験に関し, 終始懇篤なご指導を賜り, 論文校閲の労をとられた楠元 守博士に深く感謝いたします。

#### 文 献

- Darden, W. H., Jr. 1966. Sexual differentiation in *Volvox aureus*. J. Protozool. 13: 239-255.
- 市村輝宜 1972. 微細藻類の培養に関するあれこれ (3). 遺伝 26(2): 73-75.
- 市村輝宜 1975. ボルボックス. 遺伝 29(3): 7-13.
- McCracken, M. D. and Starr, R. C. 1970. Induction and development of reproductive cells in the K-32 strain of *Volvox rousselletii*. Arch. Protistenk. 112: 262-282.
- Smith, G. M. 1944. A comparative study of the species of *Volvox*. Trans. Amer. Microscop. Soc. 63: 265-307.
- Starr, R. C. and Jaenicke, L. 1974. Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri* f. *nagasakiensis* Iyengar. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1050-1054.
- Tschochner, H., Lottspeich, F. and Sumper, M. 1987. The sexual inducer of *Volvox carteri*: Purification, chemical characterization and identification of its gene. EMBO J. 6: 2203-2207.