

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 21 年度博士課程入学
氏名 藤井 渉
指導教員名 内藤邦彦

論文題目

哺乳類卵の減数分裂における CDC2 161 番スレオニンのリン酸化に関する研究

卵成熟過程における減数分裂の進行は、分裂期促進因子 (MPF) の活性とそれを制御する因子によって調節されている。MPF の触媒サブユニットである CDC2 の 161 番スレオニン (T161) は進化的に保存されたリン酸化修飾部位であり、CDC2-T161 のリン酸化は MPF の活性化に必須であることが生化学的な検討や体細胞分裂における細胞周期進行にて報告されている。しかしながら、これまで減数分裂過程における CDC2-T161 のリン酸化状態やその意義、またこのリン酸化を制御する機構については十分に検討されておらず、これらの詳細な解析は卵成熟の生理機構の理解に貢献すると期待される。そこで本研究では、ブタ卵母細胞の体外成熟培養系をモデルとし、哺乳類卵母細胞の成熟進行過程における CDC2-T161 のリン酸化状態と減数分裂における意義を検討し、さらにそのリン酸化や脱リン酸化を制御する機構について検討した。

第一章 ブタ卵の減数分裂における CDC2-T161 のリン酸化状態と機能

初めに、卵成熟過程における CDC2-T161 のリン酸化状態を調べた結果、培養 18 時間からリン酸化が上昇し、これは CDC2 と複合体を形成する MPF 調節サブユニットの Cyclin B の発現開始時期と一致し、減数分裂の再開時期とも良く相関していた。また、Cyclin B が分解され MPF 活性が低下する培養 36 時間においてリン酸化の低下が認められた。この結果から、卵成熟過程において生理的な CDC2-T161 リン酸化変動が明らかとなり、この変動は MPF 活性と同期していることが示唆された。この変動が、CDC2-T161 をリン酸化する CDK 活性化キナーゼ (CAK) の活性変動によるかを調べるために、Cyclin 非依存的に CAK によってリン酸化を受ける CDK2 を基質に、卵成熟過程の CAK 活性を測定した結果、CDC2-T161 のリン酸化が見られない減数分裂再開前から減数分裂を通して卵母細胞は CAK 活性を持つことが明らかとなり、卵成熟過程の CDC2-T161 リン酸化は CAK 活性の変動ではなく、Cyclin B 合成による複合体形成に依存することが示唆された。続いて、卵成熟過程における CDC2-T161 リン酸化の低下が脱リン酸化によるものか、またはリン酸化 CDC2 の分解によるものかを調べるために、脱リン酸化される直前の卵母細胞をタンパク質合成阻害下で培養し、CDC2 発現量とリン酸化量の変化を調べた。その結果、CDC2 量は変化せず、CDC2-T161 リン酸化のみが低下したことから、分解ではなく脱リン酸化によることが示唆された。以上の卵成熟過程における CDC2-T161 リン酸化が減数分裂の進行に必要であるかを調べるため、卵母細胞に野生型 CDC2 および T161 をアラニンに置換してリン酸化を抑制した変異型 CDC2 (TA-CDC2) の過剰発現を行い、減数分裂進行への影響を調べた。その結果、野生型 CDC2 はリン酸化修飾を受け、減数分裂の再開を促進したのに対し、TA-CDC2 は減数分裂の促進が見られず、むしろ減数分裂再開率および成熟率は有意に低かった。この結果は過剰発現した CDC2 が減数分裂の促進に作用するには CDC2-T161 のリン酸化が必要であることを示しており、CDC2-T161 のリン酸化修飾が減数分裂の進行に必要であることを強く支持している。以上より、卵成熟過程において CDC2-T161 はリン酸化修飾を受け、これは減数分裂進行や Cyclin B 発現と同期して変動することが明らかとなった。また、これをリン酸化する CAK は卵成熟を通して活性を持ち、一方で卵母細胞に脱リン酸化活性もあることが明らかとなった。また、このリン酸化は卵成熟過程における減数分裂の再開に必要であることが示唆された。

第二章 ブタ卵母細胞の CDK 活性化キナーゼ (CAK) の同定

哺乳類をはじめとする後生生物の体細胞分裂においては CDK7、Cyclin H、

MAT1 からなる複合体が広く保存されており CAK として機能することが明らかとなっている。しかし、哺乳類卵母細胞においては未だこれらの存在と CAK としての作用を示した報告は無い。そこで、ブタ卵母細胞においてこれらの存在と機能の解析を試みた。初めに、ブタ卵母細胞由来 cDNA より CDK7、Cyclin H、MAT1 の遺伝子をクローニングし、これらの発現と局在を検討した。その結果、これらの転写産物は卵成熟過程を通して存在し、減数分裂再開前では核内に局在し、再開後は細胞質全体に存在することが分かった。次に、これらが実際に哺乳類卵母細胞において CAK として機能しているかを調べるため、それぞれのアンチセンス RNA を用いて発現抑制を試みた。CDK7 および Cyclin H を抑制した結果、CDC2-T161 リン酸化が低下し、減数分裂進行や MPF 活性が抑制された。一方、MAT1 については上記の抑制的作用は認められなかった。また、CDK7 および Cyclin H を過剰発現した場合、CDC2-T161 リン酸化、減数分裂再開の促進が認められたが、MAT1 の過剰発現では促進的効果は認められなかった。以上の結果から、CDK7 および Cyclin H は減数分裂期において CAK として積極的に機能しており、MAT1 は CAK としては機能していないことが示唆された。なお、CDC2 の Cyclin B 結合配列に変異を導入した Cyclin B 非結合型 CDC2 を用いて T161 リン酸化修飾を観察した結果、通常条件下ではリン酸化は認められないのに対して、CDK7 過剰発現下ではリン酸化修飾を受けることが明らかとなった。このことから、CAK の過剰発現による減数分裂の早期進行は単量体 CDC2 がリン酸化されたことによるものであり、CAK の適切な発現量が生理的な卵成熟進行に重要であることが明らかとなった。

第三章 CDC2-T161 の脱リン酸化酵素の検討

続いて哺乳類卵母細胞の CDC2-T161 脱リン酸化酵素の同定を試みた。哺乳類体細胞を用いた報告から、PP2C α/β と、CDKN3 を候補遺伝子として、初めにブタ卵母細胞由来 cDNA より PP2C α 、PP2C β および CDKN3 のクローニングを行い、これらの転写産物の卵成熟を通じた存在を確認した。次に、これらの卵成熟過程における生理機能を調べるためにアンチセンス RNA による発現抑制を行った。その結果、いずれを抑制した場合でも早期に CDC2-T161 のリン酸化が認められ、減数分裂の再開が促進された。この結果はこれらがブタ卵母細胞の CDC2-T161 脱リン酸化に機能していることと矛盾しないが、同時に Cyclin B 合成も早期に起こっており、CDC2/Cyclin B 複合体を早期に形成したことによる 2 次的な作用とも考えられた。そこで次に Cyclin B 合成の抑制を期待して、既報に基づき MPF 活性阻害剤である Vanadate または Roscovitine を添加して影響を観察した。そ

の結果、非注入区では Cyclin B 合成が抑制され、CDC2-T161 のリン酸化が認められなかったのに対し、PP2C または CDKN3 を抑制した区では、阻害剤存在下においても CDC2-T161 のリン酸化のみならず Cyclin B の合成が認められた。この結果は、これらの因子が Cyclin B の合成制御に関与していることを示唆するが、CDC2-T161 の脱リン酸化酵素として機能しているか結論付けることはできない。そこで、Cyclin B 非結合型 CDC2 を用い、Cyclin B の存在に影響されない条件での CDC2-T161 脱リン酸化機能解析を試みた。その結果、第二章と同様に非結合型 CDC2 に対するリン酸化は抑制されていたが、この時 PP2C または CDKN3 を発現抑制しても対照区との間に差は認められなかった。非結合型 CDC2 をリン酸化する Cak1 を共発現しても結果は同様であった。以上の結果から、卵母細胞における PP2C および CDKN3 の発現抑制による CDC2-T161 の早期リン酸化は、Cyclin B の早期発現による二次的なものであり、CDC2-T161 脱リン酸化機能の低下によるものではないことが示唆された。以上は、減数分裂再開が起こる培養 24 時間での検討であるが、第一章で生理的な CDC2-T161 の脱リン酸化は培養 36 時間に観察されている。そこで、これらの因子が生理的な脱リン酸化時期に機能しているかを検討するために、脱リン酸化が起こる直前の第一減数分裂中期の卵母細胞を回収し、同期的な Cyclin B の低下に伴う CDC2-T161 脱リン酸化への影響を観察した。その結果、対照区と比較し PP2C または CDKN3 を抑制した卵母細胞に脱リン酸化の遅延は認められず、非注入区と同様の CDC2-T161 脱リン酸化が観察された。以上の結果から、卵成熟過程において PP2C や CDKN3 は CDC2-T161 の脱リン酸化には働いていないと考えられた。

以上、本実験の結果から、卵成熟過程において CDC2-T161 がリン酸化修飾を受け、減数分裂と同期的に変動することが明らかとなり、このリン酸化は減数分裂の再開に必要であると考えられた。卵成熟において CDC2-T161 は CDK7 および Cyclin H からなる CAK によってリン酸化され、MAT1 は不要であることが示唆された。また、CDC2-T161 は卵成熟過程において生理的な脱リン酸化を受けるが、PP2C や CDKN3 は脱リン酸化には機能しておらず、これらは Cyclin B の合成に関与している可能性が示唆された。以上の知見は卵成熟過程における MPF 活性制御に新たな知見を提供し、卵成熟の生理機構の理解に貢献すると考えられる。