

学位論文題名

ボツリヌス菌体外酵素C 3により
ADP-リボシル化される GTP 結合蛋白質の研究

- マボヤ卵の活性化における役割 -

学位論文内容の要旨

精子によって引き起こされる卵の活性化は、減数分裂の再開や多精拒否機構の始動という、受精後の正常な胚発生を保証するための重要な過程であると考えられている。

本研究では、受精研究の材料として原索動物マボヤ *Halocynthia roretzi* を用いた。マボヤ未受精卵に精子を添加すると30分以内に卵黄膜の上昇が観察される。マボヤの卵黄膜上昇は、卵細胞内顆粒のエキソサイトーシスの結果引き起こされる現象であり、動物細胞一般の分泌現象と同様の機構で起こると考えられる。卵の活性化を卵黄膜上昇という特徴的な形態変化で容易に観察できること、他の動物の卵に比較して卵のサイズが大きく顕微注入実験に用いやすいことから、マボヤは卵の活性化の研究に適している。

本研究では、マボヤの受精過程の中で、特に卵の活性化における細胞内情報伝達機構を解明する目的で、ボツリヌス菌体外酵素C 3によりADP-リボシル化される低分子量GTP結合蛋白質（G蛋白質）の生理機能に着目した。その低分子量G蛋白質の役割を解析するツールとして、ボツリヌス菌体外酵素C 3およびC 3酵素による低分子量G蛋白質のADP-リボシル化を阻害するモノクローナル抗体を調製し、それらを用いた顕微注入法により、マボヤ卵の活性化の機構を解析した。

最初に、低分子量G蛋白質の生理機能を解析するためのツールとして、ボツリヌス菌体外酵素C 3を精製した。得られた精製酵素標品は還元、非還元のいずれの条件下でもSDS-電気泳動で分子量25,000の位置に単一のバンドを与え、Sephadex G-75を用いたゲル濾過から求められた分子量25,000と良く一致した。本酵素は分子間にジスルフィド結合を有しない分子量25,000の単量体蛋白質であることが明らかになった。

次に、精製C 3酵素標品を用いてマボヤ卵におけるC 3酵素基質となる蛋白質の検出を行った。マボヤ未受精卵ホモジネートを遠心分離して上清画分と沈澱画分を得、それぞれを用いて [^{32}P]

NAD と C 3 酵素存在下で ADP-リボシル化反応を行い、SDS-電気泳動後のオートラジオグラフィーで放射活性を検出した。その結果、マボヤ未受精卵の沈澱画分中に、C 3 酵素で ADP-リボシル化される分子量 23,000 の蛋白質が存在することが明らかになった。なお、上清画分には放射活性の取り込みは観察されなかった。

C 3 酵素により ADP-リボシル化される低分子量 G 蛋白質の生理機能を解析するためのもう 1 つのツールとして、C 3 酵素による低分子量 G 蛋白質の ADP-リボシル化を阻害するモノクローナル抗体の調製を試みた。マボヤ未受精卵の膜画分および低分子量 G 蛋白質の部分精製標品を免疫原として用いてマウスに免疫し、常法によりハイブリドーマ細胞を得た。その培養上清を用い、C 3 酵素によるマボヤ卵低分子量 G 蛋白質の ADP-リボシル化反応の阻害活性を指標にしてハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、4 種のクローンを得た。免疫沈降法を用いた解析から、これら 4 種のクローンが産生するモノクローナル抗体は、いずれも C 3 酵素の基質となる低分子量 G 蛋白質を認識することが明らかになった。

次に、マボヤ卵の活性化機構の解析を行った。媒精によって誘起される卵黄膜上昇は顕微注入された EGTA あるいはヘパリンにより完全に阻害されることから、マボヤの卵黄膜上昇に細胞内カルシウム濃度の上昇が必要であり、そのカルシウム濃度の上昇は生成されるイノシトール三リン酸 (IP_3) の作用によることが示唆された。また、GTP γ S の顕微注入によっても卵黄膜上昇が誘起されるが、GTP γ S によって誘起される卵黄膜上昇も EGTA あるいはヘパリンの同時注入により完全に阻害されることから、マボヤの受精過程で G 蛋白質が活性化され、それが卵の活性化を引き起こす可能性が示された。さらに、受精に伴って卵細胞内の遊離 IP_3 量が増加することが明らかになった。

マボヤ卵の活性化に関与する G 蛋白質を明らかにするために、精製した C 3 酵素標品をツールとして用い、それをマボヤ卵内に顕微注入し、低分子量 G 蛋白質の卵の活性化への関与を検討した。その結果、C 3 酵素はそれを顕微注入するだけでマボヤ卵の卵黄膜上昇を誘起するという興味深い知見が得られた。その卵黄膜上昇の誘起も EGTA あるいはヘパリンの同時注入により完全に阻害された。以上の結果より、C 3 酵素の作用により低分子量 G 蛋白質が活性化され、 IP_3 の生成が起これ、その結果、細胞内カルシウム濃度が上昇し、卵黄膜上昇が誘起されると考えられる。さらに、NAD 存在下での C 3 酵素処理により、マボヤ未受精卵の膜画分から IP_3 が遊離されることが明らかになった。

C 3 酵素により誘起される卵黄膜上昇の過程で低分子量 G 蛋白質が活性化される可能性が考えられるので、同様の活性化が受精時でも起きているか否かを明らかにする目的で、C 3 酵素によ

る低分子量G蛋白質のADP-リボシル化を阻害する抗G蛋白質・モノクローナル抗体をマボヤ未受精卵内に顕微注入し、媒精によって誘起される卵黄膜上昇に対する影響を調べた。その結果、抗体を注入すると媒精により誘起される卵黄膜上昇は阻害され、さらに卵割も進行しなかった。以上の結果は、受精時に起きる卵の活性化にC3酵素によりADP-リボシル化される低分子量G蛋白質が関与することを示唆している。

以上の結果より、本研究において、以下のことが明らかになった。

- (1)マボヤ卵の膜画分に存在する、C3酵素によりADP-リボシル化される低分子量G蛋白質がマボヤ卵の活性化に関与する。
- (2)マボヤ卵において、低分子量G蛋白質の、C3酵素によるADP-リボシル化を介して、 IP_3 が生成する。
- (3)マボヤ卵の活性化過程において、受精時に生成される IP_3 が細胞内カルシウム濃度の上昇を誘起し、細胞内顆粒のエキソサイトーシスが起こり、卵黄膜上昇に至るという機構が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横	沢	英	良
副査	教授	野	村	靖	幸
副査	教授	徳	光	幸	子
副査	助教授	沢	田	均	

細胞は外来性の情報伝達物質に応答してその情報を細胞内に伝達する、いわゆるシグナル伝達システムを有していることが明らかにされつつある。GTP結合蛋白質は、細胞のシグナル伝達に関与する重要な蛋白質で、様々なファミリーを構成しており、それらの機能の解明はきわめて重要な問題であるが、それらGTP結合蛋白質の生理機能の詳細についてまだ不明の点が多く残されている。

本論文提出者は、GTP結合蛋白質の中で、ボツリヌス菌体外酵素C3によりADP-リボシル化される低分子量GTP結合蛋白質に着目し、マボヤ卵の活性化機構におけるGTP結合蛋白質の役割を解明する目的で、一連の研究を展開し、以下の成果を納めた。

- (1)ボツリヌス菌の培養上清から菌体外酵素C3を精製した。そして、C3酵素によりADP-リボシル化される低分子量GTP結合蛋白質がマボヤ卵に存在することを明らかにした。
- (2)C3酵素によるADP-リボシル化を阻害するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞クローンを確立した。それらハイブリドーマ細胞が産生するモノクローナル抗体は、C3酵素の基質となる低分子量GTP結合蛋白質を認識していることを明らかにした。
- (3)精子によって誘起されるマボヤ卵の活性化に、細胞内カルシウム濃度の上昇が必要であることを明らかにした。また、そのカルシウム動員はGTP結合蛋白質の活性化に伴うIP₃の生成に起因することを明らかにした。
- (4)ボツリヌスC3酵素および上記モノクローナル抗体を用いてマボヤ卵内への顕微注入実験を行い、C3酵素によりADP-リボシル化される低分子量GTP結合蛋白質がIP₃の生成を介するマボヤ卵の活性化機構に関与することを明らかにした。

以上の新知見およびそれを得るために用いた研究技法は、卵の活性化機構の解析にとどまらず、細胞の広範な生命現象の解析に広く利用し得るものであり、細胞の生存に基本的かつ重要な機能を果たしているGTP結合蛋白質の生理機能を解明する上で重要な寄与をなすものである。審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。