

学 位 論 文 題 名

Molecular Biological Analysis of the Morphological Changes That Occur during Oocyte Maturation

(卵成熟過程における形態変化の分子生物学的解析)

学位論文内容の要旨

動物の卵母細胞は減数分裂を第一分裂前期で停止し、受精後の発生に必要な因子を蓄積する。この卵母細胞は十分に成長しても受精能を持たない。繁殖時期が訪れると、卵母細胞はホルモン刺激を受けて減数分裂を再開し、受精能を獲得する。この過程を卵成熟と呼ぶ。卵成熟が誘起されると卵母細胞は卵核胞の崩壊 (GVBD) を起こし、第一分裂の紡錘体を卵表層に形成することで極体を放出する。その後、DNA 合成を行わず第二分裂の紡錘体を形成し、中期で再び分裂を停止する。これらの形態変化は半数体の配偶子形成に必須であり、現在まで多くの生物で観察されてきた。しかし、その分子制御機構はほとんど不明のままである。申請者は、卵成熟における形態変化の分子制御機構を解明することを目的に以下の解析を行った。

第 1 章

卵成熟は卵成熟促進因子 (MPF) の活性化によって引き起こされる。しかし、卵成熟過程における MPF の具体的な役割はほとんど解明されていない。MPF は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 からなる複合体であり、サイクリン B が Cdc2 キナーゼの活性化時期、細胞内で機能する場所、基質選択を制御することで、分裂が正確に進行すると考えられている。多くの生物種でサイクリン B に B1 と B2 のサブタイプが存在し、発現パターンの違いなどから、それらが形成する MPF の機能差が示唆されてきたが、明確な証拠はなかった。ツメガエル、マウスの未成熟卵母細胞では分裂前にすでにサイクリン B1 と B2 両方の型の不活性型 MPF (Pre-MPF) が蓄積している。これらは卵成熟開始に伴って一斉に活性化するため、それぞれの機能を単独で解析することは不可能であった。一方、アカガエル未成熟卵は Pre-MPF を持たない。アカガエル卵母細胞では新たに合成されたサイクリン B が活性型 MPF を形成する。このため、アンチセンス RNA で B1 あるいは B2 の合成を特異的に阻害し、B2 あるいは B1 型 MPF のみを形成させることができる。すなわち、アカガエル未成熟卵母細胞を用いることで初めて B1、B2 型 MPF それぞれの機能を単独で解析することが可能となる。本章ではこのアカガエルの特性を利用し、B1 と B2 が形成する MPF に機能的な違いが存在すること、B1 型 MPF ではなく B2 型 MPF が減数分裂の紡錘体形成に必須であることを明らかにした。

第2章

脊椎動物、無脊椎動物に関係なく、すべての生物の卵成熟過程で MPF と MAPK (mitogen-activated protein kinase) が活性化する。これらは共に、無細胞系で間期様の安定な微小管配列を分裂期様の動的な状態に変化させる。この性質から、実際の卵成熟においても MPF あるいは MAPK が間期から分裂期への微小管の再編成に関与すると考えられてきた。しかし、その解析は以下の理由で困難だった。ヒトデ、ツメガエル、マウスの未成熟卵母細胞ではサイクリン B を発現させ MPF を活性化させた場合、活性化した MPF が Pre-MPF を活性化する。また、MPF は卵内の不活性型 MAPK を活性化し、さらに活性化した MAPK は Pre-MPF を活性化する。このため、MPF 活性を任意に調節すること、MPF 活性と MAPK 活性を分離して操作することは不可能であった。一方、Pre-MPF を持たないアカガエル未成熟卵母細胞では、サイクリン B の発現量のみで MPF 活性が決まる。MPF 活性は最小限の MAPK 活性のみを誘起する。Pre-MPF が存在しないため MAPK 活性は MPF 活性を増幅しない。すなわち、アカガエル未成熟卵母細胞を用いることで MPF 活性を任意に調節することと、MPF 活性と MAPK 活性を分離して操作することが可能である。本章ではこの特性を利用し、次のことを明らかにした。1) MPF は単独で卵核胞の崩壊、微小管配列の脱重合を起こすことができる。2) MPF は MAPK と協同で微小管形成中心を形成させ、染色体を完全に凝縮させる。また、極体を放出するため微小管と染色体の凝集体を卵表層に移動させる。3) 正常な紡錘体形成には MPF と MAPK に加えてその他のキナーゼが必要である。これらの結果は卵の減数分裂における MPF の機能を初めて明確にしたものであり、さらに MPF と MAPK が協同して減数分裂の形態変化を制御していることを初めて示したものである。

第3章

γ -Tubulin は構造蛋白質の一つでありすべての真核生物が形成する紡錘体の極に存在するが、紡錘体形成における役割は全く不明である。また、 γ -Tubulin 蛋白質は合成、精製の過程で不溶化しやすいため、その生化学的解析は非常に困難である。本章では両生類卵母細胞で発現させた蛋白質が不溶化しにくいことを利用し、紡錘体形成における γ -Tubulin の役割を解析した。その結果、1) γ -Tubulin は微小管モーター蛋白質の運動能に依存して紡錘体極に移動する、2) γ -Tubulin は紡錘体極に微小管を集積する役割を持つ、3) γ -Tubulin は紡錘体極に微小管を繋ぎとめる役割を持つことが示された。これらの結果は、全く新しい γ -Tubulin の機能を提示すると共に、紡錘体形成におけるその役割を初めて明らかにしたものである。

以上、本研究は卵成熟における形態変化の分子制御機構を、MPF、MAPK、 γ -Tubulin という普遍的な蛋白質を中心に詳細に解明したものであり、その成果は卵成熟のみならず全真核生物における細胞分裂の分子制御機構を解析する上でも礎となるものといえる。

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	清水	隆
副査	助教授	田中	実

学位論文題名

Molecular Biological Analysis of the Morphological Changes That Occur during Oocyte Maturation

(卵成熟過程における形態変化の分子生物学的解析)

卵母細胞は半数体の配偶子を形成するため、卵成熟過程で卵表層に正確に定位した紡錘体を形成し、極体を放出する。この一連の形態変化は、正常な受精と発生を保证するために必須の現象であるが、その分子制御機構はほとんど不明である。本研究はニホンアカガエル *Rana japonica* とアフリカツメガエル *Xenopus laevis* を実験材料に用いて、卵成熟過程における形態変化の分子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、卵成熟促進因子 (MPF) の調節サブユニットであるサイクリン B のサブタイプ、B1 と B2 の機能解析を行った。従来の主要な実験系であるツメガエル卵母細胞や哺乳類培養細胞では MPF が不活性型分子(pre-MPF)としてすでに存在するため、その機能を操作することが困難で、サイクリン B1 型と B2 型の MPF の機能分担を含め、MPF の作用機構の解析は進んでいなかった。本章では pre-MPF を持たないアカガエルを用い、1) サイクリン B1 と B2 に機能差が存在すること、2) B1 型ではなく B2 型 MPF が紡錘体形成に必須であることを明らかにした。

第2章では、すべての動物の卵成熟で活性化する MPF と MAPK (mitogen-activated protein kinase) の機能解析を行った。この解析にも、pre-MPF が無いために MPF と MAPK の機能を個別に解析することが可能なアカガエルを用いた。本章では次のことを明らかにした。1) MAPK は単独で微小管を再編成させる。2) MPF は単独で卵核胞の崩壊を誘起し、微小管を脱重合させる。3) MPF と MAPK は協同で微小管形成中心を形成させ、染色体を完全に凝縮させる。また、極体を放出するため微小管と染色体の凝集体を卵表層に移動させる。4) 正常な紡錘体形成には MPF と MAPK に加えて、その他のキナーゼが必要である。以上の結果は卵成熟における MPF と MAPK の機能を初めて明確にしたものである。また、MPF と MAPK が協同して卵成熟の形態変化を制御していることが本研究により初めて示された。

第3章では、種々の顕微操作が容易で、無細胞系における解析も可能なツメガエル卵母細胞を用い、紡錘体形成における γ -tubulin の機能を解析した。その結果、1) γ -tubulin は微小管モーター蛋白質の運動能に依存して紡錘体極に移動する、2) γ -tubulin は紡錘体

極に微小管を集積する役割を持つ、3) γ -tubulin は紡錘体極に微小管を繋ぎ止める役割を持つことが示された。これらの結果は、 γ -tubulin のこれまでに知られていない全く新しい機能を明らかにし、紡錘体形成におけるその役割を明確にしたものである。

以上をまとめると、著者は卵成熟における形態変化の分子生物学的な解析を行い、MPF、MAPK、 γ -tubulin による紡錘体形成の分子機構解析の基盤を作った。本研究は細胞分裂の制御に普遍的に関わるこれら蛋白質の機能を次々と明らかにしたもので、全真核生物に共通する細胞分裂の分子制御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。