

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻
平成 22 年度 博士課程 進学
氏 名 西村 鷹 則
指導教員名 内藤 邦彦

論文題目 哺乳類の卵成長における減数分裂能獲得機構の解析

序論

哺乳類の卵母細胞は、第一減数分裂前期で分裂を停止した状態で、卵巣内でその体積を大きく増加させる(卵成長)。卵成長を終えた卵母細胞(成長卵)は、ホルモン刺激や体外培養により、停止していた減数分裂を再開し、第二減数分裂中期まで分裂を進行させる。しかし卵成長の途中にある卵母細胞(成長途上卵)は、たとえその直径が成長卵の 90%に達していても減数分裂を再開することができない。卵成長の過程で減数分裂再開の能力(減数分裂能)を獲得することは自明だが、その詳細な分子機構は不明である。そこで本研究ではこの機構の解明を目指し、成長途上卵が減数分裂を再開しない原因を分子レベルで明らかにすることを目的とした。哺乳類の卵巣には成長途上卵が成長卵に比べて極めて多量に存在しており、その利用が優良な家畜生産へ貢献するものと期待されている。そこで本研究では、大型の哺乳類であり家畜としても優良なブタの卵母細胞をモデルに検討を行った。

第 1 章 ブタ成長途上卵の MPF と MPF 活性制御因子の機能

卵母細胞の減数分裂の再開には、CDC2 と Cyclin B からなる M 期促進因子 (MPF) や、MOS を最上流とする MAP キナーゼカスケードの活性化が重要とされているが、成長途上卵ではこれらが活性化しないことや、活性に必要な構成因子の不足が確認された。そこで *in vitro* で合成した mRNA を成長途上卵の細胞質に注入することにより Cyclin B、CDC2、MOS の強制発現を行った。その結果、CDC2 を発現させた場合でのみ減数分裂の再開が誘起され、MOS や Cyclin B ではなく、CDC2 の不足が減数分裂を再開しない原因の一つであることが示された。しかし、CDC2 を強制発現した場合でも減数分裂再開率が成長卵と比較し低かったことからその他の要因が存在すると考えられた。そこで次に MPF 活性制御に重要である CDC2 のリン酸化に着目した。抑制的リン酸化部位の脱リン酸化酵素 CDC25B やリン酸化酵素 WEE1B を、それぞれ mRNA やアンチセンス RNA 注入により強制発現、発現抑制した結果、減数分裂再開が誘起され、さらに CDC2 強制発現と CDC25B 強制発現、もしくは WEE1B 発現抑制を同時に行うと成長卵に匹敵する減数分裂再開率が得られた。以上から、ブタ成長途上卵では MPF の構成因子である CDC2 が不足すること、およびその抑制的リン酸化により減数分裂の再開が積極的に抑制されていることが示された。

第 2 章 ブタ成長途上卵の PKA 活性とその制御機構

CDC25B や WEE1B はいずれも cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKA) によって活性を制御されることが知られており、第 1 章の結果は、成長卵ならば減数分裂再開時に低下する cAMP 濃度や PKA 活性が、成長途上卵では低下せずに維持されていることを示唆している。そこで成長途上卵の cAMP 濃度と PKA 活性を測定した結果、cAMP 濃度は成長卵と同様に低下したのに対して、PKA 活性は低下せず維持されたままであった。さらに、成長途上卵の PKA 活性を阻害したところ減数分裂の再開が誘起され、これと CDC2 強制発現を同時に行うと成長卵に匹敵する高い減数分裂再開率が得られた。この結果は第 1 章の結果とよく一致しており、CDC2 の抑制的リン酸化による減数分裂再開の抑制は、成長卵では cAMP 依存的に低下する PKA 活性が、成長途上卵では cAMP 非依存的に維持されるためであり、卵成長の段階によって PKA 活性制御機構が異なることを示唆している。そこで次に成長途上卵が cAMP 非依存的に PKA 活性をもつ原因を検討した。PKA は触媒サブユニット (PKA-C) と、これに結合してその活性抑制や局在制御を行う制御サブユニット (PKA-R) によって構成される。PKA-R の機能は一般的には cAMP 濃度によって変化するため、PKA-R の発現不足は cAMP 非依

存的な PKA 活性化、および局在異常を起すと考えられる。そこでまず PKA 活性維持の原因が PKA-R の不足による可能性を考え、ブタ卵に発現する 2 種の PKA-R(PKA-R1、PKA-R2)をクローニングし、これらの機能を成長卵で確認した後に成長途上卵に強制発現を行った。しかしどちらの強制発現によっても PKA 活性の低下や減数分裂再開は認められず、PKA-R の不足が PKA 活性維持の原因ではないことが示された。一方、PKA の局在異常が cAMP の応答性や PKA 活性の変化を誘起することが知られている。そこで続いて PKA と EGFP の融合タンパク質の発現による局在解析を行った。その結果、成長卵では、減数分裂再開前には細胞質に局在していた PKA-C が PKA-R2 と共に減数分裂再開直前に核内に移行した。これに対し、成長途上卵ではこのような変化は確認されず、細胞質に局在し続けていた。そこで成長途上卵の PKA-R2 を強制的に核に移入させたが、減数分裂の再開に影響はなかった。一方で PKA-R1 の強制核移入では減数分裂再開が誘起され、成長卵と成長途上卵では PKA-C の制御に機能している PKA-R が異なっていることが示唆された。以上より、ブタ成長途上卵の減数分裂再開は cAMP 非依存的な PKA 活性によって抑制されるが、この活性は制御サブユニットの不足によるものではなく、機能する PKA-R やその局在制御が卵成長の段階によって異なることに起因することが示唆された。

第 3 章 ブタ成長途上卵における AKAP の発現と機能

PKA はそれ自体に局在シグナルを持たず、PKA-R に結合するアンカータンパク質(A-kinase anchor protein; AKAP)によって局在が制御される。そこで成長卵と成長途上卵の PKA 制御や減数分裂能の相違には AKAP の相違が関与していると考えた。AKAP は 50 種以上が存在し、それぞれ固有の局在を示すが、ブタ卵母細胞に発現する AKAP は不明である。そこで、まず Far western blotting 法を応用してブタ卵母細胞に発現する AKAP を網羅的に検出し、それらによる PKA 活性や局在の制御、及び減数分裂再開における機能について解析した。検出された複数種の AKAP の分子量から予測される AKAP 遺伝子をクローニングし、ブタ卵母細胞に発現する AKAP として AKAP1、AKAP5、AKAP7 α の 3 種を同定した。これらの機能を解析するため、まず PKA 活性を高め減数分裂再開を抑制した成長卵に対し各 AKAP の発現抑制を行った。その結果、AKAP5 を抑制した場合にのみ減数分裂を再開することが明らかとなった。この時、卵全体の PKA 活性は影響されないが、PKA-R2 の核内への移入が早期に誘起されており、AKAP5 が PKA の細胞質局在を制御することが示された。そこで次に成長途上卵に対し同様に各 AKAP の発現抑制を行ったところ、AKAP5 に加えて AKAP7 α を

抑制した場合に減数分裂が再開した。この時、やはり卵全体の PKA 活性は影響されず、対照区では細胞質のみに存在する PKA-R1 がこれら AKAP の抑制によって核内にも存在するようになった。成長卵では PKA-R1 にはこのような変化は見られなかった。以上から、成長卵では AKAP5 による PKA-R2 の細胞質局在制御を介して減数分裂の再開が抑制されること、また成長途上卵では AKAP5 に加えて AKAP7a が、PKA-R1 の細胞質局在を制御して減数分裂再開を抑制していることが示唆された。これらの結果は酵素活性を持つ PKA-C の局在を制御する PKA-R が成長段階によって異なるという第 2 章の結果を支持している。これらの PKA-R は PKA-C と結合することで減数分裂再開を抑制していると考えられたため、各 PKA-R の機能阻害を行ったところ、成長卵では PKA-R2、成長途上卵では PKA-R1 を特異的に阻害したときに減数分裂が再開した。以上の結果は、成長卵と成長途上卵とで機能する AKAP や PKA-R が異なり、この違いこそが成長段階による PKA の活性や局在の相異の原因であり、成長途上卵が減数分裂を再開できない原因であると考えられた。

総括

本研究より、ブタ成長途上卵では CDC2 の不足と PKA 機能の制御に伴う CDC2 活性の抑制という 2 つの MPF 抑制により減数分裂を再開しないことが明らかとなった。生理的には卵成長の過程で予期しない減数分裂の再開が起こってしまうことを、2 つの MPF 抑制機構で強力に抑制していると考えられる。また成長卵と成長途上卵とでは PKA の局在に機能する AKAP や PKA-R が異なる可能性が示され、卵成長過程で PKA の制御機構が切り替わることが示唆された。以上本研究によって、CDC2 発現の増加と機能する PKA-R/AKAP の切り替えが、ブタ卵成長の減数分裂能獲得の本質であるという全く新しい知見を見出すことができた。