学 位 論 文 題 名

Molecular Biological Analyses of Protein Kinases
Activated during Oocyte Maturation
in Fish and Amphibians

(魚類・両生類卵成熟過程で活性化される
蛋白質リン酸化酵素の分子生物学的解析)

学位論文内容の要旨

卵は成熟することで、受精・発生可能となる。産卵期になると脳下垂体から生殖腺刺激ホルモン (GTH) が分泌される。GTHは卵母細胞を取り囲む濾胞細胞に働き、卵成熟誘起ホルモン (MIH) を合成、分泌させる。MIHは卵母細胞の細胞膜に作用し、最終的に細胞内で卵成熟促進因子 (MPF) が活性化することで卵は成熟し、受精可能となる。MPFは卵成熟の最終誘起因子のみならず、体細胞分裂のM期促進因子として全真核生物で普遍的に機能する。分子構造も種を越えて共通で、触媒サブユニットのCdc2と調節サブユニットのサイクリンBからなる蛋白質リン酸化酵素である。しかし、MPFの活性化機構は種により異なり、アフリカツメガエルタイプとキンギョ・ニホンアカガエルタイプの2つに大別できる。ツメガエルタイプでは未成熟卵中にCdc2とサイクリンBは既に存在し、複合体を形成している。しかし、抑制的なリン酸化修飾を受けているため、このMPFはリン酸化酵素活性を持たない (pre-MPF)。MIH刺激後、抑制的なリン酸化部位が脱リン酸化されることでMPFは活性化する。一方、キンギョ・アカガエルタイプでは未成熟卵中にサイクリンBは存在せず、Cdc2は単量体で存在する。MIH刺激後、サイクリンBが合成され、Cdc2と複合体を形成することでMPFは活性化する。両タイプの機構においても、MIHが細胞膜に作用すると、卵内で多くの蛋白質がリン酸化されることが知られており、MPF以外のリン酸化酵素も重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細は不明である。本研究では、この卵成熟過程で活性化されるリン酸化酵素に注目し、その作用機序を明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

【第1章】キンギョ・アフリカツメガエル卵成熟に関わる蛋白質リン酸化酵素の検索

キンギョとツメガエルの卵成熟誘起に関わる蛋白質リン酸化酵素を検索することを目的に、MIH刺激後経時的に得た卵抽出液に44種の外来基質を加え、リン酸化の程度を測定した。その結果、キンギョでは18種の蛋白質がリン酸化され、そのうち卵成熟過程でリン酸化の程度が変化したのは4種であった。ツメガエルでは18種の蛋白質がリン酸化され、変化が認められたのは6種であった。両種で共通なものはヒストンH1、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、ペプシンの3種であった。

ヒストンH1はMPFとCdk2で、MBPはmitogen-activated protein kinase (MAPキナーゼ) でリン酸化されることが知られている。酵母のG1/S期ではCdc2が機能するが、真核生物では機能しない。Cdk2は酵母のG1/S期でのCdc2の機能を相補しうるcDNAとしてクローニングされた。MAPキナーゼは哺乳類の培養細胞で細胞増殖因子の刺激により活性化されるリン酸化酵素として発見された。ペプシンをリン酸化する酵素はこれまで知られていなかったが、本研究によりMPFでリン酸化されることが明らかになった。

以上の実験結果から、卵成熟過程においてキンギョとツメガエルの両種で共通して働いているのはMPF、Cdk2、MAPキナーゼであり、ヒストンH1、MBP、ペプシン以外の基質がキンギョとツメガエルで異なることから、両種の卵成熟では異なるリン酸化酵素カスケードが作用していることが明らかになった。また、両種ではMPFの活性化機構が大きく異なり、本研究結果はこれを反映したものと推測される。

【第2章】キンギョ卵成熟過程におけるサイクリンE/Cdk2の役割

第1章の実験結果から、通常サイクリンEと複合体を形成してG1期やG1/S移行で機能するCdk2がM期の進行を含む卵成熟過程で活性化されることが明らかになった。卵成熟過程でのCdk2のパートナーや活性化の分子機構は不明である。これらを明らかにするため、Cdk2のサイクリンパートナーとしてサイクリンEに注目し、キンギョ卵成熟におけるサイクリンEの挙動を解析した。その結果、卵成熟過程でサイクリンEはCdk2と複合体を形成し、Cdk2を活性化することが明らかになった。さらに、卵成熟の開始、つまりMPFの活性化と卵核胞崩壊（GVBD）へのサイクリンE/Cdk2の関与を調べた結果、未成熟卵でサイクリンE/Cdk2を活性化しても、MPF活性化・GVBDは起こった。卵成熟過程でサイクリンE/Cdk2活性を阻害しても、MPF活性化・GVBDは起こる。これらの結果は、サイクリンE/Cdk2は卵成熟過程で活性化されるが、卵成熟の開始には直接関与しないことを示す。さらに、サイクリンE/Cdk2複合体はサイクリンEとともに胞胚期で消失することから、胚発生の初期段階で機能することが示唆された。

【第3章】ニホンアカガエル卵成熟過程におけるMos/MAPキナーゼの役割

第1章の実験結果から、どのタイプのMPF活性化機構であれ、MAPキナーゼは卵成熟過程で共通して活性化されることが明らかになった。一方、MAPキナーゼは間接的にMosによって活性化されることが知られている。Mosは癌遺伝子産物で、蛋白質リン酸化酵素である。ツメガエルでは、Mos/MAPキナーゼが卵成熟に必要な不可欠であると考えられている。実際、多くの脊椎動物の卵成熟過程においてMos/MAPキナーゼが活性化することが報告されている。しかし、その機能の詳細は未だ不明である。

アカガエルでは、①2細胞期胚の片方の割球でMos/MAPキナーゼを活性化させると、その割球は中期で停止した。②未成熟卵でMos/MAPキナーゼを活性化させても、MPF活性化・GVBDは誘起されなかった。逆に、卵成熟過程でのMosの合成またはMAPキナーゼの活性化を阻害しても、MPF活性化・GVBDは誘起された。①の結果はツメガエルやキンギョの結果と同様で、卵の第二減数分裂中期での停止に関与する細胞分裂抑制因子（CSF）の一つとしてMos/MAPキナーゼは種を越えて普遍的に機能することが示された。②の結果から、Mos/MAPキナーゼはツメガエルとは異なり、アカガエル卵成熟ではMPF活性化・GVBDに直接関与しないことが示された。このことから、Mos/MAPキナーゼがpre-MPFを活性化することで卵成熟を誘起するため、pre-MPFが存在しないアカガエルでは機能しないのではないかという仮説を導いた。

また、MAPキナーゼを予め活性化させた未成熟卵をMIH処理した場合、MPFの活性化が早まり、逆に、卵成熟過程でのMAPキナーゼ活性を阻害した場合、MPFの活性化が遅れた。MAPキナーゼが活性化しない状態でMosのみを活性化させると、少量のサイクリンB蛋白質が合成された。これらの結果は、アカガエル卵成熟において、Mos/MAPキナーゼはMPFの活性化に必要な十分ではないが、MosがMPFの構成成分であるサイクリンBの合成を補助的に促進し、MAPキナーゼがMPFの安定化に機能していることを示す。この事実はツメガエルタイプの卵成熟機構を持つ動物を用いた実験では発見不可能で、アカガエルを用いることで初めて明らかにできたものである。

以上、本研究はそれぞれの実験動物の特徴を生かした実験により、魚類・両生類卵成熟で活性化される蛋白質リン酸化酵素の機能を解析したもので、生殖生物学の発展に多大な貢献をなすものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 正 兼
副 査 教 授 鈴 木 範 男
副 査 教 授 高 橋 孝 行

学 位 論 文 題 名

Molecular Biological Analyses of Protein Kinases Activated during Oocyte Maturation in Fish and Amphibians

(魚類・両生類卵成熟過程で活性化される
蛋白質リン酸化酵素の分子生物学的解析)

近年、卵成熟誘起の分子機構の解析が盛んに行われている。濾胞細胞から分泌される卵成熟誘起ホルモン (MIH) の刺激下、卵細胞内で蛋白質リン酸化酵素である卵成熟促進因子 (MPF) が形成・活性化されることで卵成熟は最終的に誘起されるが、MPF 以外のリン酸化酵素も卵成熟の誘起やその正常な進行に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、その詳細は未だ不明である。本研究は、卵成熟過程で活性化されるリン酸化酵素の作用機序を明らかにすることを目的に行われた。

学位論文は3章から成る。第1章では、キンギョとアフリカツメガエルの卵成熟過程で活性化する蛋白質リン酸化酵素の検索を目的に、MIH 刺激後経時的に得た卵抽出液に44種の外来基質を加え、リン酸化の程度を測定した。その結果、両種で共通にリン酸化された基質はヒストン H1、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、ペプシンの3種であった。ヒストン H1 は MPF (Cdc2/サイクリン B) と Cdk2 で、MBP はマイトジェン活性化リン酸化酵素 (MAP キナーゼ) でリン酸化される。ペプシンをリン酸化する酵素はこれまで知られていなかったが、本研究により MPF でリン酸化されることが明らかになった。以上の実験結果から、キンギョとツメガエルの卵成熟過程で共通して働いているのは MPF、Cdk2、MAP キナーゼのみで、両種で異なるリン酸化酵素が作用していることが示唆された。両種の MPF 活性化機構は大きく異なり、本研究結果はこれを反映したものと推測された。

第1章の実験結果から、通常、サイクリン E と結合して G1 期や G1/S 移行で機能する Cdk2 が、M 期の進行を含む卵成熟過程でも活性化されることが明らかになった。

卵成熟過程での Cdk2 のサイクリンパートナーや活性化の分子機構は不明である。第 2 章では Cdk2 のパートナーとしてサイクリン E に注目し、キンギョ卵成熟におけるサイクリン E の挙動を解析した。その結果、卵成熟過程でサイクリン E は Cdk2 と複合体を形成し、Cdk2 を活性化することが明らかになった。さらに、未成熟卵でサイクリン E/Cdk2 を活性化しても、MPF の活性化と卵核胞崩壊 (GVBD) は起こらず、卵成熟過程でサイクリン E/Cdk2 活性を阻害しても、MPF の活性化と GVBD は起こることがわかった。これらの結果は、サイクリン E/Cdk2 は卵成熟過程で活性化するが、卵成熟の開始には直接関与しないことを示す。サイクリン E/Cdk2 複合体はサイクリン E とともに胞胚期で消失することから、胚発生の初期段階で機能することが示唆された。

第 1 章の実験結果から、キンギョとツメガエル卵成熟過程で MAP キナーゼが活性化することが明らかになった。脊椎動物に限らず、多くの動物種の卵成熟過程において MAP キナーゼが活性化することが報告されている。しかし、その機能の詳細は未だ不明である。脊椎動物においては、MAP キナーゼは癌遺伝子産物である Mos によって活性化される。第 3 章ではアカガエルを実験材料に、Mos/MAP キナーゼの卵成熟における機能を解析し、以下の結果を得た。①2 細胞期胚の片方の割球で Mos/MAP キナーゼを活性化させると、その割球は分裂中期で停止した。②未成熟卵で Mos/MAP キナーゼを活性化させても、MPF の活性化は早まるが GVBD は誘起されず、Mos/MAP キナーゼを阻害しても、MPF の活性化は遅れるが GVBD は誘起された。③MAP キナーゼの活性阻害下で Mos を活性化させると、サイクリン B 蛋白質が合成された。①の結果はツメガエルやキンギョの結果と同様で、卵の第 2 減数分裂中期での停止に関与する細胞分裂抑制因子 (CSF) として Mos/MAP キナーゼは種を越えて普遍的に機能することを示す。②、③の結果はツメガエルと異なり、アカガエル卵成熟では Mos/MAP キナーゼは MPF の活性化に必要十分ではないが、Mos が MPF の構成成分であるサイクリン B の合成を誘起し、MAP キナーゼが MPF を安定化することで卵成熟を促進することを示す。

以上をまとめると、著者は魚類・両生類卵成熟過程で活性化される蛋白質リン酸化酵素の機能を解析し、Cdk2/サイクリン E と Mos/MAPK の機能に関する新知見を得たもので、卵成熟誘起で機能するリン酸化酵素カスケードの理解、特に Mos/MAP キナーゼの一般的機能の理解に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。