

学 位 論 文 題 名

Molecular Biological Analysis of the Translational Control of Cyclin B1 mRNA during Oocyte Maturation

(卵成熟におけるサイクリン B1 mRNA 翻訳調節機構の分子生物学的解析)

学位論文内容の要旨

多くの動物では、卵巣内に存在する卵母細胞は十分に成長したものでも減数第一分裂の前期で細胞周期を停止しており、受精能力のない未成熟卵である。多くの脊椎動物の未成熟卵は、減数分裂を再開して第二分裂中期に至り、受精可能な成熟卵となる。この過程は卵成熟と呼ばれ、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン、濾胞細胞から分泌される卵成熟誘起ホルモン (MIH)、卵母細胞内で形成される卵成熟促進因子 (MPF) が順次作用することで誘起される。MPF は Cdc2 とサイクリン B の複合体である。脊椎動物の卵成熟誘起には、MIH 刺激後、mRNA の翻訳により新たな蛋白質 (イニシエーター) が合成される必要がある。多くの脊椎動物の未成熟卵にはサイクリン B 蛋白質はなく、MIH の刺激で mRNA の翻訳が起こり、サイクリン B は合成される。合成されたサイクリン B は既存の Cdc2 と結合し、MPF ができる。アフリカツメガエルの未成熟卵内には Pre-MPF と呼ばれる Cdc2 とサイクリン B2 の複合体が存在するが MIH 刺激でサイクリン B1 mRNA の翻訳が開始されることが卵成熟に必須である。私は卵成熟におけるサイクリン B1 mRNA の翻訳制御機構を明らかにするため、その過程に関わると予想されるポリ A ポリメラーゼ (PAP)、ポリ A 結合蛋白質 (PABP)、細胞質ポリアデニル化エレメント (CPE) 結合蛋白質 (CPEB)、Pumilio に注目し、以下の解析を行った。

第 1 章

サイクリン B1 を含む多くの母性 mRNA はポリアデニル化が引き金になり翻訳される。この過程には 3' 非翻訳領域に存在する AAUAAA 配列と、その近辺の U に富む CPE 配列が必要である。CPE には CPEB が結合し、PAP や PABP と協同で mRNA のポリアデニル化を調節している。本章では、これら分子の cDNA の単離、単クローン抗体の作製、免疫学的同定を行った。抗キンギョ PAP 抗体を用いたウェスタンブロット解析により、数種の PAP がキンギョ卵、ツメガエル卵に存在することがわかった。その中には、これまでに報告のある高分子型 (約 100 kDa) PAP のほか、低分子型 (約 40 kDa) の PAP があることが初めてわかった。さらに、細胞質と核の両方に存在する高分子型 PAP に対し、低分子型 PAP は細胞質に特異的に存在した。以上のことは、この新しいタイプの PAP が卵細胞質でおこるポリアデニル化に関わる因子であることを示唆する。抗キンギョ PABP 抗体は、哺乳類で知られている PABP2 をツメガエル

卵で初めて検出し、これまで解析の進んでいる PABP1 には備わっていない新たな機能をこの蛋白質は持つ可能性を示した。卵成熟過程で CPEB はリン酸化され、62 kDa から 64 kDa へ変化することが知られているが、抗ツメガエル CPEB 抗体はいずれの CPEB も認識した。キンギョ CPEB に特異的な抗体はすでに作製済みであるが、今回作製した抗体はキンギョ CPEB を認めず、ツメガエルに特異的であった。以上、本研究により得られたこれら細胞質ポリアデニル化に関わる分子の cDNA、組換蛋白質、抗体は、今後、ポリアデニル化を介した翻訳調節機構を解析する上で、有力な分子プローブになる。

第2章

ショウジョウバエにおいて Pumilio は Nanos と協同して腹部形成過程に必須の hunchback mRNA 翻訳を抑制することが知られている。翻訳抑制は Pumilio が hunchback mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する nanos response element (NRE) に結合することによって生じる。ツメガエルサイクリン B1 mRNA には NRE に似た配列がある。本章ではサイクリン B1 mRNA の翻訳調節機構を解明するため、Pumilio に注目し、この蛋白質の生化学的性質を調べた。Pumilio ホモログであることを決定づける RNA 結合領域に対応する cDNA 断片を単離し、それに対する単クローン抗体を作製した。抗体を用いた解析から、ツメガエル卵に 137 kDa の Pumilio 蛋白質が存在することが脊椎動物で初めて明らかになった。RNA アフィニティークロマトグラフィー、UV クロスリンクなどの解析によりこの蛋白質はサイクリン B1 mRNA に特異的に結合することがわかった。またツメガエル Pumilio は NRE に相同な配列を認識した。この蛋白質は Nanos のツメガエルホモログである Xcat2 と物理的に結合することも明らかになり、ショウジョウバエ Pumilio と同様の性質がツメガエル Pumilio にも存在することが示された。さらにツメガエル Pumilio は、母性 mRNA の翻訳の主要調節因子として知られる CPEB と卵内で結合して存在していることが示され、サイクリン B1 mRNA 翻訳調節機構への関与が強く示唆された。

第3章

ツメガエル Pumilio がサイクリン B1 mRNA の翻訳調節に働くかを調べるため、卵母細胞への RNA 微小注射によるレポーター解析を行った。サイクリン B1 3' 非翻訳領域の Pumilio 認識配列に変異を持つレポーターは、野生型のそれより効率よく翻訳された。このことは、Pumilio 認識配列が翻訳抑制に関わることを示す。機能阻害を目的に、Pumilio 抗体を注射された卵母細胞では MIH 刺激後の卵成熟が加速された。一方、機能強化を目的に、Pumilio RNA 結合領域を過剰発現した卵母細胞では、MIH 刺激後のサイクリン B1 合成が阻害され、卵成熟が遅れた。さらに、このような卵内でのサイクリン B1 mRNA には、ポリアデニル化は認められず、ポリ A 鎖は MIH 刺激前と同じ短い状態にあった。これらの結果は、Pumilio はサイクリン B1 mRNA のポリアデニル化の阻害を介して翻訳を抑制する機能を持つことを示す。

以上、本研究は脊椎動物卵成熟におけるサイクリン B1 mRNA 翻訳制御機構の全貌解明の基盤となるものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山下	正兼
副査	教授	高橋	孝行
副査	助教授	若原	正己
副査	助教授	田中	実

学位論文題名

Molecular Biological Analysis of the Translational Control of Cyclin B1 mRNA during Oocyte Maturation

(卵成熟におけるサイクリン B1 mRNA 翻訳調節機構の分子生物学的解析)

卵成熟は正常な受精と発生を保証する過程で、卵母細胞内で生成される卵成熟促進因子 (MPF) により誘起される。MPF は触媒サブユニットに Cdc2、調節サブユニットにサイクリン B というすべての真核生物に共通の分子構造を取る。第一前期の卵母細胞 (未成熟卵) には Cdc2 は単量体として存在し、サイクリン B は翻訳が抑制された母性 mRNA の状態で存在する。従って、サイクリン B 翻訳開始は卵成熟の開始及び進行に必須の過程である。本研究はキンギョとアフリカツメガエルを実験材料に用いて、サイクリン B1 mRNA 翻訳制御機構の解明を目的に行われた。

学位論文は3章からなる。第1章では、母性 mRNA の翻訳調節に関わるポリ A ポリメラーゼ (PAP)、ポリ A 結合蛋白質 (PABP)、細胞質ポリアデニル化エレメント (CPE) 結合蛋白質 (CPEB) に注目し、これら分子の cDNA クローニングと単クローン抗体の作製を行い、細胞質特異的 PAP を含む数種の PAP がキンギョとツメガエル卵に存在することを明らかにした。また、新しいタイプの PABP (PABP2) がツメガエル卵に存在することを示し、リン酸化状態の異なる2種の CPEB を検出することが可能になった。以上の知見並びに分子プローブは、今後の翻訳制御機構解析の基礎になるものである。

第2章では、ショウジョウバエ形態形成で翻訳抑制蛋白質として機能する Pumilio が、ツメガエル卵成熟におけるサイクリン B1 mRNA の翻訳調節に関与するかを調べた。まず、ツメガエル卵に 137 kDa の Pumilio 蛋白質が存在することを示し、脊椎動物で初めてその存在を確認した。また、1) Pumilio がサイクリン B1 mRNA 結合蛋白質であること、2) CPEB と Pumilio は卵内で結合していること、3) 翻訳開始の引き金になる配列が Pumilio 認識配列の近くにあることを示し、Pumilio が CPEB と共にサイクリン B1 mRNA 翻訳を制御している可能性を示した。

第3章では、ツメガエル卵成熟過程でのサイクリン B1 mRNA 翻訳調節における Pumilio の役割を解析し、以下の証拠から、この蛋白質はサイクリン B1 mRNA の翻訳を配列特異的に抑制することを明らかにした。1) サイクリン B1 3'非翻訳領域の Pumilio 認識配列に変異を持つレポーターは、野生型のそれより効率よく翻訳された。2) Pumilio

抗体を注射された卵母細胞は MIH 刺激後の卵成熟が加速された。3) Pumilio RNA 結合領域を過剰発現された卵母細胞は卵成熟が遅延した。

以上をまとめると、著者は卵成熟におけるサイクリン B1 mRNA 翻訳制御機構の分子生物学的な解析を行い、Pumilio と CPEB によるサイクリン B1 mRNA 翻訳調節機構解析の基盤を作った。本研究で作製された分子プローブは更なる解析に必須の道具となる。また、本研究は Pumilio が翻訳制御に機能することを脊椎動物で初めて明らかにしたもので、mRNA 翻訳調節機構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。