

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成19年度博士課程 進学
氏名 嶋岡 琢磨
指導教員名 内藤 邦彦

論文題目 ブタ卵母細胞の一次停止機構における Wee1B の機能解析

哺乳類の卵母細胞は、卵巣内では減数分裂を第一減数分裂前期で停止（一次停止）しており、排卵直前に減数分裂を再開して受精可能な状態になる。この減数分裂再開は卵母細胞内のM期促進因子(MPF)の活性化に伴って起こる。MPFは触媒サブユニットであるCdc2と調節サブユニットであるサイクリンBの二量体であり、その活性はCdc2の抑制的リン酸化とサイクリンBの量的変動によって制御される。齧歯類の一次停止卵母細胞ではサイクリンBは充分量存在し、タンパク質の合成を阻害しても減数分裂が再開するため、一次停止時のMPF抑制はCdc2の抑制的リン酸化のみによってなされると考えられる。近年マウスでこの時期のMPFの抑制的リン酸化に機能するWee1Bが発見された。一方、齧歯類以外の哺乳類の卵母細胞では減数分裂再開にタンパク質合成が必要であるため、一次停止維持機構は齧歯類と異なると考えられている。これらの種の一次停止時の卵母細胞内にはサイクリンBがごく僅かしか存在しておらず、減数分裂の再開と同時にサイクリンB量が増加する。このため、サイクリンBの不足が一次停止の要因とする考え方が一般的であり、MPFの抑制的リン酸化が一次停止に関与するかは不明である。また現在、Wee1Bはマウスのみで報告されており、他種でも普遍的に存在し機能しているかは不明である。そこで、本研究ではブタ卵母細胞においてWee1Bの存在と一次停止維持への機能を探ることを目的とした。

§ 第一章 ブタ卵母細胞における Wee1B 存在確認 §

まず、マウス Wee1B の配列を基にプライマーを設計し、RT-PCR、5' & 3' RACE を行いブタ Wee1B の完全長 cDNA を得た。その配列を解析した結果、塩基配列、アミノ酸配列共にマウス Wee1B と非常に相同性が高く、マウス・ブタ間で Wee1B が高度に保存されていることから、Wee1B が哺乳類に普遍

的に存在する可能性が示唆された。

次に、ブタ卵母細胞における pigWee1B タンパク質の存在確認のため、抗 pigWee1B 抗体を作製し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、ウエスタンブロッティングでは pigWee1B タンパク質は検出されず、pigWee1B がブタ卵母細胞の一次停止に機能しない可能性も考えられた。

§ 第二章 pigWee1B の機能解析 §

pigWee1B の機能を調べるため、 pigWee1B mRNA をブタ卵母細胞に注入し、過剰発現を行った。 pigWee1B は Cdc2 を抑制的にリン酸化する機能をもつと考えられ、したがって pigWee1B 過剰発現卵母細胞は一次停止が維持されると予想された。しかし、予想に反し pigWee1B 過剰発現卵母細胞は対照と同様に減数分裂を再開させ、有意な差は見られなかった。この結果は、卵巣から取り出した事により減数分裂再開のスイッチが入り、発現させた Wee1B が活性化されなかったためと考えた。卵母細胞の一次停止は高濃度の cAMP によって維持されている。また mouseWee1B は cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PKA)によって活性化され、Cdc2 を抑制的にリン酸化する機能を持つことが報告されている。 pigWee1B も mouseWee1B と同様に cAMP の下流にある因子であるとすれば、卵巣から取り出した卵母細胞では cAMP 濃度が自然に低下するため、過剰発現させた pigWee1B が活性を持たないと考えられる。そこで、過剰発現させた pigWee1B に活性を持たせるために、培地に dbcAMP を 0.5mM 添加し、減数分裂再開を完全には妨げない程度に cAMP 濃度を維持することにした。その結果、 pigWee1B 過剰発現卵母細胞は対照と比べ長期間一次停止を維持し続けた。これにより、 pigWee1B も cAMP からのシグナルにより活性化され、一次停止維持の機能を持つことが示された。この時、MPF 活性も低く抑制されており、Cdc2 抑制的リン酸化部位である Y15 も過度にリン酸化を受けていたため、 pigWee1B は Cdc2 を抑制的にリン酸化する事で MPF の抑制に働く事が示唆された。

pigWee1B 過剰発現時のサイクリン B 量を調べたところ、通常であればサイクリン B は培養 24 時間後から増加が見られるのに対し、 pigWee1B 過剰発現卵母細胞では培養 48 時間後でもほとんど増加しておらず、このことから pigWee1B が MPF 活性を介してサイクリン B 蓄積を抑制している可能性が考えられた。

§ 第三章 ブタ卵母細胞の減数分裂一次停止に対する Wee1B の機能 §

内在性 pigWee1B がブタ卵母細胞の生理的な一次停止に機能しているかを調べるため、 pigWee1B antisenseRNA をブタ卵母細胞に注入し、 pigWee1B の翻訳を阻害することで内在性 pigWee1B の抑制を行った。その結果、卵巣内での状態と同程度の高濃度の dbcAMP を培地に添加し、減数分裂再開をほぼ完全に抑制した条件下でも、 pigWee1B antisenseRNA 注入卵母細胞は減数分裂を再開した。このことから pigWee1B がブタ卵母細胞の生理的な一次停止に不可欠であることが示され、齧歯類以外の哺乳類において Cdc2 の抑制的リン酸化による一次停止維持機構が存在する事が初めて明らかとなった。

第二章で提示された、 pigWee1B が MPF を抑制することでサイクリン B の蓄積を抑制しているという可能性を検証するため、MPF 特異的阻害剤のロスコビチン添加によって MPF 活性を抑制した結果、サイクリン B の蓄積は著しく抑制された。このことからサイクリン B の蓄積には MPF の活性化が必要であることが示された。これは、減数分裂再開に際して、サイクリン B の蓄積に先駆けて MPF が活性化することを示しており、これは従来の齧歯類以外の哺乳類において減数分裂再開の引き金はサイクリン B の蓄積であるとの考えを修正するものである。

§ 第四章 ブタ Wee1B の機能制御 §

最後に pigWee1B の細胞内での動態や活性制御に関する知見を得るため、pigWee1B の局在と PKA によるリン酸化について解析した。まず pigWee1B の局在を調べた結果、pigWee1B は一次停止時には卵核胞内に局在し、減数分裂再開後は細胞質中に一様に存在することが明らかとなった。卵核胞への局在が MPF 抑制機能に必要なか否か調べるため、核移行シグナルと予想される部位に変異を導入した変異体を一次停止卵母細胞に過剰発現させた。その結果、pigWee1B の卵核胞への局在が見られなくなり、またそれらの卵母細胞を pigWee1B 活性化のため低濃度 dbcAMP 添加培地で培養しても、一次停止は維持されなかった。このことから、pigWee1B が一次停止に機能するには卵核胞内へ局在することが必要であることが示された。

第二章で dbcAMP の添加により pigWee1B が活性化されたことから、pigWee1B の活性化は cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PKA)によるリン酸化で制御されると考えられた。しかし、mouseWee1B で PKA による制御に関与するリン酸化部位のアミノ酸は pigWee1B では変異が生じていた。そこで PKA による活性制御に関与する pigWee1B のリン酸化部位解析のため、PKA によってリン酸化されうる部位として予想される 77, 118, 133, 149 番目の四カ所のセリンをそれぞれアラニンに置換し、非リン酸化型 pigWee1B を作製し、ブタ卵母細胞に過剰発現させた。その結果、S77 変異型 pigWee1B を発現させた卵母細胞でのみ pigWee1B が機能していないことが示唆された。この結果より、pigWee1B は S77 が PKA にリン酸化されることで活性を持つことが示唆された。

§ 総括 §

本研究により、pigWee1B は PKA によって活性化され Cdc2 を抑制的にリン酸化する機能を持ち、その活性がブタ卵母細胞の一次停止維持に不可欠であることが示された。またブタ卵母細胞における減数分裂再開の引き金は従来考えられて来たサイクリン B の増加ではなく、Cdc2 の抑制的リン酸化の解除による MPF の活性化であることが強く示唆された。