

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成18年度博士課程 進学

氏名 西村 行雄

指導教員名 内藤 邦彦

論文題目 ブタ卵の減数分裂過程における Aurora A の機能解析

第一減数分裂前期で停止していた卵巣内の卵（GV 期卵）は、卵成熟開始ホルモンの刺激により減数分裂を再開し、第二減数分裂中期で再停止する。この一連の過程を卵成熟という。この卵成熟における減数分裂再開が果たしてどのように行われているのか、その制御機構はこれまで多くの動物種で研究されており、機構の解明は、当研究室の主要な研究テーマの一つである。

これまでの報告によると GV 期卵の卵内には母性由来の大量の mRNA が翻訳抑制状態で蓄積されていることが知られている。これらの mRNA は、卵成熟進行に主要な働きを担っている MPF の構成因子である CyclinB や、正常な成熟進行と密接な関係のある MAP キナーゼカスケード、その上流因子である Mos を含んでいる。従って、これら mRNA の翻訳制御が減数分裂再開には極めて重要であると考えられる。しかし、哺乳類においてこれらの翻訳制御に関わる機構について未だほとんど明らかとなっていないのが現状である。

近年、アフリカツメガエルにおいては、分裂期キナーゼである Aurora A が、この機構において主要な働きをしていることが報告された。卵内の母性 mRNA はポリ A テイルの短い状態で、翻訳抑制状態で蓄積されているが、これらのうちの一部は翻訳領域とポリ A シグナル配列の間に相同性のある CPE 配列を有しており、ここには CPEB という因子が結合している。卵成熟開始ホルモンの刺激によって活性化された Aurora A は、この CPEB をリン酸化し、活性化させることで、3' 末端へポリ A ポリメラーゼがリクルートされ、これら mRNA のポリ A 伸長を誘

導する。このポリ A 伸長反応の結果、mRNA が翻訳活性化され、Mos や CyclinB などの発現が誘導されることが知られている。この転写後翻訳制御の機構は、アフリカツメガエルにおいて卵の正常な減数分裂再開に重要な働きを担っていることが知られている。しかし、哺乳類卵においては Aurora A の翻訳制御における働きはマウスにおいてわずかに報告があるものの、ほとんど明らかとなっていない。また、マウスを初めとするげっ歯類は減数分裂再開において蛋白質合成が必須ではなく、哺乳類一般におけるこれら mRNA の翻訳制御機構の存在及び重要性を研究するにあたっては不向きである可能性が考えられる。

そこで、本研究では蛋白質合成が減数分裂の再開に必須なブタの卵を材料に用い、哺乳類卵減数分裂過程における Aurora A の存在及び機能について解析することを目的とした。

ブタの Aurora A 遺伝子はデータベースに登録されていなかったため、他種の Aurora A 遺伝子配列を元に、ブタの EST データベース上で検索した。そして得られた配列を元に ORF 配列を含むようにプライマーを設計し、ブタ卵 Total RNA から RT-PCR を行ったところ、予測されるサイズの PCR 産物を得ることをできた。このシーケンス解析を行い、ヒト、マウス、アフリカツメガエルの配列と比較したところ、高い相同性が確認された。特にキナーゼドメインでは顕著に高い相同性が見られ、その機能の重要性が示唆された。次に卵減数分裂過程における Aurora A の存在を mRNA レベル、蛋白質レベルで確認した。RT-PCR の結果、Aurora A は卵減数分裂過程を通して存在することが示された。また、ウエスタンブロッティングの結果、Aurora A は GV 期で既に存在し、卵減数分裂過程を通して一定量存在することが示された。また、ポジティブコントロールとして用いたヒト乳癌細胞と発現量を比較したところ、著しく大量に存在することが明らかとなり、減数分裂において特有の重要な機能を担っている可能性が示唆された。

そこで、実際にブタ卵減数分裂過程で Aurora A を発現させた場合、どのような影響が現れるのか確認することにした。クローニングしたブタ Aurora A 遺伝子配列を元に Aurora A mRNA を合成し、GV 期のブタ卵に顕微注入し、その後の減数分裂進行における影響をウエスタンブロッティング、核相観察、MPF 活性測定により確認した。その結果、Aurora A の過剰発現は確認されたものの、CPE 配列を有する CyclinB1/B2 の発現促進は見られなかった。また、CPE 配列を有する Mos の発現によりリン酸化される Rsk を確認したところ、早期のリン酸化は見られなかった。さらに、MPF の早期活性化、核相観察による減数分裂再開の促進も見られなかった。

発現させた Aurora A は卵内において活性化されていない可能性が考えられたの

で、そこで次に卵内の活性制御環境に影響されない、恒常活性型の Aurora A 変異体の作製を試みた。アフリカツメガエルにおける Aurora A の活性制御機構の知見を元にブタ Aurora A における活性制御リン酸化サイトに相当する部位を検討し、恒常活性型ブタ Aurora A 変異体を作製し、前述と同様に卵に発現させ影響を確認した。その結果、Rsk の早期リン酸化は明確にはみられなかったものの、CyclinB1/B2 の発現は、対照と比較したところ、それぞれ約 12 時間早い発現が確認された。また、MPF 活性も対照と比べ早期に活性の上昇が見られ、核相観察の結果からも減数分裂再開が顕著に早まっていることが確認された。これらのことから、Aurora A が減数分裂関連因子群の翻訳制御を通じて、減数分裂再開に機能することが哺乳類卵において初めて示された。また、Aurora A が卵内においてリン酸化制御を受けている可能性が示唆された。

そこで、これらの結果を踏まえ、実際に内在性の Aurora A がブタ卵減数分裂に機能しているか確認するため、Aurora A 機能阻害による卵減数分裂への影響を確認した。最初に、Aurora A アンチセンス RNA を注入し発現抑制による影響を確認したところ、予想に反し、CyclinB1 の発現、Rsk のリン酸化に影響は見られなかった。これは、Aurora A は発現抑制により経時的な減少が見られたものの、GV 期で既に豊富に存在しているために、減数分裂再開に影響を与えるほどのものではないためと考えられた。

そこで、高濃度 dbcAMP 添加培地で卵を GV 期で維持した状態で、発現抑制により、Aurora A の存在量を極めて減少させ、その後成熟培養を行った場合の影響を確認した。その結果、意図どおりに Aurora A が極めて減少した条件を作り出すことができた。しかし、またしても予想と異なり、減数分裂進行には影響は見られず、CyclinB1/B2 の発現及び Rsk のリン酸化にも有意な差は見られなかった。これは、ウエスタンブロッティングにおいて Aurora A の感光時間を長くすると、明らかなバンドが検出されるように、本実験系では Aurora A を完全に枯渇させられないことによるものであると考えられた。そのため、次に、Aurora A の作用基質である CPEB からのアプローチで Aurora A の機能阻害を試みることにした。

これまでの知見により、CPEB には Aurora A による特異的リン酸化部位である LDS/TR motif が存在することが報告されていた。そこで、ブタ CPEB 遺伝子を前述と同様にクローニングし、配列比較により検討したところ、これに相当する部位が確認された。この予測リン酸化部位をアラニンに置換したブタ CPEB 変異体を作製し、卵内に発現させ、その影響を確認した。その結果、対照と比較して CyclinB1/B2 の明らかな発現低下が確認された。特に CyclinB1 において顕著な発現低下が見られた。また Rsk のリン酸化にも遅れがみられた。さらに、減数分裂

再開にも顕著な遅れがみられた。従って、CPEB の Aurora A 特異的リン酸化部位が mRNA 翻訳には重要であることが示唆された。

そこで最後に、この CPEB 発現条件において、さらに Aurora A を減少させることで、より完全な Aurora A の機能阻害を試みた。その結果、CyclinB1/B2 については、劇的ではないものの、さらなる発現の低下が見られた。また、減数分裂再開もさらに顕著な遅れが確認された。これらの結果から、内在性 Aurora A が卵減数分裂に関わる因子群の翻訳制御に機能することが示された。また本研究により、ブタ卵における CPEB の存在が明らかとなり、哺乳類卵でも Aurora A による活性制御を受けていることが示唆された。