

学 位 論 文 題 名

Studies on the Role of the Proteasomes
in Starfish Oocyte Maturation

(ヒトデ卵成熟におけるプロテアソームの役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

近年、細胞周期制御における、蛋白質分解の重要性についての認識が高まってきている。実際、ガン遺伝子産物やガン抑制遺伝子産物をはじめとする様々な細胞周期制御因子群は代謝的に不安定であり、これらの不安定性に細胞周期制御のひとつの本質があるようである。このような細胞内の短寿命蛋白質の分解を触媒するのは、高分子量多機能プロテアーゼ複合体、プロテアソームである。

イトマキヒトデ卵母細胞は、第一減数分裂前期で分裂を一時停止しており、卵成熟誘起ホルモンである1-メチルアデニンの刺激を受けて減数分裂を再開し、受精可能な成熟卵となる。卵成熟において中心的な役割を担うのは卵成熟促進因子であり、その分子の実体は、触媒サブユニットであるcdc2キナーゼタンパク質と、制御サブユニットであるサイクリンBの複合体である。卵成熟促進因子は、ヒトデ未成熟卵母細胞中では、cdc2の15位のチロシン残基がリン酸化された不活性な前駆体として存在し、1-メチルアデニンの刺激によってこのチロシンが脱リン酸化されることで活性化される。また、蛋白質分解による細胞周期調節機構の例として、分裂期の終了にプロテアソームによってサイクリンBが分解されることで卵成熟促進因子が不活性化されることが知られている。本研究は、これまで卵成熟促進因子の分解への関与が注目されていたプロテアソームが、卵成熟促進因子の活性化にも必須であることを明らかにし、さらに、卵成熟過程における蛋白質分解活性及びその分子型の変化について解析した。

トリプシン阻害剤でプロテアソームのトリプシン活性とキモトリプシン活性の両者を阻害するZ-Phe-Ser-argininalおよびプロテアソーム阻害剤であるMG115は、1-メチルアデニンによって引き起こされる卵核胞崩壊と、cdc2の脱リン酸化すなわち卵成熟促進因子の活性化を阻害した。さらに、卵核胞崩壊とcdc2の脱リン酸化は、抗20Sプロテアソーム抗体の卵母細胞への顕微注入によっても阻害された。これらの結果は、プロテアソームが卵成熟促進因子の活性化に深く関与していることを示す。

この結果を受け、プロテアソームの卵成熟への関与について更に検討した。卵母細胞抽出液中のプロテアーゼ活性を測定したところ、1,500 kDa及び700 kDa画分に、高いキモトリプシン様プロテアーゼ活性が検出された。26Sプロテアソームの制御サブユニット複合体および20Sプロテアソームに対する抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、1,500 kDa画分中のプロテアーゼ活性を持つ蛋白質は両方の抗体によって沈降し、700 kDa画分中のプロテアーゼ活性を持つ蛋白質は抗20Sプロテアソーム抗体でのみ沈降した。これにより、1,500 kDa及び700 kDaのプロテアーゼはそれぞれ26Sおよび20Sプロテアソームに相当することを明らかにした。

26Sプロテアソームの活性は1-メチルアデニン処理後経時的に変動し、同調的な卵成熟を引き起こすのに充分量の1-メチルアデニンを添加後まもなく、わずかに低下し、その後大きく上昇した。1-メチルアデニンの濃度を著しく増加させた場合、一時的な

低下は観察されず、活性は直ちに増加した。この変動について、26Sプロテアソームの制御サブユニット複合体及び20Sプロテアソームに対する抗体を用いてウエスタンブロットを行い、その挙動を調べた結果、活性の増加は各サブユニット群の会合に起因することが明らかになった。これらの結果より、1-メチルアデニンの刺激によって制御サブユニット複合体と20Sプロテアソームが会合し、新規に26Sプロテアソームを形成することによってその活性が増加すること、会合は高濃度の1-メチルアデニンによって、より促進されることが明らかになった。さらに、今回用いた制御サブユニット複合体に対する抗体によって、26Sプロテアソーム画分では活性と同調的な56 kDaのバンドが検出されたが、遊離型の制御サブユニット複合体を含む画分では56 kDaのバンドは検出されず、58 kDaにバンドが検出された。この結果は、遊離型の制御サブユニット複合体が26Sプロテアソームを形成する際、何らかの修飾を受けている可能性を示す。

プロテアソーム阻害剤による卵成熟阻害効果は個体差が大きく、同じ濃度でも、卵核胞崩壊が完全に阻害される個体と遅延を引き起こす程度の阻害しか受けない個体があった。この感受性の違いは、卵巣内ですでに1-メチルアデニン刺激を受けている度合により、卵成熟の起きやすさが異なる為であると考えられる。そこで、1-メチルアデニン濃度の違いが卵成熟に及ぼす影響を検討した。卵成熟促進因子の活性化の速さは1-メチルアデニンの濃度に依存的で、高濃度の時、より速やかに活性化された。プロテアソーム阻害剤の効果は、1-メチルアデニン濃度が低い時ほど顕著であり、高濃度では阻害効果は小さいことが明らかになった。また、26Sプロテアソームの新規会合は高濃度の1-メチルアデニンによって、より促進された。このことより高濃度の1-メチルアデニンは26Sプロテアソームの会合による活性の増加を促進し、その結果として卵成熟促進因子の活性化が早まるものと結論した。

卵成熟において、蛋白質分解と並ぶもう一つの重要な柱は、リン酸化によって制御される情報伝達カスケードである。そこで本研究では、主に2種類のキナーゼ阻害剤を用いてリン酸化酵素の役割について検討した。LY294002はホスファチジルイノシトール-3-キナーゼに特異的な阻害剤として知られている。この酵素はチロシンキナーゼ系情報伝達や3量体型GTP結合蛋白質による情報伝達と共役して活性化されると考えられており、近年注目を集めている。また、K252aは各種のセリン/スレオニンキナーゼを幅広く阻害し、細胞周期研究の有用な手段となり得ることが示唆されているが、ヒトデ卵成熟におけるその影響は、これまで調べられていなかった。本研究では、これらのキナーゼ阻害剤が卵成熟に及ぼす影響について解析し、両阻害剤とも1-メチルアデニンによって誘起される卵成熟促進因子の活性化と卵核胞崩壊を強く阻害することを示した。また、K252aにより阻害されるキナーゼはLY294002に阻害されるキナーゼ、すなわちホスファチジルイノシトール-3-キナーゼよりも上流で作用していることを示唆する結果を得た。さらに、1-メチルアデニン刺激により、卵成熟の早い段階でセリン残基がリン酸化されたタンパク質が高分子量の画分に取り込まれることを明らかにするとともに、取り込みはK252aによって阻害されることを見い出した。これらのことから、このリン酸化タンパク質が卵成熟促進因子の活性化に関与するものと結論した。

以上、本研究は1-メチルアデニン刺激による、リン酸化タンパク質の高分子画分への取り込み、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼによる情報伝達、26Sプロテアソームの新規会合による活性の増加とそれに続く卵成熟促進因子の活性化、という一連の流れを明らかにしたもので、本研究の成果は、卵成熟および細胞周期調節機構の解明に大きく貢献するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 教 授 横 沢 英 良 (大学院薬学研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies on the Role of the Proteasomes in Starfish Oocyte Maturation

(ヒトデ卵成熟におけるプロテアソームの役割に関する研究)

近年、細胞周期制御におけるタンパク質分解の重要性についての認識が高まってきている。ガン遺伝子産物やガン抑制遺伝子産物を含む各種の細胞周期制御因子タンパク質群は不安定でしかも分解されやすい。このような細胞内の短寿命タンパク質の分解を触媒するのはプロテアソームと呼ばれる高分子量多機能プロテアーゼ複合体である。本研究は、卵成熟機構の研究に頻用され、輝かしい成果を上げてきた海産無脊椎動物イトマキヒトデを用いて、これまで卵成熟促進因子の分解への関与が注目されていたプロテアソームが、卵成熟促進因子の活性化にも必須であることを明らかにし、さらに、卵成熟過程におけるタンパク質分解活性及びその分子型の変化について詳細に解析したものである。

研究に用いたイトマキヒトデ卵母細胞は、第一減数分裂前期で分裂を一時停止しており、卵成熟誘起ホルモンである 1-メチルアデニンの刺激を受けて減数分裂を再開し、受精可能な成熟卵となる。卵成熟は cdc2 キナーゼタンパク質とサイクリン B から構成される卵成熟促進因子によって引き起こされる。卵成熟促進因子の活性化は構成タンパク質である cdc2 の 15 位のリン酸化チロシン残基が脱リン酸化されることによって起こる。卵成熟促進因子はその構成タンパク質であるサイクリン B が分解されると不活性化されることが知られている。

本研究によって卵成熟には 26S (1,500 kDa) と 20S (700 kDa) の 2 種類のプロテアソームが関与しているが明らかになった。また、本研究は 26S プロテアソームは 1-メチルアデニンの刺激によって遊離状態の制御サブユニット複合体と 20S プロテアソームが会合することによって形成され、この形成速度は 1-メチルアデニン濃度に依存していることを示した。さらに、26S プロテアソームが形成される前に遊離状態の制御サブユニット複合体は何らかの修飾を受けることが必須であることを示唆する結果も得ている。

一方、本研究はホスファチジルイノシトール-3-キナーゼの特異的阻害剤 LY294002 及び各種のセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤である K252a とともに 1-メチルアデニンによって誘起される卵成熟促進因子の活性化と卵核胞崩壊を強く阻害することを明らかにするとともに、K252a により阻害されるキナーゼは LY294002 に阻害されるキナーゼ、すなわちホスファチジルイノシトール-3-キナーゼよりも上流で卵成熟に機構に作用していることを明らかにした。さらに、1-メチルアデニン刺激により、卵成熟の早い段階でセリン残基がリン酸化されるタンパク質が高分子量の画分に取り込まれることを明らかにし、この取り込みは K252a によって阻害されることを見出し、このリン酸化タンパク質が卵成熟促進因子の活性化に関与するものと結論した。

以上、本研究は1-メチルアデニン刺激による、リン酸化タンパク質の高分子画分への取り込み、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼによる情報伝達、26Sプロテアソームの新規会合による活性の増加とそれに続く卵成熟促進因子の活性化、という一連の流れを明らかにしたもので、本研究の成果は、卵成熟および細胞周期調節機構の解明に大きく貢献するものと考ええる。

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。