

論文の内容の要旨

論文題目 ブタ卵母細胞の減数分裂過程における Cyclin B 蓄積量の制御機構

氏 名 山室 匡史

多くの生物の卵母細胞は、卵巣内では第一減数分裂前期で停止しており、この状態の卵母細胞が正常な減数分裂を進行するためには分裂期促進因子 (MPF) の厳密な活性制御が必要である。MPF は減数分裂開始に伴って活性化し、第一減数分裂中期 (M1) から後期へと移行する際に一旦低下するが、すぐさま再活性化して、卵母細胞を第二減数分裂中期 (M2) で停止させる。MPF は、CDC2 と Cyclin B からなる複合体であり、減数分裂進行における MPF 活性の複雑な変動は、調節サブユニットである Cyclin B のタンパク質の蓄積量と非常によく相関している。しかし、Cyclin B タンパク質の増減がどのような機構を介して制御されているのか、その詳細に関しては不明瞭な点が数多く残されている。

本研究では、減数分裂過程における Cyclin B の量的変動の制御メカニズムを明らかにすることを目的とし、ブタの卵母細胞をモデルに用いて、タンパク質蓄積の両側面である「合成」と「分解」の双方の観点から、それぞれの制御機構を解析した。

第 1 章 ブタ卵母細胞の減数分裂過程における Cyclin B 分解制御機構の解析

Cyclin B 分解に大きく寄与する因子として Anaphase-Promoting Complex (APC) が知られている。APC は、基質にユビキチン鎖を付加してプロテアソームによる分解を導くユビキチンリガーゼであり、体細胞において、Cyclin B の分解を介し

て MPF 活性を調節する役割を担っている。APC の活性化には、CDC20、CDH1 という 2 つの因子のどちらかとの結合が必要であり、この因子の違いによって、基質や活性時期が制御されている。体細胞分裂では、APC-CDC20 が中期から後期に、APC-CDH1 が後期から分裂期の脱出にかけて働くことが知られており、減数分裂においては、APC-CDC20 が M1 に働き、APC-CDH1 は全く機能を持たない、というのが通説とされてきた。本章では、この通説の正否の確認も含め、APC 活性化因子 CDC20、CDH1 を介した Cyclin B 分解制御機構の詳細を解析した。

まず、ブタ卵母細胞の減数分裂過程における CDC20、CDH1 のタンパク質発現パターンを解析した。その結果、CDC20 は成熟初期には殆ど存在しておらず、成熟中盤から発現していた。一方 CDH1 は、成熟初期の段階から既に卵内に存在しており、終盤は減少するという発現パターンが見られた。

次に、以前明らかにしたブタ CDC20、CDH1 の cDNA 全長配列を基に、CDC20、CDH1 の asRNA を作製し、顕微注入によってそれぞれの因子の発現を抑制することで、内在性 CDC20、CDH1 の機能を解析した。その結果、CDC20 を抑制すると、M1 での分裂停止が誘導され、培養後半における Cyclin B の過剰蓄積や MPF の高活性が観察された。一方、CDH1 抑制時には、減数分裂の開始、Cyclin B の蓄積、MPF の活性化の全てが早期に誘起されたが、成熟後半では異常が見られなかった。これらから、APC-CDC20 は通説どおり M1 から後期への移行の時期に、APC-CDH1 は通説とは異なり成熟の最初期に、Cyclin B の分解に寄与することが示された。

また、CDC20、CDH1 の mRNA を顕微注入し、過剰発現による影響を解析した。その結果、CDH1 mRNA 注入時には、予想通り、減数分裂開始の遅延と、Cyclin B 蓄積の阻害が確認された。一方、CDC20 mRNA 注入時には、成熟初期に Cyclin B の蓄積促進が見られ、むしろ APC の活性が抑制された。これは、CDC20 が APC-CDH1 の標的となり、Cyclin B の分解を拮抗的に阻害したためと推察され、CDC20 mRNA と CDH1 asRNA の共注入実験により CDC20 が成熟最初期に分解されていることが確かめられた。これらから、APC-CDH1 が成熟最初期に機能を有することがさらに強く支持され、APC 活性化因子 CDC20 が間接的に APC を抑制方向にも調節し得るという興味深い知見が得られた。

以上のことから、成熟初期には APC-CDH1 のみが働き、Cyclin B 蓄積を阻害して減数分裂開始を抑制しており、その後、M1 では APC-CDC20 のみが働いて、Cyclin B を分解し卵母細胞を後期に移行させる、という減数分裂特異的な Cyclin B 分解制御機構が明らかになった。

第2章 ブタ卵母細胞の減数分裂過程における Cyclin B 翻訳制御機構の解析

哺乳動物の Cyclin B には、Cyclin B1、Cyclin B2 という二つのアイソフォームが存在するが、その蓄積パターンは大きく異なっている。Cyclin B2 が M1 から後期への移行時に大幅に減少するのに対し、Cyclin B1 は M1 以降も蓄積し、M2 において最大値をとる。Cyclin B1、B2 は共に APC の基質となるため、この差異は前章の分解制御機構では説明出来ず、合成制御に違いがあるものと考えられた。卵母細胞内におけるタンパク質の合成は、蓄積された母性 mRNA が適切なタイミングで翻訳を開始することで行われる。近年、アフリカツメガエルの卵母細胞において、翻訳開始時期が mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) に存在するシスエレメントの配列によって制御されることが報告された。本章では、同様の機構がブタにも存在していると仮定し、Cyclin B1、B2 の 3'UTR 配列を解析することで、両因子の翻訳制御の違いを明らかにすることを目的とした。

ブタ卵母細胞より採取した全 RNA を用い、Cyclin B mRNA の 3'UTR の配列を 3'RACE 法により同定し、シークエンス解析を行った。その結果、ブタ Cyclin B1 mRNA には 3'UTR の長さが異なる long form と short form という二つのヴァリエーションが存在することが判明し、short form の配列は long form の前半部分と完全に一致していた。内在するシスエレメントの配列から long form は序盤翻訳型、short form は終盤翻訳型であることが予想された。また、Cyclin B2 の 3'UTR には、有効なエレメントが存在せず、3'UTR 非依存的な翻訳が予想された。

次に、Cyclin B の各 mRNA について、減数分裂過程におけるポリ A テイルの長さの変化を経時的に調べた。ポリ A テイルの長さは、翻訳活性と相関することが知られており、long form と short form の mRNA は、概ね配列から予想される翻訳時期にポリ A テイルの伸長が起こっていた。一方、Cyclin B2 の mRNA は減数分裂の進行に伴ってポリ A テイルの短縮が観察され、翻訳活性の低下が示唆された。

ブタ Cyclin B1 の 3'UTR の違いによる翻訳時期の調節が本当に存在するか調べるため、asRNA を作製し、顕微注入を行った。Cyclin B1 の long form のみ抑制する asRNA を注入すると、成熟序盤の Cyclin B1 蓄積のみが減少し、M2 での蓄積量は変化しなかった。一方、Cyclin B1 の long form と short form の共通配列に対する asRNA を注入した卵母細胞では、Cyclin B1 蓄積が全体的に抑制され、M2 での蓄積が起こらなかった。これらから、減数分裂序盤の Cyclin B1 蓄積は long form が、終盤の蓄積は short form が担っていることが示唆された。

さらに、Cyclin B1 の 3'UTR が上流の ORF の翻訳開始時期にどのような違いをもたらすか、より明確に調べるため、Cyclin B1 のそれぞれの 3'UTR を有するレ

ポーターmRNA を作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、long form を有するものでは減数分裂過程の序盤において、short form を有するものでは減数分裂過程の終盤において、その翻訳活性が増加する傾向が見られた。

以上のことから、ブタ Cyclin B1 には序盤翻訳型の long form と終盤翻訳型の short form という 2 種類の mRNA が存在するため、M1 と M2 で 2 つのピークを示すが、Cyclin B2 には終盤翻訳型の mRNA が無く、翻訳活性が低下するため M2 で蓄積出来ず、その差異が蓄積パターンの違いに繋がるものと考えられた。

総括

本研究の結果を全て統合すると、ブタ卵母細胞の減数分裂過程における、次のような Cyclin B 蓄積制御モデルが考えられる。まず、減数分裂の最初期には CDH1 が機能を有し、APC-CDH1 が Cyclin B1、B2 の蓄積を阻害して MPF 活性の上昇を抑制し、減数分裂の再開を妨げる方向に作用する。この時、CDC20 も APC-CDH1 の基質となるため、発現量は非常に低いレベルで維持されている。序盤翻訳型 mRNA である Cyclin B1 long form の翻訳活性が上昇し、Cyclin B1 の蓄積が始まると、Cyclin B2 も APC-CDH1 による分解を免れやすくなるため、同期して蓄積される。MPF の活性化により、CDH1 は抑制的リン酸化を受けて機能を失うため、CDC20 も蓄積可能となる。そして、M1 には APC 活性化の役割は CDH1 から CDC20 に譲られ、後期への移行に際しては、APC-CDC20 が Cyclin B1、B2 を分解に導く。しかし、Cyclin B1 は終盤翻訳型 mRNA である short form の翻訳活性化が起こるため再蓄積し、一方の Cyclin B2 の mRNA は翻訳活性を持たないため、タンパク質量は低いレベルのまま維持される。

以上、本研究により減数分裂過程における複雑な Cyclin B の量的変動を制御するメカニズムの詳細を明らかにすることが出来た。