

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻
平成12年度博士課程 進学
氏名 杉浦幸二
指導教官 東條英昭

論文題目

哺乳動物卵における卵成熟促進因子の減数分裂特異的制御機構

卵形成過程の最後に起こる減数分裂の期間は、特に卵の「成熟」と呼ばれる。成熟を開始する前の卵母細胞(未成熟卵)は卵核胞(Germinal Vesicle: GV)と呼ばれる巨大な核を持ち、成熟が開始すると、この核膜が消失する(GV breakdown: GVBD)。そして、卵は第1減数分裂中期に至り、その後第1極体を放出して、第2減数分裂中期に達し、成熟が完了する。卵成熟は、卵母細胞が受精・発生能を獲得するための重要な期間であり、その制御機構を解明するために多くの研究が行われてきた。そして、その制御の中心因子として卵成熟促進因子(Maturation promoting factor: MPF)と呼ばれるタンパク質リン酸化酵素が存在することが明らかにされた。MPF活性が上昇することによってGVBDが起こり、その後MPF活性が低下すると同時に卵は第1極体を放出する。さらに、MPFが再活性化することによって、卵はDNA合成期へ進行せずに2回目の分裂期、すなわち、第2減数分裂期に進行し、その後MPF活性は高く維持されて卵成熟が完了する。

前述のようにGVは特異的に巨大な核であり、GVBDによってその中に含まれる多くの物質が細胞質中に放出される。そのためGV内に卵の減数分裂を制御する因子が含まれているとの考え方もある。実際、卵成熟開始時にMPFがGV内へ移行するなど、卵成熟制御の中心因子であるMPFの制御に何らかの核内因子の関与が示唆されている。しかし哺乳動物では、卵成熟制御に対するGVの必要性、とりわけMPF活性の制御について、GV内因子との相互作用に注目した十分な研究は見られない。そこで本研究では、哺乳動物において卵成熟特異的なMPF活性制御にGV内因子が必要かどうかを検討することを目的とした。

第1章 プタの卵核胞内には、MPFの再活性化を促す因子が存在する

第1章では、ブタ未成熟卵からGVを除去した卵(除核卵)を培養してMPF活性の経時変化を調べた。すると除核卵でも、卵成熟開始時のMPFの活性上昇は、除核をしていない対照卵と同程度まで見られた。このことから、卵成熟開始時のMPF活性化には、GVは必要ないことが明らかとなった。しかし対照卵では、その後MPF活性が一旦低下し、続いて卵が第2減数分裂へ進行するための再活性化が見られたのに対して、除核卵では、MPF活性が低下した後、再活性化が起こらなかった。さらに、MPF活性が低下したままの除核卵に、他の未成熟卵からGVの核質を注入するとMPFの再活性化が見られるようになった。これらのことから、MPFの再活性化には何らかのGV内因子が必要であることが明らかとなり、以降の研究では、MPF再活性化に対するGV内因子の必要性に焦点を絞って研究を行った。

第2章 MAPキナーゼカスケードのシグナル伝達に卵核胞は必要ない

第1節 MAPキナーゼの活性化について

カエルやマウスの卵成熟過程においてMPF再活性化にはMitogen Activated Protein (MAP)キナーゼの活性化が必要であることが報告されている。さらに、ヒトではMAPキナーゼの活性化にGVが必要であること、また、哺乳動物でも卵成熟の開始時にMAPキナーゼがGV内へ移行するなど、MAPキナーゼの活性化に何らかのGV内因子との相互作用が必要であることが予想される。

そこで、本研究の除核卵でMPF再活性化が起こらなかった原因が、MAPキナーゼ活性に異常があったためではないかと考え、第1節では、MAPキナーゼの活性化に対するGVの必要性について検討した。その結果、除核卵においても対照卵と同様なMAPキナーゼのリン酸化及び活性化が見られ、MAPキナーゼの活性化にGVは必要ないことが明らかとなった。しかし、免疫染色を行ってその局在を調べたところ、除核卵では対照卵で見られる、GV内への移行、GVBD以降での紡錘体への局在が見られなかった。一般にタンパク質が適切に機能を発揮するには、その局在が重要であることから、MAPキナーゼが下流へシグナルを伝達する機構に何らかの異常が存在する可能性が考えられた。

第2節 RSKの活性化について

そこで、第2節においてはMAPキナーゼの下流でその機能を仲介することで知られるp90 Ribosomal S6 Kinase (RSK)に着目し、除核卵においてRSKが正常に活性化するかどうか、すなわちMAPキナーゼカスケードのシグナルが除核卵においても正常に伝達されているかどうかを調べた。実験に先立ち、哺乳動物卵では十分な報告がなかったRSKの酵素活性、リン酸化状態、MAPキナーゼとの関連について正常な卵を用いて調べ、RSKがMAPキナーゼによりリン酸化され活性化することを示唆した。次に、除核卵においてRSKの動態を調べたところ、対照卵と同様なRSKのリン酸化及び活性化が見られ、ブタ卵成熟過程においてRSKの活性化にGVが必要ないことが明らかとなった。したがって、MAPキナーゼカスケードのシグナル伝達にGVは必要なく、除核卵においてMPF再活性化が起こらなかった原因はMAPキナーゼカスケードの異常ではないことが明らかとなった。

第3章 プタ卵核胞内にはCyclin B1の分解を抑制する因子が存在する

第1節 Cyclin B1の蓄積量について

MPFはCdc2とCyclin Bと呼ばれる2種類のタンパク質の複合体であり、MPFの再活性化は卵内にCyclin Bが蓄積することによって起こる。そこで第3章では、MAPキナーゼカスケードから離れて、Cyclin Bの蓄積に着目し

た。一般に Cyclin B として Cyclin B1 及び Cyclin B2 が存在するが、ウエスタンブロットの結果、Cyclin B2 量は除核卵においても対照卵と同様な推移を示し、異常は見られなかった。一方、Cyclin B1 については、対照卵では GVBD 近辺から合成が開始し、成熟が完了するまで徐々に蓄積量が増加したのに対して、除核卵では対照卵と同様の時間から合成が開始して一旦蓄積したが、すぐに分解されてしまい、その後は蓄積が見られなかった。さらに、除核卵に GV の核質を注入すると、Cyclin B1 の蓄積が見られるようになった。これらのことから、GV 内には、Cyclin B1 の蓄積を促す因子が存在することが明らかとなり、除核卵で MPF 再活性化が起こらなかったのは Cyclin B1 の蓄積量が不十分であったためであることが示唆された。

第2節 Cyclin B1 の分解について

第2節では、GV 内因子が Cyclin B1 の合成を促すのか、分解を抑制するのかを調べることにした。Cyclin B1 の分解はユビキチンタンパク質分解系によって行われ、Anaphase Promoting Complex (APC) がユビキチンリガーゼとして働いている。そこで、APC によって認識される部位である Cyclin B1 の D-box を除核卵に過剰発現させ、Cyclin B1 の分解を特異的に阻害することを試みた。その結果、除核卵で Cyclin B1 の分解を阻害すると、その蓄積量が増して対照卵での蓄積量以上までに至った。したがって、除核卵においても、Cyclin B1 の合成は対照卵と同等またはそれ以上に行われていることが予想され、GV 内の因子は Cyclin B1 の分解を阻害する因子であることが示唆された。

第4章 ブタ卵成熟過程において Cdk2 は Cyclin B1 の蓄積に必要である

カエルの卵成熟過程や哺乳動物の体細胞では Cdk2 が APC を抑制すること、さらに、哺乳動物の体細胞で Cdk2 が核内に存在することが報告されている。そこで第4章では、MPF 再活性化に必要とされる GV 内因子が Cdk2 ではないかという仮説を立て、この仮説の正当性について検討した。まず、正常な卵に抗体を注入して Cdk2 の活性化を阻害したところ、卵は第2減数分裂へ進行できず、この時 Cyclin B1 の蓄積量が低下していた。したがって、ブタ卵成熟過程でも Cdk2 が APC を制御していることが示唆された。次に、除核卵に活性型の Cdk2 タンパク質を注入して Cdk2 活性を人為的に上昇させたところ Cyclin B1 の蓄積が見られるようになった。さらに免疫染色により Cdk2 が GV 内に局在していることが明らかとなった。したがって、除核によって失われた、MPF 再活性化に必要とされる GV 内因子が Cdk2 である可能性が強く示唆された。

以上、本研究の結論として、卵成熟開始時の MPF 活性化に GV は必要ないこと、しかし第2減数分裂に進行するための MPF 再活性化には何らかの GV 内因子が必要であることが哺乳動物において初めて明らかとなった。また、この MPF 再活性化に必要である因子は、MAPキナーゼ活性を介さずに MPF の再活性化を誘導すること、APC 活性を阻害して卵に Cyclin B1 の蓄積を促す因子であることが明らかになった。さらに、Cdk2 活性が Cyclin B1 の蓄積に必要であること、Cdk2 活性を人為的に上昇させることによって除核卵に Cyclin B1 の蓄積を促すことができること、そして、Cdk2 が GV に局在することを哺乳動物において初めて明らかにした。そしてこれらの知見を総合して、ブタ卵成熟過程において GV 内の Cdk2 が GVBD によって細胞質中に放出され、この Cdk2 が APC を阻害して Cyclin B1 の蓄積を促し、その結果、MPF 再活性化が起こるといふ、卵が第2減数分裂期へ進行するための卵成熟特異的 MPF 制御機構を新たに示唆することができた。本研究のこれらの結果は、生殖生物学や発生生物学といった基礎分野のみならず、畜産・医療等の多くの応用分野の発展に有用な知見であると確信している。